

© Вознесенська Т. Ю., Ступчук М. С., Шепель О. А., Блашків Т. В.

УДК 576.8.097.5, 591.465.1, 615.27

Вознесенська Т. Ю., Ступчук М. С., Шепель О. А., Блашків Т. В.

ОВАРІАЛЬНА ФУНКЦІЯ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОІМУННОГО РОЗЛАДУ У МИШЕЙ

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України (м. Київ)

tblashkiv@gmail.com

Робота виконана в рамках наукової програми відділу імунофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Дослідження молекулярно-генетичних і імунопатологічних механізмів функціональних порушень жіночої репродуктивної системи і можливості їх корекції», державний реєстраційний номер теми 0112U008233 в рамках програми НАН України «Функціональна геноміка, протеоміка та метаболоміка в системній біології» за відомчою темою «Дослідження молекулярно-генетичних та епігенетичних механізмів функціонування жіночої репродуктивної системи при експериментальній аутоімунній патології».

Вступ. Відомо, що аутоімунні захворювання вражають 3-8% населення Землі і в жінок розвиваються в 3-10 разів частіше. Безпліддя є однією із складних проблем у жінок репродуктивного віку з аутоімунними розладами [3,4]. Цукровий діабет I типу (ЦД) відносять до аутоімунних захворювань. У світі є одним з найпоширеніших хронічних захворювань, розвиток якого зв'язують зі зниженням рецептор-опосередкованої чутливості клітин організму до ендogenous інсуліну. Причини безплідності при цукровому діабеті, як правило, є: аменорея, мимовільний викидень, внутрішньоутробна загибель плода, відсутність овуляції, гормональні порушення. При сучасних можливостях медицини й адекватному їхньому використанні у жінок з цукровим діабетом, як правило, вдається зберегти репродуктивну функцію, однак протікання вагітності й пологи в таких жінок ускладнені й вимагають особливої уваги. Нині актуальними є дослідження, спрямовані на з'ясування механізмів розвитку безплідності аутоімунного походження на експериментальних моделях з використанням тварин. Ця проблема є актуальною, останнім часом вона широко обговорюється і досліджується.

Мета роботи – дослідити оваріальну функцію за умов експериментального аутоімунного розладу, а саме оцінити мейотичне дозрівання ооцитів та життєздатність кумулюючих клітин, а також інтегральну цілісність генома та експресію генів в клітинах кумулюючого оточення ооцитів за умов експериментального аутоімунного діабету у мишей.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводилися на статевозрілих самках мишей лінії СВА віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. При роботі дотримувались принципів «Міжнародної Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з

експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986). Після завершення експериментів тварин піддавали ефірному наркозу і умертвляли методом дислокації шийних хребців та брали ооцити і кумулюючі клітини для подальших досліджень.

Експериментальний аутоімунний діабет у мишей викликали введенням стрептозотоцину трикратно внутрішньоочередово з інтервалом в 7 діб. При першому введенні кількість препарату, що вводять, визначають із розрахунку 25 мг/кг, при другому — 20 мг/кг, при третьому — 25 мг/кг маси експериментальної тварини. Причому за добу перед кожним введенням стрептозотоцину внутрішньоочередово вводять 1 мл неповного адьюванта Фрейнда. Введення стрептозотоцину проводилося за методикою А.Р. Закирьянова та інші. Спосіб забезпечує адекватне відтворення аутоімунної моделі цукрового діабету (ЦД). Рівень глюкози у тварин у групі з моделюванням ЦД I типу піднімався на 5 добу після останнього введення стрептозотоцину і до кінця 3-4 тижня досягав $9,7 \pm 2,4$ ммоль/л (норма $5,3 \pm 0,5$ ммоль/л), потім відзначалося подальше збільшення рівня глюкози, що вірогідно зберігається протягом 3 місяців, тоді як у контрольній групі рівень глюкози не підвищувався й зберігався в межах норми. Для доказу аутоімунної природи ЦД при моделюванні за допомогою введення стрептозотоцину, у експериментальних тварин на 40-й добі експерименту був виконаний адаптивний перенос захворювання шляхом введення інтактним тваринам спленоцитів (лімфоцитів селезінки), отриманих від тварин з аутоімунною моделлю ЦД I типу. У результаті у тварин, яким був виконаний адаптивний перенос спленоцитів, через 2-3 тижні було відзначено зростання рівня глюкози в крові. Здійснення адаптивного переносу за допомогою лімфоцитів свідчить про специфічний аутоімунний характер захворювання. Контрольними були миші, яким вводили фізіологічний розчин за цією самою схемою.

З яєчників мишей неферментативно (механічно) виділяли ооцити, збирали та розподіляли в окремі камери, по 10-20 ооцитів у кожній. Усі контрольні та експериментальні ооцити культивували в однакових умовах (стерильний бокс, камери по 0,4 мл культурального середовища DME з 15 мМ NEPES, концентрація Ca^{2+} 1,71 мМ, температура 37°C, тривалість 20 год). Морфологічні дослідження ооцитів проводили під мікроскопом. Визначали стан зародкового пухирця, перивітелінового простору та цитоплазми, а саме щільність, ступінь

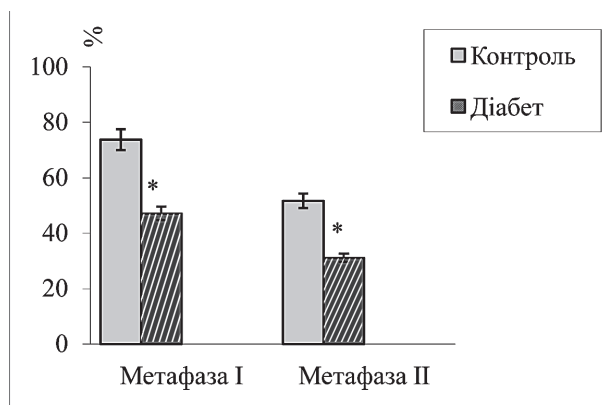


Рис. 1. Мейотичне дозрівання ооцитів в умовах експериментального аутоімунного діабету.

Примітка: * — $P < 0,01$ — відносно контролю.

гранульованості, ознаки фрагментації і дегенерації. Після 2 год культивування підраховували ооцити (% до загальної кількості), що перебували на стадії метафази I (розчинення зародкового пухирця), а після 20 год – на стадії метафази II (формування першого полярного тільця), а також ооцити з атиповою морфологією (нерівномірно гранульованою цитоплазмою та ознаками фрагментації останньої).

Шляхи клітинної загибелі кумулюсних клітин вивчали методом прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот (Хехст 33342 та йодидом пропідіуму) [7,10]. Клітини (не менш як 400 на одному препараті) досліджували за допомогою люмінесцентного мікроскопа Люмам И-1 з водно-імерсійним об'єктивом х85.

Ступінь ушкодження ДНК визначали в кумулюсних клітинах мишей методом лужного гелелектрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет – «DNA-comet assay») за Afanasieva та співавт. [1] з деякими модифікаціями. Суть методу полягає в тому, що при електрофорезі клітин в агарозному гелі петлі і фрагменти ушкодженої ДНК в електричному полі витягуються в напрямку до анода, що надає їм вигляд комет [2,9]. Розміри хвоста ДНК-комети позитивно корелюють зі ступенем ушкодження ДНК [13]. Аналіз ДНК-комет на електрофореграмах, забарвлених Хехст 33342 (700 мкмоль/л) протягом 15 хв, здійснювали візуально, використовуючи люмінесцентний мікроскоп ЛЮМАМ И-1, Росія) та відеосистему передачі зображення на комп'ютер при застосуванні водно-імерсійного об'єктива (Ч30). Застосовували напівкількісний метод оцінки інтенсивності забарвлення та довжини хвостів комет, на кожному мікропрепараті аналізували не менше ніж 500 окремо розташованих ДНК-комет. Їх поділяли за загальновизнаною класифікацією на 5 класів з відповідним числовим значенням від 0 до 4, залежно від співвідношення ДНК у «голові» та «хвості» комети [5].

Експресію мРНК генів HAS2, COX2 і Grem1 оцінювали методом полімеразної ланцюгової

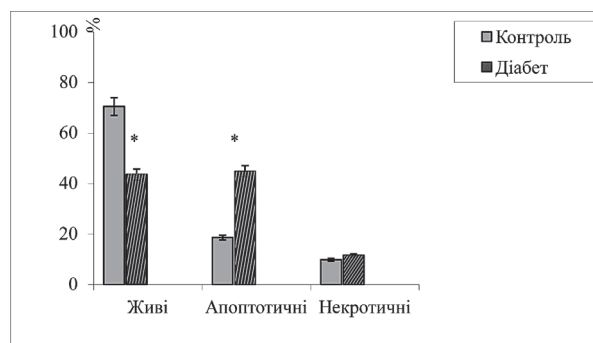


Рис. 2. Життєздатність та загибель кумулюсних клітин в умовах експериментального аутоімунного діабету.

Примітка: * — $P < 0,01$ — відносно контролю.

реакції в кумулюсних клітинах. Для кількісної оцінки експресії генів використовували по парі специфічних праймерів («Fermentas», Litva) для генів HAS2, COX2 і Grem1 та гену GAPDH (внутрішній контроль). Отримані ампліфікати розділяли горизонтальним електрофорезом в 1,5%-му агарозному гелі у трис-боратному буфері (TBE буфер). Візуалізацію та оцінку яскравості ампліфікатів після електрофорезу при 160В протягом 25 хв проводили за допомогою транслюмінатора та програмного забезпечення Vitran («Біоком», Росія).

Для статистичної обробки результатів використовували пакет програм Origin 8Pro (OriginLab Corp., North., MA, USA) та електронні таблиці «Microsoft®Excel2003». Достовірність різниці середніх значень визначали за t критерієм Стьюдента, достовірними вважали значення $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Мейотичне дозрівання ооцита є абсолютно необхідним для нормального запліднення і подальшого розвитку плода. Здатність яєчника надсилати ооцит із гаплоїдним набором хромосом у маточну трубу для запліднення є однією з необхідних умов фертильності самки ссавців. Для здійснення цього процесу ооцит, фолікулярні (кумулюсні, гранулярні) і текальні клітини повинні реалізувати певну програму розвитку, згідно з якою відбирається домінуючий фолікул.

Проведеними дослідженнями встановлено суттєве ушкодження яєчників мишей, у яких відтворювалася модель експериментального аутоімунного діабету. У тварин виявлено вірогідне зменшення кількості зрілих фолікулів, що були виділені з яєчника (великих фолікулів з яйцеклітиною з вираженою прозорою оболонкою та оточеною багатьма шарами фолікулярних клітин). Відмічено збільшення (у порівнянні з контролем) кількості ооцитів з атиповою морфологією (нерівномірно гранульованою цитоплазмою, ознаками фрагментації цитоплазми). У тварин виявлено вірогідне ($P < 0,01$) зменшення кількості ооцитів, що були виділені з яєчника ($10,1 \pm 0,4$ у порівнянні з $16,1 \pm 0,4$ у контролі). Показано що, за експериментальних умов при культивуванні суттєво зменшувався відсоток клітин, що розчиняли зародковий пухирець (метафаза I) та здатних до

формування першого полярного тільця (метафаза II) (рис. 1). А саме, на стадії метафази I до 47,2±1,7% (у контролі 73,8±1,2%; P<0,01) та до 31,2±1,2% (у контролі 51,7±0,8%; P<0,01) на стадії метафази II.

Таким чином, встановлене значне ушкодження яєчників у тварин — порушення мейотичного дозрівання ооцитів, у яких відтворювали модель аутоімунного цукрового діабету.

Життєво необхідна роль кумулюсних клітин під час *in vivo* і *in vitro* мейотичного дозрівання ооцитів змусило зосередитися на їх дослідженні. Очікування є такими, що кумулюсні клітини можуть стати надійною моделлю для розуміння складових якості ооцитів та ефективності протоколу гіперстимуляції яєчників, а також передбачити анеуплоїдію ооцитів, оцінювати розвиток ембріона і сам результат вагітності [7].

Нами показано, що пригнічення функції яєчників супроводжувалося суттєвими змінами життєздатності та загибеллю кумулюсних клітин. Встановлено, що за умов експериментального аутоімунного цукрового діабету відбуваються зменшення (P<0,01) кількості живих кумулюсних клітин та збільшується (P<0,01) кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу (рис. 2).

А саме, в експериментальних умовах кількість живих клітин знижувалась до 43,6±0,4%, а число апоптотичних і некротичних зростало (відповідно 44,8±1,2% та 11,6±0,14%) порівняно з контролем (відповідно 70,5±1,4%, 18,6±1,1% та 9,8±0,5%).

Геном живих організмів піддається постійній атаці різних фізичних і хімічних факторів як навколишнього середовища, так і продуктів власного метаболізму, які можуть ушкоджувати ДНК клітин. Не будучи репарованими, пошкодження ДНК можуть ініціювати каскад біологічних реакцій на клітинному, органному, організменному і популяційному рівні. Виявлення пошкоджень ДНК на клітинному рівні полягає в мікроелектрофорезі лізованих клітин, за яким фрагментоване ядро утворює на електрофореграмі своєрідний ореол, що схожий на хвіст комети. Нами вперше встановлено, що в умовах експериментального аутоімунного діабету відбувається пошкодження ДНК клітин кумулюсного оточення ооцитів. Проведена нами оцінка інтегральної цілісності геному клітин кумулюсного оточення ооцитів, дає підстави стверджувати, що експериментальний аутоімунний діабет у мишей може змінювати процеси пошкодження і репарації, що відображається як однострочковий розрив ДНК. При ушкодженні ДНК може відбутися або її репарація, або клітинна загибель. Реалізація програми апоптотичної загибелі — найважливіший механізм захисту від трансформації клітин. Однак за сильних ушкоджувальних впливів або за недостатніми енергетичними ресурсами клітини може розвинути некроз, який є прозапальним і імуногенним шляхом клітинної загибелі. Дані про вплив експериментального аутоімунного діабету на цілісність ДНК клітин кумулюсного

Таблиця 1.

Кількісна оцінка впливу експериментального аутоімунного діабету на цілісність ДНК клітин кумулюсного оточення ооцитів

	Розподіл комет за класами, %			
	0/1	2	3	4
Контроль	92,63	2,53	4,32	0,52
Діабет	19,25	18,13	50,33	12,29

оточення ооцитів у мишей представлено в таблиці 1.

Таким чином, встановлено, що в умовах експериментального аутоімунного діабету кількість кумулюсних клітин із пошкодженою ДНК становить 62,6%, більшість комет клітин із однострочковими розривами ДНК віднесено до 3 класу.

Відомо, що взаємодія між ооцитом і кумулюсом у значній опосередована експресією генів які беруть участь у кумулюсному розширенні, у тому числі HAS2, COX2 і GREM1. Відомо, що взаємодія між ооцитом і кумулюсом в значній мірі опосередковано експресією GDF9 (фактор диференціації 9) і BMP15 (фактор кісткових морфогенетичних протеїнів 15), що входять до складу β суперродини трансформуючих факторів росту, яка є однією з найбільших родин ростових факторів у ссавців і які функціонують у численних фізіологічних процесах і процесах розвитку. Їх ключову роль в регуляції овуляції встановлено спочатку у мишей, підтверджено у овець і людини [9].

GDF9 регулює експресію декількох генів кумулюсних клітин, що беруть участь в кумулюсному розширенні, в тому числі HAS2, PTGS2 і GREM1 [11]. Gremlin, як вважають, здійснює регуляцію функції кумулюсних клітин через ооцит-продуктовані GDF9 і BMPs. HAS2 має важливе значення для кумулюсного розширення, гіалуронова кислота, є основним компонентом матриці, яка утворюється при розширенні кумулюсу у відповідь на овуляторний викид ЛГ [8]. PTGS2 має важливе значення для овуляції, але також необхідний для запліднення і діє як селективний інгібітор BMP15, що запобігає передчасній лютеїнізації кумулюсу [12].

В наших досліджах вперше встановлено, що за умов експериментального аутоімунного діабету у мишей відбувається зниження експресії ключових генів Grem1, HAS2 та COX2 в кумулюсних клітинах.

Таблиця 2.

Зміни в експресії генів HAS2, COX2 та Grem1 на рівні мРНК в кумулюсних клітинах за умов експериментального аутоімунного діабету

	Grem1	HAS2	COX2
Контроль	1,3442±0,2119	0,08043±0,0342	0,4367±0,0098
Діабет	0,9533±0,0391 *	0,0508±0,0355 *	0,3465±0,0122 *

Примітка: * — P< 0,01 — відносно контролю.

Дані про зміни в експресії генів на рівні представлено в таблиці 2.

Показано, що за умов експериментального аутоімунного цукрового діабету відбувається зниження експресії *Grem1* в 1,41 разів, а експресія *HAS2* та *COX2* в 1,58 та 1,26 разів, відповідно.

Такими чином, встановлено, що в умовах експериментального аутоімунного діабету відбувається зниження експресії досліджуваних генів, що може бути однією з важливих причин порушення оваріальної функції в даних експериментальних умовах.

Отже отримані дані дають можливість стверджувати, що в умовах експериментального аутоімунного діабету порушується розвиток ооцитів, а це є важливим фактором у випадках безпліддя, зумовлених аутоімунними розладами, що пов'язані із не результативними екстрокорпоральними заплідненнями. Одержані дані можуть скласти експериментальне обґрунтування для створення нових тест-систем для передбачення якості ембріона і результату вагітності у жінок, зокрема, з аутоімунним діабетом й запровадження новітніх технік в допоміжних репродуктивних технологіях. Подальші дослідження повинні бути спрямовані на дослідження оцінки якості ооцитів за станом геному клітин їх кумулюсного оточення в окремих кумулюсно-ооцитарних клітинних комплексах.

Висновки. Встановлено, що за умов експериментального аутоімунного діабету відбувається:

1. Зменшення кількості ооцитів, що виділялися з одного яєчника, відсотка ооцитів, що розчиняли зародковий пухирець (метафаза I), а також таких, що формували перше полярне тільце (метафаза II) *in vitro*.

2. Зменшення кількості живих кумулюсних клітин та збільшення клітин з морфологічними ознаками апоптозу.

3. Зниження експресії оваріальних генів — *Grem1* в 1,41 разів, *HAS2* та *COX2* в 1,58 та 1,26 разів, відповідно.

4. Пошкодження ДНК клітин кумулюсного оточення ооцитів, більшість комет із однострочковими розривами ДНК віднесено до третього класу.

Перспективи подальших досліджень.

Подальші дослідження повинні бути спрямовані на дослідження оцінки якості ооцитів за станом геному клітин їх кумулюсного оточення в окремих кумулюсно-ооцитарних клітинних комплексах. Одержані дані можуть скласти експериментальне обґрунтування для створення нових тест-систем для передбачення якості ембріона і результату вагітності у жінок, зокрема, з цукровим діабетом I типу й запровадження новітніх технік в допоміжних репродуктивних технологіях.

Література

1. Afanasieva K. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments / K. Afanasieva, M. Zazhytska, A. Sivolob // *Electrophoresis*. – 2010. – Vol. 31. – P. 512-519.
2. Application of single-cell gel electrophoresis (comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes / P. Heaton, R. Ransley, C. Charlton [et al.] // *J. Nutr.* – 2002. – Vol. 132, № 6. – P. 1598-1603.
3. Carp H. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss / H. Carp, C. Selmi, Y. Shoenfeld // *J. Autoimmun.* – 2012. – Vol. 38, № 2-3. – P. 266-274.
4. Cervera R. Autoimmunity and recurrent pregnancy losses / R. Cervera, J. Balasch // *Clin. Rev. AllergyImmunol.* — 2010. – Vol. 39, № 3. – P. 148-152.
5. Collins A. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations / A. Collins // *Mol. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 26, № 3. – P. 249-261.
6. Comet assay of dna fragmentation: modification of silver staining for obtaining permanent preparations / V. Kaminsky, M. Lutsik, R. Stoika // *Ukrainian Biochemical Journal*. – 2005. – Vol. 77, № 6. – P. 105-107.
7. Differential gene expression in cumulus cells as a prognostic indicator of embryo viability: a microarray analysis / A. van Montfoort, J. Geraedts, J. Dumoulin [et al.] // *Mol Hum Reprod.* – 2008. – Vol. 14, № 3. – P. 157-168.
8. Effect of gonadotropins on brain-derived neurotrophic factor secretion by human follicular cumulus cells / B. Feng, S. Chen, R. Shelden, D. Seifer // *Fertility and Sterility*. – 2003. – Vol. 80, № 1. – P. 658-659.
9. Growth differentiation factor 9: bone morphogenetic protein 15 heterodimers are potent regulators of ovarian function / J. Peng, Q. Li, K. Wigglesworth [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2013. – Vol. 19, № 8. – P. 776-785.
10. Involvement of ICE family proteases in apoptosis induced by reoxygenation of hypoxic hepatocytes / S. Shimizu, Y. Eguchi, W. Kamiike [et al.] // *Am. J. Physiol.* – 1996. – Vol. 271, № 6. – P. 949-958.
11. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins / T. Hussein, D. Froiland, F. Amato [et al.] // *Journal of Cell Science*. – 2005. – Vol. 118, № 3. – P. 5257-5268.
12. Pangas S. Growth differentiation factor 9 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin / S. Pangas, C. Jorgez, M. Matzuk // *J Biol Chem*. – 2004. – Vol. 279, № 2. – P. 32281-32286.
13. Soroehinska J. Application of the comet assay for the DNA damage assessment caused by different environmental agents / J. Soroehinska, V. Mikhaïlenko // *Oncology*. – 2008. – Vol. 10, № 3. – P. 303-308.
14. The pathways and mechanisms of immune cell death in the time course of experimental immune-mediated liver injury / T. Bryzgina, N. Makogon, L. Alexyuk [et al.] // *Pathologia*. – 2011. – Vol. 8, № 2. – P. 108-110.

УДК 576.8.097.5, 591.465.1, 615.27

ОВАРІАЛЬНА ФУНКЦІЯ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОІМУННОГО РОЗЛАДУ У МИШЕЙ

Вознесенська Т. Ю., Ступчук М. С., Шепель О. А., Блашків Т. В.

Резюме. Вивчали мейотичне дозрівання ооцитів, шляхи загибелі кумулюсних клітин (апоптоз і некроз), інтегральну цілісність геному та експресію оваріальних генів в клітинах кумулюсного оточення ооцитів при

моделюванні експериментального аутоімунного діабету у мишей. Встановлено, що мейотичне дозрівання ооцитів пригнічується (зменшується відсоток ооцитів, що розчиняли зародковий пухирець (метафаза I) та формували перше полярне тільце (метафаза II) *in vitro*). Знижувалася кількість живих кумулюсних клітин ($p < 0,001$) і збільшувалася їх загибель ($p < 0,001$). Спостерігалось підвищення кількості клітин кумулюсного оточення ооцитів з максимальним пошкодженням ДНК, більшість клітин із одностривковими розривами ДНК віднесено до 3 класу. Показано, що за умов експериментального аутоімунного діабету відбувається зниження експресії генів (*Grem1* в 1,41 разів, а *HAS2* та *COX2* в 1,58 та 1,26 разів, відповідно). Такими чином отримані дані дають можливість стверджувати, що в умовах експериментального аутоімунного цукрового діабету порушується розвиток ооцитів, а це є важливим фактором у випадках безпліддя, зумовлених аутоімунними розладами, що пов'язані із не результативними екстрокорпоральними заплідненнями. Одержані дані можуть скласти експериментальне обґрунтування для створення нових тест-систем для передбачення якості ембріона і результату вагітності у жінок, зокрема, з аутоімунним діабетом в допоміжних репродуктивних технологіях.

Ключові слова: експериментальний аутоімунний діабет, мейотичне дозрівання ооцитів, пошкодження ДНК кумулюсних клітин, апоптоз, експресія генів *HAS2*, *COX2*, *GREM1*.

УДК 576.8.097.5, 591.465.1, 615.27

ОВАРИАЛЬНА ФУНКЦІЯ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОІММУННОГО ПОВРЕЖДЕННЯ У МЫШЕЙ

Вознесенская Т. Ю., Ступчук М. С., Шепель О. А., Блашків Т. В.

Резюме. Изучали мейотическое созревание ооцитов, гибель кумулюсных клеток (апоптоз и некроз), интегральную целостность генома и экспрессию овариальных генов в клетках кумулюсного окружения ооцитов при моделировании экспериментального аутоиммунного диабета у мышей. Показано, что в данных экспериментальных условиях нарушается мейотическое созревание ооцитов (уменьшается процент ооцитов, что растворяли зародышевый пузырек (метафаза I) и формировали первое полярное тельце (метафаза II) *in vitro*). Снижается количество живых кумулюсных клеток ($p < 0,001$) и увеличивается их гибель ($p < 0,001$). Наблюдается повышение количества клеток кумулюсного окружения ооцитов с максимальным повреждением ДНК, большинство клеток с разрывами ДНК отнесено до 3 класса. Показано, что в условиях экспериментального аутоиммунного диабета происходит снижение экспрессии овариальных генов (*Grem1* в 1,41 раз, а *HAS2* и *COX2* в 1,58 и 1,26 раз, соответственно). Полученные данные могут быть перспективной тест-системой для оценки качества эмбриона и результата беременности у женщин с аутоиммунными заболеваниями при использовании вспомогательных репродуктивных технологий.

Ключевые слова: экспериментальный аутоиммунный диабет, мейотическое созревание ооцитов, повреждение ДНК кумулюсных клеток, апоптоз, экспрессия генов *HAS2*, *COX2*, *GREM1*.

UDC 576.8.097.5, 591.465.1, 615.27

OVARIAN FUNCTION IN MODELING OF EXPERIMENTAL AUTOIMMUNE DISEASES IN MICE

Voznesenska T., Stupchuk M., Shepel O., Blashkiv T.

Abstract. Type I diabetes attributed to autoimmune diseases. The causes of infertility in diabetes usually include: amenorrhea, spontaneous abortion, fetal death, lack of ovulation, hormonal disorders. With modern medicine and adequate opportunities to their use in women with diabetes tend not save reproductive function, but pregnancy and childbirth in women such complicated and require special attention.

Meiotic maturation of oocytes, ways of death cumulus cells (apoptosis and necrosis), integrated genome integrity and expression of genes by cumulus cells surrounding oocytes have been studied in modeling of experimental autoimmune diabetes in mice.

Experimental autoimmune diabetes in mice caused by three times introduction of streptozotocin at intervals of 7 days. The first administration of the drug, which is injected, determine 25 mg/kg, the second — 20 mg/kg, in the third — 25 mg/kg. Before each administration of streptozotocin injected 1 ml of incomplete Freund's adjuvant.

Isolated oocytes were collected and distributed in separate camera 10-20 oocytes each. All control and experimental oocytes cultured in identical conditions (sterile box, camera, 0.4 ml culture medium DME with 15 mM HEPES, Ca²⁺ + concentration of 1.71 mM, 37 ° C, 20 hours).

Cell death ways were studied in by dual-color fluorescent nucleic acid dyes (Hoechst 33342 and iodide propidiumu). Cells (at least 400) was studied using a fluorescent microscope Lyumam s-1 water-immersion lens x85.

The degree of DNA damage was determined in cumulus cells of mice by alkaline gel electrophoresis of isolated cells (Comet assay method — «DNA-comet assay»). In all specimens analyzed not less than 500 detached DNA comets. They generally shared by classification into 5 classes with corresponding numerical value from 0 to 4, depending on the ratio of DNA in the «head» and «tail» comet.

Expression of mRNA gene *HAS2*, *COX2* and *Grem1* assessed by polymerase chain reaction in cumulus cells. To quantify gene expression using a pair of specific primers for gene *HAS2*, *COX2* and *Grem1* and gene *GAPDH* (internal control).

Percentage of oocytes that dissolved germinal vesicle (metaphase I) and formed the first polar body (metaphase II) were reduced *in vitro*. Number of live cumulus cells ($p < 0,001$) and increased their death ($p < 0,001$) were reduced

too. There was increasing the number of cumulus cells surrounding oocytes with maximum damage DNA, most cells with DNA single-strand breaks classified as third class. Gene expression (Grem1 in 1.41 times, and HAS2 and COX2 in 1.58 and 1.26 times, respectively, was decreases in modeling of experimental autoimmune diabetes.

Thus the data make it possible to assert that disrupted oocyte development is an important infertility factor caused by autoimmune disorders. The data could make a pilot study to create new test systems to predict embryo quality and pregnancy outcome in women, particularly with autoimmune diabetes in assisted reproductive technologies.

Keywords: experimental autoimmune diabetes, oocyte meiotic maturation, DNA damage, gene expression.

Рецензент – проф. Громова А. М.

Стаття надійшла 10.05.2016 року