

## РОСТОВІ ФАКТОРИ ТКАНИН РЕПРОДУКТИВНИХ ОРГАНІВ САМОК ПРИ СТАНОВЛЕННІ ВАГІТНОСТІ НА ДОІМПЛАНТАЦІЙНИХ СТАДІЯХ

С. В. Федорова<sup>1</sup>, А. В. Мадіч<sup>2</sup>, О. В. Штапенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Інститут біології тварин НААН, Україна

<sup>2</sup>Інститут Генома людини Кембріджського Університету, Великобританія

У статті описані дослідження білкового спектру тканин репродуктивних органів самок білих щурів лінії Wistar на ранніх стадіях вагітності (до стадії імплантації). За допомогою методу електрофоретичного розділення білків у поліакриламідному гелі було показано наявність декількох низькомолекулярних білків, які можна віднести до групи ростових факторів, що приймають участь у процесах регуляції утворення ембріонально-маткового сигналу на ранніх доімплантаційних стадіях, зокрема епідермальний фактор росту, інсуліноподібні фактори росту та інсулін. За допомогою імуно-блот аналізу досліджено рівень експресії трансформуючого фактору росту- $\beta$ , який був виявлений тільки на 6-й день після запліднення.

**Ключові слова:** ССАВЦІ, РАННІ СТАДІЇ ВАГІТНОСТІ, ІМПЛАНТАЦІЯ, РОСТОВІ ФАКТОРИ, БЛОК

Початкові етапи імплантації — процес первинної взаємодії ембріона з матковим епітелієм — критичний і складний процес, контролюється складними взаємодіями великої кількості сигнальних молекул і ефекторних сполук, які продукуються репродуктивними органами матері та ембріоном [7]. Саме його порушення найчастіше розглядають як основну причину порушення відтворення та досліджують умови для його подолання [9]. Клітини строми ендометрію піддаються децидуалізації безпосередньо перед імплантацією під впливом метаболічного сигналу зі сторони як бластоцисти, так і материнського ендометрію. Таким чином, регуляція є взаємна [10].

Відомо, що від секреторної активності ендометрію, зокрема, кількості та природи специфічних білків, які виділяються його клітинами, залежать інтенсивність ембріонально-маткового сигналу та імплантація ембріона [6]. Під час активної підготовки материнських репродуктивних органів до прийняття зиготи в дію вступають складні регуляторні системи, які пов'язані зі специфічними ростовими факторами, зокрема, інсуліноподібним (ІФР-1), епідермальним (ЕФР), трансформуючим факторами росту (ТФР- $\beta$ ), а також самим інсуліном [9]. Кожен з факторів росту синтезується на визначеній стадії та «відповідає» за

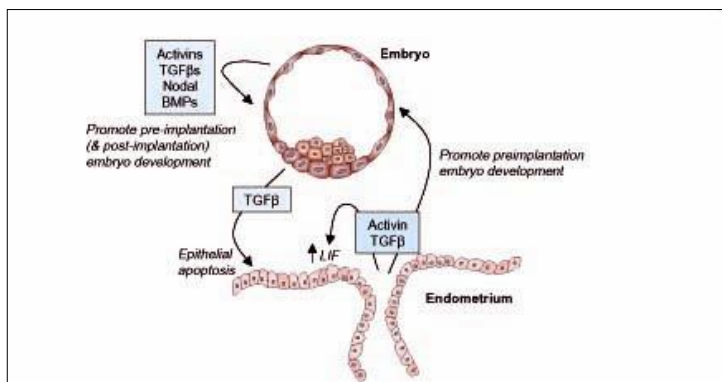


Рис. 1. Взаєморегуляція імплантації бластоцисти за допомогою ростового фактору ТФР- $\beta$  (Lee K. Y and F. J. De Mayo, 2004)

різні стадії пересування ембріона по репродуктивному тракту матері до матки і самої імплантації. Наприклад, ТФР- $\beta$  регулює пул інгібіторів колагеназ, які синтезуються клітинами ендометрію матки, чим викликає набряк слизової, таким чином полегшуючи інвазію ембріона [2, 3]. ЕФР навпаки, посилює синтез протеолітичних ферментів, чим

збільшує в'язкість колагенів різних типів [8]. Таким чином, комплексний вплив багатьох факторів росту забезпечує

перебіг всіх процесів ранніх стадій вагітності у ссавців [4]. Критичні періоди розвитку ембріонів співпадають у часі з перебудовою білкового складу різних органів репродуктивної системи самок. Перехід з однієї стадії розвитку в іншу пов'язують з регуляторним впливом специфічних білків, які діють на ембріональні клітини локально за аутокринним або паракринним механізмом [1]. У результаті специфічної взаємодії ростового фактора і рецептора виникає комплекс внутрішньоклітинних реакцій, які активують експресію певних генів, зокрема, тих, які забезпечують здійснення циклу клітинного поділу [5]. У зв'язку з цим, дослідження білкового спектру тканин репродуктивних органів самок щурів, а також рівня експресії ТФР- $\beta$  є актуальними і становлять мету наших експериментів.

## Матеріали і методи

Відповідно до мети підібрали шість груп самок білих щурів лінії Wistar 3-місячного віку — три дослідних по 5 голів та три контрольних по 3 голови в кожній групі. Тварини утримувались на стандартному раціоні при 12-годинному світловому періоді. Після проведення попереднього дводенного зближеного утримання самок і самців в окремих клітках проведено спонтанне їх спаровування без попередньої гормональної синхронізації охоти статевозрілих самиць та забій самиць на 1, 3 та 6-й день р. с. (post coitus) способом декапітації з попереднім введенням їх в наркотичний стан ефіром для наркозу (табл.).

Після морфометричної оцінки репродуктивних органів з них виготовлялись лізати для подальшого дослідження спектру білків методом електрофоретичного розділення в поліакриамідному гелі.

Таблиця

**Схема досліджень з вивчення формування ембріонально-маткового сигналу у щурів на ранніх стадіях вагітності**

Групи тварин n=5	Характеристика груп	Маніпуляції	Відбір матеріалу та дослідження
Контрольна	Не запліднені самки	Забій на 1, 3 і 6-й день після запліднення самок дослідних груп	Тканини яйцепроводів, тіла матки, рогів матки, яєчників
Дослідна 1	Запліднені	Забій на 1-й день після запліднення	Тканини яйцепроводів, тіла матки, рогів матки, яєчників
Дослідна 2	Запліднені	Забій на 3-й день після запліднення	Тканини яйцепроводів, тіла матки, рогів матки, яєчників
Дослідна 3	Запліднені	Забій на 6-й день після запліднення	Тканини яйцепроводів, тіла матки, рогів матки, яєчників

Органи попередньо відмивались у дистилаті для легшого відділення жиру, потім гомогенізувались у рідкому азоті у фарфоровій чашці фарфоровим пестиком. Лізис тканин проводили з використанням буфера Леммлі (1:1) із сумішшю інгібіторів протеаз (Sigma, Germany) на льодяній бані, потім проварювали і центрифугували 30 хв при 14000 об/хв. У готових лізатах визначали кількість білка методом Лоурі, після чого заморожували при  $-20^{\circ}\text{C}$  для подальшого використання.

Розділення білків у поліакриамідному гелі проводили згідно з загальноприйнятою методикою (Остерман О. О., 1981). Використовували реактиви фірм-виробників Acros Organics®, Merck®, «Макрохим». Для визначення молекулярної маси білків у лізатах використовували білкові стандарти з молекулярними масами від 6,5 до 66 кДа (Low Molecular Weight Range, Sigma®). Білки фарбували розчином 0,2 % Кумассі Блю (Merck®).

Імуноблот-аналіз проводили згідно з загальноприйнятою методикою (Walker J. M., 2002) з використанням PVDF-мембрани (Millipor, USA). Після електроблоттингу мембрану блокували інгібуванням у 5 % знежиреному молоці 60 хв. Інкубацію з моноклональними

анти-ТФР- $\beta$  антитілами (Sigma®, GB) у розведенні 1:2000 проводили 90 хв, поліклональними анти-мишачими антитілами, конюгованими з лужною фосфатазою (Sigma®, USA) — 1:5000 30 хв. Інкубацію проводили у забуференому фізрозчині. Детекцію імунних комплексів здійснювали з використанням субстрату для лужної фосфатази CDR-Star (Tropix, GB). Візуалізацію проводили за допомогою рентгенівської плівки ECL CDP-Star (Amersham, USA) та набору для проявки плівок (Kodak).

### Результати й обговорення

При аналізі електрофоретичного розділення білків репродуктивних органів самок щурів на ранніх стадіях вагітності встановлено, що на 1-й день після запліднення у тканинах матки, яйцепроводів і яєчників виявлені білки інсулінового ряду — інсулін (5,7 кДа) та інсуліноподібні фактори росту-1 (7,7 кДа) (рис. 2).

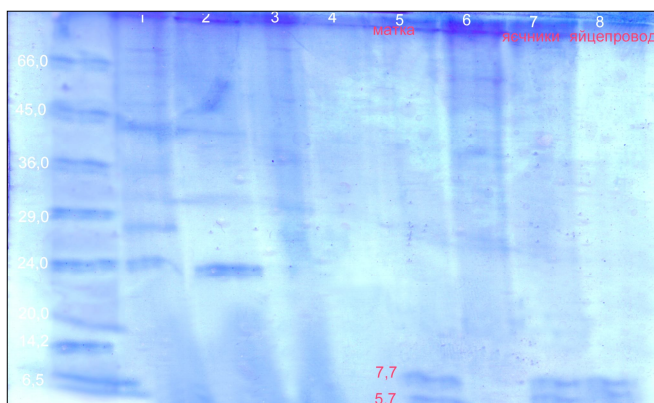


Рис. 2. Спектр білків репродуктивних органів самок щурів на 1-й день після запліднення

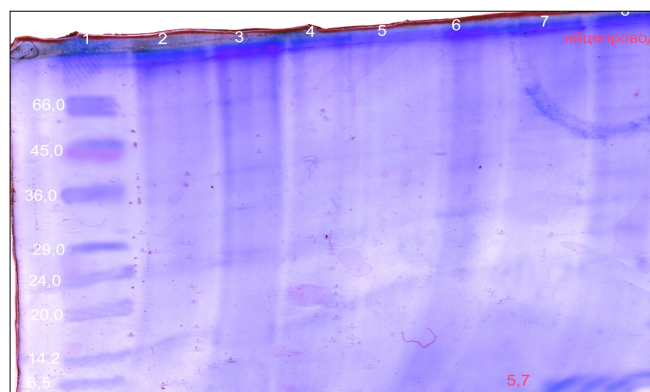


Рис. 3. Спектр білків репродуктивних органів самок щурів на 3-й день після запліднення

Відомо, що ІФР-1 та ІФР-2 стимулюють мітоз і диференціацію клітин ендометрію на перших днях вагітності, а інсулін стимулює диференціацію клітин ембріона на межі переходу зародка із стадії морули у бластоцисту.

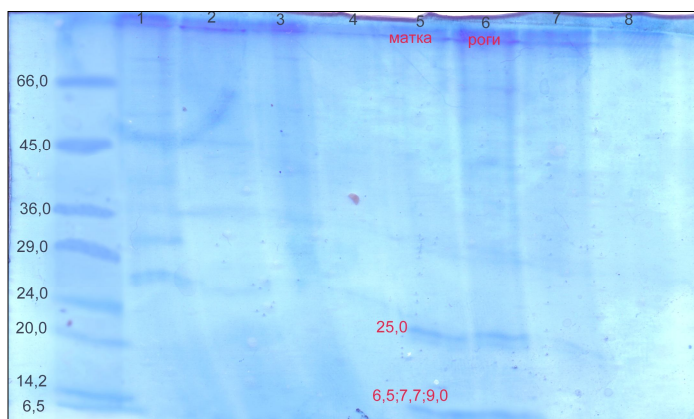


Рис. 4. Спектр білків репродуктивних органів самок щурів на 6-й день після запліднення

При аналізі електрофоретичного розділення білків репродуктивних органів самок щурів на 3-й день після запліднення у тканинах яйцепроводів нами виявлено білок Мм 5,7 кДа, який може відповідати саме інсуліну (рис. 3).

На 6-й день після запліднення у самок щурів в рогах матки і в самій матці виявлено білки з Мм 6–9 кДа (тканина, або зародкова форма ЕФР) та секреторний комплекс ЕФР з Мм 25 кДа, який складається з молекули ЕФР та білків-транспортів і є неактивною формою цього ростового фактора, але з'являються саме перед початком імплантації (рис. 4). Сам ЕФР знайдений в ендометрії матки саме в тому місці, де буде знаходитись «вікно імплантації» — місце прикріплення та подальшої інвазії бластоцисти.

Трансформуючий фактор росту- $\beta$  був виявлений у зразках тканин материнських репродуктивних органів виключно на 6-й день після запліднення, тобто перед самим початком процесів імплантації (рис. 5). Це повністю відповідає літературним даним щодо контролюючої дії ТФР- $\beta$  на пізніх передімплантаційних стадіях. У щурів імплантація відбувається на 7-й день після запліднення, отже на 6-й день експресія ТФР- $\beta$  значно зростає, особливо у матці (як у самому тілі, так і в рогах). Ембріональний ТФР- $\beta$  підвищує рецептивність ендометрію до бластоцисти, полегшує адгезію і інвазію останньої, ТФР- $\beta$  материнського походження, навпаки, пригнічує надлишкову інвазію трофобласта і в надлишку може взагалі інгібувати імплантацію (рис. 1).

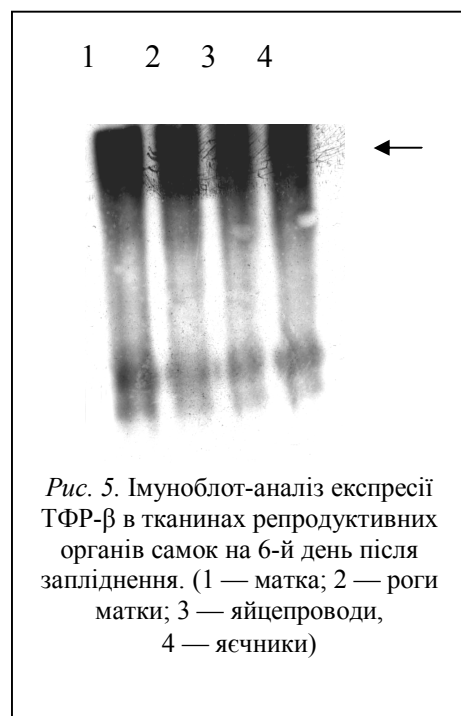


Рис. 5. Імуноблот-аналіз експресії ТФР- $\beta$  в тканинах репродуктивних органів самок на 6-й день після запліднення. (1 — матка; 2 — роги матки; 3 — яйцепроводи, 4 — яєчники)

## Висновки

Встановлено, що проведення попереднього дводенного зближеного утримання самок і самців щурів в окремих клітках та їх спаровування без попередньої гормональної стимуляції охоти у самок призводить до запліднення. Виявлені в лізатах яєчників яйцепроводів і матки низькомолекулярні білки на 1, 3 та 6-й дні після запліднення самиць є специфічними білками, які відповідають за формування ембріонально-маткового сигналу, що підтверджує наявність ТФР- $\beta$  виключно на 6-й день після запліднення — перед початком імплантації.

**Перспективи подальших досліджень.** У перспективі планується дослідити інші, глибші ланки ембріонально-маткового сигналу для його подальшої корекції при попередженні переривання вагітності на ранніх доімплантаційних стадіях.

*S. V. Fyodorova, A. V. Madich, O. V. Shtapenko*

## THE GROWTH FACTORS TISSUES OF FEMALES REPRODUCTIVE ORGANS ON PREIMPLANTATION STAGES OF PREGNANCY

### Summary

The paper deals with the proteins spectrum of white rats females reproductive organs tissues at early (preimplantation) stages of pregnancy. The purpose of researches was studying the maintenance of specific proteins which are responsible for formation embryo-uterine signal at early stages of becoming of pregnancy (up to a stage of implantation). By means of a method electrophoresis separates of proteins in polyacrylamide gel presence of several low weight proteins which can be carried to group growth factors which take part in processes of regulation of formation embryo-uterine signal on early preimplantation stages, in particular epidermal growth factor, insulin-like growth factors and insulin has been shown. By means of a method Western-blot analysis

was study a level of expression transforming growth factor- $\beta$ , which was presence on 6 day after fertilization only.

*С. В. Фёдорова, А. В. Мадич, О. В. Штапенко*

## **РОСТОВЫЕ ФАКТОРЫ ТКАНЕЙ РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ САМОК ПРИ СТАНОВЛЕНИИ БЕРЕМЕННОСТИ НА ДОИМПЛАНТАЦИОННЫХ СТАДИЯХ**

### **А н н о т а ц и я**

В статье описаны исследования белкового спектра тканей репродуктивных органов самок белых крыс линии Wistar на ранних стадиях беременности (до стадии имплантации). С помощью метода электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле было продемонстрировано наличие некоторых низкомолекулярных белков, которые можно отнести к группе ростовых факторов, которые принимают участие в процессах регуляции образования эмбрионально-маточного сигнала на ранних доимплантационных стадиях, в частности эпидермального фактора роста, инсулиноподобных факторов роста и инсулина. С помощью иммуно-блот анализа исследован уровень экспрессии трансформирующего фактора роста- $\beta$ , который был выявлен только на 6-й день после оплодотворения.

1. *Чернуха Г. Е.* Роль факторов роста в функции репродуктивной системы / Г. Е. Чернуха, В. П. Сметник // Проблемы эндокринологии. — 1996. — Т. 2. — С. 8–13.

2. *Godkin J. D.* Transforming growth factor  $\beta$  and the endometrium : reviews of reproduction/ J. D. Godkin, J. E. Dore // Journals of Reproduction and Fertility. — 1998. — V. 3. — P. 1–6.

3. *Jones R. L.* TGF- $\beta$  superfamily expression and actions in the endometrium and placenta : review / R. L. Jones, Ch. Stoikos, J. K. Findlay // Reproduction. — 2006 — Vol. 132. — P. 217–232

4. *Kaye P. L.* Preimplantation growth factor physiology : reviews of reproduction / P. L. Kaye. — 1997. — Vol. 2. — P. 121–127.

5. *Klonisch T.* Epidermal growth factor-like ligands and erbB genes in the periimplantation rabbit uterus and blastocyst / T. Klonisch, P. Wolf, S. Hombach-Klonisch et al. // Biology of Reproduction. — 2001. — Vol. 64. — P. 1835–1844.

6. *Lee K. Y.* Animal models of implantation : reviews / K. Y. Lee and F. J. De Mayo. — 2004. — № 128. — P. 679–695.

7. *Norwitz E. R.* Implantation and the survival of early pregnancy / E. R. Norwitz, D. Schust, S. J. Fisher // The New England journal of medicine. — 2001. — V. 345, № 19. — P. 1400–1408.

8. *Paria B. C.* Cellular and molecular responses of the uterus to embryo implantation can be elicited by locally applied growth factors/ B. C. Paria, W. G. Ma, J. Tan et al. // Proceeding Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America. — 2001. — V. 98, № 3. — P. 1047–1052.

9. *Pinto A. B.* Preimplantation exposure to high insulin-like growth factor-I concentration results in increased resumption rates in vivo / A. B. Pinto, A. L. Schlein, K. N. Moley // Human reproduction. — 2002. — Vol. 17, № 2. — P. 457–46.

10. *Tamada H.* The effect of transforming growth factor on the progression of decidualization in rats / H. Tamada, H. Sakaguchi, T. Inaba // Life Science — 2001. — V. 69, № 13. — P. 1549–1558.

**Рецензент:** завідувач лабораторії фізіології та патології відтворення тварин, доктор сільськогосподарських наук, с. н. с. Шаран М. М.