

## АНАЛІЗ ОСОБЛИВОСТЕЙ БІЛКОВОГО СПЕКТРА ТКАНИН РЕПРОДУКТИВНИХ ОРГАНІВ САМОК НА РАННІХ СТАДІЯХ ВАГІТНОСТІ

С. В. Федорова\*

Інститут біології тварин УААН

*У статті описані дослідження білкового спектра тканин репродуктивних органів самок білих щурів лінії Wistar на ранніх стадіях вагітності. Метою досліджень було вивчення вмісту специфічних білків, які відповідають за формування ембріонально-маткового сигналу на ранніх стадіях становлення 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, які приймають участь у процесах регуляції утворення ембріонально-маткового сигналу на ранніх доімплантаційних стадіях, зокрема епідермальний фактор росту, інсуліноподібні фактори росту та інсулін.*

Імплантація ембріона в стінку матки — критичний і складний процес, саме його порушення частіше за все розглядають як основну причину порушення відтворення та досліджують умови для його подолання [4]. Відомо, що від секреторної активності ендометрію, зокрема, кількості та природи специфічних білків, які виділяються його клітинами, залежать інтенсивність ембріонально-маткового сигналу та імплантація ембріона [2]. 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 [3]. Критичні періоди розвитку ембріонів збігаються у часі з перебудовою білкового складу різних органів репродуктивної системи самок [1]. 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. 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]. Саме тому дослідження цих процесів актуальне.

Матеріали і методи. Згідно мети були підібрані шість груп самок білих щурів лінії Wistar 3-місячного віку три дослідних по 5 голів у кожній та три контрольних по 3 голови в кожній групі.

Тварин утримували на стандартному раціоні при 12-годинному світловому періоді. Після проведення попереднього дводенного зближеного утримання самок і самців у 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 у наркотичний стан ефіром для наркозу.

Після морфометричної оцінки репродуктивних органів з них виготовляли лізати для подальшого дослідження спектра білків методом електрофоретичного розділення в поліакриламідному гелі.

\* Науковий керівник: д-р. с.-г. наук, Мадіч А. В.

Групи тварин	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 відмивали у дистилаті для легшого відділення жиру. Для легшої гомогенізації органи гомогенізували у рідкому азоті у фарфоровій чашці фарфоровим товкачем. Після випаровування рідкого азоту до гомогенатів додавали стандартний буфер лізису. Чашки з гомогенатами залишали на 30 хв у холодильнику (на льодяній бані). Гомогенати переносили у пластикові пробірки і додавали буфер Лемлі (1:1). Пробірки з вмістимим проварювали на киплячій водяній бані 10 хвилин, після чого центрифугували 30 хв при 14.000 об/хв. Супернатант заморожували при  $-20^{\circ}\text{C}$  для подальшого використання.

Поліакриламідний гель виготовлявся по методу Остерман О. О., 1981. Використовували реактиви фірм-виробників Acros Organics®, Merck®, «Макрохим». Отримані лізати вносили за допомогою шприца на дно кишеньок концентрувального гелю з розрахунку 30–50 мкг білка на один трек. 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®).

**Результати та обговорення.** При аналізі електрофоретичного розділення білків репродуктивних органів самок щурів на різних 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).

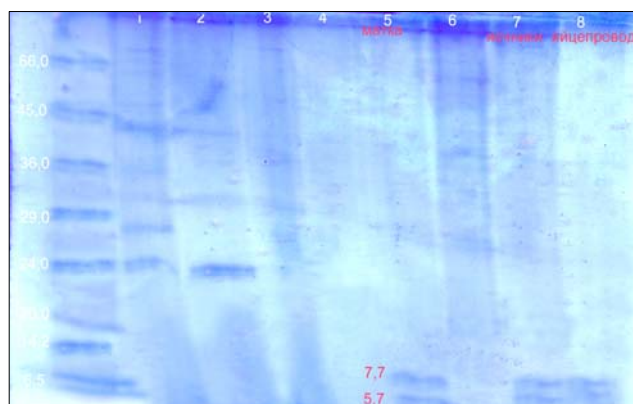


Рис. 1. Спектр білків репродуктивних органів самок щурів на 1-й день після запліднення. Виявлено білки молекулярної маси 7,7 та 5,7 кДа

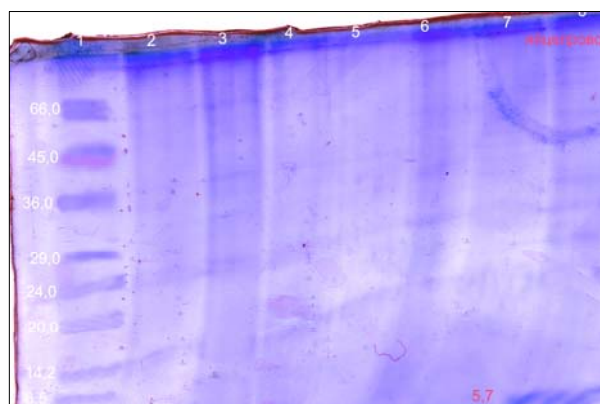
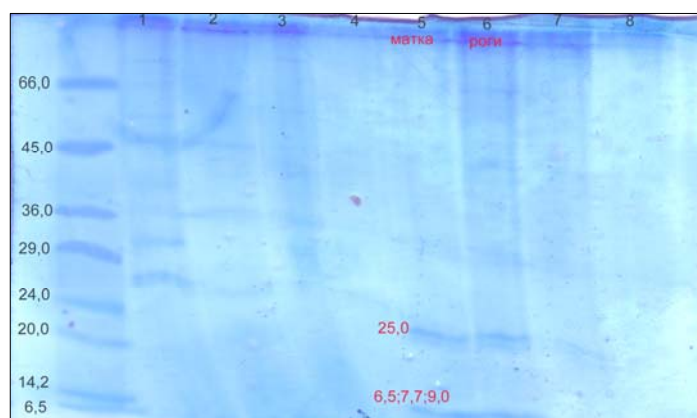


Рис. 2. Спектр білків репродуктивних органів самок щурів на 3-й день після запліднення. Виявлено білки молекулярної маси 5,7 кДа



*Рис. 3. Спектр білків репродуктивних органів самок щурів на 6-й день після запліднення.  
Виявлено білки молекулярної маси 25; 6,5; 7,7 та 9,0 кДа*

З літературних джерел 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.

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

На 6-й день після запліднення в самок щурів у 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.

## В И С Н О В К И

Встановлено, що проведення попереднього дводенного зближеного утримання самиць і самців щурів в окремих клітках та їх спаровування без попередньої гормональної стимуляції охоти у самиць приводить до запліднення. Виявлені в лізатах яєчників яйцепроводів і матки низькомолекулярні білки на 1, 3 та 6-й день після запліднення самиць очевидно можна вважати специфічними білками, які відповідають за формування ембріонально-маткового сигналу.

## **АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ БЕЛКОВОГО СПЕКТРА ТКАНЕЙ РЕПРОДУКТИВНЫХ ОРГАНОВ САМОК НА РАННИХ СТАДИЯХ БЕРЕМЕННОСТИ**

*С. В. Фёдорова*

## 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. Целью исследований было изучение содержания специфических белков, которые ответственны за формирование эмбрионально-маткового сигнала на ранних стадиях становления беременности (до стадии имплантации). С помощью метода электрофоретического разделения белков в полиакриламидном геле было показано наличие нескольких низкомолекулярных белков, которые можно отнести к группе ростовых факторов, которые принимают участие в процессах регуляции образования эмбрионально-маткового сигнала на ранних доимплантационных стадиях, в частности эпидермальный фактор роста, инсулиноподобные факторы роста и инсулин.

## **ANALYSIS OF PROTEINS SPECTRUM CHARACTERISTIC FEATURES OF FEMALES REPRODUCTIVE ORGANS TISSUES ON EARLY STAGES OF PREGNANCY**

*S. V. Fyodorova*

## S U M M A R Y

The researches of proteins spectrum of Wistar line white rat females' reproductive organs tissues at early stages of pregnancy are described in this article. The purpose of researches was to study the contents of specific proteins responsible for embryo-uterine signal forming at early stages of pregnancy formation (up to a stage of implantation). Using electrophoresis protein separation in

polyacrylamide gel method, presence of some low weight proteins which could be referred to the group growth factors was observed. These proteins take part in the processes of regulation of embryo-uterine signal formation on early preimplantation stages, particularly epidermal growth factor, insulin-like growth factors and insulin was shown.

#### Л И Т Е Р А Т У Р А

1. *Чернуха Г. Е.* Роль факторов роста в функции репродуктивной системы : [Электронный ресурс] / Чернуха Г. Е., Сметник В. П // Проблемы эндокринологии — 1996. — Т. 2. — С. 8–13. — Режим доступа до журн.:  
[http://www.rusmedserv.com/problreprod/1999/6/article\\_342.html](http://www.rusmedserv.com/problreprod/1999/6/article_342.html)
2. *Kaye P. L.* Preimplantation growth factor physiology : [Электронный ресурс] / Kaye P. L // Reviews of Reproduction — 1997. — Vol. 2. — P.121–127. — Режим доступа до журн.:  
<http://ror.reproduction-online.org/content/vol2/issue2/>
3. *Klonisch T.* Epidermal growth factor-like ligands and erbB genes in the periimplantation rabbit uterus and blastocyst : [Электронный ресурс] / Klonisch T., Wolf P., Hombach-Klonish S. et al // Biology of Reproduction. — 2001. — Vol.64. — P. 1835–1844. — Режим доступа до журн.:  
<http://www.biolreprod.org/content/vol64/issue6/>
4. *Lee K. Y.* Reviews: Animal models of implantation : [Электронный ресурс] / Lee K. Y and F. J. De Mayo // Reproduction. — 2004 — № 128. — P. 679–695. Режим доступа до журн.:  
<http://www.reproduction.online.org/cgi/search?Fulltext=Animal+models+of+implantation&volume=128&issue=6&journalcode=reprod>
5. *Pinto A. B.* Preimplantation exposure to high insulin-like growth factor-I concentration results in increased resumption rates in vivo : [Электронный ресурс] / Pinto A. B., Schlein A. L., Moley K. N. // Human reproduction. — 2002. — Vol.17. — № 2. — P.457–46. Режим доступа до журн.:  
<http://humrep.oxfordjournals.org/content/vol17/issue2/index.dtl>