

Количественный ПЦР-анализ маркеров овариального резерва для оценки эффективности модели преждевременного истощения яичника**Ерюкова Юлия Эдуардовна***Студент (магистр)*

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра эмбриологии, Москва, Россия

E-mail: eruckova.julia@yandex.ru

Синдром раннего истощения яичников - это серьезное медицинское состояние, при котором пул примордиальных фолликулов в яичнике значительно уменьшается. Синдром может возникнуть по различным причинам, в том числе из-за перенесенного ранее онкологического заболевания и процедуры химиотерапии. Важной задачей при исследовании данного синдрома на мышиных и других моделях является точная количественная оценка состояния овариального пула [1]. Целью работы стала разработка эффективного молекулярного подхода к оценке овариального резерва, который мог бы составить альтернативу классическому морфологическому исследованию с применением серийных гистологических срезов.

В качестве молекулярного маркера овариального пула был выбран ген, кодирующий белок блестящей оболочки *Zp3*, экспрессия которого в ооцитах не изменяется в ходе оогенеза как человека, так и мыши, и традиционный маркер половых клеток *Ddx4* (*Vasa*) [2]. Разработан протокол точного и воспроизводимого анализа овариального резерва, заключающийся в измерении экспрессии маркерных генов с нормировкой на внутренний стандарт (ген *TBP*) и внешний стандарт (синтезированная *in vitro* РНК рекомбинантного *GFP*). В экспериментах, проведенных на пробах яичников неполовозрелых мышей (14 dpp) - целых, $\frac{1}{2}$ - и $\frac{1}{4}$ -фрагментах - мы подтвердили, что нормированная экспрессия генов *Zp3* и *Ddx* отражает количество ооцитов в исследуемом фрагменте ткани. Для сопоставления морфологического и молекулярного метода оценки овариального резерва был разработан оригинальный метод получения вибротомных срезов овариальной ткани, окрашенной красителем FITC-LCA и стабилизированных в реагенте *IntactRNA* (Евроген), которые могут быть исследованы с помощью флуоресцентной микроскопии, а затем использованы для анализа методом ПЦР в реальном времени.

Разработанный молекулярный метод применен для анализа эффективности модели синдрома преждевременного истощения яичника. Синдром моделировали на мышах *Mus musculus* с использованием цитостатического препарата циклофосфамид (ЦФА). Наряду с контрольной, сформированы две экспериментальные группы: 1) однократное введение 10 мкл 80 мг/мкл ЦФА и 2) введение 10 мкл 80 мг/мкл ЦФА и далее каждые три дня 10 мкл 30 мг/мкл ЦФА в течение трех недель. Затем яичники каждой мыши фиксировали для морфологического и молекулярно-генетического анализа и сбор крови для оценки содержания эстрадиола. Вторая модель оказалась более эффективной: у мышей достоверно падала масса тела, а количество эстрогена в плазме возрастало, этот эффект отражает механизм действия циклофосфамида. Это подтверждает молекулярно-генетический анализ, в котором выявлено достоверное снижение экспрессии *Zp3* и *Ddx4* в обеих экспериментальных группах.

Источники и литература

- 1) Goswami D., Conway G. S. Premature ovarian failure // Human reproduction update. – 2005. – Т. 11. – №. 4. – С. 391-410.

- 2) Zhang Y. et al. Transcriptome landscape of human folliculogenesis reveals oocyte and granulosa cell interactions //Molecular cell. – 2018. – Т. 72. – №. 6. – С. 1021-1034.