

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

СТУПЧУК МАРІЯ СЕРГІЇВНА

УДК 616.092:612.398+661.857:612.621;612.63.03:616-002.155

ДИСЕРТАЦІЯ
ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ СИРТУЇНІВ ТА НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА
НА ФУНКЦІОНУВАННЯ КЛІТИН ЯЄЧНИКА МИШІ

03.00.13 –Фізіологія людини і тварин

Біологічні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

Науковий керівник: Вознесенська Тетяна Юріївна, доктор біологічних наук

Київ – 2019

АНОТАЦІЯ

Ступчук М.С. Вплив модуляторів сиртуїнів та наночастинок срібла на функціонування клітин яєчника миші – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук (доктора філософії) за спеціальністю 03.00.13 – «Фізіологія людини і тварин» – Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ, 2019.

Досліджували параметри мейотичного дозрівання ооцитів, життєздатності клітин їх фолікулярного оточення, а також особливості розподілу однострункових розривів ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів (ФОО) модулюючи експериментальне системне аутоімунне ушкодження (ЕСАУ), оксидативний стрес *in vitro* та застосовуючи модулятори сиртуїнів (активатор ресвератрол та інгібітор нікотинамід), інгібітори NF-κB (BAY11-7082) і мітохондріального переносника (РРТ) та експериментальну субстанцію наночастинок срібла (НЧС), що раніше не було вивчено. У дисертаційній роботі, відповідно до поставленої мети, наведено теоретичне узагальнення та подано нове вирішення наукового завдання стосовно участі сиртуїнів та наноматеріалів в оогенезі за різних експериментальних умов.

Модель ЕСАУ відтворено шляхом імунізації тварин гомогенатом нирки (імунізація мишей першого покоління суспензією антигену нирки, отриманої від материнської особи) [10]. Оксидативний стрес *in vitro* змодельовали додаванням у середовище культивування ооцитів та клітин ФОО перекису водню (H₂O₂) у концентрації 100 μМ.

Під час виконання поставлених нами задач застосовані такі методи – культивування ооцитів *in vitro*, флуоресцентна мікроскопія, лужний гель-електрофорез поодиноких клітин (метод ДНК-комет), полімеразна ланцюгова реакція, статистичні методи обробки результатів.

Отримані результати продемонстрували, що інгібітор сиртуїнів нікотинамід діє на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітини ФОО шляхом впливу на мітохондрії.

Показано, що в умовах оксидативного стресу *in vitro* спостерігається пошкодження ооцитів, а саме: пригнічення мейотичного дозрівання, зменшення кількості живих клітин ФОО. Встановлено, що за даних експериментальних умов вплив ресвератролу призводить до зменшення пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів як на стадії розчинення зародкового пухирця (метафаза I), так і на стадії формування першого полярного тільця (метафаза II), відповідно, на 9% і 17% порівняно з такими величинами в умовах оксидативного стресу. Встановлено, що в умовах оксидативного стресу *in vitro* і впливу ресвератролу відбувається покращення показників життєздатності клітин ФОО - вірогідно збільшувався відсоток живих клітин. Відсоток апоптотичних і некротичних клітин навпаки зменшувався. Встановлено, що в умовах оксидативного стресу *in vitro* транскрипційний фактор NF-κB бере участь в механізмі дії ресвератролу (активатора сиртуїна 1) на процес мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатність клітин ФОО.

В умовах ЕСАУ відбувається пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафази I та метафази II; збільшується кількість клітин ФОО з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу; відбуваються зміни у експресії генів *COX2*, *Grem1* та *HAS2* у клітинах ФОО; збільшується рівень первинних пошкоджень ДНК клітин ФОО. Ми вважаємо, що імунозпальні процеси в умовах ЕСАУ, викликаного імунізацією антигенної суспензії нирки, призводять до збільшення ушкодження ДНК та клітинної загибелі, у результаті чого порушуються метаболічні та електричні зв'язки між фолікулярними клітинами та ооцитами, що можна вважати домінуючим фактором порушення мейотичного дозрівання ооцитів.

Встановлено, що в умовах ЕСАУ застосування активатора сиртуїнів – ресвератролу *in vitro* призводить до наступних змін: відбуваються

покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафази I і метафази II, підвищення відсотка живих клітин і зниження показників апоптотичної та некротичної загибелі клітин ФОО. Окрім цього, за вищезгаданих умов відмічається зменшення пошкодження ДНК ядер клітин ФОО.

Введення субстанції НЧС не впливає на процес мейотичного дозрівання ооцитів та клітинну загибель ФОО. Введення НЧС в умовах моделювання ЕСАУ призводить до зменшення пошкодження ДНК клітин ФОО, а саме: збільшується частка ядер клітин ФОО 0-го і 1-го класу та зменшується частка ядер цих клітин 3-го і 4-го класу ($P < 0,05$). Також встановлено зростання кількості ооцитів, які відновлюють мейоз та формують перше полярне тільце *in vitro*, підвищення відсотка живих клітин та зниження клітин із морфологічними ознаками апоптотичної загибелі.

Ключові слова: ооцити, клітини фолікулярного оточення ооцитів, оксидативний стрес, експериментальне системне аутоімунне ушкодження, наночастинки срібла.

Stupchuk M.S. The effect of Sirtuins activity modulators and silver nanoparticles on the functional status of mouse ovarian cells – Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

A PhD thesis in biological sciences, in speciality 03.00.13 – "Human and Animal Physiology" – Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, 2019.

In the dissertation, according to a stated goal, a theoretical generalization is given and a new solution to the scientific problem concerning the involment of Sirtuins and nanomaterials in oogenesis under various experimental conditions is presented.

The parameters of oocytes' meiotic maturation and viability of cells of their follicular environment were investigated, as well as features of distribution of DNA single-strand breaks in cells of follicular environment of oocytes (FEO),

which have not been studied previously, were assessed using the model of experimental systemic autoimmune damage (ESAD) and modeling of oxidative stress *in vitro*. The effect of Sirtuins activity modulators (resveratrol and nicotinamide), an inhibitor of NF- κ B (BAY11-7082) and an inhibitor of mitochondrial carrier (PPT) under above mentioned experimental conditions was studied.

The model of experimental systemic autoimmune damage was recreated by immunizing the animals (mice) with kidney antigen suspension. The pathological process was modeled by immunization of the first generation mice with a suspension of the kidney antigen derived from the parental animals [10], and oxidative stress was reconstructed *in vitro* by adding hydrogen peroxide (H_2O_2) at a concentration of 100 μ M in the cultural medium where oocytes and FEO cells have been cultivated.

The following methods were used: *in vitro* cultivation of oocytes, fluorescence microscopy, the alkaline single cell gel electrophoresis (DNA comet assay), polymerase chain reaction, statistical methods for data analysis.

The obtained results demonstrated that Sirtuins' activity modulators affect the oocytes and FEO cells due to their effect on mitochondria; 1) under the impact of nicotinamide - only on FEO cells; 2) under the conditions of resveratrol influence, the parameters of viability of FEO cells changes not because of resveratrol influence on mitochondria.

It is shown that in the conditions of oxidative stress, the inhibition of meiotic maturation of oocytes is observed. The influence of resveratrol (20 μ M concentration) under the conditions of oxidative stress *in vitro* was found to decrease the inhibition of meiotic maturation of oocytes both at the stage of dissolution of the germinal vesicle (metaphase I), and at the stage of the first polar body formation (metaphase II) on respectively 9% and 17% in comparison with such values under conditions of oxidative stress without resveratrol influence. Moreover, it has been established that under the conditions of oxidative stress *in vitro* and the influence of resveratrol there is an improvement in the indicators of

viability of FEO cells - the percentage of living FEO cells increased, and the percentage of apoptotic and necrotic cells decreased. It was found that in the conditions of oxidative stress *in vitro*, the NF- κ B transcription factor is involved in the mechanism of resveratrols' (activator of Sirtuin 1) action of both on the process of meiotic maturation of oocytes and on the viability of FEO cells.

Our data indicates that in the conditions of ESAD there is: a depression of meiotic maturation of oocytes at the stage of metaphase I and metaphase II; an increase in the number of FEO cells with morphological signs of apoptosis and necrosis; an occurrence of changes in the levels of expression of *COX2*, *Grem1*, and *HAS2* genes in FEO cells; an increase in the level of DNA primary damages to of the FEO cells.

Taking into account our results, we believe that immunoinflammation processes under the conditions of ESAD caused by immunization of the renal antigenic suspension lead to an increase in DNA damages and cell death, resulting in disturbances of metabolic and electrical bonds between follicular cells and oocytes, which can be considered as the dominant factor in the disruption of meiotic maturation of oocytes.

It has been also established that in the conditions of ESAD the influence of the activator of the Sirtuin 1 - resveratrol *in vitro* leads to next changes, such as: the improvement of the parameters of oocytes meiotic maturation at the stage of metaphase II; the increase of the percentage of living FEO cells and the decrease of the apoptotic and necrotic death of FEO cells, as well as the decrease in the number of FEO cells with the maximum degrees of DNA primary damages.

The injection of silver nanoparticles substance was not found to affect the process of oocytes meiotic maturation and cell death of the FEO cells, whereas in the conditions of ESAD the injection of silver nanoparticles was found to lead to the decrease in the FEO cells DNA primary damages, namely: the proportion of 0 and 1 class - FEO cells increases, and the proportion 3rd and 4th class damages in DNA of FEO cells decreases ($P < 0.05$); it was also shown the increase in

the number of oocytes that restore meiotic maturation and form the first polar body *in vitro*, as well as the increasement of the number of living FEO cells and decreasement of the number of those cells with morphological signs of apoptotic death.

Key words: oocytes, cells of the follicular environment of oocytes, oxidative stress, experimental systemic autoimmune damage, silver nanoparticles.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

В яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Ступчук МС**, Грушка НГ, Шепель ОА, Блашків ТВ, Вознесенська ТЮ. Мейотичне дозрівання ооцитів і життєздатність клітин їх фолікулярного оточення, тимуса і лімфатичних вузлів в умовах експериментального імунного гломерулонефриту. Вісн пробл біол мед. 2015; Вип 4, 2(125): 229-32.
2. Вознесенська ТЮ, **Ступчук МС**, Шепель ОА, Блашків ТВ. Оваріальна функція в умовах експериментального аутоімунного розладу у мишей. Вісн пробл біол мед. 2016; 2(3):113-8.
3. Литвиненко АП, **Ступчук МС**, Блашків ОВ, Вознесенська ТЮ Морфофункціональний стан жіночої репродуктивної системи в умовах застосування наночастинок срібла. Наук вісн Східноєвр нац універ ім Л України. 2016; 12:131-7.
4. Lytvynenko A, Rieznichenko L, Sribna V, **Stupchuk M**, Grushka N, Shepel A, Voznesenska T, et al. Functional status of reproductive system under treatment of silver nanoparticles in female mice. IJRCOG. 2017; 6(5): 1713-20.
5. **Ступчук МС**, Блашків ОТ, Вознесенская ТЮ. Влияние наночастиц серебра на ооциты и эмбрионы. Пробл репрод. 2017; 23(2): 22-6.

6. **Ступчук МС**, Вознесенська ТЮ. Біологічна роль сиртуїнів в еукаріотів. *Фізіол журн.* 2017; 63(4): 105-13.
7. Вознесенська ТЮ, **Ступчук МС**, Калейнікова ОМ, Блашків ТВ Сиртуїн 1 – ключовий клітинний регулятор метаболізму та оксидативного стресу. *Вісн пробл біол мед.* 2018; Вип 1, 1(142): 20-5.
8. Вознесенська ТЮ, **Ступчук МС**, Грушка НГ, Кондрацька ОА, Блашків ТВ. Вплив внутрішньовенного введення наночастинок срібла на ДНК ядер клітин тимуса, лімфатичних вузлів і фолікулярного оточення ооцита в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження. *Вісн пробл біол мед.* 2018; Вип 1, 2(143): 327-31.
9. Blashkiv TV, **Stupchuk MS**, Sribna VA, Kaleynykova OM, Grushka NG, Voznesenska TY. Resumption of Meiotic Maturation of Oocytes, Preand Post-Implantational Embryonic Mortality under Conditions of Experimental Glomerulonephritis and Treatment of Silver Nanoparticles. *Nano Biomed Eng.* 2018; 10(4): 355-61.
10. **Ступчук МС**, Янчій РІ, Вознесенська ТЮ. Роль сиртуїнів у змінах функціонального стану ооцитів та клітин їх фолікулярного оточення в умовах системного аутоімунного ушкодження у мишей. *Фізіол журн.* 2019; 65(1): 34-40.

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Stupchuk MS.** The effect of experimental immune-mediated kidney injury on ovarian function. *CYS: Conference for Young Scientists (Kyiv, 21-25 September 2015). Abstract book.* Lutsk, Vezha-Print, 2015: 143.
2. **Ступчук МС**, Вознесенська ТЮ. Участь сиртуїнів у процесі мейотичного дозрівання ооцитів мишей. XV міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances (м. Київ, 18-21 квітня 2017 р.). Збірник тез конференції – Київ: Паливода А.В., 2017:116-17.

3. Срібна ВО, Шепель ОА, **Ступчук МС**, Маврич СІ, Резниченко ЛС, Калейнікова ОМ, та ін. Функціональний стан яєчника в умовах експериментального імунного ушкодження та введення субстанції наночастинок срібла. Наукова конференція, присвячена 120-річчю від дня народження та 40-річчю від дня смерті акад. М.М. Сиротиніна - 15 травня 2017 р, м. Київ, Інститут фізіології ім. А.А. Богомольця НАН України. – Збірник тез – Київ, 2017: 26.
4. **Ступчук МС**. Вплив експериментального імунного ушкодження нирок на показники функціонального стану яєчників мишей. IV Всеукраїнська наукова конференція студентів та молодих вчених з фізіології з міжнародною участю (м. Харків, 16 травня 2017 р.). Збірник матеріалів конференції – Харків: ХНМУ, 2017:117.
5. **Stupchuk MS**. The impact of Sirtuin activity modulators on the cumulus cells viability of female mice in the conditions of experimental systemic immune disorder. 2nd Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology NAS of Ukraine (CYS-2017) (Kyiv, Juny 6-9, 2017) – The Ukrainian biochemical journal, 2017, Vol. 89: 126.
6. **Stupchuk MS**. 9th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS 2017), Lviv, September 8-11, 2017 – Book of abstracts. – Lviv, 2017:29.
7. Вознесенська ТЮ, **Ступчук МС**, Шепель ОА, Грушка НГ, Блашків ТВ. Цілісність ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцита, тимуса і лімфатичних вузлів в умовах експериментального імунного ушкодження нирок та введення наночастинок срібла. VIII Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (м. Київ, 17-20 жовтня 2017 р.). – Збірник тез доповідей конференції – Київ, КНУ ім.Т. Шевченка, 2017: 30.
8. **Ступчук МС**. Вплив ресвератролу на *in vitro* відновлення мейотичного дозрівання ооцитів в умовах дії інгібітора аспартатних

- мітохондріальних переносників. II Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні тенденції розвитку науки» (м.Київ, 17-18 березня 2018 р.). Збірник матеріалів конференції – Київ.: МЦНД, 2018: 35.
9. **Ступчук МС**, Вознесенська ТЮ. Вплив ресвератролу на відновлення мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність кумулюючих клітин в умовах оксидативного стресу *in vitro*. XVI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances (м. Київ, 24-27 квітня 2018 р.). Збірник тез доповідей конференції – Київ: Паливода А.В., 2018: 270-71.
10. Калейнікова ОМ, **Ступчук МС**, Срібна ВО, Блашків ТВ, Вознесенська ТЮ. Вплив застосування субстанції НЧС, активатора і блокатора сиртуїна 1 на репродуктивну функцію в умовах ЕСАУ. Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (м. Львів, 4-5 жовтня 2018 р.). – Збірник тез конференції. – Львів, 2018:118.
11. **Sribna VO, Stupchuk MS**, Kaleinikova OM, Voznesenska TYu, Blashkiv TV. Effect of silver nanoparticles intravenous treatment on oocytes and cells of their follicular environment under conditions of experimental. V International meeting Clusters and nanostructured materials (CNM-5'2018) (Uzgorod, 22-26 October 2018). - Materials of the International Meeting "Clusters and nanostructured materials (CNM-5)" – Uzhgorod, Ukraine, 2018:262.
12. **Ступчук МС**, Вознесенська ТЮ. Участь сиртуїна 1 у мейотичному дозріванні в ооциті. XX-ий з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (27-29 травня 2019 р.). – Фізіол. журн., 2019, Т. 65, № 3 (Додаток) : матеріали з'їзду. – Київ, 2019:7-8.

13. **Stupchuk MS**, Voznesenskaya TYu. The effect of resveratrol and an inhibitor of Nf- κ B on the functional status of ovarian cells under conditions of oxidative stress *in vitro*. 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation (Yaremche, Ukraine, June 18-21, 2019). Proceedings. – Yaremche, 2019: 21.

Які додатково відображають наукові результати дисертації:

Ступчук МС, Вознесенська ТЮ, Грушка НГ, Шепель ОА, Джуран БВ, Блашків ТВ. Патент на корисну модель № 120418 / Спосіб моделювання системного аутоімунного ушкодження у мишей // (№ 120418 від 25.10.2017, Бюл. № 20).

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ	15
ВСТУП	16
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Роль сиртуїнів у здійсненні жіночої репродуктивної функції.....	24
1.2. Вплив наночастинок срібла на жіночу репродуктивну систему.....	32
1.3. Експериментальні моделі ушкодження яєчників для дослідження аутоімунної патології яєчників у жінок.....	38
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	
2.1. Схема експерименту.....	42
2.2. Метод культивування ооцитів <i>in vitro</i>	53
2.3. Метод прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот	54
2.4. Метод ДНК-комет (лужний)	56
2.5. Метод полімеразної ланцюгової реакції.....	58
2.6. Модель експериментального системного аутоімунного ушкодження (ЕСАУ)	59
2.7. Використані речовини.....	62
2.8. Статистична обробка даних.....	64
РОЗДІЛ 3. УЧАСТЬ СИРТУЇНІВ У ПРОЦЕСІ МЕЙОТИЧНОГО ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ ТА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КЛІТИН ФОЛІКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ ООЦИТІВ (ФОО) <i>IN VITRO</i>	

3.1. Вплив активатора та інгібітора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО в умовах дії інгібітора аспаратних мітохондріальних переносників *in vitro*.....65

3.2. Вплив активатора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО в умовах дії інгібітора NF-кВ *in vitro*.....70

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ АКТИВАТОРА СИРТУЇНІВ НА ПРОЦЕС МЕЙОТИЧНОГО ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ ТА ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КЛІТИН ФОЛІКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ ООЦИТІВ В УМОВАХ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕСУ *IN VITRO*

4.1. Вплив активатора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах оксидативного стресу *in vitro*.....72

4.2. Вплив активатора сиртуїнів та інгібітора NF-кВ на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах оксидативного стресу *in vitro*.....75

РОЗДІЛ 5. ФУНКЦІОНУВАННЯ КЛІТИН ЯЄЧНИКА

В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СИСТЕМНОГО АУТОІМУННОГО УШКОДЖЕННЯ

5.1. Мейотичне дозрівання ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження.....79

5.2. Життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження80

5.3. Експресія генів *COX2*, *Grem1* та *HAS2* у клітинах ФОО

в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження.....81

5.4. Оцінка цілісності ДНК у ядрах клітин ФОО в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження83

РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ МОДУЛЯТОРІВ СИРТУЇНІВ НА МЕЙОТИЧНЕ ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ, ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КЛІТИН ЇХ ФОЛІКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ ТА РОЗПОДІЛ ОДНОНИТКОВИХ РОЗРИВІВ ДНК ЯДЕР КЛІТИН ФОЛІКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ ООЦИТІВ

В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СИСТЕМНОГО АУТОІМУННОГО УШКОДЖЕННЯ

6.1. Вплив модуляторів сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження85

6.2. Вплив модуляторів сиртуїнів на життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів мишей в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження87

6.3. Вплив модуляторів сиртуїнів на цілісність ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів мишей в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження89

РОЗДІЛ 7. ВПЛИВ ВВЕДЕННЯ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЯЄЧНИКА В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО СИСТЕМНОГО АУТОІМУННОГО УШКОДЖЕННЯ

7.1. Вплив введення наночастинок срібла на функціональний стан яєчника..92

7.2. Вплив введення наночастинок срібла на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження94

7.3. Вплив введення наночастинок срібла на пошкодження ДНК ядер клітин ФОО в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження.96

РОЗДІЛ 8. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....98

ЗАКЛЮЧЕННЯ.....114

ВИСНОВКИ.....115

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....117

ДОДАТОК 1.....141

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

ДРТ	– допоміжні репродуктивні технології
ІКК	– імунокомпетентні клітини
ЕСАУ	– експериментальне системне аутоімунне ушкодження
ЛВ	– лімфатичні вузли
МІ	– метафаза I
МІІ	– метафаза II
НЧС	– наночастинки срібла
РФК	– реактивні форми кисню
РРТ	– піридоксал–5'-фосфат
ФОО	– фолікулярне оточення ооцитів
SIRT	– сиртуїни

ВСТУП

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми та обґрунтування вибору напряму дослідження. Сиртуїни (Silent Information Regulator proteins, Sirtuins (Sirt)) є класом білків, що мають властивості гістонових деацетилаз та монорибозил-трансфераз, виявлені у всіх організмах – від бактерій до людини. Відомо, що сиртуїни регулюють процеси транскрипції та апоптозу. Вони відіграють важливу роль у реакції організмів на стрес [13, 23, 63, 70, 143]. Встановлено, що у ссавців SIRT 1 і 6 локалізуються в ядрі, SIRT2 – у цитоплазмі, SIRT3,4,5 – у мітохондріях, SIRT7 – у ядерці, також є відмінності в рівні експресії таких сиртуїнів у різних тканинах [23, 83, 84; 138; 215]. Відомо, що найпотужнішим природнім активатором SIRT1 *in vitro* та таким, що при цьому не чинить негативного впливу на функціонування клітин репродуктивної системи, є ресвератрол (3,5,4-тригідроксистилен) [28, 182; 185].

У пошуках стратегій, спрямованих на запобігання оксидативного ушкодження яєчників, активно вивчається роль SIRT 1 і 3 [134, 184]. Ці протеїни експресуються в яєчниках ссавців, клітинах кумулюсного оточення ооцитів та ембріонах [63, 98, 107, 169], в овульованих ооцитах, що проходять метафазу II (MII) мейотичного дозрівання [97, 98]. Вважають, що експресія SIRT1 у мишей пов'язана зі зміною конфігурації хроматину в ооцитах під час метафазу I (MI) і метафазу II миші [97, 98]. Експресія цього гену, що кодує цей протеїн істотно змінюється при оксидативному стресі і репродуктивному старінні [63, 104, 107]. Відомо, що SIRT1 змінює внутрішньоклітинну локалізацію, активує перегрупування хроматину в MI ооцитах, модулює антиоксидантну ферментну відповідь і таким чином істотно задіяний у запуск адаптивної реакції на окисний стрес в ооцитах мишей [63, 134, 184].

На сьогодні визначення ролі SIRT1 і SIRT3 у процесі мейотичного дозрівання ооцитів є перспективним напрямком, це може сприяти отриманню позитивних результатам у допоміжних репродуктивних

технологіях (ДРТ), шляхом підвищення фертильності і збільшення потенціалу розвитку ранніх ембріонів. Потребує подальшого вивчення роль SIRT1 і 3 у клітинах фолікулярного оточення ооцитів, які відіграють важливу роль у диференціації фолікула.

Останнім часом з'явилося чимало наукових досліджень, присвячених ролі аутоімунних порушень у патогенезі різних гінекологічних захворювань, зокрема, недостатності яєчників. Існують припущення, що аутоімунне ураження нирок здатне впливати як прямо, шляхом дії безпосередньо на ооцити та скоротливу активність матки, так і шляхом опосередкованих механізмів – зокрема, наприклад, впливаючи на клітини фолікулярного оточення ооцитів [31, 159]. Це становить серйозну проблему для нормального функціонування жіночої репродуктивної системи та, відповідно, значного зниження вірогідності успішного проходження процесу запліднення, навіть у разі застосування допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) [160].

З огляду на це, визначення механізмів вищезгаданого впливу є важливим питанням, яке потребує детального дослідження та пошуку можливих шляхів його вирішення. Тому важливим та актуальним є вивчення впливу аутоімунного ураження на імунну та репродуктивну системи організму, застосовуючи експериментальні моделі на тваринах.

В останнє десятиліття надзвичайно широкого використання у косметологічній, харчовій та фармакологічній промисловостях набули наночастинки металів, зокрема срібла (НЧС), а їх загальне виробництво у світі оцінюється у 500 тонн на рік [71, 228]. На основі колоїдного срібла випускають різні препарати, що мають антибактеріальні, противірусні і протигрибкові властивості [30,61]. На сьогодні відомо, що в основі дії НЧС лежить механізм регуляції рівнів активних форм кисню (супероксидних радикалів, гідроксильних радикалів та інших) у клітинах. НЧС мають антиоксидантні властивості, їх активно використовують на даний час не тільки як лікарські засоби, але й як харчові добавки для підтримання

оптимальної функції організму [23, 64, 66, 148]. Проте ефекти впливу наночастинок срібла на репродуктивну систему як в умовах здорового організму, так і за наявності в ньому аутоімунного ураження, не досліджено, а тому є актуальним завданням, що потребує вирішення.

Отже, дослідження впливу модуляторів сиртуїнів та наночастинок срібла на функціональний стан ооцитів та клітин їх фолікулярного оточення (ФОО) у нормі та в умовах аутоімунного ураження нирок є актуальним. Отримані результати можуть сприяти вдосконаленню та розробці нових методів у регуляції народжуваності та фертильності, у лікуванні безпліддя, корекції порушень оваріального циклу. Такі дослідження допоможуть обґрунтувати нові підходи до підвищення вірогідності імплантації та успішного перебігу вагітності при екстракорпоральному заплідненні.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках програми НАН України «Функціональна геноміка, протеоміка та метаболоміка в системній біології», (державний реєстраційний номер 0112U001477), а також у рамках НДР відділу імунофізіології Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України «Дослідження клітинно-молекулярних механізмів імуноіндукованих розладів жіночої репродуктивної системи та корегуючого впливу наночастинок металів» (державний реєстраційний номер теми 0116U004471).

Мета роботи – з'ясувати впливи модуляторів сиртуїнів і наночастинок срібла на функціонування клітин яєчника миші, а саме: оцінити впливи даних факторів на характеристики мейотичного дозрівання ооцитів, життєздатність та пошкодження ДНК у клітинах фолікулярного оточення ооцитів в умовах аутоімунного стресу.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні **завдання**.

1. Визначити вплив модуляторів сиртуїнів (активатора та інгібітора) на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів миші *in vitro*.
2. З'ясувати вплив активатора сиртуїнів ресвератролу на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах моделювання оксидативного стресу *in vitro*.
3. Оцінити характеристики мейотичного дозрівання ооцитів, життєздатність та пошкодження ДНК клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ураження.
4. З'ясувати вплив модуляторів сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів, життєздатність та пошкодження ДНК клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах експериментального системного аутоімунного ураження.
5. Вивчити вплив введення наночастинок срібла на функціональний стан яєчника в умовах експериментального системного аутоімунного ураження.

Об'єкт дослідження – клітини яєчника миші в нормі та в умовах різних експериментальних впливів (експериментального системного ураження та моделювання оксидативного стресу *in vitro*).

Предмет дослідження – зміни параметрів мейотичного дозрівання ооцитів; життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів; визначення первинних пошкоджень ДНК у клітинах фолікулярного оточення ооцитів та імунокомпетентних клітинах мишей в умовах моделювання експериментального системного аутоімунного ураження та дії експериментальних впливів.

Методи дослідження – метод культивування клітин *in vitro* – для дослідження ооцитів, які відновили мейотичне дозрівання, розчинили зародковий пухирець (метафаза I) і сформували перше полярне тільце

(метафаза II); метод прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками – оцінка шляхів клітинної загибелі клітин ФОО, тимуса та ЛВ; метод ДНК-комет (лужний) – оцінка ступеня пошкодження ДНК клітин ФОО, тимуса та ЛВ; метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) – визначення експресії мРНК оваріальних генів в клітинах ФОО; імунофлуоресцентний метод – із застосуванням FITC-мічених антитіл; статистичні методи обробки отриманих результатів.

Наукова новизна одержаних результатів. Нами вперше показано, що інгібітор сиртуїнів – нікотинамід змінює параметри життєздатності клітин ФОО за рахунок його впливу на мітохондрії; в умовах оксидативного стресу транскрипційний фактор NF-κB бере участь в механізмі дії ресвератролу (активатор SIRT1) на процес мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатність клітин ФОО.

Вперше показано, що в умовах ЕСАУ, яке досягається імунізацією самиць мишей гомогенатом нирки, у тварин відбувається зменшення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів; збільшується кількість клітин ФОО з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу; відбуваються зміни у експресії генів *COX2*, *Grem1* та *HAS2* у клітинах ФОО; збільшується рівень первинних пошкоджень ДНК клітин ФОО.

Вперше встановлено, що в умовах ЕСАУ застосування активатора сиртуїнів – ресвератролу (20 μM) *in vitro* покращує параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатність клітин ФОО, а також призводить до зниження кількості клітин ФОО із максимальним ступенем пошкоджень ДНК.

Вперше показано, що введення НЧС не впливає на ДНК клітин ФОО, а в умовах ЕСАУ параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин ФОО покращуються, окрім цього відмічається зменшення пошкодження ДНК ядер клітин ФОО.

Практичне значення одержаних результатів. Результати проведеного дослідження сприяють розширенню фундаментальних знань

стосовно функціонального стану яєчника в умовах ЕСАУ. Вони можуть слугувати базою для подальшого дослідження впливу модуляторів активності сиртуїнів та НЧС на ооцити і клітини ФОО з метою розробки можливих практичних шляхів корекції негативного впливу РФК на клітини та органи жіночої репродуктивної системи.

Модель експериментального системного аутоімунного ушкодження (моделювання гломерулонефриту), створена та запатентована нами (№ 120418 від 25.10.2017, бюл. № 20/2017), дозволяє в моделях на тваринах вивчати механізми розвитку хвороб у людей, що страждають на аутоімунні розлади, а також сприятиме розробці та визначенню ефективності терапевтичних підходів для корекції цих патологічних процесів.

Результати дослідження впливу ресвератролу та НЧС в умовах ЕСАУ на здатність ооцитів до мейотичного дозрівання можуть бути використані у випадках системних імунних розладів і безпліддя, а також для удосконалення методик екстракорпоральних запліднень.

Особистий внесок здобувача. Дисертантка провела підбір та ґрунтовний аналіз актуальних вітчизняних та зарубіжних наукових літературних джерел, що стосуються обраного напряму дисертаційного дослідження. Авторка у співавторстві із науковим керівником здійснила розробку ідеї, мети та завдань дисертаційного дослідження; самостійно вивчила та проаналізувала підібрані наукові літературні джерела за темою дисертації; спланувала підготовку, організацію та проведення переважної частини досліджень; провела кількісну обробку отриманих даних, опис та інтерпретацію результатів, обґрунтувала та сформулювала висновки та повністю сформувала текст дисертаційної роботи. Науковий керівник брав безпосередню участь у розробці плану та дизайну роботи, обговоренні результатів та здійсненні уточнень при формулюванні висновків. Окремі частини дослідів у перебігу дисертаційної роботи виконані разом із співавторами опублікованих робіт.

Апробація результатів дисертації. Основні положення та результати дисертаційного дослідження представлені на: міжнародній науковій конференції для молодих вчених «Conference for Young Scientists (CYS-2015)» (Kyiv, 21-25 September 2015); XV-й Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances» (м. Київ, 18-21 квітня 2017); науковій конференції, присвяченій 120-річчю від дня народження та 40-річчю від дня смерті акад. М.М. Сиротиніна (м.Київ 15 травня 2017 р.); IV-й Всеукраїнській науковій конференції студентів та молодих вчених з фізіології з міжнародною участю, (м. Харків, 16 травня 2017 р.); Міжнародній науковій конференції для молодих вчених «2nd Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology NAS of Ukraine (CYS-2017)» (Kyiv, 6-9 Juny 2017); IX-й Міжнародній школі імунології «9th EFIS-EJ South Eastern European Immunology School (SEEIS 2017)» (м.Львів 8-11 вересня 2017 р.); VIII-й Міжнародній науковій конференції «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (м.Київ, 17-20 жовтня 2017 р.); II-й Міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні тенденції розвитку науки» (м.Київ, 17-18 березня 2018 р.); XVI-й Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances (м. Київ, 24-27 квітня 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (м.Львів, 4-5 жовтня 2018 р.); V-й Міжнародній конференції «International meeting Clusters and nanostructured materials (CNM-5'2018)» (Uzgorod, 22-26 October 2018); XX-му з'їзді Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвяченого 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (м.Київ, 27-29 травня 2019 р.); 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation (Yaremche, Ukraine, June 18-21, 2019).

Публікації. Результати дисертаційної роботи викладено в 24 публікаціях : 10 з яких - статті у провідних вітчизняних і зарубіжних фахових наукових журналах, рекомендованих ДАК України та 12 тез доповідей на міжнародних конференціях і 1 у збірнику тез доповідей учасників літньої школи імунології «9th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS 2017), September 8-11, 2017, Lviv, Ukraine». Отримано деклараційний патент на корисну модель «Спосіб моделювання системного аутоімунного ушкодження у мишей» (№ 120418 від 25.10.2017, бюл. № 20).

Структура і обсяг дисертації. Дисертація складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, основної частини (огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, результатів досліджень, аналізу результатів та їх обговорення), висновків, списку використаних джерел (229 найменувань). Робота викладена на 148 сторінках машинописного тексту та проілюстрована 24 рисунками та 17 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Роль сиртуїнів у здійсненні жіночої репродуктивної функції

Характеристика сиртуїнів та їх класифікація

Сиртуїни (Sirtuins, Silent Information Regulator (Sirt) proteins) є класом білків, що мають властивості гістонових деацетилаз та монорибозил-трансфераз. Це висококонсервативні НАД-залежні протеїни, які виявлені у всіх організмах - від бактерій до людини. На відміну від інших білкових деацетилаз, що просто гідролізують ацетиллізинові залишки, сиртуїн-опосередковане деацетилювання поєднує в собі деацетилювання залишків лізину і гідроліз НАД. У результаті гідролізу утворюються О-ацетил-АДФ-рибоза, деацетильований субстрат і нікотинамід, який є інгібітором активності сиртуїнів. Тому активність сиртуїнів залежить від енергетичного стану клітини через НАД – вмісту НАД, НАДН і нікотинамїду або від поєднання цих параметрів. Сиртуїни – третій клас гістонових деацетилаз, які потребують для протікання реакцій НАД⁺ в якості кофактора, що є їхньою принциповою відмінністю від гістонових деацетилаз класів I і II [23; 137, 142, 145].

Відомо, що сиртуїни регулюють процеси старіння, транскрипції, апоптозу, відіграють важливу роль у реакції організмів на стрес (наприклад, тепловий шок або голод). Регуляція метаболізму й клітинні захисні механізми, в яких беруть участь сиртуїни, можуть бути використані для збільшення тривалості життя [43, 69, 82; 95; 210, 218].

Родина сиртуїнів підрозділяється на п'ять класів (I–IV і U); існує також поділ і всередині деяких класів. Так, U-клас сиртуїнів характерний винятково для грампозитивних бактерій. У геномі дріжджів закодовано п'ять сиртуїнів, у геномі людини – сім представників класів I–IV. Сиртуїни ссавців, SIRT1–7 (таблиця 1), класифікуються за їхніми висококонсервативними центральним

НАД⁺ -зв'язуючим і каталітичним доменами [137]. Хоча ці сиртуїни є достатньо консервативними, їхні N- і С-кінці відрізняються, і вони, ймовірно, володіють різноманітними біологічними функціями за рахунок наступних факторів: а) різні ферментативні активності; б) унікальні субстрати; в) різні субклітинні локалізації та характер експресії [170, 173, 198].

Таблиця 1.1

Характеристика сиртуїнів ссавців

Сиртуїн	Локалізація	Взаємодії	Біологічна роль
<i>SIRT1</i>	Ядро	<i>FOXO, PGC-1α, NF-κB, Ku70</i>	Метаболізм, стрес
<i>SIRT2</i>	Цитозоль	Тубулін, H4, <i>FOXO</i>	Клітинний цикл
<i>SIRT3</i>	Мітохондрія	<i>AceCS2, GDH, complex I</i>	Термогенез, продукція АТФ
<i>SIRT4</i>	Мітохондрія	<i>GDH, IDE, ANT</i>	Секреція інсуліну
<i>SIRT5</i>	Мітохондрія	<i>CPS1</i>	Цикл сечовини
<i>SIRT6</i>	Ядро	<i>H3, NF-κB</i>	Репарація основ, метаболізм
<i>SIRT7</i>	Ядерце	<i>Pol I</i>	Транскрипція рекомбінантної ДНК

Так, *SIRT1*, 6 ссавців локалізуються в ядрі, *SIRT2* – у цитоплазмі, *SIRT3,4,5* – у мітохондріях, де вони деацетилюють негістонові протеїни в процесі регуляції різних метаболічних процесів. *SIRT7* локалізований у ядерці. Також існують відмінності в рівні експресії сиртуїнів у різних тканинах [23, 82, 131, 137, 210, 217].

Рядом дослідників встановлено, що на сьогодні найпотужнішим природнім активатором *SIRT1 in vitro* та таким, що при цьому не чинить негативного впливу на функціонування клітин репродуктивної системи, є ресвератрол (3,5,4-тригідроксистилен). Опубліковані дані про те, що

активація Sirt1 ресвератролом супроводжувалася значним підвищенням рівнів мРНК Sirt1 [182, 185].

Вільнорадикальна теорія старіння яєчників

Репродуктивна функція у жінок здійснюється завдяки діяльності яєчників і матки. У яєчниках дозріває жіноча статеві клітина – яйцеклітина. Розрив стінки фолікула й вихід яйцеклітини в черевну порожнину, які відбуваються в середині циклу під впливом пікового вивільнення лютропного гормону, одержали назву овуляції. Тривалість функціонування яєчників або здійснення оваріальної функції є основним детермінантом репродуктивної функції у жінок, що забезпечує резерв статевих клітин, які утворені до або незабаром після народження дівчинки [133].

Протягом періоду репродуктивного життя жінки оваріальний резерв яєчника поступово зменшується. У період статевого дозрівання яєчник нараховує 300000 первинних фолікулів, що містять ооцити, призупинені у профазі першого поділу мейозу, які періодично залучаються у фазу росту і диференціювання [130, 175]. Під час фолікулогенезу ооцит зазнає ряд змін – генетичних, епігенетичних та цитоплазматичних, спрямованих на розвиток повної компетентності для запліднення та продукування нормального потомства. У цей процес задіяний безперервний обмін між ооцитами та клітинами гранульози, які забезпечують координацію всіх подій у яєчнику під впливом паракринних та ендокринних факторів [36, 186, 220].

Старіння яєчників – процес поступової втрати кількості та якості оваріальних фолікулів. Розмір ооцитарного/фолікулярного пулу суттєво знижується з віком. Функціональне згасання яєчників при старінні також характеризується зниженням здатності виробляти ооцити, компетентні для запліднення та подальшого розвитку (так звані «aged oocytes») [68, 152].

Вільнорадикальна теорія старіння передбачає те, що такі невідворотні побічні продукти метаболізму як реактивні форми кисню (РФК), постійно генеруються в клітинах, в основному електронно транспортним ланцюгом

мітохондрій. Якщо такі реактивні хімічні речовини ефективно не нейтралізуються, можуть виникати окисні ушкодження біомолекул [117, 146, 201].

Вільнорадикальна теорія старіння яєчників, біологічні та клінічні дослідження надали численні докази того, що збільшення РФК може сприяти атрезії фолікулів та старінню ооцитів в яєчниках. Сьогодні оксидативний стрес, який генерується дисфункцією мітохондрій, вважається основною причиною укорочення теломерів, розладів хромосомних сегрегацій, порушень дозрівання та запліднення або фрагментації ооцитів/ембріонів [34, 90, 146]. Проте, з огляду на високу реактивність та короткий період напіврозпаду, вимірювання рівнів РФК у мікросередовищі фолікулів призвело до суперечливих результатів щодо їх ролі у підтримуванні фертильності [73, 187].

Докази оксидативного стресу в розвитку фолікулів в яєчнику, отримані нещодавніми дослідженнями як кумулюсних [135], так і гранулярних клітин [73]. Більше того, виявлено значне вікове збільшення оксидативно пошкоджених ліпідів, білків та ДНК у різних відділах яєчників, включаючи гранулярні клітини [104].

Встановлено, що ферментативна активність та рівень супероксид-дисмутази (SOD), фермента, що реагує з супероксидними аніонними радикалами для утворення кисню та H_2O_2 , зменшується з віком, низькі рівні активності SOD також пов'язують із невдалими результатами ДРТ [91, 161].

Показано, що етіологія оксидативного стресу пов'язана з порушенням вікової васкуляризації фолікулів. Вважають, що фактори, які спричиняють розлади мікросередовища яєчників, можуть впливати на судини строми яєчників, ріст і розвиток фолікулів, викликати розлад ефективної системи антиоксидантного ферментативного захисту [81, 186].

Незважаючи на те, що участь оксидативного стресу у старінні яєчників є точно встановленою, на сьогодні існує все ще небагато доказів можливої користі від застосування антиоксидантів у людини. Актуальними стають

дослідження суб'єктів, що мають потенційну роль у модуляції редокс балансу, його втрати у яєчнику при старінні.

Участь сиртуїнів у регуляції оваріальної функції

У пошуках стратегій, спрямованих на запобігання оксидативному ушкодженню яєчників, активно вивчається роль сиртуїнів. Експресія сиртуїнів спостерігається у яєчниках ссавців, клітинах кумулюсного оточення ооцитів та ембріонах [97-99, 107, 187].

В яєчниках

Відомо, що в яєчниках щурів активація SIRT1 і SIRT6 може підтримувати оваріальний резерв [65, 122, 225, 226]. Обмеження калорійності шляхом активації SIRT1 сприятливо впливає на функціональний стан яєчників. Тоді як в яєчниках тварин, що перебувають на дієті з високим вмістом жирів, пригнічення SIRT1 призводить до фолікулярних втрат [205].

У гранулярних клітинах

У клітинах кумулюсного оточення ооцитів – клітинах, що, відіграють головну роль у диференціюванні фолікулів під впливом паракринних факторів ооцитів та яєчників, а також ендокринних молекул, роль сиртуїнів наразі мало вивчена. В результаті досліджень SIRT1 та SIRT3 встановлена можлива роль цих білків у регуляції проліферації та гормонального метаболізму. FOXL2 – фактор транскрипції, який регулює цілий ряд біологічних процесів, таких як розвиток, диференціація та проліферація, і необхідний для нормального розвитку гранулярних клітин [105, 130]. На лініях гранулярних клітин людини KGN та COV434 показано, що каскад SIRT1-FOXL2 відіграє ключову роль у підтримці клітинного гомеостазу [33]. Цей висновок впливає з того, що інгібування SIRT1 нікотинамідом сприяло зупинці фази G1 та пригніченню репарації ДНК шляхом деацетилювання FOXL2.

Результати досліджень [150] на гранулярних клітинах свиней свідчать про те, що SIRT1 стимулює проліферацію клітин, сприяючи накопиченню

ними цикліну B1 та Cdc2/p34. Крім того, взаємозв'язки між SIRT1, NF-κB/p50 та NF-κB/p65 у трансфікованих клітинах є важливими для контролю проліферації та секреторної активності гранулярних клітин свиней. Встановлено, що життєздатність кумулюсних клітин залежить від балансу між інгібіторним та стимулюючим впливом на SIRT1 [172]. Хоча дослідники визнають, що ресвератрол є непрямим і неспецифічним активатором SIRT1, він був застосований, аби показати, що SIRT1 може відігравати ключову роль у активації стероїдогенезу, асоційованого із лютеїнізацією та термінальною диференціацією кумулюсних клітин щурів [136]. Тому стимуляція SIRT1 ресвератролом може бути проведена при терапії дефіциту лютеїнової фази. Вищезазначені дані свідчать про безпосередню участь SIRT1 у регуляції гормональної секреції яєчників. Нещодавно встановлено, що SIRT3, діючи як регулятор рівня РФК та мітохондріальних функцій, відіграє важливу роль у процесах фолікулогенезу та лютеїнізації в гранулярних клітинах. Дійсно, SIRT3 впливає на мітохондріальні ферменти, такі як глутаматдегідрогеназа, і підвищує рівень оксидативного фосфорилування шляхом деацетилювання ферментів електронно транспортного ланцюга [200]. У кумулюсних клітинах людини спостерігали зниження експресії SIRT3, яке залежить від материнського віку та резерву яєчників. Це пов'язано з нижчим рівнем активної форми глутаматдегідрогеназа - деацетилюваної, що в результаті призводить до змін метаболізму фолікулярних клітин під час процесу старіння [120, 143]. Окрім цього, відсутність експресії SIRT3 призвело до порушення регуляції стероїдогенних ферментів і отже, до зниження секреції прогестерону в гранулярних клітинах [74].

Таким чином, потребує подальшого вивчення роль сиртуїнів у гранулярних клітинах ссавців, що оточують ооцит, і які відіграють важливу роль в диференціації фолікула.

В ооцитах

Усі сиртуїни є експресованими в овульованих ооцитах МІ і їх експресія поступово зменшується від запліднення до стадії бластоцисти у мишей [97, 98]. Вважають, що експресія SIRT1 пов'язана зі зміною конфігурації хроматину в ооцитах МІ і МІІ миші [79, 85], з оксидативним стресом і репродуктивним старінням [63, 107, 117, 224]. Показано, що SIRT1, шляхом зміни його внутрішньоклітинної локалізації, активуючи перегрупування хроматину в МІ ооцитах, і модуляцією антиоксидантної ферментної відповіді, задіяний в запуск адаптивної реакції на окисний стрес в ооцитах мишей [63, 117].

Експериментальні дані на ооцитах миші продемонстрували роль SIRT1 у регуляції окисно-відновної сигналізації [63]. Так, в МІ ооцитах ген, що кодує транскрипт SIRT1, активується у відповідь на *in vitro* застосування H_2O_2 . Припускають, що SIRT1, як хроматин регулюючий фактор, бере участь у зміні транскрипційної активності, викликаній оксидативним стресом. Зниження за допомогою специфічного інгібітора Ex527 активності SIRT1 (через FOXO3A), призводить до посилення активності MnSOD гена і запобігає збільшенню ROS [115, 185-187].

Існують дані про участь кількох мікроРНК у посттранскрипційній регуляції SIRT1 [214] і відповіді на стрес [49, 50] в ооциті миші. Дані про непрямі кореляції між рівнями експресії мікроРНК-132 і SIRT1 підтримують гіпотезу про те, що ця мікроРНК бере участь у модуляції мРНК SIRT1 [214]. Більше того, показано нижчу здатність регулювати ген SIRT1 і рівні мікроРНК-132 у відповідь на окисний стрес [63] у старих ооцитах.

SIRT1, як вважають, важливий у період оогенезу, а на запліднення і ранній розвиток ембріона впливає Sirt3 [97]. Так, встановлено зниження рівня транскриптів SIRT1 в МІІ ооцитах у порівнянні з МІ ооцитами [63, 185], що узгоджується з положенням про те, що деградація специфічних транскриптів, як відомо, відбувається під час завершення мейозу [133]. Отже,

зниження активності Sirt1 в ооцитах на стадії МІІ можна прийняти як доказ незначної ролі Sirt1 в подальших подіях після запліднення.

Значне підвищення рівня РФК пригнічує активність Sirt1, впливає на просування мейозу і супроводжується аномаліями шпинделя й організації хромосом в ооцитів, які дозрівали *in vitro*. Вважають, що певний рівень активності Sirt1 захищає ооцити від оксидативного ушкодження, викликаного стресом, пов'язаним з культивуванням *in vitro*. З використанням ооцитів старих корів встановлено, що активація Sirt1 може бути дієвим контрзаходом проти старіння ооцитів. Додавання в середовище культивування N-ацетил-цистеїна (NAC) знижує рівні РФК в ооцитах, в той час як інгібування Sirt1 збільшує кількість аномальних запліднень [182].

Більш низький рівень SIRT2 реєструвався в ооцитах від старих мишей. В ооцитах миші пригнічення SIRT2 пов'язане зі збільшенням дефектів шпинделя і хромосомною дезорганізацією [223]. Активність SIRT2, подібно як і SIRT1, пов'язана з коливаннями рівнів клітинного NAD [48].

В ембріонах

Роль сиртуїнів як регуляторів транскрипції генів ембріонів обговорюють із 1994 року, відколи було встановлено, що нікотинамід інгібує розвиток ембріонів миші *in vitro* [194]. Спочатку дослідження зосереджувались на ролі сиртуїнів, зокрема SIRT3, у процесі розвитку ембріона. Так, було показано, що інгібітори сиртуїнів і мРНК-індукований нокдаун SIRT3 сприяють утворенню РФК та знижують розвиток бластоцисти [98]. Це свідчить про те, що SIRT3 виступає як захисний фактор при стресових умовах під час запліднення і культивування ембріонів, забезпечуючи підтримку мітохондріальної функціональності. Важливу роль у сигналінгу SIRT3 в ембріонах миші відіграє білок p53. Експерименти з SIRT3-нокдаун ембріонами показали, що маніпулювання активністю SIRT3 призводить до змін експресії генів та шляху РФК-p53. Ці спостереження на мишах підтверджені й на свинячих ембріонах, де було встановлено, що

SIRT1 та SIRT3 регулюють ранній розвиток ембріона шляхом модуляції природньої експресії генів [66, 106].

Таким чином, на основі проведеного аналізу даних літератури можна зробити узагальнення про те, що інтерес до потенційної ролі сиртуїнів у репродуктивній фізіології останнім часом зростає. На сьогодні вивчення ролі сиртуїнів (SIRT1 і SIRT3) у процесі мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин їх фолікулярного оточення є перспективним і може сприяти позитивним результатам в ДРТ, шляхом підвищення якості ооцитів і збільшення потенціалу розвитку ранніх ембріонів.

1.2. Вплив наночастинок срібла на жіночу репродуктивну систему

Характеристика та біологічні властивості наночастинок

На сьогодні багато груп дослідників у всьому світі проводять розробки у галузі нанотехнологій. Відповідно, важливим є вивчення питання потенційної небезпеки використання наноматеріалів, а також визначення критеріїв їх безпеки для здоров'я людини

Такі унікальні фізико-хімічні властивості наночастинок, як більш висока стабільність у водному середовищі, зменшення розмірів і збільшення поверхні і, таким чином, підвищення реакційної здатності, роблять наноматеріали ефективнішими в промисловому використанні [52, 70, 87, 109, 113, 227] і спричиняють реальну загрозу для живих організмів [76, 118, 164].

На теперішній час нанотехнології посідають провідне місце в науково-практичній діяльності людини і набувають широкого застосування в лікуванні та діагностиці захворювань різної етіології. Новітнім напрямком нанофармакології є використання нанопрепаратів як субстанції для нових лікарських засобів [25, 29, 44, 58, 67, 132, 138]. Перспективними в цьому аспекті є наночастинок металів.

Відомо, що одним із найважливіших показників при гігієнічному нормуванні нанопродуктів є вивчення їхнього впливу на репродуктивну

функцію, в тому числі вивчення оогенезу та сперматогенезу у експериментальних тварин. Згідно з даними літератури, наночастинки, завдяки своїм малим розмірами, легко проникають в організм людини і тварин через захисні бар'єри (епітелій, слизова оболонка ін.), респіраторну систему, шлунково-кишковий тракт [92, 93]. Існують дані, що різні речовини й матеріали при переведенні їх у форму наночастинок значно змінюють свої фізико-хімічні властивості, а це може відобразитися на їх фізіологічних ефектах у процесі всмоктування [24, 139, 140, 141].

Отже, на сьогодні біологічний вплив наночастинок на клітини і тканини ссавців досліджений недостатньо і потребує подальшого детального вивчення.

Вплив наночастинок металів на репродуктивну систему

Серед сучасних досліджень в області нанобіотехнологій лише незначна їх частина присвячена дослідженню впливу нанометалів на органи репродуктивної системи та ембріогенез.

Групою дослідників [37] проведена оцінка впливу наночастинок золота на чоловічу репродуктивну функцію, зокрема процес сперматогенезу. Показано, що при пероральному введенні наночастинок золота розміром 5 та 20 нм у сім'яниках тварин, методом аутометалографії, реєстрували накопичення наночастинок лише в сполучнотканинній оболонці органу, в паренхімі накопичення не було. Водночас відбувалося пригнічення експресії PCNA - фактору проліферації і диференціювання клітин на рівні переходу статевих клітин від сперматогонії до сперматоцитів I порядку, наслідком якого може бути незавершений сперматогенез. Із представлених дослідниками даних можна зробити висновок, що наночастинки золота розмірами 5 і 20 нм не можуть подолати гемато-тестикулярний бар'єр, проте володіють репродуктивною токсичністю.

Аналіз даних літератури дозволяє припускати, що можливі зміни гострої токсичності хімічного елементу при переході до наноформи не перевищують одного порядку. Найбільшу ймовірність становить поява у наночастинок специфічної токсичності, зокрема, розвиток порушень репродуктивної функції. При цьому отримані різними дослідниками дані є дуже суперечливими. Так, показано, що тривалий пероральний вплив наносполук гідрозолей золота та срібла на самок білих щурів не супроводжувався розвитком гонадотоксичного ефекту [86, 128]. Як свідчать результати автометалографічних досліджень ряду вчених, гематофолікулярний бар'єр для наночастинок золота є непроникним. Водночас при тривалому введенні самкам дослідники зареєстрували накопичення нанозолота в ряді утворень ретикуло-ендотеліальної системи. При введенні нанозолота вагітним самкам також виявлено проникнення наночастинок у фетальні тканини, зокрема, в печінку плода [21]. Слід зазначити, що питання про здатність наночастинок золота долати плацентарний бар'єр теж розцінюється в літературі як суперечливе: поряд з дослідженнями, результати яких підтверджують можливість penetрації наночастинок золота через плаценту [190], опубліковані дані, де проникність плацентарного бар'єру для наночастинок заперечується [229]. Встановлений факт наявності нанозолота в печінці плода при відсутності їх у плаценті, змушує розглянути й такі можливості, як їх міграція в зародкові тканини на більш ранньому етапі (при закладці ембріона і початкових стадіях формування плаценти), або існування параплацентарних шляхів проникнення цих частинок в організм плоду. Окрім вищезгаданого, наночастинки золота не чинили впливу на постнатальну смертність потомства. Основні ознаки прогресуючого морфологічного дозрівання, сенсорні функції (слух, зір, нюх) і здатність до локомоторної координації у новонароджених щурів дослідної та контрольної груп формувалися синхронно. Тому дещо несподіваними виявилися дані, отримані при обстеженні 30-денного потомства, коли при тотальній реєстрації маси тіла було виявлено гальмування її приросту [190].

По досягненні потомством віку репродуктивної зрілості порушення біохімічного гомеостазу у піддослідних тварин проявилися підвищенням вмісту піровиноградної кислоти. Порушення гематологічних показників свідчили про серйозне пригнічення червоного паростка кровотворення. Відмінний від контролю поведінковий патерн потомства щурів, які зазнали впливу наночастинок золота, продемонстровано і в цьому віці. Комплексна оцінка змін, виявлених у функціональній системі «мати-плід» при впливі наночастинок золота, переконує в тому, що «носійство» наночастинок може мати безсимптомний характер тільки до певного часу. Так, проникнення наночастинок золота до плоду на антенатальній стадії не мало значущих проявів: ембріолетальний ефект був відсутній, анатомічні пороки не виникали, депресії загального розвитку плодів не спостерігалися. Девіації розвитку у потомства вперше виявлялися в кінці першого місяця життя і до моменту досягнення віку репродуктивної зрілості не зникає. Така динаміка порушень дозволяє зробити висновок, що прямий контакт наночастинок золота з ембріональними тканинами здатний призводити до формування дефектів, які виявляються після значного латентного періоду і потім одержують характер тривалого патологічного стану [57, 190, 229].

Також було показано статево залежність токсичності наночастинок заліза при внутрішньовенному введенні мишам: LD50 для самок, самців і обох статей. Після внутрішньовенного введення мишам наночастинок заліза у токсичних дозах протягом першої доби спостерігали дозозалежні порушення з боку серцево-судинної, дихальної і нервової систем. Однак введення найменших рівнів доз призводило до незначного й короткотривалого порушення загального стану тварин [92].

Таким чином, робимо висновок, що можлива протективна або токсична дія наночастинок металів на репродуктивну функцію досліджена недостатньо.

Вплив наночастинок срібла на ооцити та ембріони

В останнє десятиліття значно збільшилося використання наночастинок срібла (НЧС), а його загальне виробництво у світі оцінюється у 500 тонн на рік [71, 228]. НЧС мають металевий елементний склад, не містять кисню, проте поверхня металевих наночастинок срібла окислюється за більшості умов навколишнього середовища і негативно заряджені гідроксо- та оксогрупи викликають негативний поверхневий заряд частинки. НЧС у певній мірі розчиняються у водному середовищі [40, 41, 111].

На основі колоїдного срібла випускають різні препарати, що мають антибактеріальні, противірусні і протигрибкові властивості. На даний час наночастинки срібла знайшли широке застосування в косметичній та харчовій промисловості. Колоїдне наносрібло складається з наночастинок, зважених у воді, воно може містити стабілізатор колоїдної системи. Порівняно зі сріблом макророзміру, його наночастинки можуть потенційно проявляти набагато більшу токсичність. Механізм розвитку такого ефекту наносрібла може бути пов'язаний з окисидативним стресом, порушенням функцій мітохондрій і збільшенням проникності мембрани [40, 52, 71, 166]. Та все ж питання про токсичність наночастинок срібла залишається відкритим.

Відомо, що НЧС розміром 10-30 нм спричиняють виражений антибактеріальний ефект і застосовуються для місцевого лікування інфікованих ран шкіри [29, 51, 58]. Також слід відмітити противірусну активність наносрібла. Іншими значущими ефектами, якими володіє наносрібло, є протизапальний та імуномодулюючий. Ці ефекти дослідники пов'язують з інгібуванням синтезу цитокінів, таких як TNF-а, IL-12, IL-2, а також металопротеїназ матриксу, зокрема MMP-9 [132].

Експериментальні дані, отримані різними авторами про вплив наносрібла на системи організму, зокрема репродуктивну, є досить суперечливими. Не існує чітких пояснень, яким шляхом, який час і яку концентрацію наночастинок срібла вводили тваринам. Так, одні автори

стверджують, що LD50 для мишей повинна бути 3000 мг/кг, інші – 11600 мг/кг, треті – 4500 мг/кг [112, 118, 156]. Ряд авторів [111, 112, 118] відзначали, що у тварин відбувалося накопичення наночастинок срібла в тканинах організму при отриманні його з питною водою в дозах 20-50 мг/л. За даними інших дослідників [94]. LD100 при внутрішньочеревному введенні мишам (2 мл) становить 500 мг/кг.

Проведені дослідження впливу наночастинок срібла на репродуктивну функцію самок мишей, стан здоров'я і кількість отриманого потомства [114]. Дослідники показали, що у всіх групах (експериментальній та контрольній) не виявлено достовірної відмінності за кількістю і станом здоров'я приплоду у першому та другому потомстві. Зовнішній вигляд і поведінка тварин не відрізнялися від приплоду в контрольній групі. Прирости маси тіла піддослідних тварин у першому і другому поколіннях розрізнялися незначною мірою. Тобто, отримані ними дані свідчать про відсутність токсичності препаратів наночастинок срібла на репродуктивну функцію тварин.

Також було встановлено, що повторне пероральне введення НЧС під час вагітності не викликає змін у розвитку ембріона і плоду в умовах введення в дозах до 1000 мг/кг/день [222]. Також не встановлено вплив НЧС на ембріони мишей [189]. Водночас існують дані, що НЧС (50 мкМ) пригнічують розвиток передімплантаційних ембріонів миші *in vitro* [116].

Темпи розвитку бластоцист після мікроін'єкції НЧС на стадії 2-клітинних ембріонів миші не відрізнялися в дослідних і контрольних групах. За допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі при аналізі шести онтогенетично важливих генів (BAX, BCL2L2, TP53, OCT4, NANOG, Dnmt3a) не виявлено впливу наночастинок на експресію генів бластоцист. На відміну від НЧС, Ag⁺ іони призводили до негайної затримки розвитку ембріона [32]. Є також дані й про те, що НЧС не впливають на розвиток преімплантаційних ембріонів до стадії бластоцисти, і не встановлено змін у експресії генів для оцінки розвитку ембріона свині [190].

Таким чином, наведені дані підтверджують, що ооцити і ембріони є чутливою системою для досліджень, пов'язаних із нанотоксикологією, у якій можуть бути візуалізовані тонкі ефекти. Використання такої тестової системи в майбутньому сприятиме поглибленню розуміння можливих ефектів впливу наночастинок на жіночу репродукцію. Тому використання НЧС є перспективним у створенні лікарських засобів, які володіють такими фармакологічними ефектами як протимікробний, противірусний, протизапальний та імуномодулюючий.

1.3. Експериментальні моделі ушкодження яєчників для дослідження аутоімунної патології яєчників у жінок

Аутоімунні розлади яєчників у жінок

Відомо, що аутоімунні захворювання є наслідком появи в організмі аутоантигенів клітин організму. Аутоантигенами виступають речовини власних незмінених тканин, позбавлених в ембріональному періоді контакту з імунокомпетентними клітинами – кришталік, тканини тестикул, тканини щитовидної залози, а також будь-яка тканина організму, що змінила свої фізико-хімічні властивості. Антитіла, які утворилися до таких антигенів – це аутоантитіла, що утворюються, найчастіше, до власних тканинних компонентів, змінених під впливом різних факторів (лікарські речовини, бактерії, токсини, віруси, фізичні фактори та ін.). Більше того відомо, що у жінок як гуморальна, так і клітинна складові імунної відповіді є більше вираженими, ніж у чоловіків; більшою є тривалість імунної відповіді, а поріг для її розвитку – нижчий. Останнім часом з'явилося чимало наукових досліджень [59, 126, 129], присвячених ролі аутоімунних порушень у патогенезі різних гінекологічних захворювань, зокрема, недостатності яєчників.

Недостатність яєчників є однією з основних причин жіночого безпліддя. Залежно від вмісту гонадотропінів (ФСГ і ЛГ) в крові, розрізняють

гіпо-, нормо- і гіпергонадотропні форми оваріальної недостатності. Гіпергонадотропна недостатність яєчників виникає в результаті первинного ураження яєчників. Відповідно до механізму негативного зворотного зв'язку між яєчниками і гіпофізом, зниження вмісту естрадіолу в крові нижче порогового рівня, призводить до підвищення секреції гіпофізом гонадотропінів [78]. Найпоширенішою причиною порушень менструального циклу і безпліддя є нормогонадотропна недостатність яєчників, що характеризується незмінним вмістом гонадотропінів в крові. Ця форма оваріальної недостатності може бути обумовлена різними факторами, як оваріальним, так і екстрагонадним: порушення регуляції функції яєчників центрального генезу (наприклад, функціональна і органічна гіперпролактинемія), ожиріння, виражений дефіцит маси тіла, синдром полікістозних яєчників (СПКЯ) [27, 54, 121].

Одним з основних факторів, що сприяють розвитку недостатності яєчників, за сучасними уявленнями, прийнято вважати аутоімунний гломерулонефрит. Було показано, що при гломерулонефриті з фокально-сегментарним гломерулосклерозом, IgA-нефропатії вагітність провокує розвиток загострень ниркових патологічних станів, розвитку артеріальної гіпертензії, порушень коагуляції крові, при вовчаковому нефриті вагітність супроводжується порушенням функцій нирок [46, 75, 121, 127, 149]. Припускають, що здатність до зачаття і перебіг вагітності без ускладнень залежить, головним чином, від відсутності артеріальної гіпертензії і порушення функції нирок, а не від характеру захворювання нирок [89, 177, 178]. Проте, це питання носить дискусійний характер. Так, результати вагітностей у жінок залежно від морфологічних варіантів гломерулонефриту наведені у ряді робіт [38, 80]. Вищезгадані автори виявили великий відсоток передчасних пологів та перинатальних втрат плода у пацієток із мембранозним гломерулонефритом та IgA-гломерулонефритом. Відповідно ж до публікації результатів досліджень, проведених дещо пізніше, інших авторів [103, 158, 159], народження здорових дітей спостерігається в 90%

жінок із мембранозним гломерулонефритом. Зважаючи на сказане, необхідно розробити певну тактику ведення і лікування жінок із гломерулонефритом, особливо перед планованою вагітністю, що є однією з головних завдань у збереженні репродуктивного здоров'я жінки і запорукою народження здорового потомства.

Загалом, у нефрології комплексна оцінка репродуктивного статусу (менструальної функції, здатності до зачаття, перебігу вагітності та пологів) у пацієнок із первинним аутоімунним гломерулонефритом рідко була предметом спеціального дослідження, тому, на нашу думку, дане питання є актуальним і потребує подальших досліджень.

Експериментальні моделі ушкодження яєчників

У зв'язку з тим, що причини аутоімунної патології яєчників досі залишаються невідомими, а кількість жінок з даними патологіями збільшується з початку останнього десятиліття [77, 104, 105, 162], актуальними залишаються дослідження на моделі з використанням тварин. Вона б найбільш відповідно відтворювала етіологію і патогенез даних захворювань у жінок.

Для вивчення патогенезу та терапії аутоімунної патології яєчників, яка викликана запальним процесом у нирках, актуальними є дослідження на експериментальних моделях із використанням лабораторних тварин, серед яких виділяють: 1) класична модель імунокомплексного гломерулонефриту — пошкодження нирок при сироватковій хворобі [102]; 2) хронічна сироваткова хвороба [55, 110,]; 3) імунокомплексний нефрит Хеймана, що викликається введенням аутологічної або гомологічної ниркової тканини з адьювантом [100], та інші [171]. Отже, на сьогодні у літературі описано моделі експериментального гломерулонефриту, за допомогою яких можна досліджувати аутоімунні патології яєчників у жінок.

Однак у зв'язку із поліморфізмом клінічних проявів порушень функції яєчників у жінок з аутоімунною етіологією, з одного боку, та складністю їх

відтворення на тваринах [9], з іншого боку, наразі серед наявних експериментальних моделей на тваринах немає такої, яка б відтворювала етіологію і патогенез захворювань у жінок.

На основі проведеного аналізу даних літератури з'ясовано, що аутоімунний гломерулонефрит впливає на розвиток недостатності яєчників. Зважаючи на те, що кількість жінок в усьому світі з цією патологією зростає, встановлення особливостей та розкриття можливих механізмів його розвитку є важливим завданням для фізіології і медицини. Необхідні дослідження, з використанням експериментальної моделі на тваринах, в яких були б вивчені окремі аспекти даного розладу. Актуальними на сьогодні є дослідження параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, життєздатності та оцінки цілісності ДНК клітин фолікулярного оточення ооцитів, а також життєздатності та особливостей розподілу однострочкових розривів ДНК ядер клітин тимуса і лімфовузлів в умовах експериментального аутоімунного ушкодження нирки, що раніше не було вивчено.

Таким чином, на основі проведеного аналізу даних літератури **зроблено такі узагальнення**. Після вільної радикальної теорії старіння яєчників, запропонованої Tарin, біологічні та клінічні дослідження надали численні докази того, що збільшення РФК може сприяти атрезії фолікулів та старінню ооцитів в яєчниках. У пошуках стратегій, спрямованих на запобігання оксидативного ушкодження яєчників, активно вивчається роль сиртуїнів.

Лише незначна частина сучасних досліджень в області нанобіотехнологій присвячена дослідженню впливу нанометалів на органи репродуктивної системи. Механізм їх дії може бути пов'язаний з оксидативним стресом, порушенням функцій мітохондрій і збільшенням проникності мембрани. Відомо, що НЧС спричиняють виражений антибактеріальний протизапальний та імуномодельючий ефект, також доцільно відмітити противірусну активність наносрібла. Експериментальні дані, отримані різними авторами про вплив наносрібла на системи організму,

зокрема репродуктивну, є досить суперечливими, тому потребують подальшого вивчення.

Одним з основних факторів, що сприяють розвитку недостатності яєчників, за сучасними уявленнями, вважають аутоімунний гломерулонефрит. Для вивчення патогенезу та терапії аутоімунної патології яєчників, яка викликана запальним процесом у нирках, актуальними є дослідження на експериментальних моделях з використанням лабораторних тварин.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досліди проводились із дотриманням основних положень Конвенції Ради Європи про охорону хребетних тварин, що використовуються в експериментах та в інших наукових цілях від 18.03.1986 р., Директиви ЄС №609 від 24.11.1986 р., Наказу МОЗ України №66 від 13.02.2006 р. та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21.02.2006 № 3447-IV.

Експерименти проведені з використанням невагітних статевозрілих (вік 8–12 тижнів) самиць мишей лінії Альбіно (вага 16–22 г) віварію Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України.

2.1. Схема експерименту

Досліджували участь сиртуїнів у процесі мейотичного дозрівання ооцитів та їх вплив на життєздатність клітин ФОО і рівень пошкодження ДНК ядер клітин ФОО за різних експериментальних умов: норми, експериментального системного аутоімунного ураження *in vivo* та оксидативного стресу *in vitro*; встановлювали шляхи та механізми вищезгаданого впливу. Наступна серія досліджень стосувалася вивчення введення наночастинок срібла у різних дозах (2,0 мг/кг та 4,0 мг/кг) на процес мейотичного дозрівання ооцитів, його вплив на життєздатність клітин ФОО та рівень пошкодження ДНК ядер клітин ФОО за різних експериментальних умов.

Схема експерименту та розподіл тварин по групах представлені в табл. 2.1. -2.9.

1. *Вплив модуляторів сиртуїнів (активатора - ресвератролу та інгібітора - нікотинаміду) на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО in vitro*

Таблиця 2.1.

Мейотичне дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО в умовах впливу РРТ і ресвератролу

Групи тварин	<p>I – контроль (ооцити та клітини ФОО), котрі культивували у середовищі DMEM;</p> <p>II – ооцити та клітини ФОО, котрі культивували у середовищі DMEM з активатором сиртуїнів - ресвератролом в концентрації 20 μM;</p> <p>III – ооцити та клітини ФОО, котрі культивували у середовищі DMEM з інгібітором аспартатного мітохондріального переносника – РРТ у концентрації</p>
--------------	---

	30 μM ; IV – ооцити та клітини ФОО, котрі культивували у середовищі DMEM з 30 μM PPT та 20 μM ресвератролу.
Забір матеріалу	Тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники для проведення подальших досліджень.
Об'єкт	Досліджувані показники:
Яєчники (ооцити, клітини ФОО)	Параметри мейотичного дозрівання ооцитів <i>in vitro</i> (розчинення зародкового пухирця - метафаза I, формування першого полярного тільця - метафаза II). Параметри життєздатності та шляхи загибелі клітин ФОО.

Таблиця 2.2.

Мейотичне дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО в умовах впливу PPT і нікотинамідом

Групи тварин	I – контроль (ооцити та клітини ФОО), котрі культивували у середовищі DMEM; II – ооцити та клітини ФОО, котрі культивували у середовищі DMEM з інгібітором сиртуїнів – нікотинамідом у концентрації 5mM; III – ооцити та клітини ФОО, котрі культивували у середовищі DMEM з інгібітором аспартатного мітохондріального переносника – PPT в концентрації 30 μM ; IV – ооцити та клітини ФОО, котрі культивували у середовищі DMEM з 30 μM PPT та 5mM нікотинамідом.
Забір матеріалу	Тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники для проведення подальших досліджень.

Об'єкт	Досліджувані показники:
Яєчники (ооцити, клітини ФОО)	Параметри мейотичного дозрівання ооцитів <i>in vitro</i> (розчинення зародкового пухирця - метафаза I, формування першого полярного тільця - метафаза II). Параметри життєздатності та шляхи загибелі клітин ФОО.

Таблиця 2.3.

Мейотичне дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО в умовах впливу BAY11-7082 і ресвератролу

Групи тварин	I – контроль (ооцити та клітини ФОО), котрі культивували у середовищі DMEM; II – ооцити та клітини ФОО, котрі культивували у середовищі DMEM з активатором сиртуїнів – ресвератролом у концентрації 20 μM; III – ооцити та клітини ФОО, котрі культивували у середовищі DMEM з інгібітором NF-κB - BAY11-7082 в концентрації 5 μM.
Забір матеріалу	Тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники для проведення подальших досліджень.
Об'єкт	Досліджувані показники:
Яєчники (ооцити, клітини ФОО)	Параметри мейотичного дозрівання ооцитів <i>in vitro</i> (розчинення зародкового пухирця - метафаза I, формування першого полярного тільця - метафаза II). Параметри життєздатності та шляхи загибелі клітин ФОО.

2. Вплив активатора сиртуїнів - ресвератролу на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО в умовах оксидативного стресу *in vitro*

Таблиця 2.4.

Мейотичне дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО в умовах оксидативного стресу *in vitro* і впливу ресвератролу

Групи тварин	<p>I – контроль (ооцити та клітини ФОО), котрі культивували у середовищі DMEM;</p> <p>II – ооцити та клітини ФОО, котрі культивували у середовищі DMEM з активатором сиртуїнів – ресвератролом у концентрації 20 μM;</p> <p>III – ооцити та клітини ФОО, котрі культивували у середовищі DMEM в умовах оксидативного стресу <i>in vitro</i> (H_2O_2 - 100 μM);</p> <p>IV – ооцити та клітини ФОО, котрі культивували у середовищі DMEM із 20 μM ресвератролу в умовах оксидативного стресу <i>in vitro</i> (через годину після початку культивування у кожен лунку вносили H_2O_2 до кінцевої концентрації у середовищі 100 μM);</p>
Забір матеріалу	Тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники для проведення подальших досліджень.
Об'єкт	Досліджувані показники:
Яєчники (ооцити, клітини ФОО)	<p>Параметри мейотичного дозрівання ооцитів <i>in vitro</i> (розчинення зародкового пухирця - метафаза I, формування першого полярного тільця - метафаза II).</p> <p>Параметри життєздатності та шляхи загибелі клітин ФОО.</p>

Таблиця 2.5.

Мейотичне дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО в умовах оксидативного стресу *in vitro*, впливу BAY11-7082 і ресвератролу

Групи тварин	<p>I – контроль (ооцити та клітини ФОО), котрі культивували у середовищі DMEM;</p> <p>II – ооцити та клітини ФОО, котрі культивували у середовищі DMEM в умовах оксидативного стресу <i>in vitro</i>;</p> <p>III – ооцити та клітини ФОО, котрі культивували у середовищі DMEM з активатором сиртуїнів – ресвератролом у концентрації 20 μM в умовах оксидативного стресу <i>in vitro</i> (через годину після початку культивування у кожную лунку вносили H_2O_2 до кінцевої концентрації у середовищі 100 μM);</p> <p>IV – ооцити та клітини ФОО, котрі культивували у середовищі DMEM з інгібітором NF-κB - BAY11-7082 в концентрації 5 μM в умовах оксидативного стресу <i>in vitro</i> (через годину після початку культивування у кожную лунку вносили H_2O_2 до кінцевої концентрації у середовищі 100 μM);</p> <p>V – ооцити та клітини ФОО, котрі культивували у середовищі DMEM з 20 μM ресвератролу та 5 μM BAY11-7082 в умовах оксидативного стресу <i>in vitro</i> (через годину після початку культивування у кожную лунку вносили H_2O_2 до кінцевої концентрації у середовищі 100 μM);</p>
Забір матеріалу	Тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники для проведення подальших досліджень.

Об'єкт	Досліджувані показники:
Яєчники (ооцити, клітини ФОО)	Параметри мейотичного дозрівання ооцитів <i>in vitro</i> (розчинення зародкового пухирця - метафаза I, формування першого полярного тільця - метафаза II). Параметри життєздатності та шляхи загибелі клітин ФОО.

3. Мейотичне дозрівання ооцитів, життєздатність клітин ФОО, тимусу, ЛВ, розподіл ДНК комет ядер клітин ФОО, тимусу, ЛВ та експресія генів *COX2*, *Grem1* і *HAS2* у клітинах ФОО в умовах ЕСАУ

Таблиця 2.6.

Дослідження функціонального стану клітин яєчника та ІКК в умовах ЕСАУ

Групи тварин	I – контроль (внутрішньоочеревне введення фізіологічного розчину замість гомогенату нирки, згідно схеми імунізації), N=7; II – ЕСАУ(внутрішньоочеревне введення гомогенату нирки, згідно зі схемою імунізації), N=7.
Оцінка параметрів стану тварин	Перед початком і під час експерименту оцінювали наступні параметри: -об'єктивний статус тварин (зовнішній вигляд, загальну рухову активність, потреба в їжі та воді, 2 рази на тиждень визначали масу тіла); - видільну функцію нирок за кількістю спонтанних сечовиділень за добу; концентрацію білку у сечі за методом Лоурі.
Забір матеріалу	Тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники, нирки та ІКК для проведення подальших

	досліджень.
Об'єкт	Досліджувані показники:
Яєчники (ооцити, клітини ФОО), тимус; пахові ЛВ.	<p>Кількість ооцитів, які виділяли з одного яєчника.</p> <p>Параметри мейотичного дозрівання ооцитів <i>in vitro</i> (розчинення зародкового пухирця- метафаза I, формування першого полярного тільця- метафаза II).</p> <p>Параметри життєздатності та шляхи загибелі клітин ФОО, тимуса і ЛВ.</p> <p>Розподіл ДНК-комет ядер клітин ФОО, тимуса і ЛВ за класами (0-4) у %.</p> <p>Експресія генів COX2, Grem1 та HAS2 у клітинах ФОО.</p> <p>Визначення наявності специфічних антигенів на відбитках нирок та яєчників тварин з ЕСАУ проводили імунофлуоресцентним методом із застосуванням FITC мічених АТ.</p>

4. Вплив модуляторів активності сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів, життєздатність клітин ФОО та розподіл ДНК комет ядер клітин ФОО в умовах ЕСАУ

Таблиця 2.7.

Мейотичне дозрівання ооцитів, життєздатність клітин ФОО, розподіл ДНК ядер клітин ФОО в умовах ЕСАУ та впливу ресвератролу і нікотинамід у *in vitro*

Групи тварин	<p>I – контроль (ооцити та клітини ФОО), котрі культивували у середовищі DMEM;</p> <p>II – ооцити та клітини ФОО, котрі виділяли у тварин в</p>
--------------	---

	<p>умовах ЕСАУ і культивували у середовищі DMEM з активатором сиртуїнів – ресвератролом у концентрації 20 μM;</p> <p>III – ооцити та клітини ФОО, котрі виділяли у тварин в умовах ЕСАУ і культивували у середовищі DMEM з інгібітором сиртуїнів – нікотинамідом в концентрації 5 mM.</p>
Оцінка параметрів стану тварин	<p>Перед початком і під час експерименту оцінювали наступні параметри:</p> <ul style="list-style-type: none"> -об'єктивний статус тварин (зовнішній вигляд, загальну рухову активність, потреба в їжі та воді, 2 рази на тиждень визначали масу тіла); - видільну функцію нирок за кількістю спонтанних сечовиділень за добу; концентрацію білку у сечі за методом Лоурі.
Забір матеріалу	Тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники для проведення подальших досліджень.
Об'єкт	Досліджувані показники:
Яєчники (ооцити, клітини ФОО)	<p>Параметри мейотичного дозрівання ооцитів <i>in vitro</i> (розчинення зародкового пухирця- метафаза I, формування першого полярного тільця- метафаза II).</p> <p>Параметри життєздатності та шляхи загибелі клітин ФОО.</p> <p>Розподіл ДНК-комет ядер клітин ФОО за класами (0-4), %.</p>

5. Вплив введення різних доз НЧС на процес мейотичного дозрівання ооцитів, життєздатності клітин ФОО та розподіл ДНК комет ядер клітин ФОО

Таблиця 2.8.

Мейотичне дозрівання ооцитів, життєздатність та розподіл ДНК ядер клітин ФОО в умовах застосування наночастинок срібла у дозах 2,0 мг/кг та 4,0 мг/кг

Групи тварин	<p>Серія А. Доза НЧС: 2,0 мг/кг маси тіла миші:</p> <p>I – контроль (внутрішньоочеревне введення фізіологічного розчину), N=8;</p> <p>II – НЧС, в/в введення суспензії НЧС у дозі 2,0 мг/кг. Інтервал введення: однократне; N=8;</p> <p>III – НЧС, в/в введення суспензії НЧС у дозі 2,0 мг/кг. Інтервал введення: п'ятикратне; N=8;</p> <p>IV – НЧС, в/в введення суспензії НЧС у дозі 2,0 мг/кг. Інтервал введення: десятикратне; N=8.</p> <p>Серія Б. Доза НЧС: 4,0 мг/кг маси тіла миші:</p> <p>I – контроль (внутрішньоочеревне введення фізіологічного розчину), N=8;</p> <p>II – НЧС, в/в введення суспензії НЧС у дозі 4,0 мг/кг. Інтервал введення: однократне; N=8;</p> <p>III – НЧС, в/в введення суспензії НЧС у дозі 4,0 мг/кг. Інтервал введення: п'ятикратне; N=8;</p> <p>IV – НЧС, в/в введення суспензії НЧС у дозі 4,0 мг/кг. Інтервал введення: десятикратне; N=8.</p>
Забір матеріалу	Тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники для проведення подальших досліджень.
Об'єкт	Досліджувані показники:

Яєчники (ооцити, клітини ФОО)	Кількість ооцитів, які виділяли з одного яєчника. Параметри мейотичного дозрівання ооцитів <i>in vitro</i> (розчинення зародкового пухирця - метафаза I, формування першого полярного тільця - метафаза II). Показники життєздатності та шляхи загибелі клітин ФОО. Розподіл ДНК-комет ядер клітин ФОО за класами (0-4), %.
-------------------------------------	--

6. Вплив введення НЧС на процес мейотичного дозрівання ооцитів, життєздатності клітин ФОО та розподіл ДНК комет ядер клітин ФОО в умовах ЕСАУ

Таблиця 2.9.

Мейотичне дозрівання ооцитів, життєздатність та розподіл ДНК ядер клітин ФОО в умовах ЕСАУ і застосування наночастинок срібла (у дозі 2,0 мг/кг)

Групи тварин	I – контроль (внутрішньоочеревне введення фізіологічного розчину), N=8; II – ЕСАУ(внутрішньоочеревне введення гомогенату нирки, згідно зі схемою імунізації), N=8; III – НЧС, в/в введення суспензії НЧС у дозі 2,0 мг/кг. Інтервал введення: відповідно до схеми імунізації тварин, N=8; IV – ЕСАУ+НЧС (2,0 мг/кг), N=8.
Оцінка параметрів стану тварин	Перед початком і під час експерименту оцінювали наступні параметри: -об'єктивний статус тварин (зовнішній вигляд, загальну рухову активність, потреба в їжі та воді, 2 рази на тиждень визначали масу тіла);

	- видільну функцію нирок за кількістю спонтанних сечовиділень за добу; концентрацію білку у сечі за методом Лоурі.
Забір матеріалу	Тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники для проведення подальших досліджень.
Об'єкт	Досліджувані показники:
Яєчники (ооцити, клітини ФОО)	Кількість ооцитів, які виділяли з одного яєчника. Параметри мейотичного дозрівання ооцитів <i>in vitro</i> (розчинення зародкового пухирця - метафаза I, формування першого полярного тільця - метафаза II). Показники життєздатності та шляхи загибелі клітин ФОО. Розподіл ДНК-комет ядер клітин ФОО за класами (0-4), %.

2.2. Метод культивування ооцитів *in vitro*

З яєчників мишей неферментативно (механічно) виділяли ооцити. Ооцити від мишей однієї групи збирали та розподіляли в окремі камери, по 10-20 ооцитів у кожній. Морфологічні дослідження ооцитів проводили під мікроскопом МБС-10 (рис. 2.1.).

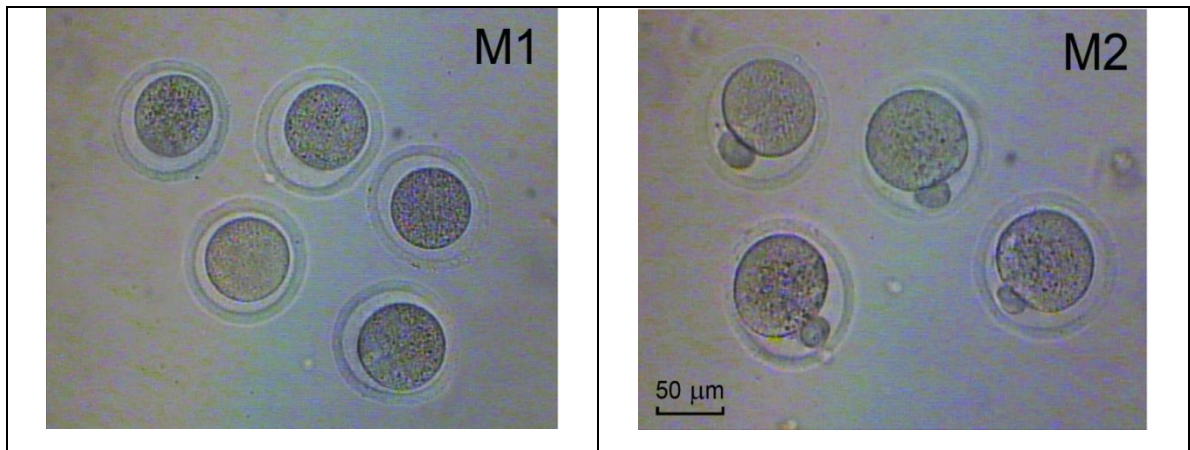


Рисунок. 2.1. Мейотичне дозрівання ооцитів мишей.

Примітка: M1 - розчинення зародкового пухирця – метафаза I; M2 - формування першого полярного тільця - метафаза II.

Визначали стан зародкового пухирця; перивітелінового простору та цитоплазми, а саме щільність, ступінь гранульованості, ознаки фрагментації і дегенерації. Усі контрольні й експериментальні ооцити культивували в однакових умовах (стерильний бокс, камери по 0,4 мл культурального середовища DMEM з 15 ммоль/л HEPES, концентрація кальцію 1,71 ммоль/л, температура 37 °С, тривалість 2 і 20 год). 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).

2.3. Метод прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот

Даний метод був використаний з метою оцінки клітинної загибелі та диференціації ядер живих, некротичних та апоптотичних клітин (рис 2.2).

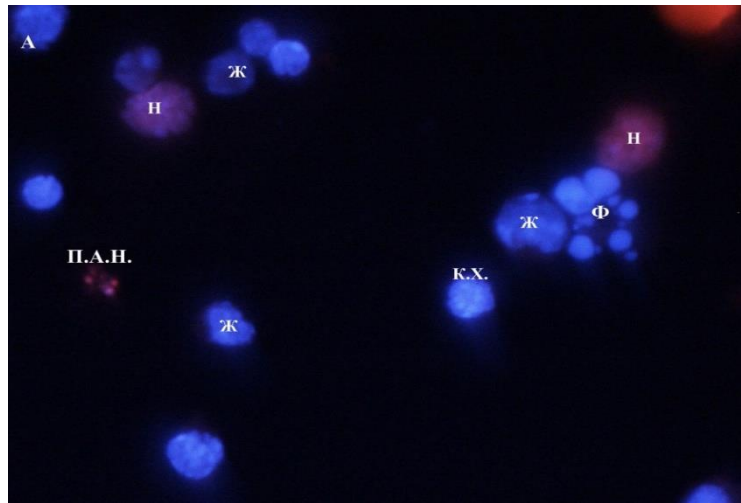


Рисунок. 2.2. Оцінка життєздатності і загибелі фолікулярних клітин яєчника. Примітки: Ж – ядра живих клітин, Н – ядра некротичних клітин, К.Х. – конденсований хроматин, Ф. – фрагментація ядра, П.А.Н. – постапoptотичний некроз (апoptотичні зміни ядра при ушкодженні плазматичної мембрани). Мікрофото з люмінесцентного мікроскопа Nikon Eclipse E200, масляно-імерсійний об’єктив Plan Fluor x100.

Після виділення клітин проводили їх морфологічну оцінку рутинним методом виключення барвника – трипанового синього (0,2% розчин на 0,9% NaCl). Живі та мертві клітини підраховували в камері Горяєва. Забарвлення флуоресцентними барвниками здійснювали в натрій-фосфатному буфері (phosphate buffered saline, PBS). Клітини інкубували в темряві у термостаті при $t\ 37^{\circ}\text{C}$ в присутності ядерних барвників Хехст 33342 та пропідіум йодид у кінцевій концентрації 10 мкмоль/л протягом 10хв, з подальшим двократним відмиванням клітин в PBS під час центрифугування (2000 об/хв, 7 хв) з наступною фіксацією 5%-м формаліном в PBS (2 хв). Забарвлені клітини відмивали в PBS, ресуспендували і робили мазки.

Живі, некротичні та апoptотичні клітини підраховували за допомогою люмінесцентного мікроскопу «Люам І-1» з водно-імерсійним об’єктивом x85 та окуляром x5. Оцінювали не менш ніж 200 клітин [177].

2.4. Метод ДНК-комет (лужний)

Для виявлення одностраничних розривів ДНК ядер фолікулярних клітин використовували метод лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет – «DNA-comet assay») за Afanasieva та співавтори [22]. 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 клітинам вигляд комет (рис 2.3).

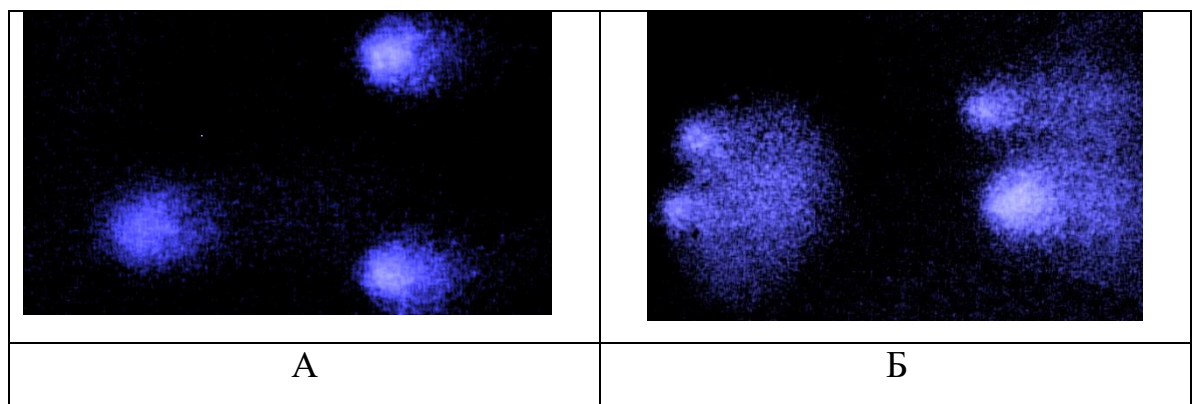


Рисунок. 2.3. Метод ДНК-комет.

Примітки: А) Контроль. Клітини інтактних мишей з неушкодженою ДНК (класи 0 - 1); Б) ЕСАУ. Клітини з сильним ушкодженням ДНК (класи 3-4). Забарвлення барвником DAPI. Мікрофото з люмінесцентного мікроскопа Nikon Eclipse E200, масляно-імерсійний об'єктив Plan Fluor x100.

Розміри хвоста ДНК-комети позитивно корелюють зі ступенем ушкодження ДНК [47]. Електрофорез препаратів (після їх стабілізації) протягом 20 хв у лужному електрофоретичному буфері) проводили за допомогою приладу Multiphor II («LKB», Швеція) при напрузі 24 В та силі току 100 мА протягом 30 хв. ДНК-комет на електрофореграмах, забарвлених флуоресцентним барвником DAPI (4',6-діамідін-2-феніліндол), аналізували візуально, використовуючи люмінесцентний мікроскоп "Люмам И-1" та відеосистему передачі зображення на комп'ютер при використанні водно-

імерсійного об'єктива ($\times 30$). Застосовували напівкількісний метод оцінки інтенсивності забарвлення та довжини хвостів комет, на кожному мікропрепараті аналізували від 100 до 400 окремо розташованих ДНК-комет. Їх поділяли за загальновизнаною класифікацією на 5 класів (рис.2.4.) із відповідним числовим значенням від 0 до 4, залежно від співвідношення ДНК у “голові” та “хвості” комети [56].

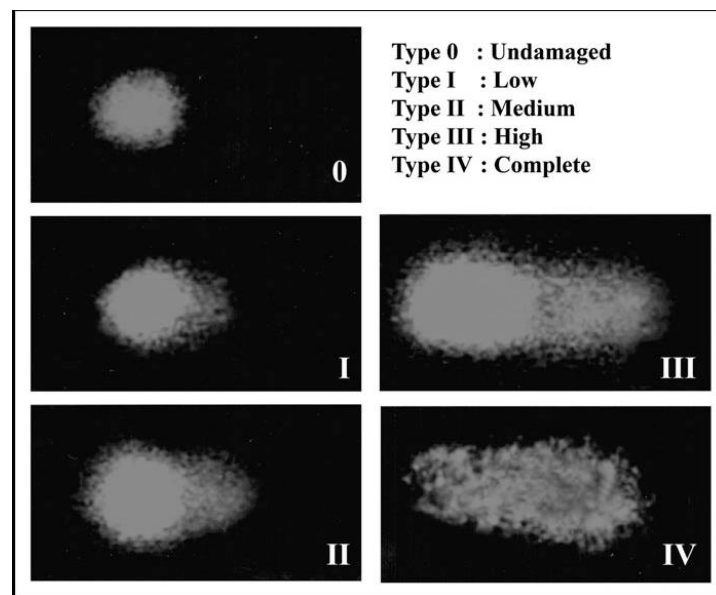


Рисунок .2.4. Класифікація кометних утворень .

Примітка: 0 - клас 0 (непошкоджена ДНК); I - клас 1 (низький рівень пошкодження ДНК); II - клас 2 (середній рівень); III - клас 3 (значний рівень); IV - клас 4 (повністю пошкоджена ДНК) [47].

Ступінь ушкодження ДНК при цьому визначали як індекс ДНК – комет ($I_{\text{ДК}}$), який обчислювали за формулою: $I_{\text{ДК}} = (0 \times n_0 + 1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4) / \sum$, де n_0 – n_4 – число ДНК–комет кожного типу, \sum – сума підрахованих ДНК–комет [22, 56].

2.5. Метод полімеразної ланцюгової реакції

Експресію мРНК оваріальних генів у фолікулярних клітинах визначали методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ПЛР). Тотальну мРНК отримували з клітин ФОО за допомогою набору Trizol RNA-prep (Isogen, Росія). Для зворотної транскрипції використовували First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва). Отриману одноланцюгову кодуючу ДНК (кДНК) клітин ФОО використовували для проведення ПЛР із застосуванням специфічних праймерів (табл. 2.10). ПЛР проводили в термосуцлер GeneAmp системі 2700 ("Applied Biosystems", США). Отримані ПЛР-продукти оцінювали за допомогою електрофорезу в 2,5% агарозному гелі, що містить етідіум бромід. Візуалізація та оцінка яскравості виконані із застосуванням транслюмінатора і програмного забезпечення ViTran («Біоком», Росія).

Таблиця 2.10.

Список ПЛР праймерів, використаних для проведення ПЛР, і розмір ампліфікату

Ген	Послідовність праймерів (прямий, зворотній)	Розмір ампліфікату /bp
COX2	прямий 5'- GAAGGAACTCAGCACTGCATC -3' зворотній 5'- CAGTCCGGGTACAGTCACACT -3'	213
GREM1	прямий 5'- AAGGCACTTCCTGTTACTCTGC -3' зворотній 5'- TACGACTGAGATGTCAGGGAGA -3'	256
HAS2	прямий 5'- CCTCCAGTTAGTGTCTGGGTTC -3' зворотній 5'- CTGTGCAGCTATTCCTGTGTTC -3'	409
GAPDH	прямий 5'-GGGTGTGAACCACGAGAAATATGA-3' зворотній 5'-AGCACCAGTGGATGCAGGGATGAT-3'	240

2.6. Модель експериментального системного аутоімунного ушкодження (ЕСАУ)

Модель експериментального системного аутоімунного ушкодження (ЕСАУ) відтворено шляхом імунізації тварин гомогенатом нирки. Патологічний процес моделювали за допомогою імунізації мишей першого покоління суспензією антигену нирки, отриманої від материнської особи [10].

Приготування гомогенату нирки. Відразу після декапітації (евтаназію проводили під ефірним наркозом відповідно до вимог Женевської конвенції «International Guiding principles for Biomedical Research Involving Animals», 1990) нирки перфузували *in situ* стерильним охолодженим середовищем DME (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Sigma, США) до отримання рівномірного сіро-коричневого кольору. Після цього їх відсікали від ниркової ніжки і переносили на стерильний лоток. Усі наступні маніпуляції виконувалися при температурі +4 °С. Відокремивши від капсули, нирки суспендували в стерильному гомогенізаторі протягом 10 хвилин, потім переносили суспензію в центрифужну пробірку, додаючи охолоджений фізіологічний розчин до 5 мл і 1 мг мертіоляту у якості антисептика. Отриману суспензію центрифугували на холоді 3-кратно по 3 хвилини (2000 об/хв), кожен раз видаляли супернатант і доводили суспензію до 5 мл охолодженим фізіологічним розчином. Потім центрифугували ще раз, осад що утворився, обережно переносили на стерильну фольгу та зважували. Для приготування антигенної суспензії осад змішували з повним ад'ювантом Фрейнда (Sigma, США) з розрахунку 1 мл на 20 мг осаду, який використовується для посилення імунної відповіді. Отриману зважену антигену суспензію нирки миші зберігали за температури +4 °С.

Схема імунізації. Імунізацію тварин проводили з розрахунку 10 мкл суспензії на 10 г маси миші за наступною схемою: 3- разове внутрішньоочеревене 1 раз на добу з інтервалом між імунізацією в 1 день;

повторно імунізацію проводили через 3 тижні внутрішньоочеревне одноразово у тій самій дозі.

Оцінка стану тварин. Перед початком і під час експерименту оцінювали об'єктивний статус тварин (зовнішній вигляд, загальна рухова активність, потреба в їжі та воді, 2 рази на тиждень визначали масу тіла); видільну функцію нирок за кількістю спонтанних сечовиділень за добу у разовій порції сечі, використовуючи тест-смужки, визначали білок (діагностичні тест-смужки Citolab для швидкого виявлення білку, «Фармаско», Україна). Так, у сечі тварин із ЕСАУ реєстрували підвищений вміст білка - $0,41 \pm 0,02$ мг/мл порівняно із $0,02 \pm 0,01$ мг/мл у мишей контрольної групи.

Імунофлуоресцентна мікроскопія. Імунофлуоресцентне виявлення фіксації імуноглобулінів проводили на відбитках нирок та яєчників миші. Препарати фіксували 1% спирт-пікриновою сумішшю та обробляли міченими ФІТС антитілами до мишачих імуноглобулінів (Sigma, США) та аналізували напівкількісним методом з визначенням інтенсивності світіння за наступною шкалою: 0 - відсутнє; 1 - слабе світіння, 2 помірне; 3 - виражене; 4 - сильне світіння. На відбитках тканин органів оцінювали в комплексі як інтенсивність флуоресценції клітин та їх тканинного оточення, так і відносну кількість клітин, що світяться (табл.2.11).

Таблиця 2.11.

Фіксація імуноглобулінів на органах тварин

	Нирки		Яєчники	
	Контроль	ЕСАУ	Контроль	ЕСАУ
Коефіцієнт флуоресценції	0	$0,43 \pm 0,15$	0	$0,25 \pm 0,03$

Модель характеризується зсувом лейкоцитарної формули крові вліво, що є свідченням індукованого імунізацією запалення - із зростанням як загального відсотка нейтрофілів (з $11,9 \pm 2,8\%$ в контролі до $31,0\% \pm 3,1$;

$P < 0,01$), так і паличкоядерних нейтрофільних гранулоцитів з $3,9 \pm 1,8\%$ в контролі до $9,7 \pm 1,4\%$ ($P < 0,01$) у імунізованих тварин.

Функціонування імунокомпетентних клітин в умовах ЕСАУ. Відомо, що при імунозапальних процесах відбувається посилення проліферації, диференціації та загибелі імунокомпетентних клітин (ІКК). Апоптоз ІКК є гомеостатичним процесом, направленим на обмеження імунних і запальних реакцій, тоді як їх некротична загибель може бути провідним патогенетичним механізмом. З метою отримання ІКК (клітин тимуса і пахових лімфовузлів), органи подрібнювали в середовищі виділення (забуференому фосфатами фізіологічному розчині - ЗФР). Клітини диспергували, фільтрували та центрифугували. Осади клітин тимуса і лімфовузлів ресуспендували в 200 мкл ЗФР. Шляхи загибелі ІКК оцінювали методом прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот.

Нами показано, що в умовах ЕСАУ суттєво зменшувався відсоток живих лімфоцитів, виділених з лімфовузлів ($P < 0,01$; $N=14$) - $71,1 \pm 1,1\%$ при $79,1 \pm 2,2\%$ клітин в контролі. Ці експериментальні умови викликали послаблення життєздатності лімфоцитів внаслідок підвищення кількості клітин лімфовузлів із морфологічними ознаками некрозу - $23,6 \pm 0,7\%$ при $13,2 \pm 1,5\%$ клітин в контролі, ($P < 0,01$; $N=14$). При цьому рівень апоптозу лімфоцитів, порівняно із контрольною групою, знижувався - $5,3 \pm 0,6\%$ при $7,7 \pm 1,6\%$ клітин у контролі. Також зменшувалася життєздатність клітин тимуса ($P < 0,01$; $N=14$) до $87,7 \pm 0,7\%$ порівняно з $94,5 \pm 0,8\%$ клітин в контролі. Встановлено посилення некрозу тимоцитів ($P < 0,05$; $N=14$) - $3,8 \pm 0,6\%$ при $1,9 \pm 0,4\%$ клітин в контролі, та виявлено посилення апоптозу клітин тимуса - $8,5 \pm 0,7\%$ при $3,6 \pm 0,9\%$ клітин у контролі ($P < 0,01$; $N=14$).

Таким чином, показано, що при ЕСАУ у клітинах лімфовузлів рівень некрозу підвищувався, а рівень апоптозу – знижувався. Тобто, виявлено посилення вторинного постапоптотичного некрозу. Причиною збільшення вторинного некрозу клітин лімфовузлів може бути те, що загибель клітин,

яка почалася шляхом апоптозу, завершилася розривом плазматичної мембрани через виснаження енергетичних ресурсів. А у клітинах тимуса відбувалося посилення як апоптозу, так і некрозу, що, як відомо, є одним із важливих механізмів обмеження надмірної активації імунної системи.

Встановлено, що в умовах ЕСАУ в клітинах тимуса $I_{\text{ДНК}}=3,3$, а в клітинах лімфовузлів 3,7, що свідчить про зростання пошкодження ДНК.

Отже, показано, що в умовах ЕСАУ має місце розвиток генотоксичного стресу в ІКК як центрального (тимус), так і периферичних органів (лімфовузли) імунної системи, котрий, імовірно, є основною причиною збільшення загибелі ІКК за прозапальним та імуногенним некротичним шляхом. Інтенсифікація запалення та імунних реакцій у результаті некрозу, в свою чергу, може провокувати ушкодження ДНК.

2.7. Використані речовини

В дослідах використовували:

- культуральне середовища DMEM з 15 mM HEPES, концентрація Ca^{2+} 1,71mM (Sigma, США);
- флюоресцентні барвники Хехст 33422 та пропідій йодид (Sigma-Aldrich, США);
- нікотинамід (інгібітор сиртуїнів) (Sigma-Aldrich, США), в концентрації 5,0 mM;
- ресвератрол (активатор сиртуїнів) (Carl Roth GmbH + Co. KG, Німеччина), в концентрації 20,0 μM ;
- піридоксал-5'-фосфат (інгібітор аспартатного мітохондріального переносника - інгібітор аспартат амінотрансферази), PPT (Sigma, США), в концентрації 30,0 μM ;
- BAY11-7082 (інгібітор NF- κB) (Sigma-Aldrich, США), в концентрації 5 μM ;
- перекис водню, H_2O_2 (Україна), в концентрації 100 μM ;
- повний ад'ювант Фрейнда (Sigma, США);

- субстанція наночастинок срібла, НЧС (Інститут біоколоїдної хімії ім.Ф.Д. Овчаренка НАН України) – коричневого колеру, сферичної форми, розміром 30 нм, концентрація: 8 мг/мл за металом (рис. 2.4). НЧС - розводили у воді для ін'єкцій та вводили в/в у дозі 2,0 мг/кг.

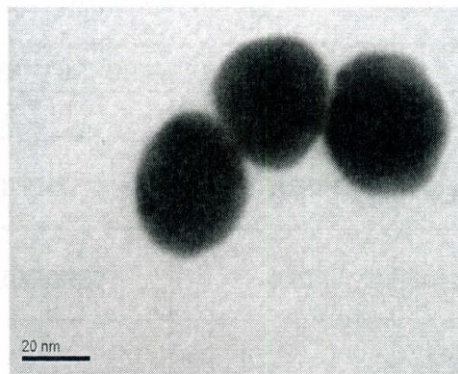


Рисунок. 2.4. Електронно-мікроскопічне зображення НЧС.

НЧС мали розмір ~ 30 нм (концентрація 8 мг/мл за металом), сферичну форму та коричневий колір. НЧС були синтезовані в Інституті біоколоїдної хімії ім. Ф.Д.Овчаренка НАН України за оригінальним протоколом (метод хімічної конденсації), не генотоксичні (тест *in vitro* на культурі клітин СНО-К1, кометний аналіз; тест *in vivo* на щурах лінії Vistas, кометний аналіз), не мутагенні (тест-об'єкти – апікальні меристеми *Allium cepa*, миші лінії BALB/c, маса 20±2 г, метод підрахунку хромосомних аберацій, мікроядерний тест). *Введення НЧС:* НЧС розводили у воді для ін'єкцій та вводили внутрішньовенно у дозі 2 мг/кг, відповідно до схеми імунізації тварин - за 1 год до введення гомогената нирки. Використані концентрації підібрані за даними літератури та апробовані на мишах лінії Альбіно.

2.8. Статистична обробка даних

Отримані дані на нормальність розподілу перевіряли за тестом Колмогорова-Смірнова. Далі, за нормального розподілу, статистичну обробку результатів при порівнянні двох груп даних проводили з використанням критерію *t* Ст'юдента, а при більшій кількості груп даних – за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA з подальшим порівнянням середніх значень між групами за тестом Ньюмена-Кейлса (Newman–Keuls post-hoc test) за допомогою програми Graph Pad Prism, version 8.1.0.325 for Windows (Graph Pad Software, USA). Результати виражали як середні значення \pm похибка середнього значення. При між груповому порівнянні $P < 0,05$ вважали ознакою статистичної вірогідності різниць [5].

РОЗДІЛ 3

Участь сиртуїнів у процесі мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів *in vitro*

Відомо, що експресія сиртуїнів спостерігається у яєчниках ссавців, клітинах кумулюсного оточення ооцитів та ембріонах [63, 97, 107]. Дані, представлені в сучасній літературі, показують, що Sirt1 – важливий у період оогенезу, а на запліднення і ранній розвиток ембріона впливає SIRT3 [98]. Вважають, що певний рівень активності SIRT1 захищає ооцити від ушкодження, викликаного стресом, пов'язаним із культивуванням *in vitro*. Ресвератрол (3,5,4'-тригідроксистилбен) є найбільш потужним активатором Sirt1 *in vitro*. Відомо, що ресвератрол – єдина сполука-активатор Sirt1, яка протестована щодо наявності впливу на фертильність ссавців. Проте механізми, за допомогою яких ця сполука активує дану деацетилазу, є предметом інтенсивних дискусій [88]. Тому першим завданням цієї роботи було дослідити вплив модуляторів сиртуїнів (активатора ревертролу та

інгібітора нікотінамід) у мейотичному дозріванні ооцитів та життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах дії інгібітора аспартатних мітохондріальних переносників – РРТ та інгібітора NF-κB BAY 11-7082 *in vitro*.

3.1. Вплив активатора та інгібітора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО в умовах дії інгібітора аспартатних мітохондріальних переносників *in vitro*

Встановлено, що частка ооцитів, які розчинили зародковий пухирець (метафаза I), не вірогідно зростала після двох годин культивування – $90,6 \pm 2,3\%$ порівняно з $84,5 \pm 6,2\%$ у контрольній групі, а формування першого полярного тільця ооцитами (метафаза II) вірогідно зросло після 20 годин культивування – $80,6 \pm 4,8\%$ порівняно із $61,9 \pm 4,6\%$ у контролі ($P < 0,05$; $N=7$) в умовах дії активатора сиртуїнів ресвератролу (рис.3.1.). Встановлено, що розчинення зародкового пухирця ооцитами не вірогідно зменшувалося – $72,7 \pm 2,9\%$ порівняно з $84,5 \pm 6,2\%$ у контрольній групі, а формування першого полярного тільця вірогідно зменшувалося – $26,3 \pm 4,7\%$ порівняно з $61,9 \pm 4,6\%$ у контролі ($P < 0,01$; $N=7$) в умовах дії інгібітора аспартатного мітохондріального переносника – РРТ (рис.3.1.). Не встановлено вірогідних відмінностей у величинах розчинення зародкового пухирця та формування першого полярного тільця ооцитами – $72,1 \pm 3,4\%$ порівняно з $72,7 \pm 2,9\%$ та $26,1 \pm 4,1\%$ порівняно із $26,3 \pm 4,7\%$, відповідно у групах в умовах дії РРТ і РРТ і ресвератролу ($P < 0,05$; $N=7$) (рис.3.1.) [19].

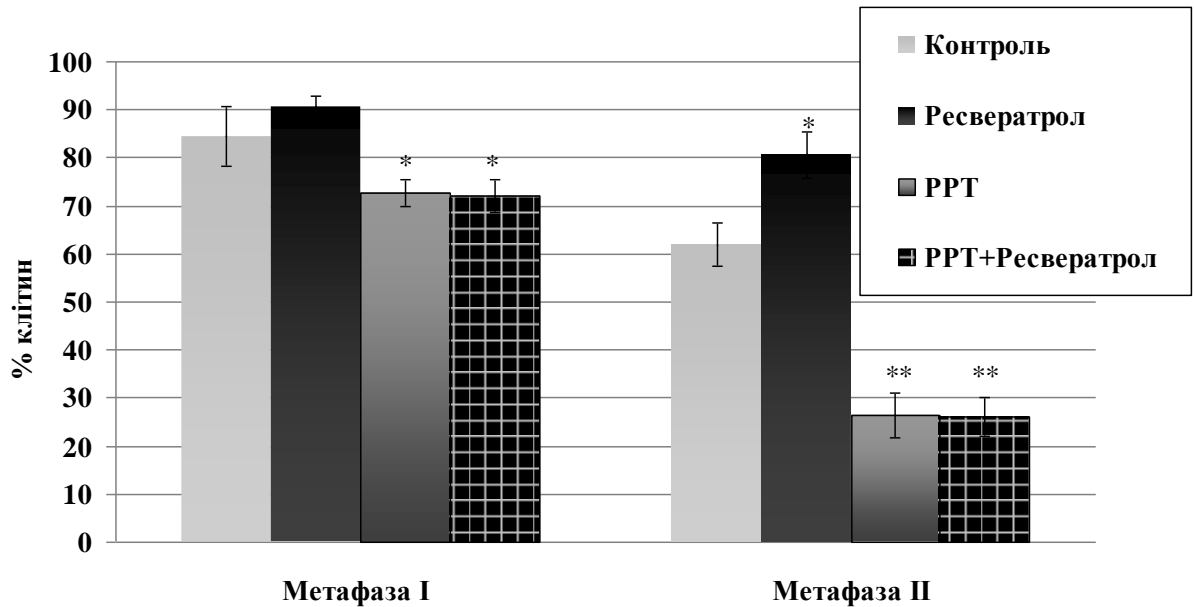


Рисунок. 3.1. Мейотичне дозрівання ооцитів в умовах впливу РРТ і ресвератролу

Примітка: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі.

Встановлено, що нікотинамід не впливав на частку ооцитів, які розчинили зародковий пухирець, – $75,2 \pm 5,0\%$ порівняно з $84,5 \pm 6,2\%$ у контрольній групі ($P < 0,05$; $N=7$) і пригнічував формування першого полярного тільця ооцитами – $33,5 \pm 3,1\%$ порівняно із $61,9 \pm 4,6\%$ у контролі ($P < 0,05$; $N=7$) (рис.3.2.). Також встановлено, що при дії РРТ та нікотинамід у частку ооцитів, які розчинили зародковий пухирець, становила $62,6 \pm 4,0\%$ порівняно з $72,7 \pm 2,9\%$ у групі в умовах дії РРТ ($P < 0,05$; $N=7$), а формування першого полярного тільця ооцитами – $20,8 \pm 3,1\%$ порівняно із $26,3 \pm 4,7\%$ в умовах дії РРТ ($P < 0,05$; $N=7$) (рис.3.2.) [19].

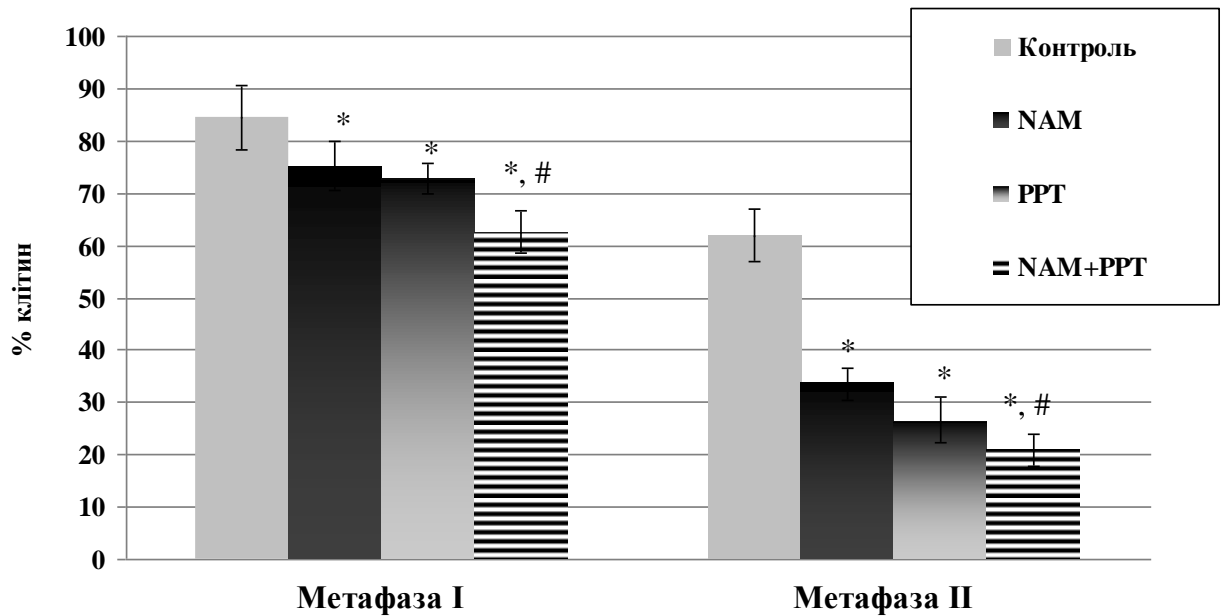


Рисунок. 3.2. Мейотичне дозрівання ооцитів в умовах дії PPT і нікотинамиду. Примітка: * – $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контролі; # – $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у групі PPT.

Таким чином, отримані результати дозволяють підтвердити припущення, що модулятори сиртуїнів впливають на мейотичне дозрівання ооцитів не за рахунок їх впливу на мітохондрії.

Оцінено також вплив модулаторів активності сиртуїнів на життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах дії інгібітора аспартатних мітохондріальних переносників.

У результаті культивування клітин фолікулярного оточення ооцитів із активатором сиртуїнів – ресвератролом встановлено дещо вищі, але не вірогідні відсоткові показники життєздатності живих клітин ФОО порівняно із контрольною групою [16]. Так, відсоток живих клітин ФОО становив $83,0 \pm 0,6\%$ порівняно із $80,1 \pm 2,0\%$ у контрольній групі, апоптотичних $11,8 \pm 0,5\%$ порівняно із $13,2 \pm 1,1\%$ ($P < 0,05$; $N=7$) та некротичних клітин $5,2 \pm 0,3\%$ порівняно із $6,7 \pm 1,8\%$ у контрольній групі ($P < 0,05$; $N=7$) (рис.3.3.).

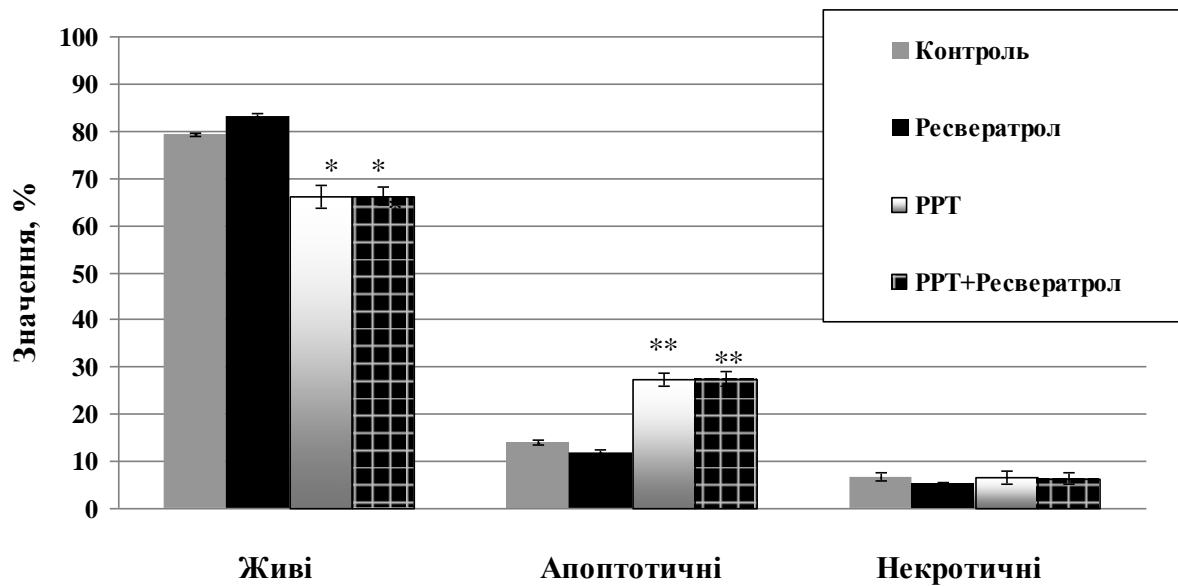


Рисунок. 3.3. Життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах дії PPT і ресвератролу

Примітка: * – $P < 0,05$; ** - $P < 0,01$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контролі.

При порівнянні показників життєздатності клітин ФОО в умовах дії PPT та ресвератрол+PPT статистично вірогідної різниці не було ($P < 0,05$; $N=7$). Так, в умовах дії PPT кількість живих клітин становила $66,0 \pm 2,5\%$ порівняно із $66,2 \pm 1,8\%$ в умовах дії одночасного впливу PPT та ресвератролу. Відсоткові показники апоптотичної загибелі клітин ФОО становили $27,4 \pm 1,3\%$ в умовах дії PPT та $27,4 \pm 1,5\%$ в умовах дії PPT та ресвератролу. За цих самих умов показники некротичної загибелі клітин становили $6,6 \pm 1,5\%$ та $6,4 \pm 1,3\%$, відповідно (рис.3.3.) [19].

Після впливу нікотинаміду реєстрували нижчі ($P < 0,05$; $N=7$) відсоткові показники життєздатності клітин ФОО порівняно із контрольною групою. Так, відсоток живих клітин ФОО становив $66,7 \pm 1,0\%$ порівняно із $80,1 \pm 2,0\%$ у контролі ($P < 0,05$; $N=7$) (рис.3.4.).

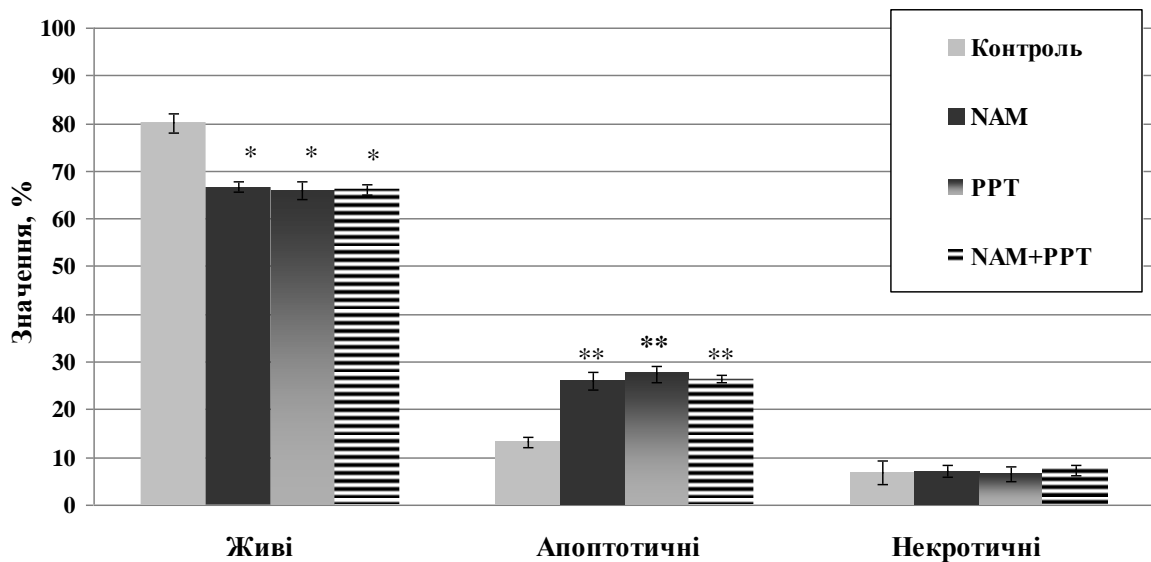


Рисунок. 3.4. Життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах дії PPT і нікотинамід

Примітка: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контролі.

Окрім цього, відзначено підвищення відсоткових показників апоптозу та некрозу. Так, після впливу нікотинамід показники апоптозу та некрозу клітин ФОО збільшилися до $26,1 \pm 1,8\%$ ($P < 0,05$; $N=7$) та $7,1 \pm 1,8\%$ ($P < 0,05$; $N=7$) порівняно, відповідно, із $13,2 \pm 1,1\%$ та $6,7 \pm 1,8\%$ у контрольній групі. В умовах дії нікотинамід та PPT не реєстрували статистично вірогідних змін в порівнянні з такими в умовах дії PPT. Так, кількість живих клітин ФОО в умовах дії нікотинамід і PPT становила $66,1 \pm 1,1\%$, відсоткові показники апоптотичної та некротичної загибелі клітин ФОО за цих самих умов становили $6,4 \pm 0,8\%$ та $7,4 \pm 1,1\%$, відповідно (рис.3.4.).

Таким чином, інгібітор сиртуїнів нікотинамід та інгібітор аспартатних мітохондріальних переносників – PPT призводять до зниження відсоткових показників живих клітин ФОО та підвищення показників апоптотичної та некротичної загибелі цих клітин. При цьому, в умовах спільної дії нікотинамід та PPT пригнічуючий вплив інгібітора сиртуїнів нікотинамід на життєздатність клітин ФОО не посилюється. Це підтверджує, що

нікотинамід впливає на клітини ФОО шляхом впливу на систему енергозабезпечення клітин – мітохондрію.

3.2. Вплив активатора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО в умовах дії інгібітора NF-κB *in vitro*

Показано, що відсоток ооцитів, які розчинили зародковий пухирець, при культивуванні у середовищі з інгібітором NF-κB – BAY 11-7082 становив $80,0 \pm 0,1\%$ порівняно із $84,5 \pm 6,2\%$ ($P < 0,05$; $N=7$) у контрольній групі. Відсоткові значення кількості ооцитів, котрі сформували перше полярне тільце, після культивування у середовищі із BAY 11-7082 становили $60,0 \pm 0,1\%$ порівняно із $61,9 \pm 4,6\%$ у контролі ($P < 0,05$; $N=7$) (рис. 3.5.) [179].

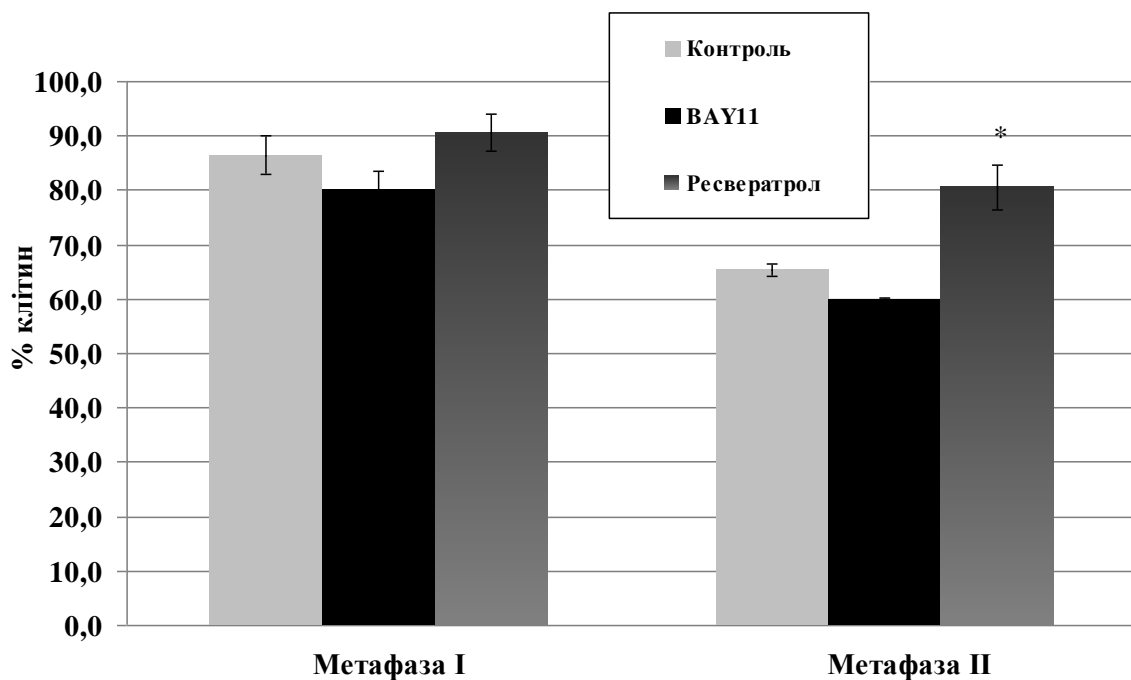


Рисунок. 3.5. Мейотичне дозрівання ооцитів в умовах дії ресвератролу та BAY11-7082

Примітка: *– $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контролі.

Не встановлено вірогідної різниці у кількості клітин ФОО живих, з ознаками апоптозу і некрозу відносно таких величин в умовах впливу як

активатора сиртуїнів ресвератролом, так і інгібітора NF-Кв – BAY11-7082 (рис.3.6) [179].

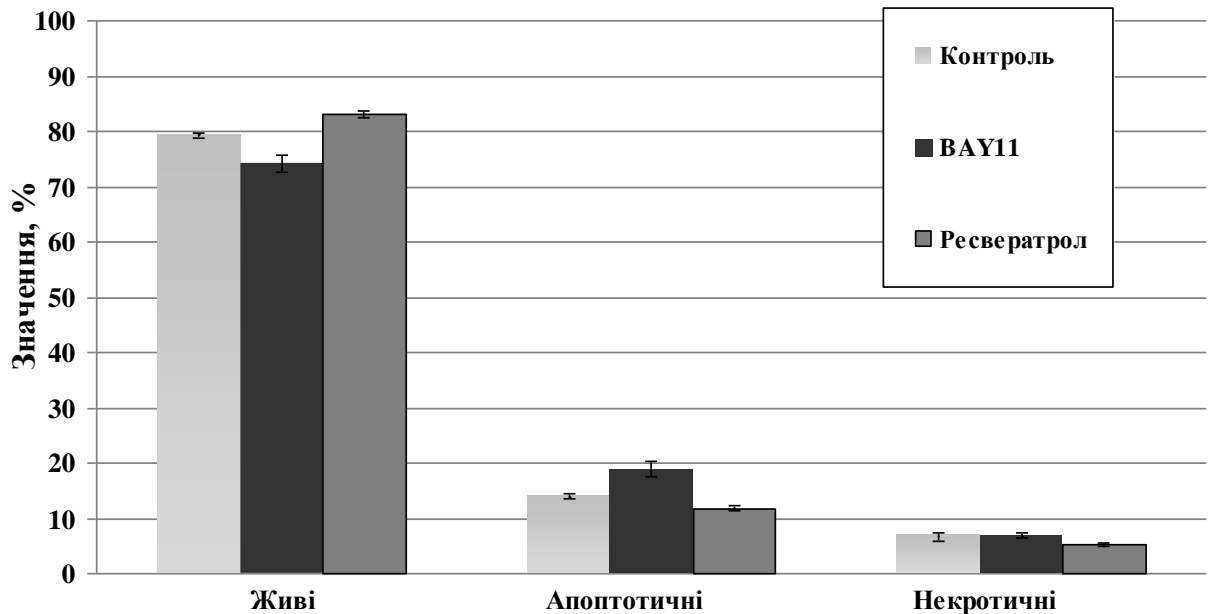


Рисунок. 3.6. Життєздатність клітин ФОО в умовах впливу ресвератролу та BAY11-7082

Таким чином, встановлено, що впливи активатора сиртуїнів – ресвератролу та інгібітора NF-кВ – BAY 11-7082 є однонаправленими.

Отже, оцінюючи вплив модуляторів сиртуїнів (активатора та інгібітора) на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів *in vitro*, зроблено наступне **узагальнення**:

1) інгібітор сиртуїнів нікотинамід діє на клітини ФОО за рахунок впливу на мітохондрії; 2) в умовах дії активатора сиртуїнів ресвератролу параметри життєздатності клітин ФОО змінюються не за рахунок його впливу на мітохондрії клітин.

РОЗДІЛ 4

Вплив активатора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах оксидативного стресу *in vitro*

Значне підвищення рівня РФК пригнічує активність SIRT1, впливає на просування мейозу і супроводжується аномаліями шпинделя та організації хромосом в ооцитах, які дозрівали *in vitro* [34, 90]. Вважають, що певний рівень активності SIRT1 захищає ооцити від оксидативного ушкодження, викликаного стресом, пов'язаним з культивуванням *in vitro*. У пошуках стратегій, спрямованих на запобігання оксидативного ушкодження яєчників, активно вивчається роль сиртуїнів.

Ми відтворили умови оксидативного стресу клітин *in vitro* додаванням у середовище культивування ооцитів та клітин ФОО перекису водню (H_2O_2) в концентрації 100 μM . H_2O_2 – речовина, яка є адекватною для відтворення оксидативного стресу клітин в умовах *in vitro* [208].

4.1. Вплив активатора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах оксидативного стресу *in vitro*

Встановлено, що показники мейотичного дозрівання ооцитів вірогідно зменшувалися в умовах оксидативного стресу *in vitro*. Так, відновлення мейотичного дозрівання в ооцитах мишей після двох годин культивування становило $41,5 \pm 2,5\%$ ($P < 0,01$; $N=7$) в умовах оксидативного стресу порівняно з $84,5 \pm 6,2\%$ у контрольній групі, а формування першого полярного тільця ооцитами після 20 годин культивування – $10,5 \pm 3,2\%$ ($P < 0,001$; $N=7$) в умовах оксидативного стресу *in vitro* порівняно з $61,9 \pm 4,6\%$ у контролі (рис.4.1.).

Встановлено, що показники мейотичного дозрівання ооцитів вірогідно зростали ($P < 0,01$; $N=7$) в умовах оксидативного стресу *in vitro* і впливу

ресвератролу (20 μM). Так, відновлення мейотичного дозрівання ооцитів мишей становило $50,2 \pm 2,9\%$ ($P < 0,01$; $N=7$), а формування першого полярного тільца ооцитами – $27,0 \pm 2,7\%$ ($P < 0,01$; $N=7$) в умовах оксидативного стресу *in vitro* і впливу ресвератролу порівняно з такими величинами в умовах оксидативного стресу (рис. 4.1.) [20].

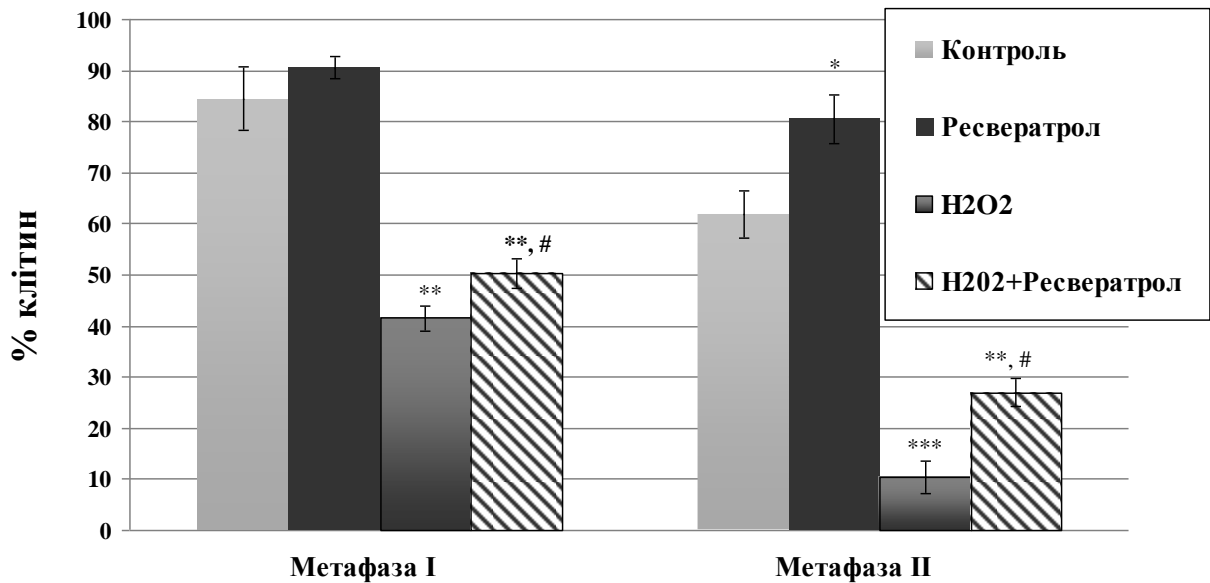


Рисунок. 4.1. Мейотичне дозрівання ооцитів в умовах оксидативного стресу стресу *in vitro* і впливу ресвератролу.

Примітка: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контролі; # – $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у групі H₂O₂.

Таким чином, в умовах оксидативного стресу *in vitro* і впливу ресвератролу підвищується відсоток ооцитів, які успішно пройшли мейотичне дозрівання.

Встановлено, що показники життєздатності клітин ФОО вірогідно зменшувалися ($P < 0,01$; $N=7$) в умовах оксидативного стресу *in vitro*. Так, зменшувалася відсоток живих клітин ФОО – $43,0 \pm 1,3\%$ ($P < 0,05$; $N=7$), збільшувався відсоток апоптотичних клітин – $43,3 \pm 1,0\%$ ($P < 0,05$; $N=7$) і

некротичних клітин $13,7 \pm 0,8\%$ ($P < 0,05$; $N=7$) в умовах оксидативного стресу *in vitro*, відповідно, $79,3 \pm 0,4\%$, $14,0 \pm 0,6\%$, $6,7 \pm 0,8\%$, порівняно з величинами контрольної групи (рис. 4.2.).

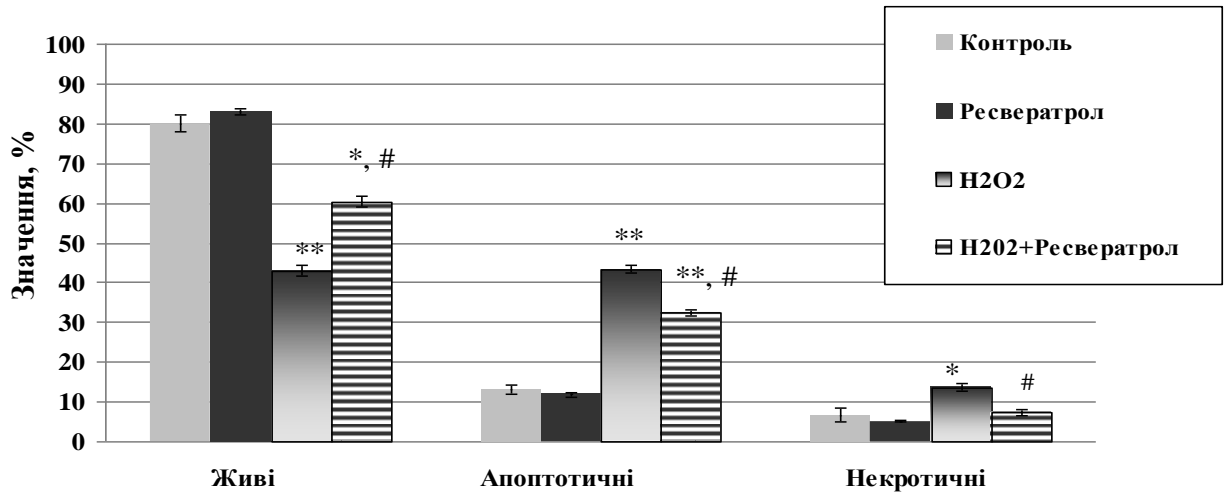


Рисунок. 4.2 Життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах оксидативного стресу *in vitro* і впливу ресвератролу.

Примітка: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контролі; # – $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у групі H₂O₂.

Так, виявлено, що показники життєздатності клітин ФОО вірогідно збільшувалися ($P < 0,01$, $N=7$) в умовах оксидативного стресу *in vitro* і впливу ресвератролу. Зокрема, збільшувався відсоток живих клітин ФОО – $60,4 \pm 1,4\%$ ($P < 0,05$; $N=7$) (порівняно із $43,0 \pm 1,3\%$ без впливу ресвератролу), зменшувався відсоток апоптотичних клітин – $32,3 \pm 0,8\%$ ($P < 0,05$; $N=7$) (порівняно із $43,3 \pm 1,0\%$ без впливу ресвератролу) і некротичних – $7,3 \pm 0,8\%$ ($P < 0,05$; $n=7$) (порівняно із $13,7 \pm 0,8\%$ без впливу ресвератролу (рис. 4.2.) [20].

Нами встановлено, що в умовах оксидативного стресу *in vitro* і впливу ресвератролу у концентрації $20 \mu\text{M}$ показники мейотичного дозрівання ооцитів покращуються, відсоток клітинної загибелі фолікулярних клітин

зменшується, тобто частка живих клітин збільшується, а кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу та некрозу зменшується.

4.2. Вплив активатора сиртуїнів й інгібітора NF-κB на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах оксидативного стресу *in vitro*

В умовах оксидативного стресу *in vitro* (вмісту H₂O₂ у концентрації 100 μM у середовищі культивування) додавання активатора сиртуїнів – ресвератролу та інгібітора NF-κB – BAY 11-7082 у середовище культивування призводить до покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів та супроводжується зменшенням пригнічення параметрів життєздатності клітин ФОО, а саме кількість живих клітин збільшується .

Так, додавання у середовище культивування ресвератролу в умовах оксидативного стресу *in vitro* призводить до покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів: частка ооцитів, які розчинили зародковий пухирець, збільшується на 8,7% (50,2±2,9% проти 41,5±2,5%) та сформували перше полярне тільце на 16,5% – 27,0±2,7% проти 10,5±3,2% без впливу ресвератролу, відповідно (P<0,05; N=7).

BAY 11-7082 у середовищі культивування за цих самих умов призводив до збільшення відсотка ооцитів на стадії метафази I на 12,3% (53,8±1,9% проти 41,5±2,5%) та метафази II на 30,0% (40,5±2,3% проти 10,5±3,2%) без впливу BAY 11-7082, відповідно (P<0,01; N=7).

А одночасний вплив ресвератролу та BAY 11-7082 за даних експериментальних умов призводив до покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів: підвищення відсотка ооцитів на стадії метафази I на 24,1% – 65,6±1,3% проти 41,5±2,5% та метафази II на 36,6% – 47,1±2,6% проти 10,5±3,2%, без впливу ресвератрол+BAY 11-7082, відповідно (P<0,01; N=7) (рис. 4.3.) [179].

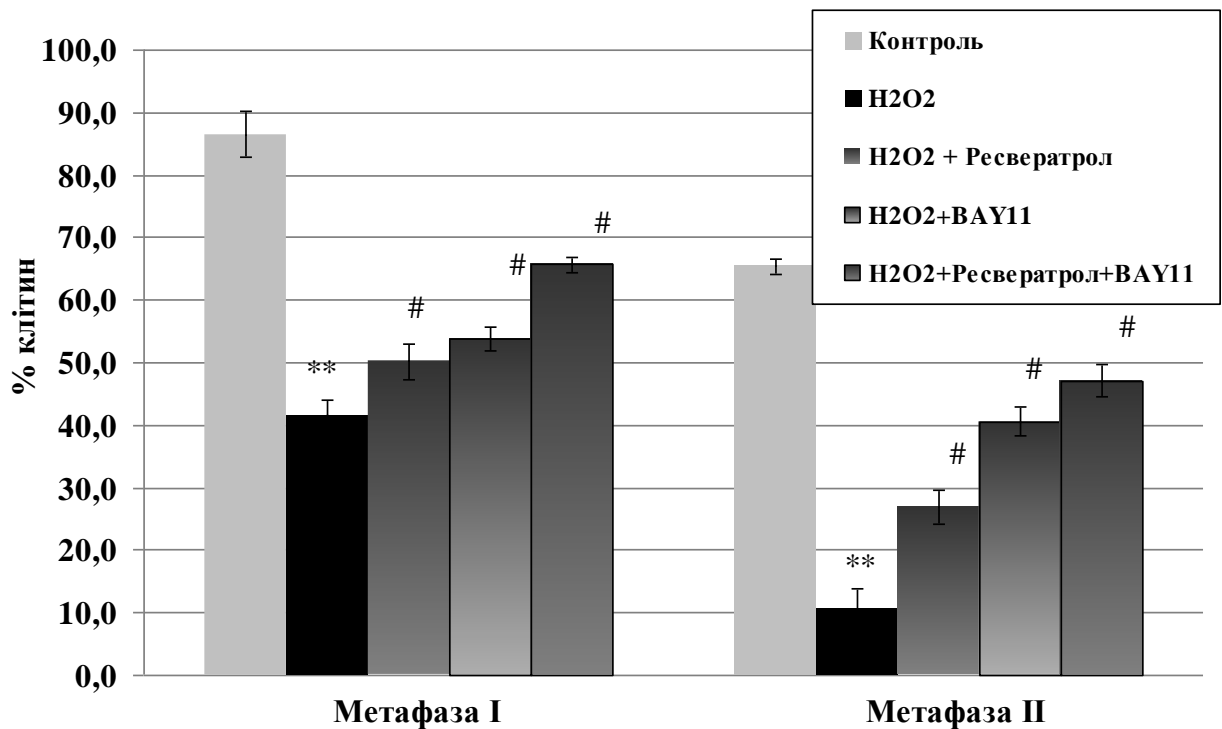


Рисунок. 4.3. Вплив ресвератролу та BAY11-7082 на мейотичне дозрівання ооцитів мишей в умовах оксидативного стресу *in vitro*.

Примітка: ** – $P < 0,01$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контролі; # – $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у групі H₂O₂.

В умовах оксидативного стресу *in vitro* додавання ресвератролу та BAY 11-7082 у середовище культивування призводило до збільшення кількості живих клітин ФОО та зменшення цих клітин із ознаками апоптозу та некрозу (рис. 4.4.).

Так, кількість живих клітин після культивування у середовище з ресвератролом збільшувалася на 17,4% та становила $60,4 \pm 1,4\%$ проти $43,0 \pm 1,3\%$ ($P < 0,05$; $N=7$) без впливу ресвератролу, відповідно; кількість клітин з ознаками апоптозу зменшилася на 11,0% – $32,3 \pm 0,8\%$ порівняно із $43,3 \pm 1,0\%$ без впливу ресвератролу ($P < 0,05$; $N=7$) (рис.4.4).

Культитивування з ВАУ 11-7082 призводило до збільшення живих клітини ФОО на 15,1% – 58,1±0,8% порівняно із 43,0±1,3% без такого впливу ($P<0,05$; $N=7$), а рівень апоптозу знижувався на 15,4% та складав 27,9±1,6% порівняно із 43,0±1,3% без такого впливу, відповідно ($P<0,05$; $N=7$).

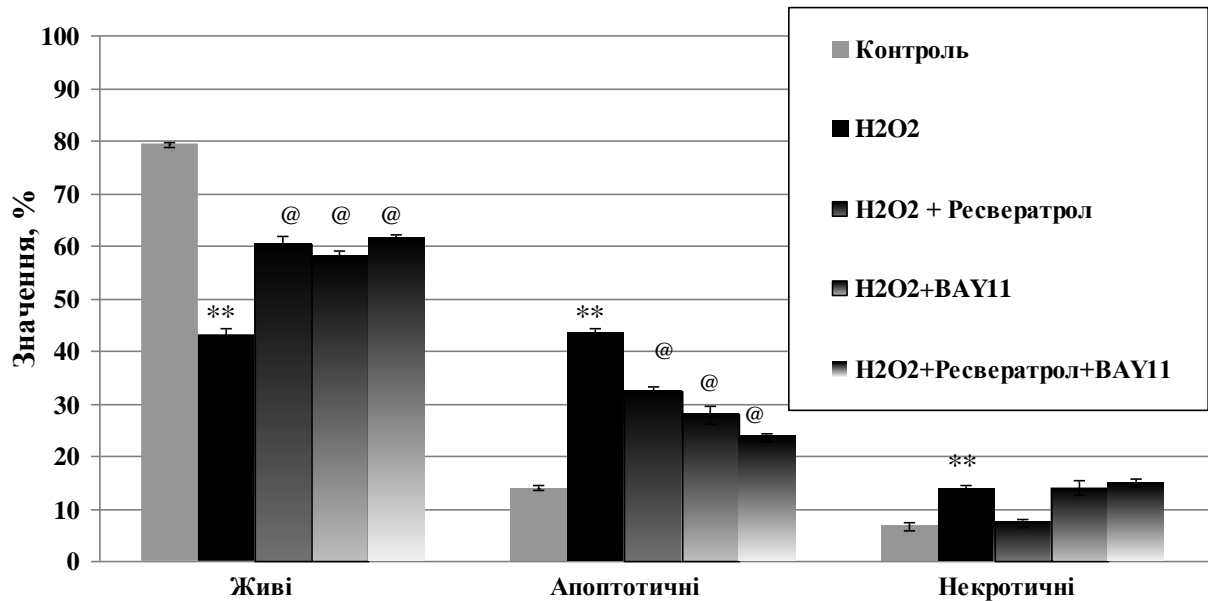


Рисунок. 4.4. Вплив ресвератролу і ВАУ11-7082 на життєздатність клітин ФОО в умовах оксидативного стресу *in vitro*.

Примітка: ** – $P<0,01$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контролі; @ – $P<0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у групі H₂O₂.

Окрім цього, нами встановлено, що одночасний вплив ресвератролу та ВАУ 11-7082 на клітини ФОО за цих самих експериментальних умов призводив до збільшення відсотка живих клітин на 18,5% – 61,5±0,7% проти 43,0±1,3% ($P<0,05$; $n=7$) за відсутності такого впливу, та зменшення частки клітин ФОО з ознаками апоптозу на 19,7% – 23,6±0,7% проти 43,3±1,0% без такого впливу, відповідно ($P<0,05$; $n=7$) (рис.4.4.) [179].

Таким чином, встановлено, що в умовах оксидативного стресу *in vitro*

застосування ресвератролу (20 μM), ВАУ11-7082 (5 μM) та їх сумісний вплив вірогідно покращує параметри мейотичного дозрівання ооцитів, а також зменшує рівень клітинної загибелі фолікулярних клітин, а саме: збільшується частка живих клітин ФОО, а кількість цих клітин з морфологічними ознаками апоптозу зменшується.

Отже, оцінюючи вплив активатора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин їх фолікулярного оточення в умовах оксидативного стресу *in vitro*, зроблено наступне **узагальнення**: в умовах оксидативного стресу *in vitro* транскрипційний фактор NF- κ B бере участь в механізмі дії ресвератролу (активатор сиртуїна 1) в процесі мейотичного дозрівання ооцитів і загибелі клітини ФОО.

РОЗДІЛ 5

Функціонування клітин яєчника в умовах ЕСАУ

Існують припущення, що аутоімунне ураження нирок здатне впливати як прямо, шляхом дії безпосередньо на ооцити та скоротливу активність матки, так і шляхом опосередкованих механізмів [158, 159]. Тому наступним завданням цієї роботи було дослідити вплив імунізації гомогената нирки (модель ЕСАУ) на функціонування клітин яєчника, а саме: на зміни параметрів мейотичного дозрівання ооцитів та загибель клітин їх фолікулярного оточення, особливості розподілу одностраних розривів ДНК ядер клітин ФОО, а також на зміни в експресії специфічних генів гіалурон синтази 2 (HAS2) циклооксигенази-2 (COX2) та білку гремлін 1 (Grem1) на рівні мРНК у клітинах ФОО з метою оцінки моделі ЕСАУ як адекватної для подальшого вивчення впливу аутоімунного ураження на системи організму.

5.1. Мейотичне дозрівання ооцитів в умовах ЕСАУ

Встановлено, що в умовах ЕСАУ кількість ооцитів зменшується до $10,3 \pm 0,4$ шт, які виділяли з одного яєчника тварин порівняно з $15,2 \pm 0,4$ шт ($P < 0,01$; $n=14$) у контрольній групі тварин (рис. 5.1.).

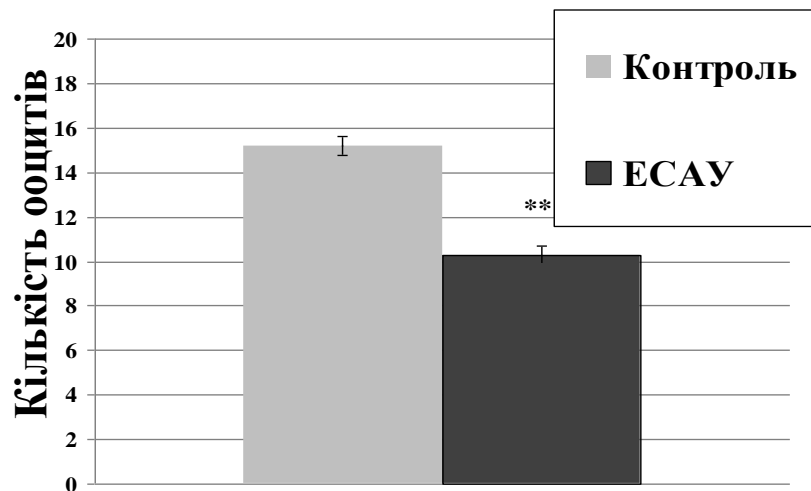


Рисунок 5.1. Кількість ооцитів, які виділяли з одного яєчника в умовах ЕСАУ.

Примітка: ** – $P < 0,01$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контрольній групі.

В умовах ЕСАУ мейотичне дозрівання пригнічується як на стадії метафаза I, так і на стадії метафаза II, а саме, зменшується кількість ооцитів, які розчинили зародковий пухирець (метафаза I) і сформували перше полярне тільце (метафаза II), що складає, відповідно $30,3 \pm 1,1\%$ ($P < 0,001$; $N=14$) і $25,9 \pm 1,5\%$ ($P < 0,001$; $N=14$), тоді як у контролі, відповідно, $76,4 \pm 3,2\%$ і $53,8 \pm 1,2\%$ (рис. 5.2.) [1, 10].

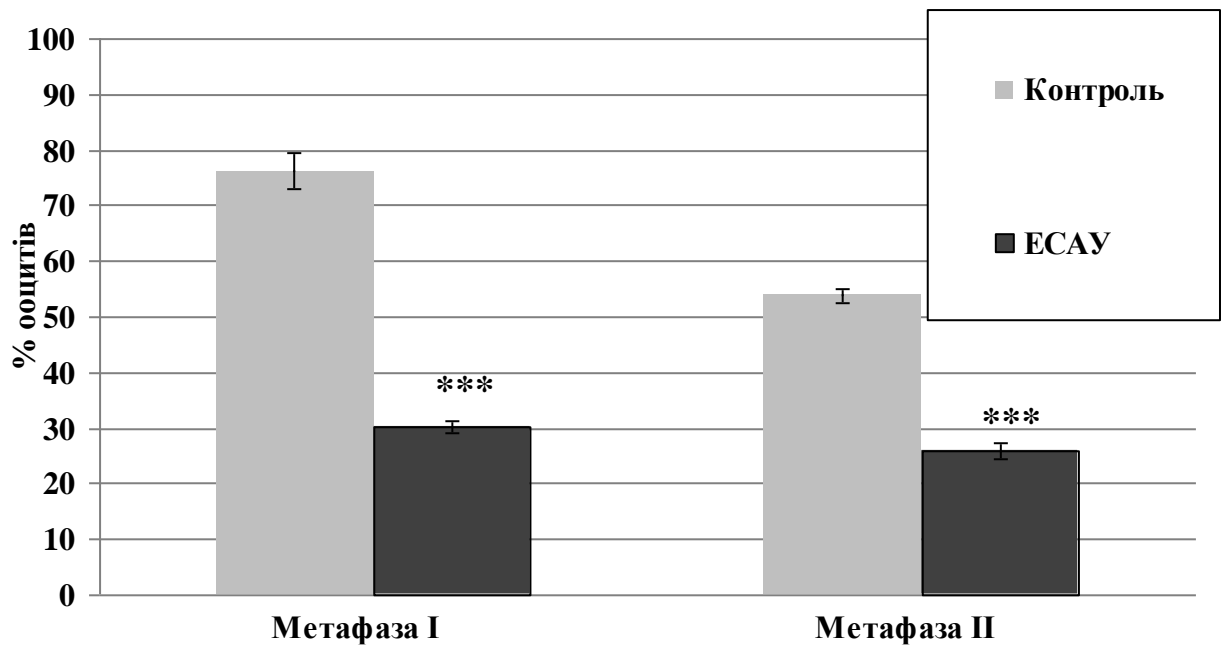


Рисунок. 5.2. Мейотичне дозрівання ооцитів в умовах ЕСАУ.

Примітка: *** – $P < 0,001$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контрольній групі.

Таким чином, в умовах ЕСАУ відбувається пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів *in vitro* на обох стадіях.

5.2. Життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах ЕСАУ

В умовах ЕСАУ спостерігається посилення клітинної загибелі: кількість живих клітин ФОО зменшується до $41,9 \pm 0,5\%$ ($P < 0,001$; $N=14$) порівняно з $74,2 \pm 1,2\%$ у контрольній групі тварин.

Відмічено збільшення кількості клітин ФОО з морфологічними ознаками апоптозу до $40,3 \pm 0,7\%$ ($P < 0,001$; $n=14$) порівняно з $19,0 \pm 0,8\%$ клітин в контролі.

Встановлено підвищення рівня некрозу клітин ФОО до $17,8 \pm 0,6\%$ ($P < 0,001$; $n=14$) порівняно з контрольною групою $6,8 \pm 0,4\%$ (рис.5.3.) [10].

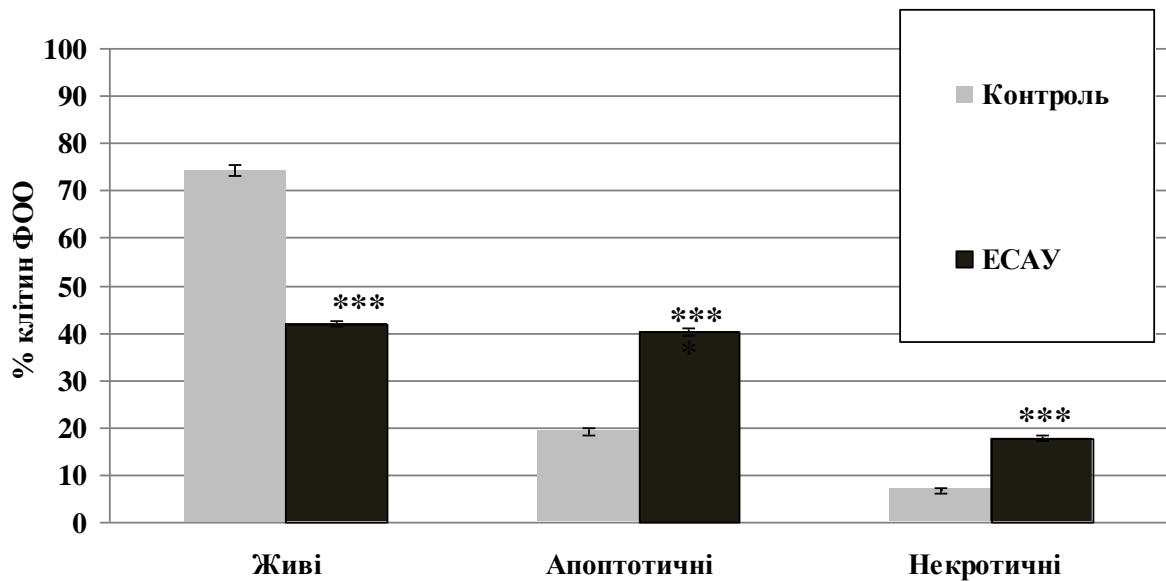


Рисунок. 5.3. Кількість живих, апоптотичних і некротичних клітин ФОО в умовах ЕСАУ.

Примітка: *** – $P < 0,001$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контрольній групі.

Таким чином, в умовах ЕСАУ відбувається пригнічення параметрів життєздатності клітин ФОО, а саме частка живих клітин зменшується, а частка клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу зростає [18], що може бути причиною порушення мейотичного дозрівання ооцитів.

5.3. Експресія генів COX2, Grem1 та HAS2 у клітинах ФОО в умовах ЕСАУ

Відомо, що HAS2, COX2 і Grem1 задіяні у процес овуляції. HAS2 і COX2 є ключовими ферментами, необхідними для кумулюсного розширення. Тому нами було досліджено зміни в експресії специфічних генів hyaluronan synthase 2 (HAS2) cyclooxygenase-2 (COX2) та gremlin 1 (Grem1) на рівні

мРНК в клітинах ФОО у мишей, що дає можливість визначити ступінь зрілості ооцита (за здатністю ооцита формувати перше полярне тільце) (рис. 5.4.).

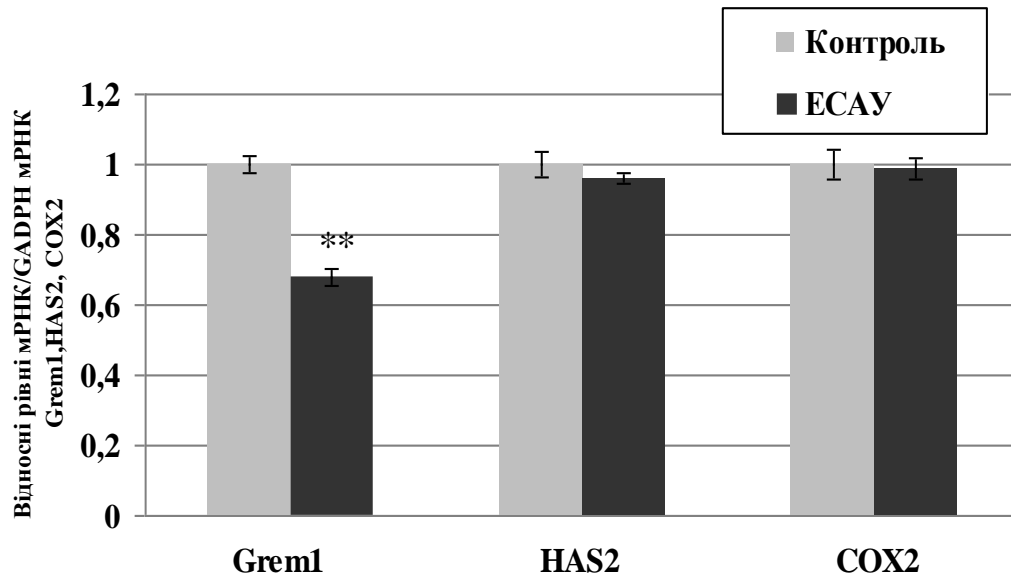


Рисунок. 5.4. Експресія специфічних оваріальних генів *Grem1*, *HAS2*, *COX2* на рівні мРНК у клітинах ФОО в умовах ЕСАУ.

Примітка: ** – $P < 0,01$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контрольній групі.

Встановлено, що в умовах ЕСАУ відбувається зниження експресії гену *Grem1* в 1,47 разів, експресія *HAS2* та *COX2* вірогідно не змінювалася, 1,14 та 1,06 разів, відповідно. Зміна експресії генів *HAS2*, *COX2* і *Grem1* на рівні мРНК у клітинах ФОО показана на (рис. 5.4.) [10].

Таким чином, в умовах ЕСАУ відбуваються зміни у експресії досліджуваних генів *COX2*, *Grem1* та *HAS2* у клітинах ФОО. Зміна експресії гена *Grem1* може стати характерним показником порушення оваріальної функції.

5.4. Оцінка цілісності ДНК у ядрах клітин ФОО в умовах ЕСАУ

Встановлено, що в умовах ЕСАУ пошкоджується ДНК ядер клітин ФОО: зменшується кількість клітин з ядрами 1-го та 0-го класів $1,1 \pm 1,0\%$ ($P < 0,01$; $N=9$) при $12,4 \pm 2,3\%$ у контролі та $0,2 \pm 0,7\%$ ($P < 0,01$; $N=9$) при $84,6 \pm 4,0\%$ клітин у контролі, відповідно. В умовах ЕСАУ частка клітин з ядрами 4-го класу зростає до $74,7 \pm 4,2\%$ ($P < 0,01$; $N=9$) порівняно з $0,2 \pm 0,5\%$ у контролі. Частка клітин з ядрами 3-го класу при ЕСАУ збільшувалася до $19,8 \pm 4,0\%$ ($P < 0,01$; $N=9$) при $0,6 \pm 0,9\%$ у контролі. Частка клітин з ядрами 2-го класу достовірно не змінюється і становить $4,2 \pm 1,6\%$ в умовах ЕСАУ порівняно з $2,2 \pm 1,9\%$ клітин у контролі.

Більшість комет ядер клітин ФОО із одностримерними розривами ДНК віднесено до 4 класу, який характеризує максимальне ушкодження ДНК (рис. 5.5.)

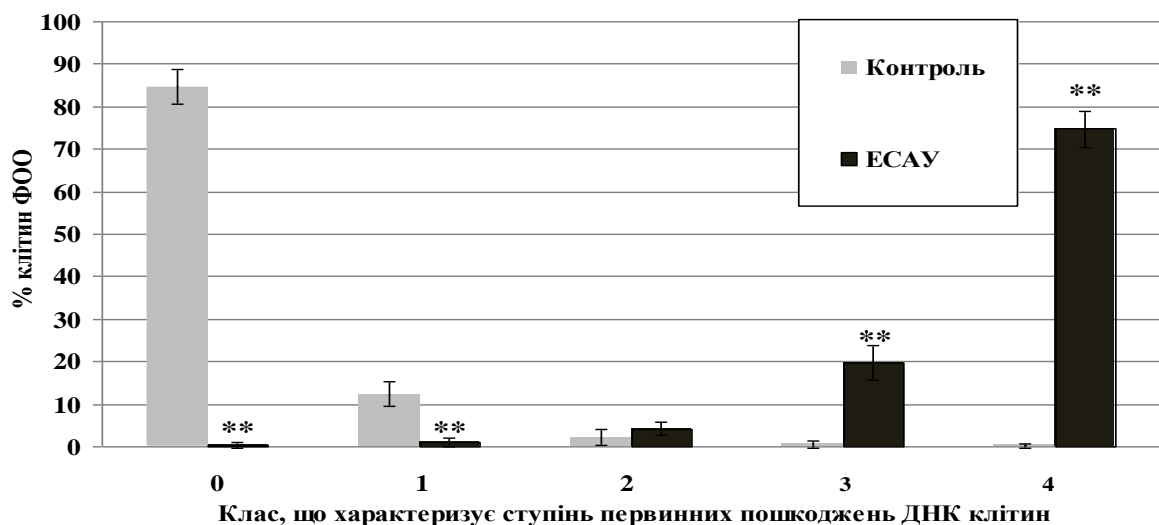


Рисунок. 5.5. Цілісність ДНК клітин ФОО в умовах ЕСАУ. Розподіл комет за класами, %

Примітка: ** – $P < 0,01$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контрольній групі.

Встановлено, що в умовах ЕСАУ кількість клітин ФОО із пошкодженою ДНК становить $94,5\%$ ($P < 0,01$; $N=9$), а $I_{ДК} = 3,7$, що свідчить

про зростання пошкодження ДНК. При цьому $I_{\text{ДК}}$ для контрольної групи тварин становив 0,2 [4, 11].

Таким чином, ЕСАУ призводить до збільшення кількості однострункових розривів ДНК ядер клітин ФОО, що свідчить про пошкодження ДНК цих клітин.

Отже, оцінюючи функціональний стан яєчника в умовах ЕСАУ зроблено наступне **узагальнення**.

Спостерігається пошкодження ооцитів – пригнічення їх мейотичного дозрівання *in vitro* на обох стадіях (метафаза I, метафаза II), а також відбувається ослаблення життєздатності клітин ФОО: зменшується частка живих клітин і зростає частка клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу. Відбуваються зміни у експресії оваріальних генів COX2, Grem1 та HAS2 у клітинах ФОО. ЕСАУ призводить до пошкодження геному клітин ФОО – збільшується кількість цих клітин із максимальним рівнем первинних пошкоджень ДНК.

РОЗДІЛ 6

Вплив модуляторів сиртуїнів на мейотичне дозрівання ооцитів, життєздатність клітин їх фолікулярного оточення та розподіл однострункових розривів ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах ЕСАУ

Натуральні та синтетичні сполуки, що є активаторами SIRT1, відіграють важливу роль у запобіганні захворювань різної етіології. Тому наступне завдання полягало у дослідженні впливу модуляторів активності сиртуїнів (активатор – ресвератрол, інгібітор – нікотинамід) в умовах ЕСАУ на параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин їх фолікулярного оточення та на розподіл однострункових розривів ДНК ядер клітин ФОО.

6.1. Вплив модуляторів сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів в умовах ЕСАУ

Встановлено, що в умовах ЕСАУ ресвератрол впливає на збільшення відсотка ооцитів, які розчинили зародковий пухирець і сформували перше полярне тільце до, відповідно, $48,6 \pm 6,9\%$ і $41,0 \pm 5,0\%$ ($P < 0,01$; $N=7$) порівняно, відповідно, $36,8 \pm 5,1\%$ і $23,6 \pm 4,3\%$ у групі з ЕСАУ (рис.6.1.) [15, 20].

Таким чином, в умовах ЕСАУ вплив активатора сиртуїнів – ресвератролу *in vitro* зумовлює покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, як на стадії метафаза I, так і на стадії метафаза II.

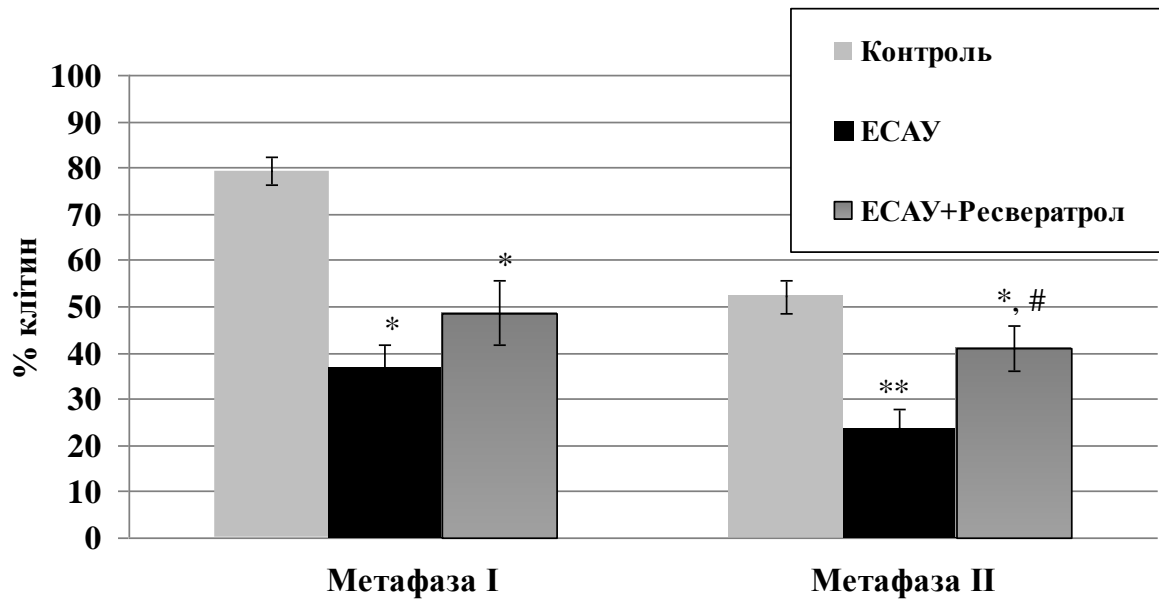


Рисунок. 6.1. Мейотичне дозрівання (метафази I та II) ооцитів в умовах ЕСАУ та застосування ресвератролу

Примітка: ** – $P < 0,01$; * – $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контрольній групі. # – $P < 0,01$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних порівняно з такими величинами у групі з ЕСАУ.

Не встановлено вірогідних змін у кількості ооцитів, що розчиняли зародковий пухирець (стадія метафази I) та формували перше полярне тільце (метафаза II) у групі тварин в умовах ЕСАУ при застосуванні інгібітору сиртуїнів – нікотинаміду.

Так, нікотинамід не мав вірогідного впливу на відсоток ооцитів, які розчиняли зародковий пухирець (в умовах ЕСАУ – $36,8 \pm 5,1\%$ та $37,1 \pm 5,0\%$ у групі тварин при застосуванні нікотинаміду в умовах ЕСАУ) та формували перше полярне тільце (в умовах ЕСАУ $23,6 \pm 4,3\%$ та $15,4 \pm 6,0\%$ у групі тварин при застосуванні нікотинаміду в умовах ЕСАУ) (рис.6.2.) [15].

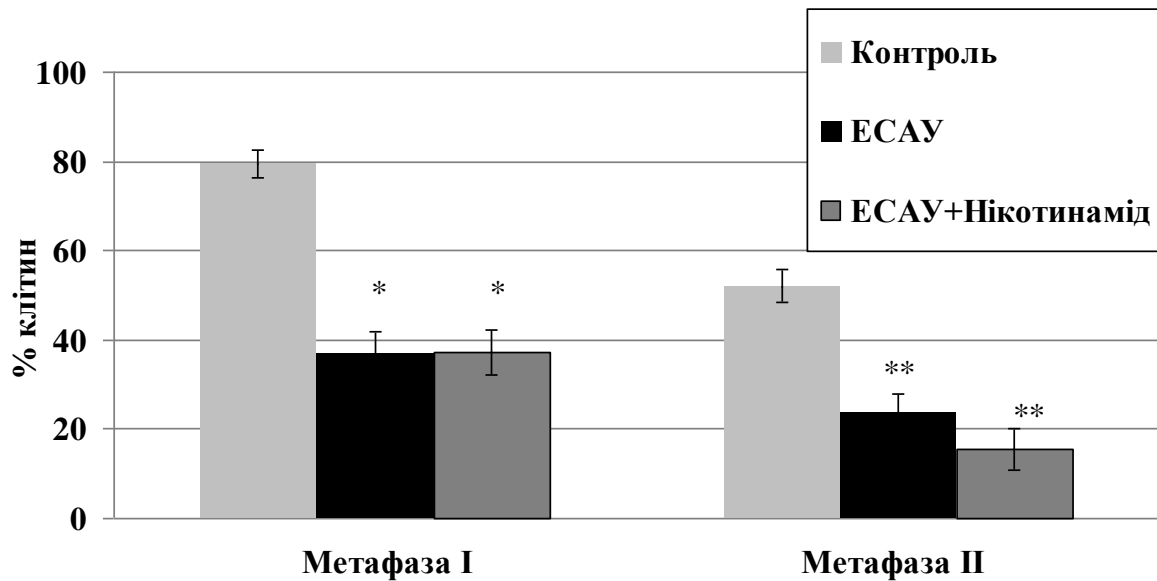


Рисунок. 6.2. Мейотичне дозрівання (метафази I та II) ооцитів в умовах ЕСАУ та застосування нікотинамід.

Примітка: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контрольній групі.

Таким чином, у тварин в умовах ЕСАУ застосування інгібітора сиртуїнів – нікотинамід не впливає на покращення процесу мейотичного дозрівання ооцитів.

6.2. Вплив модуляторів сиртуїнів на життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів мишей в умовах ЕСАУ

В клітинах ФОО в умовах ЕСАУ застосування ресвератролу ($20 \mu\text{M}$) призводить до зниження клітинної загибелі – збішується кількість живих клітин, а частка клітин з морфологічними ознаками апоптозу та некрозу зменшується порівняно з величинами у групі з ЕСАУ [11, 16].

Так, відсоток живих клітин при культивуванні з ресвератролом у групі тварин в умовах ЕСАУ становив $49,7 \pm 0,8\%$ ($P < 0,05$; $N=12$), тоді як у тварин в умовах ЕСАУ – $39,2 \pm 0,8\%$. Кількість клітин ФОО із морфологічними ознаками апоптозу становила для групи тварин в умовах ЕСАУ – $38,5 \pm 2,0\%$,

а для групи тварин в умовах ЕСАУ при культивуванні з ресвератролом – $32,1 \pm 0,7\%$ ($P < 0,05$; $N=12$). Відсоткові показники некрозу клітин ФОО становили, відповідно, $22,3 \pm 1,6\%$ та $18,2 \pm 0,3\%$ ($P < 0,05$; $N=12$) для групи тварин в умовах ЕСАУ і таких в умовах ЕСАУ при застосуванні ресвератролу (рис.6.3.).

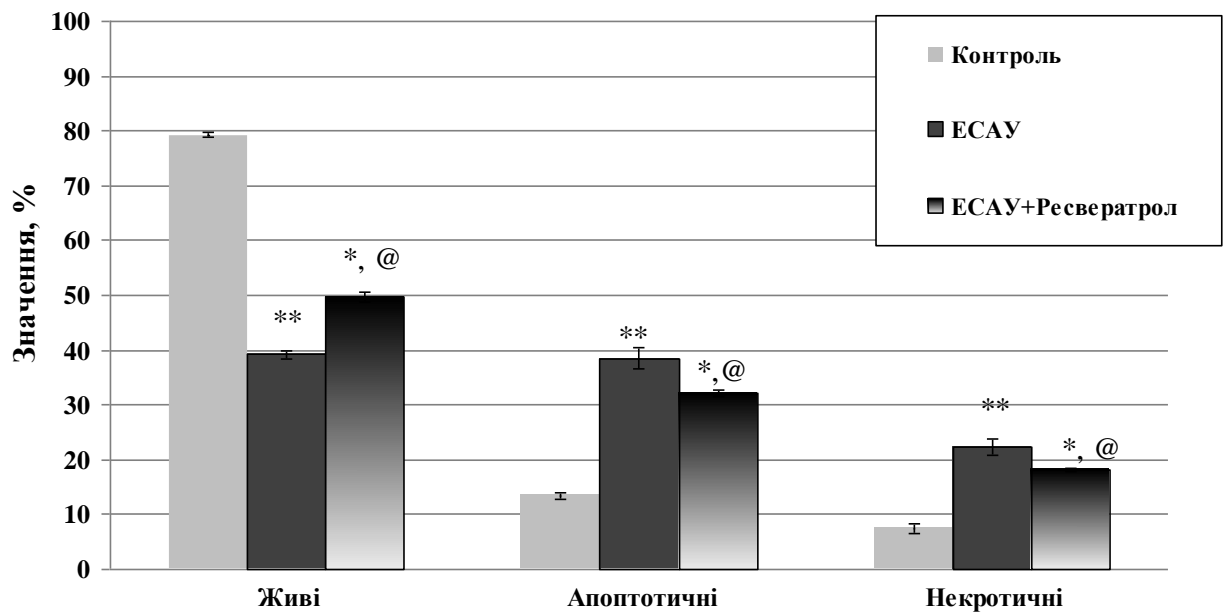


Рисунок. 6.3. Життєздатність клітин ФОО та шляхи їх загибелі в умовах ЕСАУ при застосуванні ресвератролу.

Примітка: * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контрольній групі. @ – $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у групі ЕСАУ.

Таким чином, культивування клітин ФОО у середовищі із активатором сиртуїнів – ресвератролом призводить до підвищення відсотка живих та зниження показників апоптотичної та некротичної загибелі клітин ФОО у тварин в умовах ЕСАУ.

Вірогідного впливу на життєздатність кліти ФОО у групи тварин в умовах ЕСАУ при застосуванні нікотинамиду не встановлено.

Так, відсоток живих клітин ФОО у групі тварин в умовах ЕСАУ при культивуванні з нікотинамідом становив $36,1 \pm 1,8\%$ порівняно із $39,2 \pm 0,8\%$ в клітинах тварин в умовах ЕСАУ. Кількість клітин ФОО із морфологічними ознаками апоптозу становила для групи тварин в умовах ЕСАУ при культивуванні з нікотинамідом – $38,7 \pm 0,9\%$ порівняно із $38,5 \pm 2,0\%$ для групи тварин в умовах ЕСАУ, та некрозу – $25,2 \pm 1,4\%$ та $22,3 \pm 1,6\%$, відповідно.

Таким чином, у тварин в умовах ЕСАУ застосування інгібітора сиртуїнів – нікотинамїду не призводить до покращення життєздатності кліти ФОО.

6.3. Вплив модуляторів сиртуїнів на цілісність ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів мишей в умовах ЕСАУ

Досліджено розподіл однострижкових розривів ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів у тварин в умовах ЕСАУ при застосуванні активатора та інгібітора сиртуїнів (табл.6.1.; 6.2) [6, 180].

Таблиця 6.1

Оцінка цілісності ДНК ядер клітин ФОО в умовах ЕСАУ та застосуванні ресвератролу

Група тварин	Розподіл ДНК-комет клітин ФОО за класами, %				
	0	1	2	3	4
КОНТРОЛЬ	$81,4 \pm 2,8$	$14,6 \pm 1,1$	$2,2 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,1$
ЕСАУ	$4,4 \pm 0,9^*$	$4,6 \pm 1,3^*$	$4,0 \pm 0,8^*$	$15,6 \pm 2,4^*$	$71,4 \pm 2,6^*$
РЕСВЕРАТРОЛ	$82,0 \pm 2,9$	$14,3 \pm 0,8$	$2,3 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,1$
ЕСАУ+ РЕСВЕРАТРОЛ	$6,2 \pm 0,7$	$7,9 \pm 0,9^\#$	$10,8 \pm 0,8^\#$	$17,3 \pm 1,1$	$57,8 \pm 1,8^\#$

Примітка: * – $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно контролю; # – $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно ЕСАУ.

Встановлено, що в умовах ЕСАУ культивування з ресвератролом призводить до збільшення частки клітин ФОО з ядрами 1-го класу до $7,9 \pm 0,9\%$ ($P < 0,01$; $N=7$) відносно $4,6 \pm 1,3\%$ у групі з ЕСАУ та до зменшення частки клітин з ядрами 4-го класу, що характеризує максимальний рівень ушкодження ДНК, становить, відповідно, $57,8 \pm 1,8\%$ ($P < 0,05$; $N=7$) відносно величин у групі з ЕСАУ $71,4 \pm 2,6\%$ (табл.6.1.) [181].

Таким чином, у тварин в умовах ЕСАУ застосування ресвератролу ($20 \mu\text{M}$) призводить до зниження кількості клітин ФОО із максимальним ступенем ушкодження ДНК, порівняно з такими величинами у тварин в умовах ЕСАУ.

Вірогідного впливу застосування нікотинаміду при культивуванні клітин ФОО від тварин в умовах ЕСАУ порівнянно з такими величинами у тварин в умовах ЕСАУ не встановлено. Так, кількість клітин ФОО 4-го класу, що характеризує максимальний рівень ушкодження ДНК, становила $71,4 \pm 2,6\%$ для групи мишей в умовах ЕСАУ та $71,6 \pm 2,1\%$ групи тварин в умовах ЕСАУ при застосуванні нікотинаміду (табл.6.2.).

Таблиця 6.2.

Оцінка цілісності ДНК ядер клітин ФОО в умовах ЕСАУ та при застосуванні нікотинаміду

Група тварин	Розподіл ДНК-комет клітин ФОО за класами, %				
	0	1	2	3	4
КОНТРОЛЬ	$81,4 \pm 2,8$	$14,6 \pm 1,1$	$2,2 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,2$	$0,4 \pm 0,1$
ЕСАУ	$4,4 \pm 0,9^*$	$4,6 \pm 1,3^*$	$4,0 \pm 0,8^*$	$15,6 \pm 2,4^*$	$71,4 \pm 2,6^*$
НІКОТИНАМІД	$77,8 \pm 2,3$	$15,4 \pm 1,4$	$3,5 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,1$
ЕСАУ + НІКОТИНАМІД	$3,1 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,4$	$4,4 \pm 0,6$	$16,4 \pm 1,8$	$71,6 \pm 2,1$

Примітка: * – $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно таких величин у контролі.

Таким чином, у тварин в умовах ЕСАУ застосування нікотинаміду (5mM) не впливає на рівень пошкоджень ДНК в ядрах клітин ФОО.

Отже, оцінюючи вплив модуляторів сиртуїнів на функціонування клітин яєчника в умовах ЕСАУ зроблено наступне **узагальнення**.

Застосування активатора сиртуїнів – ресвератролу (20 μ M) *in vitro* в умовах ЕСАУ зумовлює покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, а також зниження клітинної загибелі ФОО та зменшення частки клітин із морфологічними ознаками апоптозу і некрозу та зниження кількості клітин ФОО із максимальним ступенем пошкодження ДНК; не встановлено вірогідного впливу інгібітора сиртуїнів – нікотинаміду (5 mM) *in vitro* на покращення процесу мейотичного дозрівання ооцитів у групи тварин в умовах ЕСАУ та на життєздатність і рівень пошкоджень ДНК в ядрах клітин ФОО.

РОЗДІЛ 7

Вплив введення НЧС на функціональний стан яєчника в умовах ЕСАУ

В останнє десятиліття використання наночастинок срібла (НЧС) у різних галузях промисловості збільшується з кожним роком. Тому питання про вплив наночастинок срібла на репродуктивну систему як здорового організму, так і при наявності в ньому системного аутоімунного ураження, є актуальним. У зв'язку з цим наступне завдання полягало у дослідженні ефекту введення НЧС в умовах ЕСАУ на параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин їх фолікулярного оточення, а також на розподіл однопітків розривів ДНК ядер клітин ФОО.

7.1. Вплив введення НЧС на функціональний стан яєчника

У цьому розділі представлено результати дослідів, у котрих вивчали зміни параметрів мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатності клітин їх фолікулярного оточення в умовах одно-, п'яти- та десятикратного внутрішньовенного введення наночастинок срібла (2,0 мг/кг та 4,0 мг/кг). За результатами даного етапу підбирали оптимальну концентрацію наночастинок срібла для застосування під час подальших досліджень [7,124, 176].

Вплив НЧС на мейотичне дозрівання ооцитів. Одно- та п'ятикратне введення НЧС (2 мг/кг та 4 мг/кг) не впливало на розчинення зародкового пухирця (метафаза I) та формування першого полярного тільця (метафаза II) ооцитами. Десятикратне введення НЧС (2,0 мг/кг та 4,0 мг/кг) призводило до зменшення кількості ооцитів, здатних до формування першого полярного тільця (метафаза II), відповідно, до $36,78 \pm 2,83\%$ при $56,93 \pm 3,84\%$ в контролі ($P < 0,01$; $n=8$) і до $28,02 \pm 3,05\%$ при $56,63 \pm 4,24\%$ в контролі ($P < 0,01$; $N=8$).

Таким чином, десятикратне введення НЧС (2,0 мг/кг та 4,0 мг/кг) призводить до пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів у мишей .

Вплив НЧС на життєздатність клітин ФОО. Дані про кількість клітин фолікулярного оточення ооцитів (живих, з морфологічними ознаками апоптотичної і некротичної загибелі) в умовах введення НЧС (2 мг/кг та 4 мг/кг) представлені в таблиці 7.1.

Таблиця 7.1

Життєздатність клітини ФОО в умовах введення НЧС (2,0 та 4,0 мг/кг)
(M±m)

Доза	Група тварин	Живі, %	Апоптоз, %	Некроз, %
2 мг/кг	Контроль n=8	79,33±1,22	19,0 ± 0,89	1,67 ± 0,82
	1-кратне n=8	70,57 ± 2,37*	28,0 ± 3,11*	1,43 ± 0,79
	5-кратне n=8	66,20 ± 1,64*	32,4 ± 1,14**	1,40 ± 1,14
	10-кратне n=8	62,80 ± 1,64**	33,40 ± 0,89**	3,80 ± 0,84*
4 мг/кг	Контроль n=8	79,33±1,22	19,0 ± 0,89	1,67 ± 0,82
	1-кратне n=8	70,0 ± 1,0*	28,20 ± 1,48*	1,80 ± 0,84
	5-кратне n=8	69,80 ± 1,64*	28,00 ± 2,35*	2,20 ± 1,30
	10-кратне n=8	60,40 ± 1,14*	34,80 ± 1,48*	4,80 ± 0,84*

Примітка: * – P<0,05; ** – P<0,01, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно контролю.

Встановлено, що введення НЧС (2,0 мг/кг та 4,0 мг/кг) викликає вірогідне зменшення кількості живих клітин фолікулярного оточення ооцитів.

Таким чином, в умовах одно- та п'ятикратного введення НЧС (2,0 мг/кг та 4,0 мг/кг) збільшується кількість апоптотичних клітин, а при десятикратному – апоптотичних і некротичних клітин фолікулярного оточення ооцитів.

Для подальших досліджень впливу введення НЧС нами обрана доза 2,0 мг/кг, оскільки вона не перевищує величин, які використовувалися в попередніх дослідженнях і не викликали значних побічних ефектів у тварин [207, 212].

7.2. Вплив введення наночастинок срібла на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО в умовах ЕСАУ

Встановлено, що введення НЧС не впливає на ооцити, а застосування НЧС в умовах ЕСАУ призводить до зростання кількості ооцитів, які виділялися з одного яєчника (таблиця 7.2).

Таблиця 7.2

Кількість ооцитів, які виділялися з одного яєчника умовах ЕСАУ і введення наночастинок срібла, шт

Контроль n=8	ЕСАУ n=8	НЧС n=8	ЕСАУ+НЧС n=8
17,3±0,6	9,8±1,3 *	17,4 ± 1,2	15,0 ± 0,8 #

Примітка: * – $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно контролю; # – $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно ЕСАУ.

Показано, що введення НЧС не впливає на процес мейотичного дозрівання ооцитів, тоді як застосування НЧС в умовах ЕСАУ призводить до зростання кількості ооцитів, як на стадії метафази I, так і на стадії метафази II порівняно з ооцитами в умовах ЕСАУ (без застосування НЧС) (рис. 7.1 А та Б) [35].

Так, після застосування НЧС в умовах ЕСАУ, кількість ооцитів, що розчинили зародковий пухирець (пройшли метафазу I), збільшилася на 14,0% ($P < 0,05$; $N=8$) і становила 69,4±4,6% після застосування НЧС в умовах ЕСАУ

порівняно із $55,0 \pm 2,0\%$ без застосування НЧС, відповідно. А кількість ооцитів, що сформували I полярне тільце (пройшли метафазу II) збільшилася на 8,0% ($P < 0,05$; $N=8$) та становила $57,5 \pm 5,0\%$, порівняно із $49,5 \pm 0,8\%$, без застосування НЧС в умовах ЕСАУ, відповідно (рис. 7.1.Б) [17].

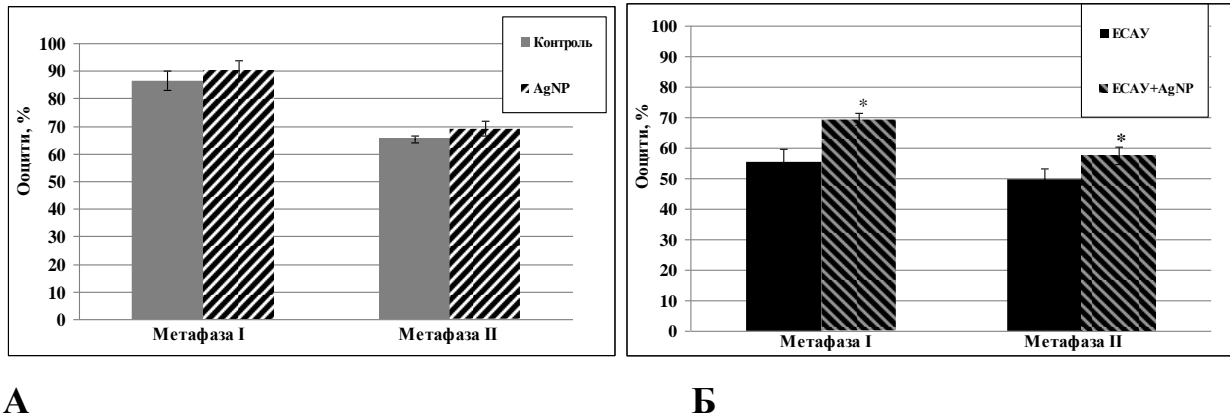


Рисунок. 7.1. Вплив наночастинок срібла на мейотичне дозрівання ооцитів в умовах ЕСАУ.

Примітка: * – $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних по відношенню до ЕСАУ.

А – вплив введення НЧС на клітини тварин контрольної групи;

Б – вплив введення НЧС на клітини тварин з ЕСАУ.

Встановлено, що в умовах ЕСАУ відбувається зменшення кількості живих клітин ФОО та збільшується кількість клітин з морфологічними ознаками апоптотичної та некротичної загибелі.

Введення НЧС в умовах ЕСАУ призводить до збільшення кількості живих клітин ФОО та зменшення частки клітин з морфологічними ознаками апоптозу по відношенню до величин групи з ЕСАУ (таблиця 7.3) [14].

Таблиця 7.3.

Вплив введення наночастинок срібла на життєздатність клітин ФОО в умовах ЕСАУ

Група тварин	Живі, %	Апоптоз, %	Некроз, %
Контроль n=8	79,5 ± 0,7	12,5 ± 1,8	8,0 ± 0,7
ЕСАУ n=8	41,8 ± 0,3**	35,2 ± 1,8**	23,0 ± 1,4**
НЧС n=8	83,5 ± 0,1	10,8 ± 0,3	5,6 ± 0,35
ЕСАУ+ НЧС n=8	62,8 ± 1,5*#	19,5 ± 0,9*#	17,7 ± 0,8**

Примітка. * – P<0,05; ** – P<0,01, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних по відношенню до контролю; # – P<0,05, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних по відношенню до ЕСАУ.

Таким чином, не встановлено пригнічення мейотичного дозрівання ооцитами і життєздатності клітин ФОО в умовах введення НЧС (2,0 мг/кг). Застосування чотирикратного введення НЧС (2,0 мг/кг) в умовах ЕСАУ призводить до збільшення кількості ооцитів, які відновлюють мейоз та формують перше полярне тільце *in vitro*. Також збільшується кількість живих клітин та зменшується кількість клітин з морфологічними ознаками апоптотичної загибелі у фолікулярному оточенні ооцитів.

7.3. Вплив введення наночастинок срібла на пошкодження ДНК ядер клітин ФОО в умовах ЕСАУ

Нами встановлено, що в умовах ЕСАУ збільшується пошкодження ДНК в ядрах клітин ФОО. Введення НЧС не впливає на розподіл пошкодження ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцита порівняно з контролем. Застосування НЧС в умовах ЕСАУ призводить до зменшення частки клітин ФОО з ядрами 4-го і 3-го класу та збільшення частки цих

клітин з ядрами 1-го та 0-го класу пошкодження ДНК відносно величин у групі з ЕСАУ, що свідчить про зниження пошкодження їх ДНК (таблиця.7.4). [2, 176].

Таблиця 7.4

Оцінка пошкодження ДНК ядер клітин ФОО в умовах ЕСАУ і введення наночастинок срібла

Група тварин	Розподіл ДНК-комет за класами, %.				
	0	1	2	3	4
Контроль n=8	84,6±4,83	12,4±3,17	2,2±1,23	0,6±0,78	0,2±0,83
ЕСАУ n=8	0,2±0,57 *	1,1±2,26 *	4,2±1,18	19,8±1,14 *	74,7±5,32 *
НЧС n=8	80,7±7,54	8,5±1,67	4,4±1,24	3,9±1,17	2,5±1,22
ЕСАУ+ НЧС n=8	49,1±3,32 #	10,0±1,27 #	8,4±1,12	6,8±1,28 #	25,7±2,14 #

Примітка: * – $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх величин у групах даних відносно контролю; # – $P < 0,05$, вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно ЕСАУ.

Отже, оцінюючи функціональний стан яєчників умовах ЕСАУ та застосуванні НЧС, робимо наступні **узагальнення**. Введення тваринам НЧС не впливає на параметри мейотичне дозрівання ооцитів; не змінює клітинну загибель у ФОО та не впливає на ДНК ядер цих клітин. Застосування НЧС в умовах ЕСАУ призводить до збільшення кількості ооцитів, які відновлюють мейоз та формують перше полярне тільце *in vitro*, зменшується пригнічення параметрів життєздатності клітин ФОО, а частка клітин з морфологічними ознаками апоптозу знижується. Окрім цього, зменшується ступінь пошкодження ДНК клітин.

РОЗДІЛ 8

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Участь сиртуїнів у процесі мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів in vitro

Відомо, що процес дозрівання ооцитів ссавців регулюється гормонами, ростовими факторами, циклічними нуклеотидами та іншими речовинами, які впливають як на процес мейотичного дозрівання ооцитів, так і на клітини ФОО, що, як відомо, утворюють із ооцитом метаболічно єдину систему [45, 192].

Для підтримання метаболічного гомеостазу необхідна наявність у клітині високоорганізованої мережі кількох шляхів обміну глюкози, ліпідів та амінокислот. Мітохондрія інтегрує ці шляхи та є не тільки головним сайтом акумуляції клітинної енергії, але й продуцентом багатьох ключових метаболічних проміжних сполук. Окрім цього, якість та кількість мітохондрій вважаються основними маркерами якості ооцитів, оскільки зниження рівнів мітохондріальної ДНК і АТФ призводить до значного зниження потенціалу розвитку ооцитів [188, 204].

Як відомо, сиртуїни є сімейством NAD⁺-залежних ферментів, які відіграють важливу роль при адаптації клітин до метаболічного стресу. Мітохондріальний SIRT3 разом із ядерним SIRT1 регулюють декілька аспектів мітохондріальної фізіології шляхом контролю посттрансляційних модифікацій білка мітохондрій та транскрипції мітохондріальних генів, що є одним із шляхів покращення мейотичного дозрівання ооцитів [151, 183, 209, 213].

Ще одним можливим шляхом регуляції мітохондріальних функцій є зворотнє ацетилювання SIRT3 лізинових залишків мітохондріальних протеїнів [120].

Для того, щоб підтвердити або заперечити те, що вплив модуляторів сиртуїнів на мейотичного дозрівання ооцитів відбувається за участю

мітохондрій (на мітохондріальний потенціал), ми провели порівняльний аналіз процесу проходження ооцитами мейотичного дозрівання в умовах дії інгібітора аспартатного мітохондріального переносника PPT (концентрація 30 μM) та модуляторів активності SIRT1 та SIRT3: активатора ресвератролу (у концентрації 20 μM) та інгібітора нікотинаміду (у концентрації 5 mM). Отримані результати (розділ 3) дозволяють підтвердити припущення, що модулятори сиртуїнів впливають на мейотичне дозрівання ооцитів не за рахунок їх впливу на мітохондрії (на мітохондріальний потенціал).

При дослідженні життєздатність клітин ФОО в умовах впливу модуляторів сиртуїнів (ресвератролу (20 μM) та нікотинаміду (5 mM)) і дії PPT (30 μM) фіксували наступне: інгібітор сиртуїнів нікотинамід та інгібітор аспартатних мітохондріальних переносників – PPT призводять до зниження відсоткових показників живих клітин ФОО та підвищення показників апоптотичної та некротичної загибелі цих клітин (розділ 3). При цьому, в умовах спільної дії нікотинаміду та PPT, не відбувається посилення пригнічуючого впливу інгібітора сиртуїнів нікотинаміду на життєздатність клітин ФОО, що підтверджує те, що модулятор сиртуїнів впливає на клітини ФОО шляхом впливу на систему енергозабезпечення клітин – мітохондрію.

Ядерний фактор κB (NF- κB), який є основним індуктором запальних реакцій, був першим описаним фактором транскрипції еукаріотів, що здатний безпосередньо реагувати на H_2O_2 -індукований окислювальний стрес [172]. Деацетилювання та інактивація NF- κB за допомогою SIRT1 призводить до пригнічення сигнального шляху, відповідального за розвиток запального процесу і зниження рівня клітинних РФК, пригнічуючи таким чином розвиток запального процесу [96, 219].

Фактор транскрипції NF- κB відіграє ключову роль у регулюванні понад 150 генів-мішеней, в тому числі експресії запальних цитокінів, хемокінів, імунорецепторів та молекул адгезії клітин (CAM). BAY 11-7082 у концентрації 5-10 μM селективно і необоротно інгібує активацію NF- κB , блокуючи, TNF- α -індуковане фосфорилювання I κB - α (інгібітор κB - α), не

впливаючи на конститутивне фосфорилування I κ B- α . В результаті сполука інгібує TNF- α -індуковану поверхневу експресію молекул адгезії ICAM-1, VCAM-1 та E-селектину в ендотеліальних клітинах людини [62, 108, 144, 165]. З огляду на це, наступним етапом нашого дослідження було встановити рівень залученості ядерної ланки у механізмі дії сиртуїнів. Ми оцінювали мейотичне дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах дії активатора сиртуїнів ресвератролу й інгібітора NF- κ B - BAY 11-7082 *in vitro*.

Нами показано, що застосування ресвератролу та BAY 11-7082 не впливає на процес мейотичного дозрівання ооцитів і параметри життєздатності клітини ФОО *in vitro* (рис. 3.5.). Не встановлено вірогідної різниці у кількості клітин ФОО живих, з ознаками апоптозу і некрозу відносно таких величин в умовах впливу як активатора сиртуїнів ресвератролу (20 μ M), так й інгібітора NF- κ B - BAY11-7082 (5 μ M) (рис.3.6). Таким чином, встановлено, що впливи активатора сиртуїнів ресвератролу та інгібітора NF- κ B – BAY 11-7082 є однонаправленими.

Отже, підсумовуючи результати, представлені у розділі 3, робимо наступний **висновок**: *в умовах впливу in vitro інгібітор сиртуїнів нікотинамід діє на клітини ФОО за рахунок впливу на мітохондрії; в умовах дії активатора сиртуїнів ресвератролу параметри життєздатності клітин ФОО змінюються не за рахунок його впливу на мітохондрії клітин.*

Вплив активатора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах оксидативного стресу in vitro

Оксидативний стрес – складова частина патогенезу багатьох фізіологічних та патологічних процесів, що супроводжують як фізіологічні стани організму – наприклад, процес старіння, так і патологічні, наприклад, аутоімунні патології. РФК беруть участь у прямому пошкодженні ДНК

клітин та можуть порушувати процеси апоптозу, регуляцію шляхів передачі клітинних сигналів та редокс-баланс у клітинах [153, 208].

Також відомо, що РФК здатні індукувати апоптоз клітин фолікулярного оточення ооцитів шляхом активації ряду транскрипційних факторів, серед яких провідна роль належить FoxO1 [115, 119]. Сиртуїни є класом білків, які регулюють процеси старіння, транскрипції, апоптозу, а також відіграють важливу роль у реакції організмів на стрес шляхом активації антиоксидантної системи [153, 196]. Внаслідок цього вони здатні коригувати негативний вплив різноманітних патологічних процесів, зокрема оксидативного стресу на процес мейотичного дозрівання ооцитів [206].

Ми відтворили модель оксидативного стресу шляхом додавання у середовище культивування ооцитів та клітин ФОО перекису водню (H_2O_2) у концентрації 100 μM [208].

Нами показано, що в умовах оксидативного стресу спостерігається пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів. Встановлено, що в умовах впливу H_2O_2 *in vitro* і впливу ресвератрола зменшується пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів як на стадії розчинення зародкового пухирця (метафаза I), так і на стадії формування першого полярного тільця (метафаза II) на, відповідно, 9% і 17% порівняно з такими величинами в умовах оксидативного стресу. Більше того, в умовах оксидативного стресу пригнічення функції яєчників супроводжувалося суттєвими змінами життєздатності та загибеллю клітин ФОО.

Відомо, що в організмі ооцит підтримує тісний зв'язок з оточуючими його фолікулярними (кумулясними та гранулярними) клітинами через клітинні контакти – перехідні проміжки, які забезпечують надходження речовин, необхідних для метаболічних процесів в ооциті. За фізіологічних умов, що супроводжують оогенез (атрезія фолікулів, овуляція, вилучення аутореактивних лімфоцитів тощо), значна роль належить апоптозу, тому втручання в цей процес може призвести до негативних наслідків. Необхідно вирішувати питання доцільності пригнічення апоптозу в конкретній ситуації,

при різних видах патології яєчника, на різних її стадіях. З огляду на це, важливо вивчити загибель фолікулярних клітин яєчника, її шляхи та наслідки в нормі і за патологічних умов, особливо пов'язаних з аутоімунними розладами, оскільки як недостатній, так і надмірний рівень апоптозу клітин може бути патологічним чинником.

Нами встановлено, що в умовах оксидативного стресу *in vitro* і впливу ресвератролу у концентрації 20 μM відбувається покращення показників життєздатності клітин ФОО – вірогідно збільшувався відсоток живих клітин ФОО, зменшувався відсоток апоптотичних клітин і некротичних.

Взявши до уваги літературні дані [26, 48, 50, 107], нами зроблено припущення, що ресвератрол, активуючи SIRT1, призводить до деацетилювання останнім FoxO1, ймовірним результатом чого є зниження рівня апоптозу та некрозу клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах оксидативного стресу, не порушуючи ланку енергетичного забезпечення процесу мейотичного дозрівання ооцитів.

В умовах оксидативного стресу *in vitro* додавання у середовищі культивування ресвератролу, БАУ 11-7082, так і одночасно ресвератрол+БАУ 11-7082 призводить до покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, як на стадії метафаза I, так і на стадії метафаза II (рис.4.3.). Так, ресвертрол збільшував кількість ооцитів на стадії метафази I та II у 1,20 та 2,57 разів; БАУ 11-7082 – у 1,29 та 3,85 разів; БАУ 11-7082+ресвератрол – у 1,58 та 4,48 разів, відповідно.

Нами експериментально встановлено, що в умовах оксидативного стресу *in vitro* ресвератрол призводив до збільшення частки живих клітин ФОО у 1,40 разів та зниження рівня апоптозу у 1,34 рази; БАУ 11-7082 збільшував частку живих клітин ФОО у 1,35 разів та зменшував частку апоптозу таких клітин у 1,54 рази. А одночасне застосування БАУ 11-7082+ресвератрол призводило до збільшення частки живих клітин ФОО у 1,43 рази та зниження апоптозу цих клітин у 1,83 рази.

Таким чином, встановлено, що в умовах оксидативного стресу *in vitro* застосування активатора сиртуїна 1 – ресвератролу (20 μM) та інгібітора NF- κB – сполуки ВАУ 11-7082 (5 μM) покращує параметри мейотичного дозрівання ооцитів та підвищує життєздатність клітин ФОО.

Отже, в умовах оксидативного стресу *in vitro* транскрипційний фактор NF- κB бере участь в механізмі дії ресвератролу (активатора сиртуїна 1) як на процес мейотичного дозрівання ооцитів, так і на життєздатність клітини ФОО.

Підсумовуючи результати, представлені у розділі 4, робимо наступний **висновок**: *в умовах оксидативного стресу in vitro транскрипційний фактор NF- κB бере участь в механізмі дії ресвератролу (активатора сиртуїна 1), впливаючи як на процес мейотичного дозрівання ооцитів, так і на життєздатність клітини ФОО.*

Функціонування клітин яєчника в умовах ЕСАУ

Останнім часом з'явилося чимало наукових досліджень, присвячених ролі аутоімунних порушень у патогенезі різних гінекологічних захворювань, зокрема, недостатності яєчників. Існують припущення, що аутоімунне ураження нирок здатне впливати як прямо, шляхом дії безпосередньо на ооцити та скоротливу активність матки, так і шляхом опосередкованих механізмів [158, 159]. Це становить серйозну проблему для нормального функціонування жіночої репродуктивної системи та, відповідно, значно знижує вірогідність успішного проходження процесу запліднення, навіть у разі застосування допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ). З огляду на це, встановлення механізмів вищезгаданого впливу є важливим завданням, яке потребує детального дослідження та пошуку можливих шляхів його вирішення. Тому важливим та актуальним є вивчення впливу аутоімунного ураження на системи організму, застосовуючи експериментальні моделі з використанням тварин.

Зважаючи на вищесказане, наступним етапом роботи було дослідити функціонування клітин яєчника (процес мейотичного дозрівання ооцитів мишей, життєздатність і цілісність ДНК клітин ФОО) в умовах імунізації тварин гомогенатом нирки (модель експериментального системного аутоімунного ушкодження (ЕСАУ)). Патологічний процес моделювали за допомогою імунізації мишей I покоління суспензією антигену нирки, отриманої від материнської особи (розділ 2.5.). Ця модель створена та запатентована у відділі імунофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАНУ [10]. Модель характеризується зсувом лейкоцитарної формули крові вліво, що є свідченням індукованого імунізацією запалення – із зростанням як загального відсотка нейтрофілів, так і паличкоядерних нейтрофільних гранулоцитів ($P < 0,01$) у імунізованих тварин (розділ 2.5.). Виявлені фіксації імуноглобулінів на відбитках нирок та яєчників миші (коефіцієнт флуоресценції: нирки – $0,43 \pm 0,15$; яєчники – $0,25 \pm 0,03$) [3, 10] .

Відомо, що при імунозапальних процесах посилюються проліферація, диференціація та загибель імунокомпетентних клітин (ІКК). Апоптоз ІКК є гомеостатичним процесом, направленим на обмеження імунних і запальних реакцій, тоді як їх некротична загибель може бути провідним патогенетичним механізмом.

Нами показано, що в умовах ЕСАУ суттєво зменшувався відсоток живих лімфоцитів, виділених з лімфовузлів ($P < 0,01$). Ці експериментальні умови викликали послаблення життєздатності лімфоцитів внаслідок підвищення кількості клітин лімфовузлів із морфологічними ознаками некрозу ($P < 0,01$), при цьому рівень апоптозу лімфоцитів, порівняно із контрольною групою, знижувався. Також зменшувалася життєздатність клітин тимуса ($P < 0,01$) та посилювалися некроз і апоптоз тимоцитів ($P < 0,05$) (розділ 2.5.).

Таким чином, показано, що при ЕСАУ у клітинах лімфовузлів рівень некрозу підвищувався, а рівень апоптозу – знижувався. Тобто, виявлено посилення вторинного постапоптотичного некрозу. Можливою причиною

збільшення вторинного некрозу клітин лімфовузлів може бути те, що загибель клітин, яка почалася шляхом апоптозу, завершилася розривом плазматичної мембрани через виснаження енергетичних ресурсів. А у клітинах тимуса відбувалося посилення як апоптозу, так і некрозу, що, як відомо, є одним із важливих механізмів обмеження надмірної активації імунної системи.

Встановлено, що в умовах ЕСАУ в клітинах тимуса $I_{\text{ДНК}}=3,3$, а в клітинах лімфовузлів 3,7, що свідчить про зростання пошкодження ДНК [178].

Отже, показано, що в умовах ЕСАУ має місце розвиток генотоксичного стресу в ІКК як центрального (тимус), так і периферичних органів (лімфовузли) імунної системи, котрий, імовірно, є основною причиною збільшення загибелі ІКК прозапальним та імуногенним некротичним шляхом. Інтенсифікація запалення та імунних реакцій у результаті некрозу, в свою чергу, може провокувати ушкодження ДНК.

Встановлено, що в умовах ЕСАУ відбувається зменшення на 32,3% кількості ооцитів, які виділялися з одного яєчника у тварин, порівняно з такими величинами у тварин контрольної групи.

Виявлено, що при культивуванні клітин відсоток ооцитів, що пройшли стадію метафази I, зменшувався на 46,1%, а тих, що пройшли стадію метафази II, – на 27,9%.

Таким чином, в умовах ЕСАУ відбувається пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафази I та метафази II. Ймовірно, в даних експериментальних умовах порушуватимуться механізми, пов'язані з відновленням мейотичного дозрівання та подальшим розвитком ооцитів і процесом запліднення.

Встановлено, що за даних експериментальних умов відбуваються зменшення на 32,3% кількості живих клітин ФОО та збільшення на 21,3% клітин з морфологічними ознаками апоптозу і на 11,0% некрозу відносно контрольної групи, відповідно.

Відомо, що на відміну від апоптозу, загибель за некротичним типом (із розривом плазматичних мембран) відіграє значну патогенетичну роль у розвитку імуноопосередкованих хвороб [153]. Така загибель є прозапальною, за рахунок виходу клітинного вмісту, в тому числі прозапальних сигнальних молекул – алармінів. Крім того, некроз є імуногенним, оскільки провокує імунну відповідь на власні антигени, до яких імунна система не толерантна (або приховані раніше, або змінені в результаті діяльності ензимів). Обидва зазначені процеси спричиняють активацію клітин - ефektorів запалення, синтез ними прозапальних чинників, які, особливо реактивні форми кисню та азоту, призводять до окисного та нітрозативного стресу клітин, ушкодження ДНК та клітинної загибелі. Посилення некрозу замикає позитивний зворотній зв'язок – патологічне коло-самопідсилення запалення, яке присутнє при багатьох хворобах, в тому числі аутоімунному системному ушкодженні. Подібний процес інтенсифікації утворення РФК, ушкодження ДНК та некротичної загибелі клітин встановлено при моделюванні імунного ушкодження яєчників різного генезу [203].

Нами вперше показано, що у мишей в умовах ЕСАУ, викликаного імунізацією антигенною суспензією нирки, збільшується загибель клітин ФОО. Це є важливою причиною порушення мейотичного дозрівання ооцитів, яке підтверджується зменшенням кількості статевих гамет, що сформували перше полярне тільце.

З даних літератури відомо, що *hyaluronan synthase 2 (HAS2)*, *cyclooxygenase-2 (COX2)* та *gremlin 1 (Grem1)* задіяні у процес овуляції. *HAS2* і *COX2* є ключовими ферментами, необхідними для кумулюсного розширення. Тому нами досліджено зміни в експресії специфічних генів *HAS2*, *COX2* та *Grem1* на рівні мРНК в клітинах ФОО у мишей.

Нами вперше встановлено, що в умовах ЕСАУ відбувається зниження експресії гену *Grem1* в 1,47 разів; експресії *HAS2*, а також *COX2* вірогідно не змінювалися – 1,14 та 1,06 разів, відповідно. Отже, зміни у експресії

досліджуваних генів можуть бути однією з причин порушення оваріальної функції в умовах ЕСАУ.

При ушкодженні ДНК відбувається або її репарація, або клітинна загибель. 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 [22]. Вважається, що розміри хвоста ДНК-комети позитивно корелюють зі ступенем фрагментації ДНК. $I_{\text{ДК}}$ – це загальноприйнятий інтегральний показник, який враховує зміни кількості всіх типів комет із різною інтенсивністю випромінювання, тобто ступенем ушкодження ДНК. Показники клітинної загибелі (відсоток апоптотичних і некротичних клітин) та $I_{\text{ДК}}$ характеризують різне ушкодження клітин. Клітина може репарувати ушкодження ДНК і залишатись живою. В умовах значного ураження ДНК може відбуватися як некротична, так і апоптотична клітинна загибель, залежно від енергетичних її ресурсів, прозапальних факторів тощо. Так що клітини з максимально ушкодженою ДНК мають як апоптотичний, так і некротичний фенотип.

Дані літератури свідчать: після опромінення відбувається збільшення комет 4-го класу із значним ушкодженням ДНК, що вказує на загибель частини клітин шляхом некрозу. Проте це не є загальноприйнятою точкою зору, оскільки некроз може розвиватися як самостійний процес, який протікає паралельно з апоптозом, а також як вторинний процес, що завершує апоптоз (постапоптотичний некроз) [205].

Нами встановлено, що в умовах ЕСАУ кількість клітин ФОО із пошкодженою ДНК ядер становить 94,5 %, а $I_{\text{ДК}} = 3,7$, що свідчить про зростання пошкодження ДНК. Більшість комет клітин ФОО із однострижковими розривами ДНК віднесено до 4 класу, який характеризує максимальне ушкодження ДНК. Так, у групі тварин, де відтворювали експериментальну модель, відсоток клітин 4-го класу ушкодження ДНК збільшувався на 74,5%, 3-го – на 19,2%. Відсоток клітин 1-го та 0-го класів,

що характеризують відсутність первинних пошкоджень ДНК, у дослідній групі зменшувався відносно контрольної на 13,3% та 84,4%, відповідно.

Таким чином, в умовах ЕСАУ встановлено підвищення рівня первинних пошкоджень ДНК клітин ФОО.

Отже, підсумовуючи отримані результати (розділ 5), робимо наступний **висновок**: *в умовах ЕСАУ відбувається пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафази I та метафази II; збільшується кількість клітин ФОО з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу; відбуваються зміни у експресії генів COX2, Grem1 та HAS2 у клітинах ФОО; зростає рівень первинних пошкоджень ДНК клітин ФОО.*

Ми вважаємо, що імунозпальні процеси в умовах ЕСАУ, викликаного імунізацією антигенної суспензії нирки, призводять до збільшення ушкодження ДНК та клітинної загибелі, що може спричиняти новий виток посилення некротичних, запальних та аутоімунних процесів в організмі.

Таким чином, пошкодження клітин ФОО за цих експериментальних умов, у результаті чого порушуються метаболічні та електричні зв'язки, можна вважати домінуючим фактором порушення мейотичного дозрівання ооциту, враховуючи функції цих клітин у регуляції метаболічних процесів в ооциті.

Вплив модуляторів сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів мишей та життєздатність і цілісність ДНК ядер клітин ФОО яєчника мишей в умовах ЕСАУ

На нашу думку, модель ЕСАУ є адекватною для подальшого вивчення механізмів функціонування клітин яєчника. Відомо, що успішне проходження ооцитами фаз мейотичного дозрівання I та II, котре вірогідно порушується в умовах ЕСАУ, необхідне для фертильності самки ссавців. А також те, що сиртуїни 1 та 3 внаслідок активації специфічних каскадів реакцій здатні коригувати негативний вплив різноманітних патологічних процесів (що супроводжує, зокрема, старіння) на процес мейотичного

дозрівання ооцитів [1, 220, 226]. Тому клітинні захисні механізми, в яких беруть участь сиртуїни, можуть бути використані для корекції стану яєчників в умовах оксидативного стресу, що невід'ємно супроводжує протікання фізіологічних процесів в організмі, зокрема старіння та аутоімунні ушкодження органів і систем.

Сполуки природного та синтетичного походження, що є активаторами SIRT1, відіграють важливу роль у запобіганні захворювань різної етіології. Тому наступне завдання полягало у дослідженні впливу модуляторів активності сиртуїнів (активатор – ресвератрол, інгібітор – нікотинамід) в умовах ЕСАУ на параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин їх фолікулярного оточення та на розподіл одониткових розривів ДНК ядер клітин ФОО.

Нами вперше встановлено покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів у тварин в умовах ЕСАУ при застосуванні активатора сиртуїнів – ресвератролу *in vitro*. Так, відсотки проходження ооцитами тварин в умовах ЕСАУ метафаз I та II мейотичного дозрівання в умовах дії ресвератролу *in vitro* збільшувалася у 1,32 (MI) та 1,73 (MII) разів, відповідно. Це свідчить, що процес мейотичного дозрівання ооцитами мишей у випадку ЕСАУ поліпшується.

Не встановлено вірогідних змін у кількості ооцитів, що розчиняли зародковий пухирець (стадія метафази I) та формували перше полярне тільце (метафаза II) групи тварин в умовах ЕСАУ при застосуванні інгібітора активності сиртуїнів нікотинаміду порівняно з такими у тварин в умовах ЕСАУ.

У тварин в умовах ЕСАУ фіксували зниження кількості живих клітин ФОО у 2,02 рази та підвищення часток апоптозу та некрозу цих клітин у 2,89 та 3,01 разів, відповідно, порівняно з контрольною групою. Тоді як культивування клітин ФОО у середовищі із активатором сиртуїнів – ресвератролом призводить до підвищення відсотка живих та зниження показників апоптотичної та некротичної загибелі клітин ФОО у тварин в

умовах ЕСАУ. Так, після впливу ресвератролу частка живих клітин ФОО у мишей із ЕСАУ збільшувалася у 1,26 разів, частки апоптозу та некрозу клітин ФОО зменшувалися у 1,19 та 1,22 разів, відповідно.

Вірогідного впливу на життєздатність кліти ФОО у групи тварин в умовах ЕСАУ при застосуванні нікотинаміду порівняно з такими у тварин в умовах ЕСАУ не виявлено.

Таким чином, отримані результати дозволяють говорити про те, що культивування клітин у середовищі із вмістом активатора сиртуїнів – ресвератролу призводить до підвищення відсотка живих клітин ФОО у тварин із ЕСАУ та зниження показників апоптотичної та некротичної загибелі клітин.

При культивуванні клітин ФОО тварин в умовах ЕСАУ при застосуванні активатором сиртуїнів – ресвератролу (20 μM) встановлено зниження кількості клітин ФОО із максимальним ступенем ушкодження ДНК, порівняно з такими величинами у тварин в умовах ЕСАУ. Так, після впливу ресвератролу відзначено зниження клітин 4 класу із максимальним ушкодженням ДНК ядер – у 1,23 рази та збільшення часток клітин 0-го, 1-го та 2-го класу, що характеризують повну або практичну відсутність первинних ушкоджень ДНК ядер клітин у 1,40, 1,71 та 2,70 разів, відповідно.

Також не встановлено вірогідного впливу застосування нікотинаміду при культивуванні клітин ФОО тварин в умовах ЕСАУ порівняно з такими величинами у тварин в умовах ЕСАУ. Так, кількість клітин ФОО 4-го класу, що характеризує максимальний рівень ушкодження ДНК, становила $71,6 \pm 2,1\%$ для групи мишей в умовах ЕСАУ та $71,6 \pm 2,1\%$ групи тварин в умовах ЕСАУ при застосуванні нікотинаміду.

Таким чином, стає очевидним, що інгібітор сиртуїнів – нікотинамід – не впливає, а активатор ресвератрол – впливає на показники стану репродуктивних клітин мишей в умовах ЕСАУ.

Отже, оцінюючи вплив модуляторів активності сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів, життєздатність клітин фолікулярного

оточення ооцитів та рівень первинних пошкоджень ДНК в ядрах клітин ФОО в умовах ЕСАУ (розділ 6), робимо наступний **висновок:** *в умовах ЕСАУ застосування активатора сиртуїнів – ресвератролу in vitro призводить до покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафази II, до підвищення відсотка живих та зниження показників апоптотичної та некротичної загибелі клітин ФОО, а також зниження кількості клітин ФОО із максимальним ступенем ураження ДНК; не встановлено вірогідного впливу на життєздатність і рівень первинних пошкоджень ДНК в ядрах клітин ФОО у групи тварин в умовах ЕСАУ при застосуванні нікотинаміду порівняно з такими у тварин в умовах ЕСАУ.*

Вплив введення НЧС на функціональний стан яєчника в умовах ЕСАУ

В літературі представлена невелика кількість даних щодо впливу НЧС на ооцити та реакцію *in vitro* кумулюсно-ооцитарних клітинних комплексів свині на наночастинки золота, срібла і сплаву золото-срібло, вкриті бичачим сироватковим альбуміном (БСА) [193, 202, 221]. На сьогодні відомо, що в основі дії НЧС лежить механізм регуляції рівнів активних форм кисню (супероксидних радикалів, гідроксильних радикалів та інших) у клітинах. НЧС мають антиоксидантні властивості, їх активно використовують на даний час не тільки як лікарські засоби, але й як харчові добавки для підтримання оптимальної функції організму. Є дані про те, що НЧС впливають на індукцію оксидативного пошкодження, зміну регуляції ферментів, які відповідають за виведення вільних радикалів, зміну регуляції шляхів експресії генів, що беруть участь в апоптозі, і порушення регуляції клітинних структур, що беруть участь в зберіганні, детоксикації та метаболізму металів (таких як металотіонеїн 2) [53, 101, 125, 168, 197] в різних органах.

Ряд дослідників вивчали ефекти внутрішньовенного введення НЧС на органі системі організму [155, 199, 211]. Для всіх розмірів частинок, незалежно від їх покриття, найвищі концентрації срібла знайдені в селезінці і

печінці, а потім в легенях, нирках і в головному мозку через 24 годин після внутрішньовенного введення; срібло, фільтрується печінкою і виводиться з організму через жовч [155, 163, 174, 211].

Відомо, що доза 10,0 мг/кг ваги тіла у мишей еквівалентна для людини дозі 0,81 мг/кг ваги тіла, що відповідає приблизно 50,0 мг для людини 60 кг, відповідно до основних принципів для перерахунку дози від тварин до людини [39, 154].

Нами вперше отримано дані про вплив одно-, п'яти- і десятикратного введення НЧС (2,0 мг/кг та 4,0 мг/кг) на мейотичне дозрівання ооцитів. Так, одно- та п'ятикратне введення НЧС (2,0 мг/кг) не впливало на мейотичне дозрівання ооцитів; десятикратне введення НЧС (2 мг/кг) викликало зменшення кількості ооцитів, здатних до формування першого полярного тільця (метафаза II) ($P < 0,01$) [2, 123]. Нами була обрана доза 2 мг/кг ваги тіла, оскільки вона не перевищує доз, які використовувалися в попередніх дослідженнях і не викликали значних побічних ефектів у тварин [60, 61, 147, 148].

Окрім того, ми вперше показали, що в умовах ЕСАУ введення НЧС покращує функціональний стан яєчника у тварин: збільшується кількість ооцитів, які відновлюють мейоз та формують перше полярне тільце *in vitro*, а також збільшується кількість живих клітин та зменшується кількість клітин з морфологічними ознаками апоптотичної загибелі у фолікулярному оточенні ооцитів ($P < 0,05$).

Нами вперше виявлено, що введення НЧС не впливає на ДНК клітин ФОО, тоді як в умовах ЕСАУ відбувається збільшення пошкодження ДНК ядер клітин ФОО. Введення НЧС в умовах ЕСАУ призводить до зменшення пошкодження ДНК клітин ФОО, а саме: збільшується частка 0-го і 1-го класу – клітин ФОО, і зменшується частка 3-го і 4-го класу клітин ФОО ($P < 0,05$).

Тобто, описані нами результати підтверджують, що оцінка цілісності геному клітин ФОО є чутливими системами для досліджень, пов'язаних з нанотоксикологією. Використання таких тестових систем у майбутньому

сприятиме поглибленому розумінню можливих ефектів наночастинок на клітинному і субклітинному рівнях. Також майбутні дослідження можна спрямовувати на встановлення чітких специфікацій наночастинок (від дози, розміру) у відповідних експериментальних умовах.

Таким чином, оцінюючи вплив введення НЧС на процес мейотичного дозрівання ооцитів, життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів та одностривкові розриви ДНК клітин ФОО в умовах ЕСАУ (розділі 7), робимо наступний **висновок**.

*В умовах ЕСАУ і чотирикратного внутрішньовенного введення НЧС збільшується кількість ооцитів, які відновлюють мейоз та формують перше полярне тільце *in vitro*, зростає кількість живих клітин, зменшується кількість клітин із морфологічними ознаками апоптотичної загибелі, а також пошкодження ДНК в ядрах клітин у фолікулярному оточенні ооцитів.*

Отже, в роботі вперше розкрита участь сиртуїнів та вплив наночастинок срібла на функціональний стан клітин яєчника у нормі та в умовах аутоімунних розладів, що зумовлено вдосконаленням та розробкою нових методів у регуляції народжуваності, фертильності та лікування безпліддя, корекції порушень оваріального циклу, а також обґрунтуванням нових підходів до прогнозу імплантації та успішного перебігу вагітності при екстракорпоральному заплідненні.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

На підставі власних результатів та літературних даних, ми вважаємо, що експериментальне системне аутоімунне ураження супроводжується оксидативним стресом і призводить до розвитку системного запального процесу з пошкодженням імунокомпетентних клітин (тимусу та лімфатичних вузлів) та порушенням функціонування клітин яєчника, а саме пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів, посиленням клітинної загибелі ФОО, пошкодження ДНК ядер клітин ФОО. Нами встановлено вплив модуляторів сиртуїнів (ресвератрол, нікотинамід) та наночастинок срібла на функціонування клітин яєчника в умовах ЕСАУ, а також показаний механізм дії даних модуляторів за різних експериментальних умов.

З урахуванням літературних даних і власних результатів можна запропонувати наступну схему функціонування клітин яєчника в умовах ЕСАУ (рис.8.1.).



Рис.8.1. Вірогідна схема функціонування клітин яєчника в умовах ЕСАУ.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, відповідно до поставленої мети отримані нові дані щодо впливу модуляторів сиртуїнів та наночастинок срібла на функціональний стан клітин яєчників за різних експериментальних умов та запропоновано теоретичне узагальнення.

Досліджено характеристики мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин їх фолікулярного оточення, а також особливості розподілу одониткових розривів ДНК ядер клітин ФОО. Була використана методика експериментального системного аутоімунного ушкодження та індукції оксидативного стресу *in vitro*. Оцінені ефекти застосування модуляторів сиртуїнів та введення експериментального зразку НЧС.

Відповідно до сформульованих завдань і отриманих результатів дослідження зроблені наступні висновки.

1. В умовах дії інгібітора сиртуїнів нікотинаміду характеристики життєздатності клітин ФОО змінюються за рахунок його впливу на мітохондрії клітин у напрямку пригнічення.
2. В умовах оксидативного стресу *in vitro*, транскрипційний фактор NF-κB бере участь у механізмі дії активатора сиртуїна 1 ресвератролу на характеристики мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин ФОО поліпшуючи їх.
3. В умовах ЕСАУ пригнічується мейотичне дозрівання ооцитів, збільшується кількість клітин ФОО з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу, істотно знижується експресія гену *Grem1* у клітинах ФОО та зростає рівень первинних пошкоджень ДНК клітин ФОО.
4. В умовах ЕСАУ застосування активатора сиртуїнів ресвератролу *in vitro* призводить до покращення проходження процесу мейотичного

дозрівання ооцитів і параметрів життєздатності клітин ФОО, а також до зниження пошкодження ДНК ядер клітин ФОО.

5. Уведення НЧС в умовах ЕСАУ призводить до помірного, але істотного покращення характеристик мейотичного дозрівання ооцитів, а також до послаблення зниження клітинної загибелі ФОО та пошкодження ДНК ядер клітин ФОО.
6. Модулятори сиртуїнів в умовах моделювання ЕСАУ істотно задіяні у функціонуванні клітин яєчників та забезпечують протективний ефект НЧС на мейотичне дозрівання ооцитів і життєздатність клітин ФОО.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Вознесенська Т. Ю. Оваріальна функція в умовах експериментального аутоімунного розладу у мишей / Т. Ю. Вознесенська, М. С. Ступчук, О. А. Шепель, Т. В. Блашків // Вісник проблем біології і медицини. - 2016. - Вип. 2(3). - С. 113-118.
2. Вознесенська ТЮ, Ступчук МС, Грушка НГ, Кондрацька ОА, Блашків ТВ. Вплив внутрішньовенного введення наночастинок срібла на ДНК ядер клітин тимуса, лімфатичних вузлів і фолікулярного оточення ооцита в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження. Вісн пробл біол мед. 2018; Вип 1, 2(143): 327-31.
3. Вознесенська ТЮ, Ступчук МС, Калейнікова ОМ, Блашків ТВ Сиртуїн 1 – ключовий клітинний регулятор метаболізму та оксидативного стресу. Вісн пробл біол мед. 2018; Вип 1, 1(142): 20-5.
4. Вознесенська ТЮ, Ступчук МС, Шепель ОА, Грушка НГ, Блашків ТВ. Цілісність ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцита, тимуса і лімфатичних вузлів в умовах експериментального імунного ушкодження нирок та введення наночастинок срібла. VIII Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (м. Київ, 17-20 жовтня 2017 р.). – Збірник тез доповідей конференції – Київ, КНУ ім.Т. Шевченка, 2017: 30.
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С.Гланц. – М.: Практика, 1998. — 459с.
6. Калейнікова ОМ, Ступчук МС, Срібна ВО, Блашків ТВ, Вознесенська ТЮ. Вплив застосування субстанції НЧС, активатора і блокатора сиртуїна 1 на репродуктивну функцію в умовах ЕСАУ. Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та

ветеринарної медицини» (м. Львів, 4-5 жовтня 2018 р.). – Збірник тез конференції. – Львів, 2018:118.

7. Литвиненко АП, **Ступчук МС**, Блашків ОВ, Вознесенська ТЮ Морфофункціональний стан жіночої репродуктивної системи в умовах застосування наночастинок срібла. Наук вісн Східноєвр нац універ ім Л України. 2016; 12:131-7.

8. Манк МА. Биология развития млекопитающих. Методы. Пер. с англ. /Под ред. М. Манк. — М.: Мир, 1990. 406 с.

9. Пальцева ЕМ. Экспериментальные модели хронических заболеваний почек. Клиническая нефрология. 2009;2: 37-42.

10. **Ступчук МС**, Вознесенська ТЮ, Грушка НГ, Шепель ОА, Джуран БВ, Блашків ТВ. **Патент на корисну модель №120418 / Спосіб моделювання системного аутоімунного ушкодження у мишей // (№ 120418 від 25.10.2017, Бюл. № 20).**

11. **Ступчук МС**, Грушка НГ, Шепель ОА, Блашків ТВ, Вознесенська ТЮ. Мейотичне дозрівання ооцитів і життєздатність клітин їх фолікулярного оточення, тимуса і лімфатичних вузлів в умовах експериментального імунного гломерулонефриту. Вісн пробл біол мед. 2015; Вип 4, 2(125): 229-32.

12. **Ступчук МС**, Вознесенська ТЮ. Участь сиртуїна 1 у мейотичному дозріванні в ооциті. XX-ий з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (27-29 травня 2019 р.). – Фізіол. журн., 2019, Т. 65, № 3 (Додаток) : матеріали з'їзду. – Київ, 2019:7-8.

13. **Ступчук МС**, Вознесенська ТЮ. Біологічна роль сиртуїнів в еукаріотів. Фізіол журн. 2017; 63(4): 105-13.

14. **Ступчук МС**, Блашків ОВ, Вознесенська ТЮ. Влияние наночастиц серебра на ооциты и эмбрионы. Пробл репрод. 2017; 23(2): 22-6.

15. **Ступчук МС**, Янчій РІ, Вознесенська ТЮ. Роль сиртуїнів у змінах функціонального стану ооцитів та клітин їх фолікулярного оточення в умовах

системного аутоімунного ушкодження у мишей. Фізіол журн. 2019; 65(1): 34-40.

16. **Ступчук МС**, Вознесенська ТЮ. Участь сиртуїнів у процесі мейотичного дозрівання ооцитів мишей. XV міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances (м. Київ, 18-21 квітня 2017 р.). Збірник тез конференції – Київ: Паливода А.В., 2017:116-17.

17. Срібна ВО, Шепель ОА, **Ступчук МС**, Маврич СІ, Резниченко ЛС, Калейнікова ОМ, та ін. Функціональний стан яєчника в умовах експериментального імунного ушкодження та введення субстанції наночастинок срібла. Наукова конференція, присвячена 120-річчю від дня народження та 40-річчю від дня смерті акад. М.М. Сиротиніна - 15 травня 2017 р, м. Київ, Інститут фізіології ім. А.А. Богомольця НАН України. – Збірник тез – Київ, 2017: 26.

18. **Ступчук МС**. Вплив експериментального імунного ушкодження нирок на показники функціонального стану яєчників мишей. IV Всеукраїнська наукова конференція студентів та молодих вчених з фізіології з міжнародною участю (м. Харків, 16 травня 2017 р.). Збірник матеріалів конференції – Харків: ХНМУ, 2017:117.

19. **Ступчук МС**. Вплив ресвератролу на *in vitro* відновлення мейотичного дозрівання ооцитів в умовах дії інгібітора аспартатних мітохондріальних переносників. II Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні тенденції розвитку науки» (м.Київ, 17-18 березня 2018 р.). Збірник матеріалів конференції – Київ.: МЦНД, 2018: 35.

20. **Ступчук МС**, Вознесенська ТЮ. Вплив ресвератролу на відновлення мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність кумулюсних клітин в умовах оксидативного стресу *in vitro*. XVI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної

науки / Bioscience advances (м. Київ, 24-27 квітня 2018 р.). Збірник тез доповідей конференції – Київ: Паливода А.В., 2018: 270-71.

21. Aengenheister L, Dietrich D, Sadeghpour A, Manser P, Diener L, Wichser A, et al. Gold nanoparticle distribution in advanced *in vitro* and *ex vivo* human placental barrier models. *Nanobiotechnology*. 2018 Oct 11;16(1):79.

22. Afanasieva K, Zazhytska M, Sivolob A. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments. *Electrophoresis*. 2010;31:512-19.

23. Agarwal A, Majzoub A. Role of antioxidants in assisted reproductive techniques. *World J Mens Health*. 2017;35:77–93.

24. Alalaiwe A. The clinical pharmacokinetics impact of medical nanometals on drug delivery system. *Nanomedicine*. 2019 Jan 19;17:47-61.

25. Alberti T, Coelho D, Voytena A, Pitz H, de Pra M, Mazzarino L, et al. Nanotechnology: A Promising Tool Towards Wound Healing. *Curr Pharm Des*. 2017; 23(24):3515-28.

26. Albertoni Guilherme, Schor Nestor. Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease - mini-review. *J. Bras. Nefrol*. [Internet]. 2015 Mar [cited 2019 Aug 05]; 37(1): 106-114.

27. Alpízar-Rodríguez D, Romero-Díaz J, Sánchez-Guerrero J, Seuc A, Cravioto Mdel C. Age at natural menopause among patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2014 Nov;53(11):2023-9.

28. Banaszewska B, Wrotyńska-Barczyńska J, Spaczynski RZ, Pawelczyk L, Duleba AJ. Effects of resveratrol on polycystic ovary syndrome: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101:4322–8.

29. Baranwal A, Srivastava A, Kumar P, Bajpai V, Maurya P, Chandra P. Prospects of Nanostructure Materials and Their Composites as Antimicrobial Agents. *Front Microbiol*. 2018 Mar 9;9:422.

30. Barkat M, Harshita, Beg S, Naim M, Pottoo F, Singh S, et al. Current Progress in Synthesis, Characterization and Applications of Silver Nanoparticles: Precepts and Prospects. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2018; 13(1):53-69.
31. Bartosch C, Monteiro-Reis S, Almeida-Rios D, Vieira R, Castro A, Moutinho M, et al. Assessing sirtuin expression in endometrial carcinoma and non-neoplastic endometrium. *Oncotarget* 2016;7: 1144–54.
32. Baulain U, Klein S, Kues W, Barcikowski S, Rath D. Injection of ligand-free gold and silver nanoparticles into murine embryos does not impact pre-implantation development. *Beilstein J Nanotechnol.* 2014; 21(5): 677-88.
33. Benayoun B, Georges A, Hotel D. Transcription factor FOX12 protects granulosa cells from stress and delays cell cycle: role of its regulation by the SIRT1 deacetylase. *Human Molecular Genetics.* 2011;20(9):1673–86.
34. Benkhalifa M, Ferreira Y, Chahine H. Mitochondria: participation to infertility as source of energy and cause of senescence. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* 2014;55: 60–4.
35. Blashkiv TV, **Stupchuk MS**, Sribna VA, Kaleynykova OM, Grushka NG, Voznesenska TY. Resumption of Meiotic Maturation of Oocytes, Preand Post-Implantational Embryonic Mortality under Conditions of Experimental Glomerulonephritis and Treatment of Silver Nanoparticles. *Nano Biomed Eng.* 2018; 10(4): 355-61.
36. Bhattacharya P, Keating A. Impact of environmental exposures on ovarian function and role of xenobiotic metabolism during ovotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 2012; 261(3): 227–35.
37. Bitounis D, Klein J, Mery L, El-Merhie A, Forest V, Boudard D, et al. Ex vivo detection and quantification of gold nanoparticles in human seminal and follicular fluids. *Analyst.* 2018 Jan 15;143(2):475-86.
38. Bolton W, May W, Sturgill Be. Proliferative autoimmune glomerulonephritis in rats: a model for autoimmune glomerulonephritis in humans. *Kidney Int.* 2010;4:294-306.

39. Bondarenko O, Juganson K, Ivask A, Kasemets K, Mortimer M, Kahru A. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells *in vitro*: a critical review. *Arch Toxicol*. 2013 Jul;87(7):1181-200.
40. Boudreau M, Imam M, Paredes A, Bryant M, Cunningham C, Felton R, et al. Differential Effects of Silver Nanoparticles and Silver Ions on Tissue Accumulation, Distribution, and Toxicity in the Sprague Dawley Rat Following Daily Oral Gavage Administration for 13 Weeks. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 2016; 150(1):131–60.
41. Braun G, Friman T, Pang H, Pallaor A, de Mendoza T, Willmore A, et al. Etchable plasmonic nanoparticle probes to image and quantify cellular internalization. *Nat Mater*. 2014; 13(9):904-11.
42. Braun G, Friman T, Pang H. Etchable plasmonic nanoparticle probes to image and quantify cellular internalization. *Nat Mater*. 2014; 13(9): 904-11.
43. Brooks CL, Gu W. How does SIRT1 affect metabolism, senescence and cancer? *Nat Rev Cancer*. 2009;9: 123–128;
44. Burduşel A, Gherasim O, Grumezescu A, Mogoantă L, Ficaï A, Andronescu E Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials (Basel)*. 2018 Aug 31; 8(9). Epub 2018 Aug 31.
45. Byskov A, Faddy M, Lemmen J. Eggs forever? *Differentiation*. 2005;73(9-10):438-46.
46. Carp H, Selmi C, Shoenfeld Y. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss. *J. Autoimmun*. 2012;38(2-3): 266-74.
47. Çavaş T, Serpil K. Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay. *Mutagenesis* 2007 (22, 4): 263-8 .
48. Chang H, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25:138–45.

49. Chen Z, Kang X, Wang L, Dong H, Wang C, Xiong Z, et al. Rictor/mTORC2 pathway in oocytes regulates folliculogenesis, and its inactivation causes premature ovarian failure. *J Biol Chem.* 2015;290:6387–96.
50. Chen Z, Shentu TP, Wen L, Johnson DA, Shyy J. Y.-J. Regulation of SIRT1 by oxidative stress-responsive miRNAs and a systematic approach to identify its role in the endothelium. *Antioxidants and Redox Signaling.* 2013;19(13):1522–38.
51. Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, metal. *Angew Chem.* 2013. doi:10.1002/anie.201205923.
52. Cho Y, Mizuta Y, Akagi J, Toyoda T, Sone M, Ogawa K. J Size-dependent acute toxicity of silver nanoparticles in mice. *Toxicol Pathol.* 2018 Jan; 31(1):73-80.
53. Choi J, Kim S, Ahn J, Youn P, Kang J, Park K, et al. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish *Aquat. Toxicol.* 2010, 100(2)151–9.
54. Cinco R, Digma MA, Gratton E, Luderer U. Spatial characterization of bioenergetics and metabolism of primordial to preovulatory follicles in whole ex vivo murine ovary. *Biol Reprod.* 2016;95:129.
55. Cochrane C, Dixon F. Cell and tissue damage through antigen-antibody complex. *California Med.* 1969 Aug;11:99.
56. Collins AR The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004;26(3): 249-61.
57. Cui Y, Zhao Y, Tian Y, Zhang W, Lü X, Jiang X. The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on *Escherichia coli*. *Biomaterials.* 2012 Mar; 33(7):2327-33.
58. Dakal T, Kumar A, Majumdar R, Yadav V. Mechanistic Basis of Antimicrobial Actions of Silver Nanoparticles. *Front Microbiol.* 2016; 7:1831.
59. Dawood A, El-Sharawy M, Nada D, El-Sheikh M. Premature ovarian failure of autoimmune etiology in 46XX patients: is there a hope? *Complement Integr Med.* 2018 May 25. pii:/j/jcim.ahead-of-print/jcim-2017-0072/jcim-2017-0072.xml. doi: 10.1515/jcim-2017-0072. [Epub ahead of print]]

60. De Jong W, Van Der Ven L, Sleijffers A, Park M, Jansen E, Lovere H, et al. Systemic and immunotoxicity of silver nanoparticles in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study in rats. *Biomaterials*. 2013; 13(34):8333–43.
61. De Jong W, Lankveld DP, Oomen AG, Krystek P, Neigh A, Troost-de Jong A, et al. The kinetics of the tissue distribution of silver nanoparticles of different sizes. *Biomaterials*. 2010 Nov;31(32):8350-61.
62. De Mingo Á, de Gregorio E, Moles A, Tarrats N, Tutusaus A, Colell A, et al. Cysteine cathepsins control hepatic NF- κ Bdependent inflammation via sirtuin-1 regulation. *Cell Death Dis*. 2016;7:e2464.
63. Di Emidio G, Falone S, Vitti M, D'Alessandro AM, Vento M, Di Pietro C, et al. SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. *Hum Reprod*. 2014;29:2006–17.
64. Diamanti-Kandarakis E, Papalou O, Kandaraki E, Kassi G. Mechanisms in endocrinology: Nutrition as a mediator of oxidative stress in metabolic and reproductive disorders in women. *Eur J Endocrinol*. 2017;176(2):79-99.
65. D'Onofrio N, Servillo L, Balestrieri ML SIRT1 and SIRT6 Signaling Pathways in Cardiovascular Disease Protection..*Antioxid Redox Signal*. 2018 Mar 10; 28(8):711-732.
66. Duhig K. Oxidative stress in pregnancy and reproduction. *Obstet Med*. 2016; 9(3): 113-16.
67. Ebrahimzadeh M, Tafazoli A, Akhtari J, Biparva P, Eslami S. Engineered silver nanoparticles, a new nanoweapon against cancer. *Anticancer Agents Med Chem*. 2018 Aug 7. doi: 10.2174/1871520618666180808093040.
68. Eichenlaub-Ritter U. Oocyte ageing and its cellular basis. *International Journal of Developmental Biology*. 2012; 56(10–12):841–52.
69. Elkhwanky M, Hakkola J. Extranuclear Sirtuins and Metabolic Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2018 Mar 10;28(8):662-76.

70. Fabrega J, Luoma S, Tyler C, Galloway T, Lead J. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ Int.* 2011 Feb;37(2):517-31.
71. Ferreyra Maillard A, Dalmasso P, López de Mishima B, Hollmann A. Interaction of green silver nanoparticles with model membranes: possible role in the antibacterial activity. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2018 Jul 21;171:320-26.
72. Fewtrell L, Majuru B, Hunter P. A re-assessment of the safety of silver in household water treatment: rapid systematic review of mammalian in vivo genotoxicity studies *Environ Health.* 2017 Jun 20; 16(1):66. Epub 2017 Jun 20.
73. Freitas C, Neto A, Matos L, Silva E, Ribeiro Â, Silva-Carvalho JL, et al. Follicular Fluid redox involvement for ovarian follicle growth. *J Ovarian Res.* 2017 Jul 12;10(1):44. doi: 10.1186/s13048-017-0342-3. Review.
74. Fu H, Wada-Hiraike O, Hirano M. SIRT3 positively regulates the expression of folliculogenesis- and luteinization-related genes and progesterone secretion by manipulating oxidative stress in human luteinized granulosa cells. *Endocrinology.* 2014;155(8):3079–87.
75. Gan P, Summers S, Ooi J, O'Sullivan K, Tan D, Muljadi R, et al. Mast cells contribute to peripheral tolerance and attenuate autoimmune vasculitis. *J Am Soc Nephrol.* 2012; 23(12): 1955-66.
76. Gao J, Youn S, Hovsepyan A, Llaneza V, Wang Y, Bitton G, et al. Dispersion and toxicity of selected manufactured nanomaterials in natural river water samples: effects of water chemical composition. *Environ Sci Technol.* 2009;43(9):3322–8.
77. Gilbert S, Weiner D, Gipson D. National Kidney Foundation's Primer on Kidney Diseases, 6th edition. Elsevier. 2014; 592.
78. Gilchrist R, Bertoldo M, Walters K, Ledger W, Mermillod P, Locatelli Y. In-vitro regulation of primordial follicle activation: challenges for fertility preservation strategies. *Reprod Biomed Online.* 2018 May;36(5):491-9.

79. Gilchrist R, Lane M, Thompson J. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. *Hum Reprod Update*. 2008; 14(2):159–77.
80. Gil-Jin S, Loránd Levente K, Margaret W. Autoimmune glomerulonephritis with spontaneous formation of splenic germinal centers in mice lacking the estrogen receptor alpha gene. *PNAS*. 2004 Feb 10; 101(6):1720-4.
81. Habermehl T, Parkinson K, Hubbard G, Ikeno Y, Engelmeyer JI, Schumacher B, et al. Extension of longevity and reduction of inflammation is ovarian-dependent, but germ cell-independent in post-reproductive female mice. *Geroscience*. 2018 Dec 13. doi: 10.1007/s11357-018-0049-4. [Epub ahead of print].
82. Haigis M, Sinclair D. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol*. 2010;5:253–95.
83. Haigis M, Guarente L. Mammalian sirtuins—emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Gen & Develop*. 2006; 20:2913–292.
84. Han S, Choi J, Soon Shin K, and Kang S. Resveratrol upregulated heat shock proteins and extended the survival of G93A-SOD1 mice. *Brain Res*. 2012; 1483:112–117.
85. Han L, Ge J, Zhang L, Ma R, Hou X, Li B, et al. Sirt6 depletion causes spindle defects and chromosome misalignment during meiosis of mouse oocyte. *Sci Rep*. 2015;5:15366.
86. Handy R, Shaw B. Toxic effects of nanoparticles and nanomaterials: implications for public health, risk assessment and the public perception of nanotechnology. *Health, Risk & Society*. 2007; 9: P.125-44.
87. Heuskin A, Gallez B, Feron O, Martinive P, Michiels C, Lucas S. Metallic nanoparticles irradiated by low-energy protons for radiation therapy: Are there significant physical effects to enhance the dose delivery? *Med Phys*. 2017 Aug;44(8):4299-312.

88. Hubbard B and Sinclair D. Small molecule SIRT1 activators for the treatment of aging and age-related diseases. *Trends in Pharmacol Sci.* 2014; 35 (3):146–54.
89. Huser M, Wagnerova K, Janku P, Malaskova L, Stourac P. Clinical management of pregnancy in women with Goodpasture syndrome. *Gynecol Obstet Invest.* 2015;79(2):73-7.
90. Ishii T, Miyazawa M, Takanashi Y. Genetically induced oxidative stress in mice causes thrombocytosis, splenomegaly and placental angiodyplasia that leads to recurrent abortion. *Redox Biology.* 2014; 2: 679–85.
91. Ito M, Imai M, Muraki M. GSTT1 is upregulated by oxidative stress through p38-mk2 signaling pathway in human granulosa cells: Possible association with mitochondrial activity. *Aging.* 2011; 3(12): 1213–23.
92. Jasmin de Souza G, Louzada R, Rosado-de-Castro P, Mendez-Otero R, Campos de Carvalho A. Tracking stem cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: perspectives and considerations. *Int J Nanomedicine.* 2017 Jan 25;12:779-93.
93. Jorge de Souza T, Rosa Souza L, Franchi L. Silver nanoparticles: An integrated view of green synthesis methods, transformation in the environment, and toxicity. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2019 Apr 30;171:691-700.
94. Kanter M, Aktas C, Erboga M. *Food and chemical toxicology.* 2012; 50 (3–4): 719—25.
95. Kapahi P, Kaeberlein M, Hansen M. Dietary restriction and lifespan: Lessons from invertebrate models. *Ageing Res Rev.* 2016, pii: S1568-1637(16): 30288-4.
96. Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, Kaarniranta K, and Salminen A. Antagonistic crosstalk between NF-κB and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders. *Cellular Signalling.* 2013; 25(10):1939–48.

97. Kawamura Y, Uchijima N. Sirt3 protects *in vitro*—fertilized mouse preimplantation embryos against oxidative stress-induced p53-mediated developmental arrest. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010;120(8): 2817–28.
98. Kawamura Y, Fu H, Wada-Hiraike O, Hirano M, Sakurabashi A, Shirane A, et al. SIRT3 positively regulates the expression of folliculogenesis- and luteinization-related genes and progesterone secretion by manipulating oxidative stress in human luteinized granulosa cells. *Endocrinology*. 2014 Aug;155(8):3079-87.
99. Kawamura Y, Koyama S, Yoshida R. Statistical inference of the rate of RNA polymerase II elongation by total RNA sequencing. *Bioinformatics*. 2019 Jun 1;35(11):1877-1884.
100. Kerjaschki D. Cellular pathology of Heyman nephritis: monoclonal antibodies against the pathogenic antigen Gp 330. *Wien Klin Wochenschr*. 1985 Jul 19;97(14):581-8. German.
101. Kim S, Ryu D. Silver nanoparticle-induced oxidative stress, genotoxicity and apoptosis in cultured cells and animal tissues. *J Appl Toxicol*. 2013 Feb;33(2):78-89. doi: 10.1002/jat.2792
102. Koffer D, Schur P, Kunkel H. Immunological studies concerning the nephritis of systemic lupus erythematosus. *J Exp Med*. 1967;126:607.
103. Kono D, Theofilopoulos A. Autoimmunity. In: Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, et al, eds. *Kelley's Textbook of Rheumatology*. 9th ed. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2012: chap 20: 386–400.
104. Kosebent EG, Uysal F, Ozturk S. Telomere length and telomerase activity during folliculogenesis in mammals. *J Reprod Dev*. 2018 Dec 14;64(6):477-84.
105. Kottarathil VD, Antony MA, Nair IR, Pavithran K. Recent advances in granulosa cell tumor ovary: a review. *Indian Journal of Surgical Oncology*. 2013;4(1):37–47.
106. Kwak S, Cheong S, Yoon J, Jeon Y, Hyun S. Expression patterns of sirtuin genes in porcine preimplantation embryos and effects of sirtuin inhibitors on *in*

vitro embryonic development after parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization. *Theriogenology*. 2012; 78(7):1597–610.

107. Lee D, Goldberg AL. SIRT1 protein, by blocking the activities of transcription factors FoxO1 and FoxO3, inhibits muscle atrophy and promotes muscle growth. *Journal of Biological Chemistry*. 2013; 288(42):30515–26.

108. Lee J, Rhee M, Kim E, Cho JY. BAY 11-7082 is a broad-spectrum inhibitor with anti-inflammatory activity against multiple targets. *Mediators Inflamm*. 2012;2012:416036.

109. Lee K, Browning L, Nallathamby P, Desai T, Cherukuri P, Xu X. In vivo quantitative study of sized-dependent transport and toxicity of single silver nanoparticles using zebrafish embryos *Chem. Res. Toxicol*. 2012; 25(5):1029–46.

110. Lehman D, Wilson C, Dixon F. Interstitial nephritis in rats immunized with heterologous tubular basement membrane. *Kidney Int*. 1974; 5:187.

111. Levard C, Hotze E, Lowry G, Brown G. Environmental transformations of silver nanoparticles: impact on stability and toxicity. *Environ Sci Technol*. 2012; 46(13):6900–14.

112. Levard C, Hotze E, Colman B, Dale A, Truong L, Yang X, et al. Sulfidation of silver nanoparticles: natural antidote to their toxicity. *Environ Sci Technol*. 2013;47(23):13440-8.

113. Levard C, Ma R, Marinakos SM, Cheng Y, Liu J. Size-controlled dissolution of organic-coated silver nanoparticles. *Environmental science & technology*. 2011; 46(2): 752-9.

114. Lewinski N, Colvin V, Drezek R. Cytotoxicity of Nanoparticles. *Small J*. 2008;4(1):26-49.

115. Li A, Yang Y, Li X, Zhang L, Guo H. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression. *Life Sci*. 2018 Jan 15;193:124-31.

116. Li P, Kuo T, Chang J, Yeh J, Chan W. Induction of cytotoxicity and apoptosis in mouse blastocysts by silver nanoparticles. *Toxicol Lett*. 2010; 197(2): 82-7.

117. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin Interv Aging*. 2018 Apr 26;13:757-72.
118. Lin H, Bu Q, Cen X, Zhao Y. Current methods and research progress in nanomaterials risk assessment. *Curr Drug Metab*. 2012 May 1;13(4):354-63.
119. Liu M, Yin Y, Ye X. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice. *Human Reproduction*. 2013; 28(3):707–17.
120. Lombard D, Tishkoff D, and Bao J. Mitochondrial sirtuins in the regulation of mitochondrial activity and metabolic adaptation. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;206: 163–88.
121. Ludwig R, Vanhoorelbeke K, Leyboldt F, Kaya Z, Bieber K, McLachlan SM, et al. Mechanisms of Autoantibody-Induced Pathology. *Front Immunol*. 2017; 8:603. Epub 2017 May 31.
122. Luo LL, Chen XC, Fu YC, Xu JJ, Li L, Lin XH, et al. The effects of caloric restriction and a high-fat diet on ovarian lifespan and the expression of SIRT1 and SIRT6 proteins in rats. *Aging Clin Exp Res*. 2012 Apr;24(2):125-33.
123. Lytvynenko A, Rieznichenko L, Sribna V, **Stupchuk M**, Grushka N, Shepel A, Voznesenska T, et al. Functional status of reproductive system under treatment of silver nanoparticles in female mice. *IJRCOG*. 2017; 6(5): 1713-20.
124. Maillard J, Finnegan M, Linley E, Denyer S, McDonnell G, Simons C. Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Oct;65(10):2108-15.
125. Maillard J, Hartemann P. Silver as an antimicrobial: facts and gaps in knowledge. *Crit Rev Microbiol*. 2013 Nov;39(4):373-83.
126. Makogon N, Voznesenskaya T, Bryzgina T, Sukhina V, Grushka N, Alexeyeva I. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 3-aminobenzamide protects against experimental immune ovarian failure in mice. *Reproductive Biology*. 2010;10(3):215-26.

127. Malik G, Al-Harbi A, Al-Mohaya S, Al-Wakeel J, Al-Hozaim W, Kechrid M, et al. Repeated pregnancies in patients with primary membranous glomerulonephritis. *Nephron*. 2002; 91(1):21-4.
128. Maurer E, Sharma M, Schlager J, Hussain S. Systematic analysis of silver nanoparticle ionic dissolution by tangential flow filtration: toxicological implications. *Nanotoxicology*. 2014 Nov;8(7):718-27.
129. Mayorga J, Alpízar-Rodríguez D, Prieto-Padilla J, Romero-Díaz J, Cravioto M. Prevalence of premature ovarian failure in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2016 Jun;25(7):675-83.
130. McGinnis L, Limback S, Albertini D. Signaling modalities during oogenesis in mammals. *Current Topics in Developmental Biology*. 2013; 102: 227–42;
131. Min Z, Gao J, Yu Y. The Roles of Mitochondrial SIRT4 in Cellular Metabolism. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9:783.
132. Mofazzal Jahromi M, Sahandi Zangabad P, Moosavi Basri S, Sahandi Zangabad K, Ghamarypour A, Aref A, et al. Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018 Jan 1;123:33-64.
133. Monget P, Bobe J, Gougeon A, Fabre S., Monniaux D, Dalbies-Tran R. The ovarian reserve in mammals: a functional and evolutionary perspective. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012; 356(1-2): 2–12.
134. Morigi M, Perico L, Benigni A. Sirtuins in Renal Health and Disease. *J Am Soc Nephrol*. 2018 Jul;29(7):1799-809.
135. Morris G, Walker AJ, Berk M, Maes M, Puri BK. Cell Death Pathways: a Novel Therapeutic Approach for Neuroscientists. *Mol Neurobiol*. 2018;55(7):5767–5786.
136. Morita Y, Wada-Hiraike O, Yano T. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2012;10:article 14.

137. Mouchiroud L, Houtkooper R, Moullan N, Katsyuba E, Ryu D, Canto C, et al. The NAD(+)/Sirtuin pathway modulates longevity through activation of mitochondrial UPR and FOXO signaling. *Cell*. 2013; 154: 430–441
138. Naderi N, Karponis D, Mosahebi A, Seifalian AM Nanoparticles in wound healing; from hope to promise, from promise to routine *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2018 Jan 1;23:1038-59.
139. Nair P, Choi J. Identification, characterization and expression profiles of *Chironomus riparius* glutathione S-transferase (GST) genes in response to cadmium and silver nanoparticles exposure *Aquat. Toxicol*. 2011; 101(3–4):550–60.
140. Nel A, Xia T, Madler L, Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*. 2006; 311:622–62.
141. Nguyen K, Richards L, Massarsky A, Moon T, Tayabali A. Toxicological evaluation of representative silver nanoparticles in macrophages and epithelial cells. *Toxicol In Vitro*. 2016 Jun;33:163-73.
142. O'Callaghan C, Vassilopoulos A Sirtuins at the crossroads of stemness, aging, and cancer. *Aging Cell*. 2017 Dec;16(6):1208-1218.
143. Pacella-Ince L, Zander-Fox DL, Lan M. Mitochondrial SIRT3 and its target glutamate dehydrogenase are altered in follicular cells of women with reduced ovarian reserve or advancedmaternal age. *Hum Reprod*. 2014;29(7):1490–9.
144. Pahl H. Activators and target genes of Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene*. 1999;18:6853-66.
145. Pan H, Finkel T. Key proteins and pathways that regulate lifespan. *J Biol Chem*. 2017; 292(16): 6452-6460;
146. Panel M, Ghaleh B, Morin D. Mitochondria and aging: A role for the mitochondrial transition pore? *Aging Cell*. 2018 Jun 11:e12793.
147. Park K, Park E, Chun I, Choi K, Lee S, Yoon J, et al. Bioavailability and toxicokinetics of citrate-coated silver nanoparticles in rats. *Arch Pharm Res*. 2011; 34: 153–8.

148. Park K, Park S, Kim J, Eom K, et al. microRNA-944 overexpression is a biomarker for poor prognosis of advanced cervical cancer. *BMC Cancer*. 2019;19(1):419.
149. Park M, Park Y, Jung S. Risk of ovarian failure and pregnancy outcome in patients with lupus nephritis treated with intravenous cyclophosphamide pulse therapy. *Lupus*. 2004; 13(8):569-74.
150. Pavlov'a A, Klucska K, Va's'i'cek D. The involvement of SIRT1 and transcription factor NF- κ B (p50/p65) in regulation of porcine ovarian cell function. *Animal Reproduction Science*. 2013;140(3-4):180–8.
151. Pirinen E, Sasso G, AuwerxBest J. Mitochondrial sirtuins and metabolic homeostasis. *Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2012;.26(6):759–70.
152. Pomatto LCD, Davies KJA. Adaptive homeostasis and the free radical theory of ageing. *Free Radic Biol Med*. 2018 Aug 20;124:420-30.
153. Rani V, Deep G, Singh R. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. *Life Sci*. 2016;148:183-93.
154. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008;22:659-61. .
155. Recordati C, De Maglie M, Bianchessi S, Argenti S, Cella C, Mattiello S, et al. Tissue distribution and acute toxicity of silver after single intravenous administration in mice: nano-specific and size-dependent effects. *Part Fibre Toxicol*. 2015; 13, 12.
156. Reidy B, Haase A, Luch A, Dawson KA, Lynch I. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: a critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. *Materials*. 2013;6:2295–2350.
158. Ronco P, Debiec H. Membranous glomerulopathy: the evolving story. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2010 May;19(3):254-9.
159. Ronco P, Debiec H. Pathogenesis of membranous nephropathy: recent advances and future challenges. *Nat Rev Nephrol*. 2012; 8(4): 203-13.

160. Rives N, Verhaeghe F, Di Pizio P, Rives A. Fertility preservation. *Rev Prat.* 2018 Feb;68(2):213-219. French.
161. Ruder E, Hartman T, Reindollar R, Goldman M. Female dietary antioxidant intake and time to pregnancy among couples treated for unexplained infertility. *Fertility and Sterility.* 2014; 101(3): 759–66.
162. Ryan CP, Hayes MG, Lee NR, McDade TW, Jones MJ, Kobor MS, et al. Reproduction predicts shorter telomeres and epigenetic age acceleration among young adult women. *Sci Rep.* 2018 Jul 23; 8(1):11100.
163. Sadauskas E. Kupffer cells are central in the removal of nanoparticles from the organism. *Part Fibre Toxicol.* 2007;4:10.
164. Sanchooli N, Saeidi S, Barani H, Sanchooli E. *In vitro* antibacterial effects of silver nanoparticles synthesized using *Verbena officinalis* leaf extract on *Yersinia ruckeri*, *Vibrio cholera* and *Listeria monocytogenes*. *Iran J Microbiol.* 2018 Dec;10(6):400-8.
165. Schmidt K, Amstad P, Cerutti P, and Baeuerle P. The roles of hydrogen peroxide and superoxide as messengers in the activation of transcription factor NF- κ B. *Chemistry and Biology.* 1995; 2(1):13–22.
166. Scown T, van Aerle R, Tyler C. Review: Do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment? *Crit Rev Toxicol.* 2010 Aug;40(7):653-70.
167. Schultz C, Powell K, Crossley A, Jurkschat K, Kille P, Morgan AJ, et al. Analytical approaches to support current understanding of exposure, uptake and distributions of engineered nanoparticles by aquatic and terrestrial organisms. *Ecotoxicology.* 2015 Mar; 24(2):239-61.
168. Sims C, Hanna S, Heller D, Horoszko C, Johnson M, Montoro Bustos A, et al. Redox-active nanomaterials for nanomedicine applications. *Nanoscale.* 2017 Oct 19; 9(40):15226-51.

169. Singh CK, Chhabra G, Ndiaye MA, Garcia-Peterson LM, Mack NJ, Ahmad N. The Role of Sirtuins in Antioxidant and Redox Signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2018 Mar 10; 28(8): 643-661.
170. Singh CK, George J, Nihal M, Sabat G, Kumar R, Ahmad N: Novel downstream molecular targets of SIRT1 in melanoma: a quantitative proteomics approach. *Oncotarget* 2014;5:1987-1999.
171. Sinico R, Mezzina N, Trezzi B, Ghiggeri G, Radice A. Immunology of membranous nephropathy: from animal models to humans. *Clin Exp Immunol*. 2016; 183(2): 157-65.
172. Sirotkin V, Dekanov'a P, Harrath AH, Alwasel SH, and Va'sicek D. Interrelationships between sirtuin 1 and transcription factors p53 and NF- κ B (p50/p65) in the control of ovarian cell apoptosis and proliferation. *Cell and Tissue Research*. 2014;358(2):627–32.
173. Smith DL Jr, McClure JM, Matecic M, Smith JS. Calorie restriction extends the chronological lifespan of *Saccharomyces cerevisiae* independently of the Sirtuins. *Aging Cell*. 2007; 6(5): 649-62.
174. Smith J, Thomas D, Jolley H, Kodali V, Littke M, Munusamy P, et al. All that is silver is not toxic: silver ion and particle kinetics reveals the role of silver ion aging and dosimetry on the toxicity of silver nanoparticles. *Part Fibre Toxicol*. 2018 Dec 5;15(1):47.
175. Sobinof A, Sutherland J, Mclaughlin E. Intra-cellular signalling during female gametogenesis. *Molecular Human Reproduction*. 2013; 19(5): 265–278.
176. Sribna VO, **Stupchuk MS**, Kaleinikova OM, Voznesenska TYu, Blashkiv TV. Effect of silver nanoparticles intravenous treatment on oocytes and cells of their follicular environment under conditions of experimental. V International meeting Clusters and nanostructured materials (CNM-5'2018) (Uzgorod, 22-26 October 2018). - Materials of the International Meeting "Clusters and nanostructured materials (CNM-5)" – Uzhgorod, Ukraine, 2018:262.
177. Stupchuk M, Grushka N, Shepel O, Blaskiv T, Voznesenskaya T. Meiotic maturation of oocytes and viability of cells of their follicular environment, thymus

and lymph nodes under conditions of experimental immune glomerulonephritis . Bulletin of Problems of Biology and Medicine. 2015; 2(125): 229-33. [in Ukrainian].

178. **Stupchuk MS.** The effect of experimental immune-mediated kidney injury on ovarian function. CYS: Conference for Young Scientists (Kyiv, 21-25 September 2015). Abstract book. Lutsk, Vezha-Print, 2015: 143.

179. **Stupchuk MS,** Voznesenskaya TYu. The effect of resveratrol and an inhibitor of Nf- κ B on the functional status of ovarian cells under conditions of oxidative stress *in vitro*. 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation (Yaremche, Ukraine, June 18-21, 2019). Proceedings. – Yaremche, 2019: 21.

180. **Stupchuk MS.** The impact of Sirtuin activity modulators on the cumulus cells viability of female mice in the conditions of experimental systemic immune disorder. 2nd Conference for Young Scientists of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology NAS of Ukraine (CYS-2017) (Kyiv, June 6-9, 2017) – The Ukrainian biochemical journal, 2017, Vol. 89: 126.

181. **Stupchuk MS.** 9th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS 2017), Lviv, September 8-11, 2017 – Book of abstracts. – Lviv, 2017:29.

182. Takeo S, Sato D, Kimura K, Monji Y, Kuwayama T, Kawahara-Miki R, Iwata H. Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. J Reprod Dev. 2014 Apr 24;60(2):92-9. Epub 2013 Dec 27.

183. Tasselli L, Zheng W, and Chua KF. SIRT6: novel mechanisms and links to aging and disease. Trends Endocrinol Metab 2017; 28: 168–

184. Tatone C, Di Emidio G, Barbonetti A, Carta G, Luciano AM, Falone S, Amicarelli F. Sirtuins in gamete biology and reproductive physiology: emerging roles and therapeutic potential in female and male infertility. Hum Reprod Update. 2018 May 1;24(3):267-89.

185. Tatone C, Di Emidio G, Vitti M, Di Carlo M, Santini S Jr, D'Alessandro AM, et al. Sirtuin Functions in Female Fertility: Possible Role in Oxidative Stress

- and Aging. *Oxid Med and Cell Long*. 2015, Article ID 659687, 11 pages, 2015. Epub 2015 May 5.
186. Tatone C, Eichenlaub-Ritter U, Amicarelli F. Dicarbonyl stress and glyoxalases in ovarian function. *Biochemical Society Transactions*. 2014; 42(2): 433–8.
187. Tatone C, Amicarelli M, Carbone M. Cellular and molecular aspects of ovarian follicle ageing. *Human Reproduction Update*. 2008; 14(2): 131–42.
188. Tatone C, Eichenlaub-Ritter U, Amicarelli F. Dicarbonyl stress and glyoxalases in ovarian function. *Biochemical Society Transactions*. 2014; 42(2): 433–38.
189. Taylor U, Garrels W, Barchanski A, Peterson S, Sajti L, Lucas-Hahn A, et al. Injection of ligand-free gold and silver nanoparticles into murine embryos does not impact pre-implantation development. *Beilstein J Nanotechnol*. 2014; 21(5): 677-688.
190. Taylor U, Tiedemann D, Rehbock C, Kues W, Barcikowski S, Rath D. Influence of gold, silver and gold-silver alloy nanoparticles on germ cell function and embryo development. *Beilstein J Nanotechnol*. 2015; 5(6): 651-64.
192. Thomas F, Vanderhyden B. Oocyte-granulosa cell interactions during mouse follicular development: regulation of kit ligand expression and its role in oocyte growth. *Reprod Biol Endocrinol*. 2006; 4:19.
193. Tiedemann D, Taylor U, Rehbock Ch, Jakobi J, Klein S, Kues W, et al. Reprotoxicity of gold, silver, and gold-silver alloy nanoparticles on mammalian gametes. *Analyst*. 2014;139(5):931-42.
194. Tsai F and Gardner D Nicotinamide, a component of complex culture media, inhibits mouse embryo development *in vitro* and reduces subsequent developmental potential after transfer. *Fertility and Sterility*. 1994; 61(2):376–82.
196. Vachharajani V, Liu T, Wang X, Hoth JJ, Yoza BK, McCall CE. Sirtuins link inflammation and metabolism. *J Immunol Res*. 2016;2016:8167273.

197. van Aerle, Lange A, Moorhouse A. Molecular Mechanisms of Toxicity of Silver Nanoparticles in Zebrafish Embryos. *Environ Sci Technol.* 2013; 47(14):8005–14.
198. van de Ven RA, Santos D, Haigis MC. Mitochondrial Sirtuins and Molecular Mechanisms of Aging. *Trends Mol Med.* 2017, 23(4): 320-331;
199. van der Zande M, Vandebriel R, Van Doren E. Distribution, elimination, and toxicity of silver nanoparticles and silver ions in rats after 28-day oral exposure. *ACS Nano.* 2012;6:7427-42.
200. Verdin E. The many faces of sirtuins: coupling of NAD metabolism, sirtuins and lifespan. *Nature Medicine.* 2014;20(1):25–7.
201. Viña J, Borras C, Gomez-Cabrera MC. A free radical theory of frailty. *Free Radic Biol Med.* 2018 Aug 20;124:358-63.
202. Völker C, Oetken M, Oehlmann J. The biological effects and possible modes of action of nanosilver. *Rev Environ Contam Toxicol.* 2013;223:81-106.
203. Voznesenskaya T, Makogon N, Bryzgina T, Sukhina V, Grushka N, Alexeyeva I. Melatonin protects against experimental immune ovarian failure in mice. *Reproductive Biology.* 2007; 7(3):207-19.
204. Wai T, Ao A, Zhang X, Cyr D, Dufort D, Shoubridge EA. The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biol Reprod.* 2010; 83: 52–62.
205. Wang Y, Subramanian M, Yurdagul A Jr, Barbosa-Lorenzi VC, Cai B, de Juan-Sanz J, et al. Mitochondrial Fission Promotes the Continued Clearance of Apoptotic Cells by Macrophages. *Cell.* 2017 Oct 5;171(2):331-345.e22. doi: 10.1016/j.cell.2017.08.041. Epub 2017 Sep 21. Wątroba M, Szukiewicz D. The role of sirtuins in aging and age-related diseases. *Adv Med Sci.* 2016;61:52–62.
206. Wen H, Dan M, Yang Y, Lyu J, Shao A, Cheng X, et al. Acute toxicity and genotoxicity of silver nanoparticle in rats. *PLoS ONE.* 2017;12(9): e0185554.
207. Weng Q, Liu Z, Li B, Liu K, Wu W, Liu H. Oxidative Stress Induces Mouse Follicular Granulosa Cells Apoptosis via JNK/FoxO1 Pathway. *PLoS ONE.* 2016; 11(12): e0167869.

208. Winnik S, Auwerx J, Sinclair D, Matter C. Protective effects of sirtuins in cardiovascular diseases: from bench to bedside. *Eur Heart J*. 2015; 36:3404–12.
209. Winnik S, Stein S, Matter CM. SIRT1 – an anti-inflammatory pathway at the crossroads between metabolic disease and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 2012; 10: 1–3.
211. Xue Y, Zhang S, Huang Y, Zhang T, Liu X, Hu Y, et al. Acute toxic effects and gender-related biokinetics of silver nanoparticles following an intravenous injection in mice. *J Appl Toxicol*. 2012; 32: 890–9.
212. Xue Y, Lofland S, Hu X. Thermal Conductivity of Protein-Based Materials: A Review. *Polymers (Basel)*. 2019 Mar 11;11(3). pii: E456.
213. Yamakuchi M. MicroRNA regulation of SIRT1. *Front Physiol*. 2012;3:68.
214. Yanchiy R, Voznesenska T, Shepel O, Bryzgina T, Sukhina V, Lazarenko L, et al. Production of immunoregulatory cytokines at autoimmune damage of mammalian ovaries. *Int Jour of Physiol and Patophysiol*. 2010; 1(3):227-34.
215. Yang X, Gondikas A, Marinakos S, Auffan M, Liu J, Hsu-Kim H, et al. Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environ Sci Technol*. 2012.;46(2):1119–27.
217. Ye X, Li M, Hou T, Gao T, Zhu W, Yang Y. Sirtuins in glucose and lipid metabolism. *Oncotarget* 2017;8:1845–59.
218. Yeung F, Hoberg J, Ramsey C. Modulation of NF- κ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylase. *EMBO Journal*. 2004; 23(12):2369–80.
219. Yoo JY, Kim TH, Fazleabas AT, Palomino WA, Ahn SH, Tayade C, et al. KRAS activation and over-expression of SIRT1/BCL6 contributes to the pathogenesis of endometriosis and progesterone resistance. *Sci Rep*. 2017;7:6765.
220. Yoon JD, Jeon Y, Cai L, Hwang SU, Kim E, Lee E, et al. Effects of coculture with cumulus-derived somatic cells on *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Theriogenology*. 2015;83(2):294-305.

221. Yu W, Son J, Lee J, Kim S, Lee I, Baek H, et al. Effects of silver nanoparticles on pregnant dams and embryo-fetal development in rats. *Nanotoxicology*. 2014; 1: 85-91.
222. Zhang L, Hou X, Ma R, Moley K, Schedl T, Wang Q. Sirt2 functions in spindle organization and chromosome alignment in mouse oocyte meiosis. *FASEB J*. 2014;28:1435–45.
223. Zhang N, Li Z, Mu W, Li L, Liang Y, Lu M, et al. Calorie restriction-induced SIRT6 activation delays aging by suppressing NF- κ B signaling. *Cell Cycle* 2016;15: 1009–1018.
224. Zhang T, Zhou Y, Li L, Wang HH, Ma XS, Qian WP, Shen W, et al. SIRT1, 2, 3 protect mouse oocytes from postovulatory aging. *Aging (Albany NY)*. 2016b;8:685–96.
225. Zhang XM, Li L, Xu JJ, Wang N, Liu WJ, Lin XH, et al. Rapamycin preserves the follicle pool reserve and prolongs the ovarian lifespan of female rats via modulating mTOR activation and sirtuin expression. *Gene*. 2013 Jul 1;523(1):82-7.
226. Zhao HC, Ding T, Ren Y, Li TJ, Li R, Fan Y, et al. Role of Sirt3 in mitochondrial biogenesis and developmental competence of human *in vitro* matured oocytes. *Hum Reprod*. 2016;31:607–22.
227. Zhao X, Zhao H, Yan L, Li N, Shi J, Jiang C. Recent Developments in Detection Using Noble Metal Nanoparticles. *Crit Rev Anal Chem*. 2019 Feb 27:1-14.
228. Zheng K, Setyawati M, Leong D, Xie J. Antimicrobial gold nanoclusters. *ACS Nano*. 2017; 11: 6904–10.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:**В яких опубліковані основні наукові результати дисертації:**

1. **Ступчук МС**, Грушка НГ, Шепель ОА, Блашків ТВ, Вознесенська ТЮ. Мейотичне дозрівання ооцитів і життєздатність клітин їх фолікулярного оточення, тимуса і лімфатичних вузлів в умовах експериментального імунного гломерулонефриту. Вісн пробл біол мед. 2015; Вип 4, 2(125): 229-32.
2. Вознесенська ТЮ, **Ступчук МС**, Шепель ОА, Блашків ТВ. Оваріальна функція в умовах експериментального аутоімунного розладу у мишей. Вісн пробл біол мед. 2016; 2(3):113-8.
3. Литвиненко АП, **Ступчук МС**, Блашків ОВ, Вознесенська ТЮ. Морфофункціональний стан жіночої репродуктивної системи в умовах застосування наночастинок срібла. Наук вісн Східноєвр нац універ ім Л України. 2016; 12:131-7.
4. Lytvynenko A, Rieznichenko L, Sribna V, **Stupchuk M**, Grushka N, Shepel A, Voznesenska T, et al. Functional status of reproductive system under treatment of silver nanoparticles in female mice. IJRCOG. 2017; 6(5): 1713-20.
5. **Ступчук МС**, Блашків ОТ, Вознесенская ТЮ. Влияние наночастиц серебра на ооциты и эмбрионы. Пробл репрод. 2017; 23(2): 22-6.
6. **Ступчук МС**, Вознесенська ТЮ. Біологічна роль сиртуїнів в еукаріотів. Фізіол журн. 2017; 63(4): 105-13.
7. Вознесенська ТЮ, **Ступчук МС**, Калейнікова ОМ, Блашків ТВ. Сиртуїн 1 – ключовий клітинний регулятор метаболізму та оксидативного стресу. Вісн пробл біол мед. 2018; Вип 1, 1(142): 20-5.
8. Вознесенська ТЮ, **Ступчук МС**, Грушка НГ, Кондрацька ОА, Блашків ТВ. Вплив внутрішньовенного введення наночастинок срібла на ДНК ядер клітин тимуса, лімфатичних вузлів і фолікулярного оточення

ооцита в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження. Вісн пробл біол мед. 2018; Вип 1, 2(143): 327-31.

9. Blashkiv TV, **Stupchuk MS**, Sribna VA, Kaleynykova OM, Grushka NG, Voznesenska TY. Resumption of Meiotic Maturation of Oocytes, Preand Post-Implantational Embryonic Mortality under Conditions of Experimental Glomerulonephritis and Treatment of Silver Nanoparticles. Nano Biomed Eng. 2018; 10(4): 355-61.
10. **Ступчук МС**, Янчій РІ, Вознесенська ТЮ. Роль сиртуїнів у змінах функціонального стану ооцитів та клітин їх фолікулярного оточення в умовах системного аутоімунного ушкодження у мишей. Фізіол журн. 2019; 65(1): 34-40.

Які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Stupchuk MS**. The effect of experimental immune-mediated kidney injury on ovarian function. CYS: Conference for Young Scientists (Kyiv, 21-25 September 2015). Abstract book. Lutsk, Vezha-Print, 2015: 143.
2. **Ступчук МС**, Вознесенська ТЮ. Участь сиртуїнів у процесі мейотичного дозрівання ооцитів мишей. XV міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances (м. Київ, 18-21 квітня 2017 р.). Збірник тез конференції – Київ: Паливода А.В., 2017:116-17.
3. Срібна ВО, Шепель ОА, **Ступчук МС**, Маврич СІ, Резниченко ЛС, Калейнікова ОМ, та ін. Функціональний стан яєчника в умовах експериментального імунного ушкодження та введення субстанції наночастинок срібла. Наукова конференція, присвячена 120-річчю від дня народження та 40-річчю від дня смерті акад. М.М. Сиротиніна - 15 травня 2017 р, м. Київ, Інститут фізіології ім. А.А. Богомольця НАН України. – Збірник тез – Київ, 2017: 26.
4. **Ступчук МС**. Вплив експериментального імунного ушкодження нирок на показники функціонального стану яєчників мишей. IV

- Всеукраїнська наукова конференція студентів та молодих вчених з фізіології з міжнародною участю (м. Харків, 16 травня 2017 р.). Збірник матеріалів конференції – Харків: ХНМУ, 2017:117.
5. **Stupchuk MS.** The impact of Sirtuin activity modulators on the cumulus cells viability of female mice in the conditions of experimental systemic immune disorder. 2nd CYS of the Division of Biochemistry, Physiology and Molecular Biology NAS of Ukraine (CYS-2017) (Kyiv, Juny 6-9, 2017) – The Ukrainian biochemical journal, 2017, Vol. 89: 126.
 6. **Stupchuk MS.** 9th EFIS-EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS 2017), Lviv, September 8-11, 2017 – Book of abstracts. – Lviv, 2017:29.
 7. Вознесенська ТЮ, **Ступчук МС**, Шепель ОА, Грушка НГ, Блашків ТВ. Цілісність ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцита, тимуса і лімфатичних вузлів в умовах експериментального імунного ушкодження нирок та введення наночастинок срібла. VIII Міжнародна наукова конференція «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (м. Київ, 17-20 жовтня 2017 р.). – Збірник тез доповідей конференції – Київ, КНУ ім.Т. Шевченка, 2017: 30.
 8. **Ступчук МС.** Вплив ресвератролу на *in vitro* відновлення мейотичного дозрівання ооцитів в умовах дії інгібітора аспартатних мітохондріальних переносників. II Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні тенденції розвитку науки» (м.Київ, 17-18 березня 2018 р.). Збірник матеріалів конференції – Київ.: МЦНД, 2018: 35.
 9. **Ступчук МС**, Вознесенська ТЮ. Вплив ресвератролу на відновлення мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність кумулюсних клітин в умовах оксидативного стресу *in vitro*. XVI Міжнародна наукова конференція студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / Bioscience advances (м. Київ, 24-27 квітня 2018 р.). Збірник тез доповідей конференції – Київ: Паливода А.В., 2018: 270-71.

10. Калейнікова ОМ, **Ступчук МС**, Срібна ВО, Блашків ТВ, Вознесенська ТЮ. Вплив застосування субстанції НЧС, активатора і блокатора сиртуїна 1 на репродуктивну функцію в умовах ЕСАУ. Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні проблеми сучасної біології, тваринництва та ветеринарної медицини» (м. Львів, 4-5 жовтня 2018 р.). – Збірник тез конференції. – Львів, 2018:118.
11. **Sribna VO, Stupchuk MS, Kaleinikova OM, Voznesenska TYu, Blashkiv TV.** Effect of silver nanoparticles intravenous treatment on oocytes and cells of their follicular environment under conditions of experimental. V International meeting Clusters and nanostructured materials (CNM-5'2018) (Uzgorod, 22-26 October 2018). - Materials of the International Meeting "Clusters and nanostructured materials (CNM-5)" – Uzhgorod, Ukraine, 2018:262.
12. **Ступчук МС**, Вознесенська ТЮ. Участь сиртуїна 1 у мейотичному дозріванні в ооциті. XX-ий з'їзд Українського фізіологічного товариства ім. П.Г. Костюка з міжнародною участю, присвячений 95-річчю від дня народження академіка П.Г. Костюка (27-29 травня 2019 р.). – Фізіол. журн., 2019, Т. 65, № 3 (Додаток) : матеріали з'їзду. – Київ, 2019:7-8.
13. **Stupchuk MS, Voznesenskaya TYu.** The effect of resveratrol and an inhibitor of Nf- κ B on the functional status of ovarian cells under conditions of oxidative stress *in vitro*. 6th Ukrainian Congress for Cell Biology with international representation (Yaremche, Ukraine, June 18-21, 2019). Proceedings. – Yaremche, 2019: 21.

Які додатково відображають наукові результати дисертації:

1. **Ступчук МС**, Вознесенська ТЮ, Грушка НГ, Шепель ОА, Джуран БВ, Блашків ТВ. **Патент на корисну модель № 120418 / Спосіб моделювання системного аутоімунного ушкодження у мишей // (№ 120418 від 25.10.2017, Бюл. № 20).**