

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

СРІБНА ВАЛЕНТИНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК.616-092:618.112:616-092.4

**РОЗЛАД ОВАРІАЛЬНОЇ ФУНКЦІЇ В УМОВАХ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУНОКОМПЛЕКСНОГО УШКОДЖЕННЯ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата медичних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі імунофізіології Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України

Науковий керівник: заслужений діяч науки і техніки України,
професор, доктор біологічних наук
завідувач відділу імунофізіології
Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України
Янчій Роман Іванович

Офіційні опоненти: академік НАМН України,
член-кореспондент НАН України,
доктор медичних наук, професор,
зав. відділу ендокринології репродукції та
адаптації ДУ «Інститут ендокринології
та обміну речовин ім. В.П.Комісаренка» НАМН України
Резніков Олександр Григорович

доктор медичних наук, професор,
завідувач лабораторії імунології
ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і
гінекології» НАМН України
Чернишов Віктор Павлович

Захист відбудеться 13 лютого 2018р. о 16:00 год на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України за адресою: 01024, м.Київ, вул.Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України за адресою: 01024, м.Київ, вул.Богомольця,4.

Автореферат розісланий « » січня 2018р.

Вчений секретар
спеціалізованої
вченої ради



к.б.н. Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Передчасна недостатність яєчників (ПНЯ) - розлад оваріальної функції, що настає у жінок до 40 років - активно вивчається. Дане захворювання стає поширеним через відстрочку материнського віку і становить на сьогодні медико-соціальну проблему.

Відповідно до сучасних уявлень в розвитку ПНЯ провідну роль відводять аутоімунній патології [Szlendak-Sauer K., et al. 2016; Tšuiiko O., et al. 2016; Daan N., et al. 2016; Rossetti R., et al. 2017]. До теперішнього часу неясно, чи розвиток аутоімунного процесу є первинною причиною виникнення цього захворювання, чи є результатом впливу тривалої хронічної патології, як би замикаючи «хибне» коло патогенезу [Silva C., et al. 2014; Szlendak-Sauer K., et al. 2016].

Останніх десять років системне запалення розглядають як чинник аутоімунізації і репродуктивних розладів у жінок [Cervera R., et al. 2010; Mc Dade T., et al. 2016; Kwak-Kim J., et al. 2016; Kushnir V., et al. 2016].

Зростає кількість публікацій про те, що оксидативно-нітрозативний стрес задіяний в етіології багатьох захворювань людини [Rochette L., et al. 2013; Castro R., et al., 2015; Fatima S. et al. 2016; Lee C., et al., 2016]. Є дані про те, що оксидативний стрес залучений в репродуктивних розладах у жінок, включаючи безпліддя, викидні, прееклампсію, затримку росту плода і передчасні пологи. Наявність надлишкових активних форм кисню може привести до пошкодження білків, ліпідів і ДНК клітин [Al-Gubory K., et al. 2010; Duhig K., et al. 2016].

На сьогодні отримано нові дані про те, що численні захворювання людини є результатом порушення гомеостазу металів, зокрема заліза і міді, які каталізують та беруть участь в реакціях утворення ушкоджувальних вільних радикалів [Jomova K., et al. 2011; Voltan R., et al. 2016]. Встановлено, що одним із наслідків дефіцита заліза в організмі може бути зниження використання NO [Vanin A., et al. 2004; Петухов В. и др. 2011]. Окрім цього редокс-активні метали можуть зв'язуватися з фосфоліпідами мембрани, порушуючи цілісність її ліпідного бішару і таким чином підвищуючи його сприйнятливість до перекисного окиснення [Voltan R., et al. 2016].

На теперішній час нанотехнології займають провідне місце в науково-практичній діяльності людини і набувають все більшого застосування в лікуванні та діагностиці захворювань різної етіології. Новітнім напрямком фармакології є використання нанопрепаратів як субстанції для нових лікарських засобів. Перспективними в цьому аспекті є наночастинки металів, зокрема наночастинки нульвалентного заліза (НЧНЗ). Відмічено, що НЧНЗ здатні відновлювати нітрат, а також встановлено, що впродовж його відновлення виділяються сполуки азоту [Hwang Y., et al. 2011]. Однак, можлива протективна або токсична дія НЧНЗ досліджена недостатньо, а дані про оваріальну функцію, життєздатність клітин та пошкодження геному органів імунної системи мишей (тимуса і лімфатичних вузлів) в умовах системної імунної патології – відсутні.

Таким чином, зважаючи на те, що кількість жінок в усьому світі з ПНЯ зростає, встановлення особливостей та розкриття можливих патогенетичних ланок її розвитку є важливим завданням для фізіології і медицини. Актуальними на сьогодні є дослідження параметрів мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин

фолікулярного оточення ооцитів (ФОО), а також життєздатності та особливостей розподілу одониткових розривів (ОНР) ДНК ядер клітин тимуса і лімфатичних вузлів в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження (ЕІУ), введення антиоксиданту, блокатора NO-синтази, субстрата NOS та експериментальної субстанції НЧНЗ, що раніше не було вивчено.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційне дослідження виконано в межах наукової програми відділу імунофізіології Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України: «Дослідження молекулярно-генетичних та імунопатологічних механізмів функціональних порушень жіночої репродуктивної системи та можливості їх корекції». Державний реєстраційний номер теми 0112U008233.

Мета роботи:

вивчити розлад оваріальної функції в умовах ЕІУ, а саме дослідити параметри мейотичного дозрівання ооцитів, а також життєздатності та ОНР ДНК ядер клітин ФОО, тимуса і лімфатичних вузлів.

Для досягнення поставленої мети сформульовані наступні **завдання:**

1. Дослідити вплив імунізації бичачим сироватковим альбуміном (БСА) на оваріальну функцію та розподіл ОНР ДНК ядер клітин тимуса і лімфатичних вузлів.
2. З'ясувати вплив введення антиоксиданта на мейотичне дозрівання ооцитів, життєздатність клітин їх ФОО, розподіл ОНР ДНК ядер клітин ФОО, тимуса і лімфатичних вузлів в умовах ЕІУ.
3. Оцінити вплив введення НЧНЗ на функціональний стан яєчника, тимуса та лімфатичних вузлів в умовах ЕІУ.
4. Дослідити вплив антиоксиданта, блокатора ПАРП, субстрата NOS, блокатора iNOS на *in vitro* відновлення мейотичного дозрівання ооцитів та на розподіл ОНР ДНК ядер ооцитів.

Об'єкт дослідження – оваріальна функція в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження.

Предмет дослідження – зміни параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, життєздатності клітин ФОО, клітин тимуса і лімфатичних вузлів та особливості розподілу ОНР ДНК в ооцитах, клітинах ФОО, клітинах органів імунної системи в умовах моделювання ЕІУ та дії експериментальних впливів.

Методи дослідження – культивування ооцитів *in vitro*, цитоморфологічний метод, метод лужного гель-електрофорезу поодиноких клітин (метод ДНК-комет), метод флуоресцентної мікроскопії, статистичні методи обробки результатів.

Наукова новизна отриманих результатів. З використанням моделі експериментального імунокомплексного ушкодження встановлено особливості розладу оваріальної функції та запропоновано нові шляхи щодо його корекції. Нами вперше показано, що в умовах ЕІУ, яке досягається довготривалою імунізацією

самиць мишей ксеногенним білком - БСА, у тварин відбувається пошкодження ДНК ядер тимуса і лімфатичних вузлів та формується розлад оваріальної функції, що відображається пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів *in vitro* та посиленням клітинної загибелі ФОО. Вперше встановлено, що введення антиоксиданта за умов ЕІУ зумовлює покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів та зниження клітинної загибелі ФОО, окрім цього відмічається зменшення пошкодження ДНК ядер клітин ФОО, тимуса і лімфатичних вузлів, що свідчить про позитивний корегуючий ефект застосування антиоксиданта при оваріальному розладі імунного генезу. Вперше показано, що введення експериментальної субстанції наночастинок нульвалентного заліза не спричиняє порушення оваріальної функції, а в умовах ЕІУ параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин ФОО покращуються. В органах імунної системи введення НЧНЗ не чинить пригнічуючого ефекту, проте в умовах ЕІУ спостерігається покращення параметрів життєздатності клітин тимуса і лімфатичних вузлів, а також змінюється розподіл ОНР ДНК їх клітин у бік зменшення пошкодження ДНК. Вперше показано, що в регуляції репарації ОНР ДНК ооцитів задіяний оксид азоту.

Практична значимість отриманих результатів. Результати проведеного дослідження і їх аналіз є внеском як у розвиток фундаментальних знань стосовно функціонального стану яєчника, тимуса і лімфатичних вузлів в умовах ЕІУ так і складають підґрунтя для подальшого дослідження дії лікарських препаратів на ооцити, клітини ФОО, тимуса і лімфатичних вузлів та здійснення диференційованих фармакологічних впливів на репродуктивну і імунну системи у жінок.

Дані щодо параметрів мейотичного дозрівання ооцитів в умовах ЕІУ дають підстави рекомендувати застосування антиоксиданту для подальшого вивчення і використання у випадках системних імунних розладів і безпліддя, а також при не результативних спробах екстракорпоральних запліднень.

Відомості про те, що в умовах ЕІУ введення субстанції НЧНЗ зумовлює підвищення і нормалізацію параметрів мейотичного дозрівання ооцитів у мишей надають підстави для обґрунтування і розробки новітніх препаратів для лікування розладів оваріальної функції.

Одержані в роботі результати розкривають і доповнюють відомості про регуляцію оваріальної функції при розладах імунного генезу, що створює підґрунтя для нових перспективних фармакологічних підходів і розвиток допоміжних репродуктивних технологій.

Особистий вклад здобувача. При виконанні дисертаційної роботи здобувачем проведено пошук і аналіз вітчизняної та зарубіжної наукової літератури за напрямом дослідження. Формування основних ідей роботи, мети та завдань експериментальних досліджень, аналіз наукової літератури за темою дисертації, організація та проведення переважної частини досліджень, статистична обробка фактичного матеріалу, інтерпретація отриманих результатів, обґрунтування наукових висновків та написання тексту дисертації здійснені автором самостійно.

Науковий керівник брав безпосередню участь в розробці дизайну роботи, обговоренні результатів досліджень та уточненні формулювання висновків. Окремі експерименти були проведені разом із співавторами опублікованих робіт.

Апробація результатів дисертаційної роботи. Основні положення й результати роботи були представлені на: Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фізіологія і патологія нейроімуноендокринної регуляції» (м.Чернівці 5-6 жовтня 2017р.); науково-практичній конференції молодих учених за участю міжнародних спеціалістів, присвяченої Дню науки в Україні «Медична наука на перетині спеціальностей: сьогодні і майбутнє» (м.Харків, 19 травня 2017р.); научно-практической конференции с международным участием «XVI чтения В.В. Подвысоцкого» (м.Одеса, 18-19 травня 2017г.); IV Всеукраїнській науковій конференції студентів та молодих вчених з фізіології з міжнародною участю «Фізіологія – медицині, фармації та педагогіці: актуальні проблеми та сучасні досягнення» (м.Харків, 16-17 травня 2017р.); 6th Annual International Scientific-Practical Conference “Medicine pressing questions” (г.Баку, Азербайджан, 10-11 мая 2017); IV Международной научно-практической конференции «Наука и медицина: современный взгляд молодежи» (г.Алматы, Казахстан, 20-21 квітня 2017г.); IV Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених “Іновації та перспективи сучасної медицини», ВІМСО 2017 (м.Чернівці, 5-7 квітня 2017р.); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні проблеми клінічної та фундаментальної медицини» (м.Харків, 13-14 квітня 2017р.); всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю „Жіноче здоров’я: імплементація сучасних протоколів в клінічну практику” (м.Тернопіль, 2-3 березня 2017р.); VII Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» (м.Харків, 5-7 жовтня 2016 р.); VII Науково-практичній конференції з міжнародною участю «YouthNanoBioTech-2016. Молодіжний форум з нанобіотехнологій-2016» (м.Київ, 25-26 травня 2016 р.); щорічній медичній конференції молодих науковців (м.Київ, 15-16 жовтня 2015р.); International Conference on Advances in Cell Biology and Biotechnology (Lviv, 11-13 october 2015).

Публікації. Результати дисертаційної роботи викладено в 22 публікації: 8 статей у провідних вітчизняних і зарубіжних фахових наукових журналах рекомендованих ДАК України та 13 тез доповідей на міжнародних конференціях. Отримано деклараційний патент на корисну модель «Спосіб оцінки впливу наночастинок нульвалентного заліза на репродуктивну та імунну системи в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження у мишей» (№112982 від 10.01.2017, Бюл.№1).

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 (257 найменувань) та додатку. Робота викладена на 129 сторінках машинописного тексту та проілюстрована 31 рисунком та 12 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведені на невагітних статевозрілих самицях мишей лінії СВА масою 16–22 г із дотриманням усіх вимог щодо роботи з тваринами (Конвенція Ради Європи про охорону хребетних тварин, 1986р., Директиви ЄС №609,1986р., Наказ МОЗ України №66, 2006р., Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3447-IV, 2006р.).

Експериментальне імунокомплексне ушкодження (EIU) відтворювали шляхом довготривалої імунізації самиць мишей зростаючою дозою ксеногенного білка – бичачого сироваткового альбуміну (БСА, «Sigma», США) за такою схемою: 1-й тиждень введення 150 мг БСА/кг; 2-й - 175 мг/кг; 3-й - 200 мг/кг; 4-й - 200 мг/кг; 5-й - 250 мг/кг; 6-й - 300 мг/кг маси миші [Пат. №93351 від 25.09.2014]

Модель EIU характеризується утворенням і накопиченням імунних комплексів в тканинах, причому в більшому ступеню в кліренсних органах із значною інфільтрацією їх клітинами природного і адаптивного імунітету, наявністю циркулюючих імунних комплексів, посиленням клітинної загибелі у тимусі і лімфатичних вузлах, зсувом лейкограми крові вліво, активацією клітинної ланки адаптивного імунітету, зокрема антиген-специфічних лімфоцитів, а також посиленням функціонально-метаболічної активності клітин неспецифічної резистентності - нейтрофілів периферичної крові та активацією фагоцитозу [Павлович С.І. та ін.]. При імунізації БСА (модель EIU) спостерігається зменшення маси яєчника; зменшення кількості ооцитів, які виділяються з одного яєчника; зменшення кількості примордіальних, первинних, вторинних і третинних фолікулів та жовтих тіл; зростання кількості атретичних фолікулів; порушення естрального циклу: збільшується тривалість перебування тварин на стадії дієструс і відсутність настання стадії еструс у порівнянні з контрольними тваринами.

Культивування ооцитів *in vitro*. З яєчників мишей неферментативно (механічно) виділяли ооцити. Останні, отримані від від мишей однієї групи збирали та розподіляли в окремі камери, по 10-20 у кожній. Контрольні та експериментальні ооцити культивували в однакових умовах (стерильний бокс, камери по 400 мкл культурального середовища DME з 15 mM NEPES, концентрація Ca²⁺ 1,71 mM, температура 37 °C, тривалість 2, 4 і 20 год). Морфологічні дослідження ооцитів здійснювали під мікроскопом МБС-10. Визначали стан зародкового пухирця, перивітелінового простору та цитоплазми – щільність, ступінь гранульованості, ознаки фрагментації і дегенерації. Після 2 год (4 год – розділ 6) 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 тільца).

Метод ДНК-комет (лузний). Для виявлення ОНР ДНК ядер ооцитів, клітин тимуса, лімфатичних вузлів та ФОО використовували метод лузного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет – «DNA-comet assay») [Afanasieva K. et al., 2010]. Електрофорез препаратів (після їх стабілізації протягом 20 хв у лузному електрофоретичному буфері) проводили за допомогою приладу Multiphor II («LKB», Швеція) при напрузі 24 В та силі струму 100 мА протягом

30 хв. Аналіз ДНК–комет на електрофореграмах, забарвлених Хехст 33342 (700 мкмоль/л) протягом 15 хв, здійснювали візуально, використовуючи люмінесцентний мікроскоп ЛЮОММ І-1 (Росія) при застосуванні водно-імерсійного об'єктива ($\times 30$). На кожному мікропрепараті аналізували від 30 (для ооцитів) до 400 (для клітин тимуса, лімфатичні вузли, ФОО) окремо розташованих ДНК-комет. За співвідношенням ДНК у “голові” та “хвості” комети поділяли на 5 класів (0-4) [Collins A., et al. 2004].

Прижиттєве подвійне забарвлення флуоресцентними барвниками. Апоптотичну і некротичну загибель клітин оцінювали за морфологічними ознаками із застосуванням прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот Хехст 33342 та пропідіум йодиду [Shimizu S., et al. 1996]. Після виділення клітин проводили їх морфологічну оцінку рутинним методом виключення барвника – трипанового синього (0,2% розчин на 0,9% NaCl) [Клаус Д., 1990] Морфологічні дослідження проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа Люомам І-1 з водно-імерсійним об'єктивом $\times 85$. Використовували відеосистему передачі зображення з мікроскопа на комп'ютер. Визначали у (%) відносну кількість живих та апоптотичних клітин, а також клітин з ознаками некрозу у вибірках ≥ 200 клітин [Shimizu S., et al. 1996].

Використані речовини. В експериментах застосовано наступні речовини: бичачий сироватковий альбумін, БСА (Sigma, USA) в зростаючій дозі 150-300мг/кг; L-норвалін – специфічний блокатор аргінази II (50мг/кг, Sigma, США), етилметилгідроксипіридин сукцинат, ГС – антиоксидант (100 мг/кг, препарат «Мексидол», "Фармасофт", Російська Федерація), L-аргінін гідрохлорид- субстрат NOS (150мг/кг, Sigma, USA та *in vitro* в концентраціях 0,0004 mM, 0,04 mM, 4,0 mM, 40,0 mM), аміногуанідин - специфічний блокатор iNOS (25мг/кг, Sigma, USA та *in vitro* в концентраціях 0,0002 mM, 0,02 mM, 2,0 mM, 20,0 mM), 4-гідроксиквіназолін, 4-ГК – блокатор ПАРП-1 (Sigma, USA) в концентраціях *in vitro* 0,0001 mM, 0,01 mM, 1,0 mM, 10,0 mM, ресвератрол - антиоксидант (Sigma, USA) в концентраціях *in vitro* 0,002 μ M, 2,0 μ M, 0,2 mM, 2,0 mM, субстанція НЧНЗ (1,68мг/кг, Інститут біоколоїдної хімії ім.Ф.Д.Овчаренка НАНУ) – сферичної форми, розмір 40 нм, зі 100% вмістом заліза.

Статистична обробка результатів. Перевірку отриманих даних на нормальність розподілу проводили за тестом Колмогорова-Смірнова. Далі, за нормального розподілу, статистичну обробку результатів при порівнянні двох груп даних проводили з використанням критерію t Ст'юдента, 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 5.00 for Windows (Graph Pad Software, USA). Результати виражали як середнє \pm стандартне відхилення. $p < 0,05$ вважалося статистично вірогідним [Гланц С. 1998].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Розлад оваріальної функції в умовах ЕІУ. ПНЯ вивчають на моделях з використанням гризунів [He X., et al. 2016; Driscoll M., et al. 2016; Kadam K., et al. 2016]. В окрему групу можна виділити моделі імунного ушкодження на яких

нещодавно отримано нові дані [Bukovsky M., et al. 2012; Silva C., et al. 2014; Szlendak-Sauer K., et al. 2016; Liu T., et al. 2016]. Нещодавно встановлено, що імунізація самок мишей введенням БСА призводить до пригнічення скоротливості різних відділів матки [Литвиненко А.П., 2015]. Однак, можливі за таких умов порушення мейотичного дозрівання ооцитів, а також цитогенетичні порушення в клітинах ФОО, тимуса і лімфатичних вузлів залишаються вивченими не достатньо.

Нами показано, що за умов введення БСА відбувається пошкодження ДНК ядер клітин органів імунної системи, а саме відмічається перерозподіл ОНР ДНК ядер клітин тимуса і лімфатичних вузлів: частка ядер клітин тимуса 0-х/1-х класу зменшується в 3,1 рази ($p < 0,05$, $n=6$), в той час як частка ядер 4-х класу збільшується в 2,2 рази ($p < 0,05$, $n=6$); кількість клітин лімфатичних вузлів з ядрами 0-х/1-х і 2-х зменшується у, відповідно, 2,3 ($p < 0,05$, $n=6$) і 2,1 рази ($p < 0,05$, $n=6$), а клітин з ядрами 4-х збільшується в 3,6 рази ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з контролем.

Окрім цього відмічається розлад оваріальної функції – пригнічується мейотичне дозрівання ооцитів – зменшується кількість ооцитів, в яких розчиняється зародковий пухирець (метафаза I) на 22% ($p < 0,05$, $n=8$) та формується перше полярне тільце на 16% ($p < 0,05$, $n=8$), а також відбувається посилення загибелі клітин ФОО - кількість живих клітин зменшується в 1,3 рази ($p < 0,01$, $n=8$), а клітин з морфологічними ознаками апоптозу збільшується в 2,7 рази ($p < 0,01$, $n=8$) (рис.1 і 2).

Спираючись на власні результати, а також дані літератури, є підстави стверджувати, що імунізація БСА призводить до розвитку системного запального процесу з пошкодженням ДНК клітин органів імунної системи (тимуса та лімфатичних вузлів) та порушенням оваріальної функції, що проявляється пригніченням мейотичного дозрівання ооцитів, посиленням клітинної загибелі ФОО, що частково відображає розлад репродуктивної функції у жінки, а саме ПНЯ.

Таким чином, ми вважаємо, що модель ЕІУ є адекватною для подальшого вивчення патогенетичних ланок розвитку ПНЯ та можливих способів її корекції. Оцінка інтегральної цілісності генома клітин тимуса і лімфатичних вузлів дає підстави припустити, що за умов ПНЯ змінюється активність експресії генів, асоційованих з репарацією, що відображається як ОНР ДНК.

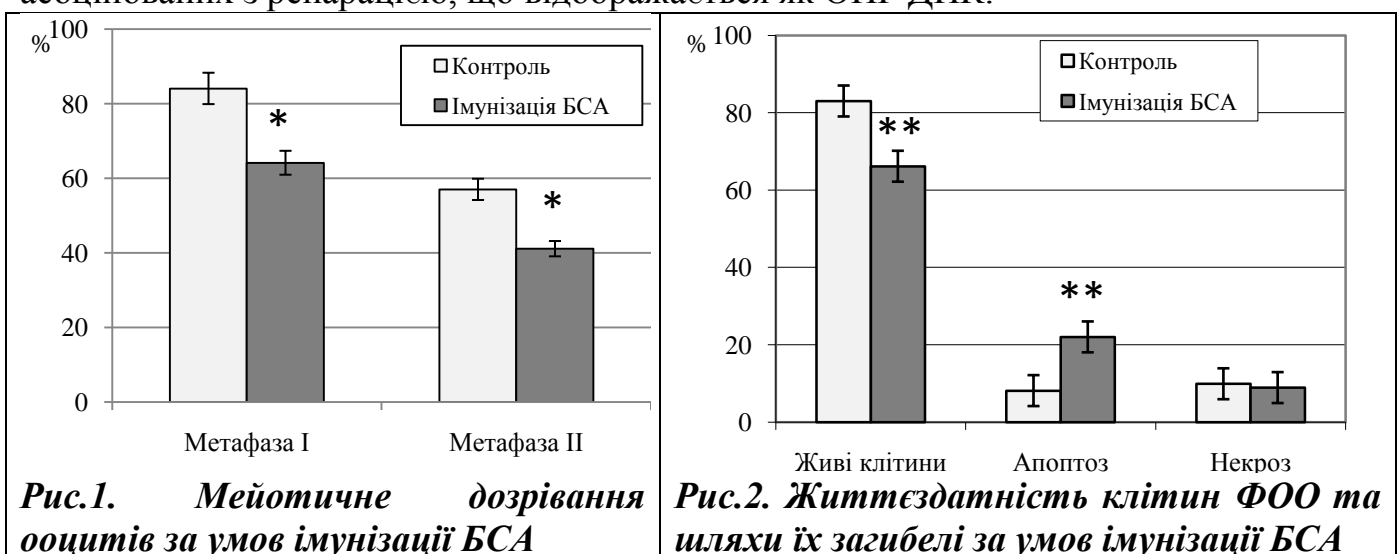


Рис.1. Мейотичне дозрівання ооцитів за умов імунізації БСА

Рис.2. Життєздатність клітин ФОО та шляхи їх загибелі за умов імунізації БСА

Примітки: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі

Вплив введення антиоксиданта на мейотичне дозрівання ооцитів, життєздатність клітин їх фолікулярного оточення та розподіл ОНР ДНК ядер клітин ФОО, тимуса і лімфатичних вузлів в умовах ЕІУ. Є дані про те, що оксидативний стрес залучений в репродуктивних розладах у жінок, включаючи безпліддя, викидні, прееклампсію, затримку росту плода і передчасні пологи. Наявність надлишкових активних форм кисню може привести до пошкодження білків, ліпідів і ДНК клітин. Антиоксиданти захищають клітини від перекисних реакцій, обмежуючи пошкодження клітин і допомагають зберегти цілісність їх мембрани [Al-Gubory K., et al. 2010; Duhig K., et al. 2016].

Етилметилгідроксіпіридин сукцинат (ГС, препарат «Мексидол») - речовина з антиоксидантними та мембранопротекторними властивостями. За останні роки її почали активно використовувати в різних галузях медицини. Нещодавно отримано дані про те, що в умовах імунокомплексемії застосування ГС чинило різнонаправлені ефекти: в оваріальному відділі матки спостерігалось зниження величин амплітуди і індексу скоротливості, у цервікальному – навпаки їх зростання. В цілому, ГС сприяв нормалізації окремих параметрів скоротливості, змінених за умов імунізації БСА [Литвиненко А.П. 2014].

Встановлено, що введення антиоксиданта – ГС в умовах ЕІУ призводить до покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів на стадіях метафази I та метафази II на, відповідно, 10% ($p < 0,05$, $n=6$) і 14% ($p < 0,05$, $n=8$), тоді як введення ГС і L-норваліну зумовлює пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафази I на 28% ($p < 0,05$, $n=8$); у ФОО при введення ГС спостерігається зменшення клітинної загибелі, а саме частка живих клітин зростає в 1,2 раз ($p < 0,05$, $n=9$), а клітин з морфологічними ознаками апоптозу знижується в 3,5 рази ($p < 0,05$, $n=9$); введення ГС і L-норваліну призводить до збільшення у 2,3 рази ($p < 0,05$, $n=8$) клітин з морфологічними ознаками некрозу та зменшення у 3,7 рази ($p < 0,05$, $n=8$) клітин з ознаками апоптозу.

Ми вважаємо, що імунізація БСА стимулює секрецію потужних вазоактивних і прозапальних чинників, зокрема, збільшується генерація активних форм кисню та експресія iNOS, що за літературними даними призводить до відповідного збільшення утворення реактивних форм азоту [Nogueira C., et al. 2015], з наступним збільшенням клітинної загибелі та розвитком оксидативно-нітрозативного стресу. В сукупності це призводить до посилення запальних процесів на системному рівні, і як наслідок відбувається пошкодження функції органів жіночої репродуктивної системи, що узгоджується з даними про пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів і посилення загибелі клітин фолікулярного оточення ооцитів за апоптичним і некротичними шляхами за умов імунізації мишей гомогенатом аллогенних яєчників [Вознесенська Т.Ю. 2006], а застосування антиоксиданта (ГС) в даних умовах призводить до покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів і зниження клітинної загибелі ФОО.

Таким чином, отримані нами дані, та дані представлені в сучасній літературі описують зв'язок між АФК, запаленням і запрограмованою загибеллю клітин [Votan R., et al. 2016] викликають інтерес до пошуку нових шляхів, які будуть вивчені і спрямовані в терапевтичних цілях. Тому, подальшого з'ясування потребує

дослідження ефекту введення антиоксиданта ГС в умовах ЕІУ на пошкодження ДНК клітин ФОО, тимуса і лімфатичних вузлів.

Особливості розподілу ОНР ДНК ядер клітин тимуса, лімфатичних вузлів та ФОО в умовах ЕІУ та введення антиоксиданта. Відомо, що стійке пошкодження ДНК може призводити до мутагенезу та грубих хромосомних перебудов. Така нестабільність геному є суттєвим кроком до розвитку раку і, ймовірно, сприяє старінню й розвитку вікових захворювань [Hoeijmakers J., et al. 2009]. Окрім цього, пошкодження ДНК може запускати клітинну відповідь, яка лежить в основі імунопатологій, що включають, вірогідно, і системне запалення.

Експериментально встановлено, що введення ГС не впливає на кількість ОНР ДНК ядер лімфатичних вузлів та не справляє пошкоджуючого впливу на ДНК ядер клітин ФОО і тимуса, але відмічається зростання частки ядер 2-го класу останніх, відповідно, в 2,0 ($p < 0,05$, $n=5$) і 1,7 рази ($p < 0,05$, $n=6$). Введення ГС за умов ЕІУ призводить до зменшення пошкодження ДНК, а саме, частка ядер клітин ФОО, тимуса і лімфатичних вузлів 4-го класу з максимальним ушкодженням ДНК зменшується, відповідно, в 3,6 ($p < 0,01$, $n=5$), 2,6 ($p < 0,01$, $n=6$) і 1,7 рази ($p < 0,05$, $n=6$), натомість частка ядер 0/1-го класу, для яких характерна практично відсутністю первинних пошкоджень зростає, відповідно, в 2,0 ($p < 0,01$, $n=5$), 7,0 ($p < 0,01$, $n=6$) і 2,2 разів ($p < 0,05$, $n=6$).

Таким чином, введення антиоксиданта ГС контрольним тваринам не справляє пошкоджувального впливу на ДНК ядер клітин тимуса, лімфатичних вузлів і ФОО, а в умовах ЕІУ призводить до перерозподілу ОНР ДНК ядер клітин органів імунної системи (тимус, лімфатичні вузли) і ФОО у бік зменшення пошкодженням ДНК. Наші результати доповнюють і розширюють відомості про ефект ГС на тканини органів імунної і репродуктивної систем [Литвиненко А.П. та ін. 2014].

Вплив введення НЧНЗ на функціональний стан яєчника, тимуса та лімфатичних вузлів в умовах ЕІУ. Новітнім напрямком фармакології є використання нанопрепаратів як субстанції для нових лікарських засобів. Перспективними в цьому аспекті є наночастинки металів, зокрема НЧНЗ [Rosenfeld L., et al. 2008]. Раніше встановлено, що НЧНЗ є біобезпечною субстанцією, яка має протективний ефект на скоротливість міометрія при використанні за умов експериментальної залізодефіцитної анемії, однак при розладах імунного генезу проявляють пригнічуючу дію [Литвиненко А.П., 2015]. Проте, можлива протективна або токсична дія НЧНЗ досліджена недостатньо і дані про оваріальну функцію, життєздатність клітин ФОО, тимуса і лімфатичних вузлів, а також дані про пошкодження геному клітин органів імунної системи мишей в умовах ЕІУ та введення НЧНЗ – відсутні.

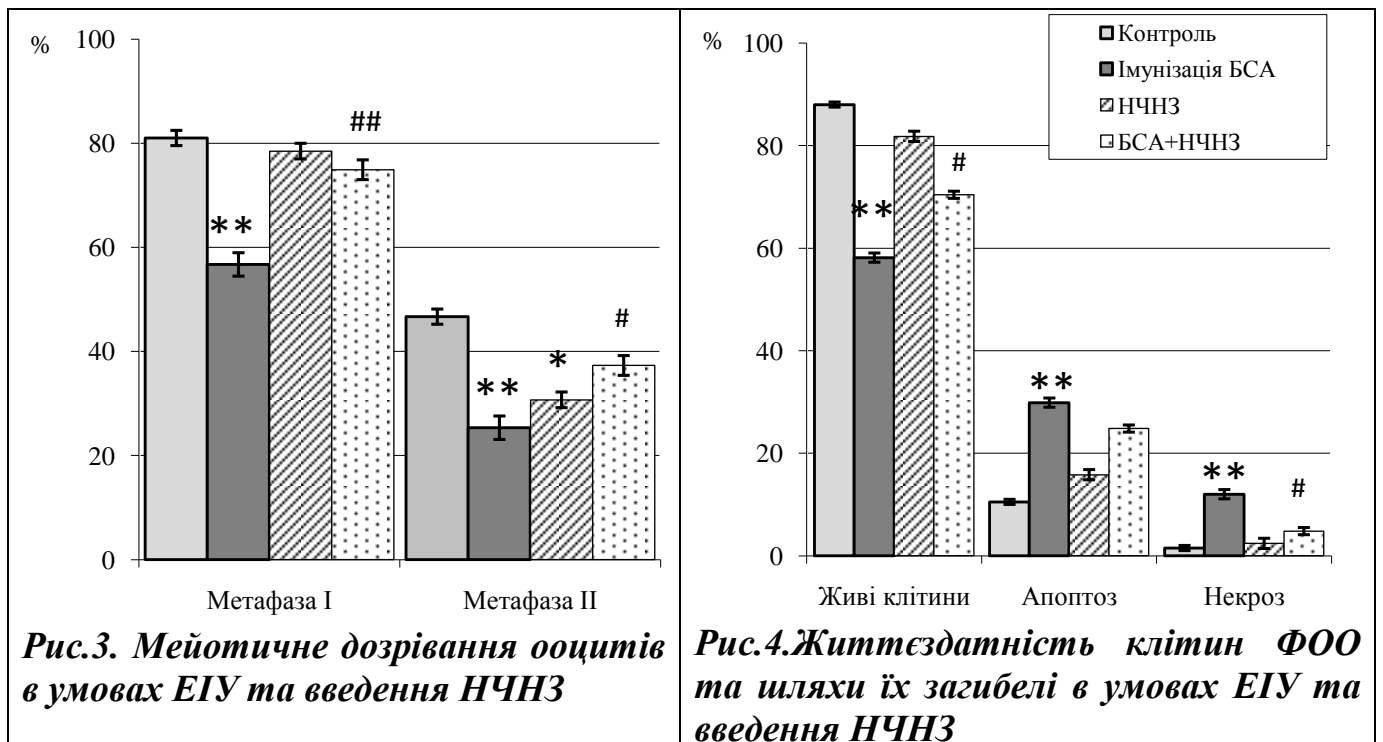
Нами встановлено, що застосування експериментальної субстанції НЧНЗ спричиняє пригнічення на 16% ($p < 0,05$, $n=6$) мейотичного дозрівання ооцитів на стадії формування зародкового пухирця (метафаза II) і не впливає на параметри життєздатності клітин ФОО; у тимусі зумовлює збільшення у 2,1 рази ($p < 0,05$, $n=6$) кількості клітин з морфологічними ознаками апоптозу. У лімфатичних вузлах

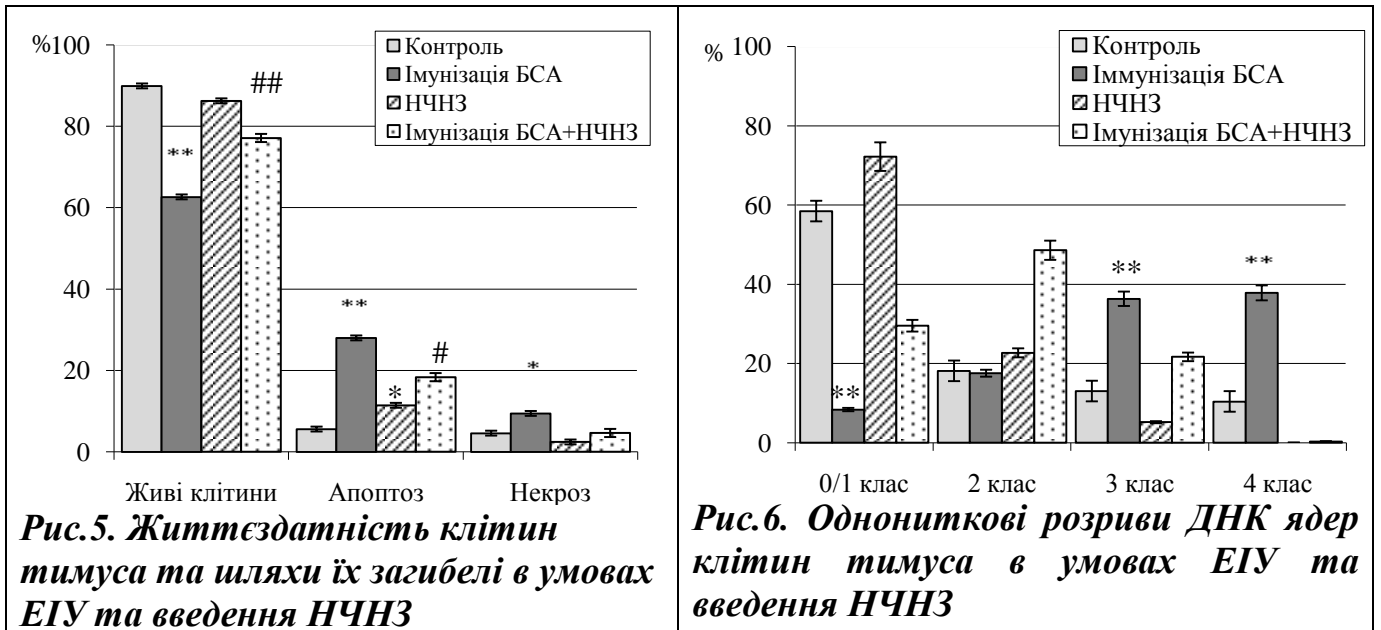
виявляється покращення параметрів життєздатності клітин, так кількість живих клітин зростає у 1,16 рази ($p < 0,01$, $n=6$), а кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу знижується у 2,5 рази ($p < 0,01$, $n=6$) в порівнянні з величинами у контролі; не призводить до пошкодження ДНК клітин тимуса і лімфатичних вузлів, а спостерігається зменшення частки клітин з ядрами 4-го класу, аж до повної їх відсутності, у порівнянні з такими величинами в контролі (рис.3-6).

В умовах ЕІУ введення НЧНЗ призводить до зменшення пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії розчинення зародкового пухирця (метафаза I) і на стадії формування першого полярного тільця (метафаза II) на, відповідно, 18% ($p < 0,01$, $n=6$) і 12% ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з такими величинами в умовах ЕІУ. В органах імунної системи (тимус і лімфатичні вузли) в умовах ЕІУ введення НЧНЗ спричиняє покращення параметрів життєздатності клітин, а також перерозподіл ОНР ДНК їх ядер у бік зменшення пошкодження (рис.3-6).

Отже, нами вперше показано, що введення експериментальної субстанції НЧНЗ зумовлює пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафаза II і не впливає на клітинну загибель ФОО, проте в умовах ЕІУ параметри мейотичного дозрівання ооцитів (розчинення зародкового пухирця, формування першого полярного тільця) і життєздатності клітин ФОО покращуються. В органах імунної системи (тимус і лімфатичні вузли) введення НЧНЗ не чинить пригнічуючого ефекту, а в умовах ЕІУ спостерігається покращення параметрів життєздатності клітин тимуса і лімфатичних вузлів, а також відмічається перерозподіл одностричкових розривів ДНК їх клітин у бік зменшення пошкодження ДНК.

Таким чином, застосування НЧНЗ, що були використані у нашій роботі, в умовах ЕІУ чинять певний корегуючий ефект на розлад оваріальної функції та зменшують пошкодження в клітинах органів імунної системи.





Примітки: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі; # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі імунізація БСА.

Функціональний стан яєчників, тимуса і лімфатичних вузлів в умовах ЕІУ та введення блокатора iNOS, субстрата NOS та застосування НЧНЗ. На сьогодні встановлено, що багато захворювань людини є результатом порушення гомеостазу металів, зокрема заліза і міді, які каталізують та беруть участь в реакціях утворення ушкоджувальних вільних радикалів. Окрім цього редокс-активні метали здатні зв'язуватися з фосфоліпідами, порушуючи цілісність ліпідного бішару і таким чином підвищуючи його сприйнятливості до перекисного окиснення [Valko M., et al. 2016]. Є дані про те, що НЧНЗ здатні відновлювати нітрат, а також встановлено, що впродовж даного процесу виділяються сполуки азоту. Тим не менше, питання про те, який кінцевий продукт утворюється при відновленні нітратів НЧНЗ все ще викликає суперечки [Hwang Y., et al. 2011].

Встановлено, що введення блокатора iNOS (аміногуанідин) в умовах ЕІУ зумовлює покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафаза I на 13% ($p < 0,05$, $n=11$), тоді як, введення субстрата NOS - L-аргініна за таких умов, – до його пригнічення на 18% ($p < 0,05$, $n=11$); в ФОО при введення аміногуанідина спостерігається зниження клітинної загибелі, так кількість живих клітин збільшується в 1,4 рази ($p < 0,05$, $n=6$), а клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу зменшується у, відповідно, 1,8 ($p < 0,05$, $n=6$), і 5,5 рази ($p < 0,05$, $n=6$); введення L-аргініна – не посилює клітинну загибель ФОО; введення аміногуанідина, як і L-аргініна призводить до перерозподілу ОНР ДНК ядер клітин ФОО у бік зменшення пошкодження.

В органах імунної системи введення аміногуанідина зумовлює зменшення клітинної загибелі. За таких умов частка живих клітин тимуса і лімфатичних вузлів зростає в, відповідно, 1,2 ($p < 0,05$, $n=6$) і 1,3 рази ($p < 0,05$, $n=6$), а клітин з

морфологічними ознаками некрозу зменшується у, відповідно, 1,7 ($p < 0,05$, $n=6$) і 2,7 разів ($p < 0,05$, $n=6$), у лімфатичних вузлах зменшується частка клітин з морфологічними ознаками апоптозу у 1,6 разів ($p < 0,05$, $n=6$); введення L-аргініна – не чинить пригнічуючого ефекту на параметри життєздатності клітин тимуса і лімфатичних вузлів; ведення як аміногуанідина, так і L-аргініна зумовлює перерозподіл ОНР ДНК ядер у бік зменшення пошкодження (рис.7 і 8).

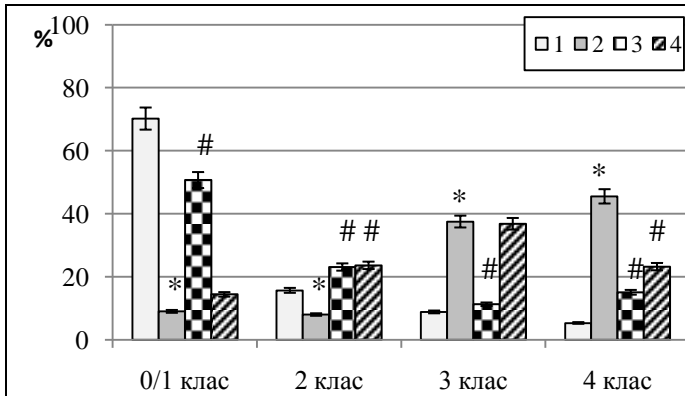


Рис.7. ОНР ДНК клітин тимуса в умовах ЕІУ та введення блокатора iNOS/субстрата NOS

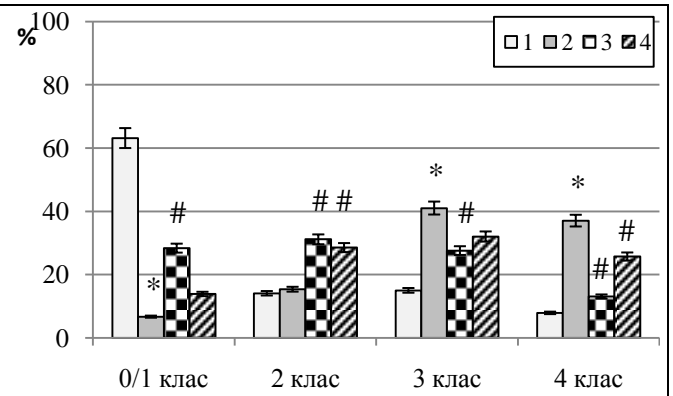


Рис.8. ОНР ДНК клітин лімфатичних вузлів в умовах ЕІУ та введення блокатора iNOS/субстрата NOS

Примітки: 1- контроль; 2- імунізація БСА; 3-імунізація БСА+ блокатор iNOS (аміногуанідин); 4-імунізація БСА+ субстрат NOS (L-аргінін). * - $p < 0,05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі; # - $p < 0,05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі імунізація БСА.

Відомо, що одним із наслідків дефіцита заліза в організмі може бути зниження використання NO [Vanin A., et al. 2004]. Це відбувається внаслідок порушення в функціонуванні трьохкомпонентної біосистеми, основна функція якої – пролонгація медіаторного ефекту нітроксида. Вона складається з NO, негемового заліза і низькомолекулярних тіолів і здатна до авторегулювання свого складу за рахунок взаємотрансформації динітрозильних комплексів заліза з тіоловмісними лігандами і S-нітрозотіолами [Петухов В. и др., 2011].

При ЕІУ застосування експериментальної субстанції НЧНЗ і введення L-аргініна призводить до покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафаза I на 9% ($p < 0,05$, $n=11$), зменшення клітинної загибелі ФОО, а саме частка живих клітин зростає у 1,2 рази ($p < 0,05$, $n=8$), а клітин з морфологічними ознаками некрозу зменшується у 2,5 рази ($p < 0,05$, $n=8$), а також спостерігається перерозподіл ОНР ДНК ядер ФОО у бік зменшення пошкодження – збільшується частка клітин з ядрами 2-го класу у 1,3 рази ($p < 0,05$, $n=6$) та зменшується частка клітин з ядрами 3-го класу у 1,7 рази ($p < 0,05$, $n=6$) по відношенню до відповідних величин у групі імунізація та введення L-аргініна (рис.9 і 10).

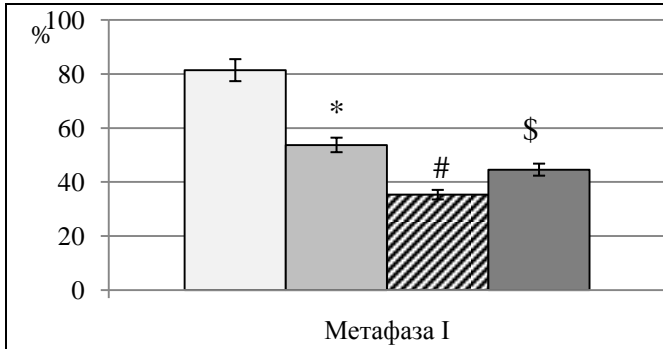


Рис.9. Мейотичне дозрівання ооцитів в умовах ЕІУ та введення субстрата NOS і НЧНЗ

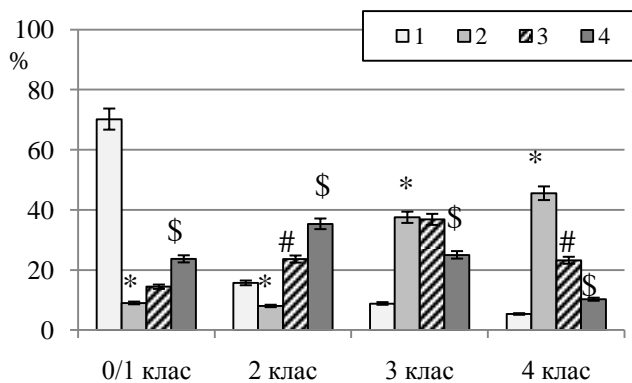


Рис.11. ОНР ДНК ядер клітин тимуса в умовах ЕІУ та введення субстрата NOS і НЧНЗ

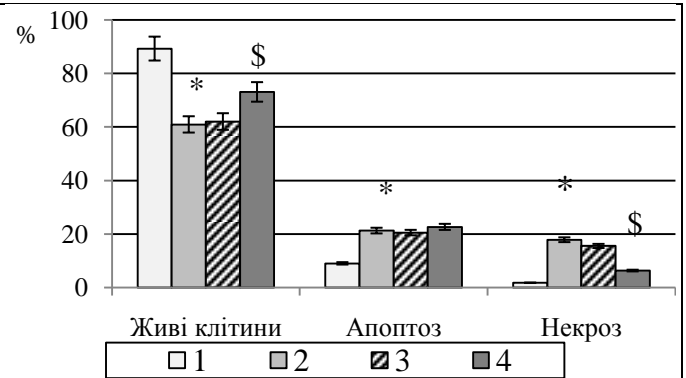


Рис.10. Життєздатність клітин ФОО та шляхи їх загибелі в умовах ЕІУ та введення субстрата NOS і НЧНЗ

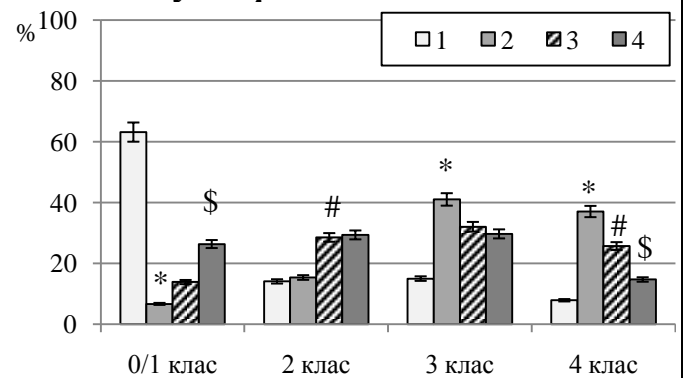


Рис.12. ОНР ДНК ядер клітин лімфатичних вузлів в умовах ЕІУ та введення субстрата NOS і НЧНЗ

Примітки: 1- контроль; 2- імунізація БСА; 3 - імунізація БСА+субстрат NOS (L-аргінін); 4 - імунізація БСА+субстрата NOS (L-аргінін)+НЧНЗ. * - $p < 0,05$ -вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі; # - $p < 0,05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі імунізація БСА; \$ $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно величин за умов імунізації БСА і введення субстрата NOS.

В органах імунної системи за даних умов відбувається зменшення клітинної загибелі в лімфатичних вузлах, а саме частка живих клітин зростає у 1,2 рази ($p < 0,05$, $n=8$), а клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу зменшується у, відповідно, 1,3 ($p < 0,05$, $n=8$) і 1,8 рази ($p < 0,05$, $n=8$), а також спостерігається перерозподіл ОНР ДНК ядер клітин органів імунної системи у бік зменшення пошкодження – у тимусі частка клітин з ядрами 0/1-го, 2-го класів збільшується у, відповідно, 1,8 ($p < 0,05$, $n=6$) і 1,5 рази ($p < 0,05$, $n=6$), а з ядрами 3-го і 4-го класів зменшується у, відповідно, 1,4 ($p < 0,05$, $n=8$) і 2,3 рази ($p < 0,05$, $n=8$); у лімфатичних вузлах частка клітин з ядрами 0/1-го класу збільшується у 1,9 разів ($p < 0,05$, $n=6$), а з ядрами 4-го класу зменшується у 1,7 рази ($p < 0,05$, $n=6$) (рис.11 і 12).

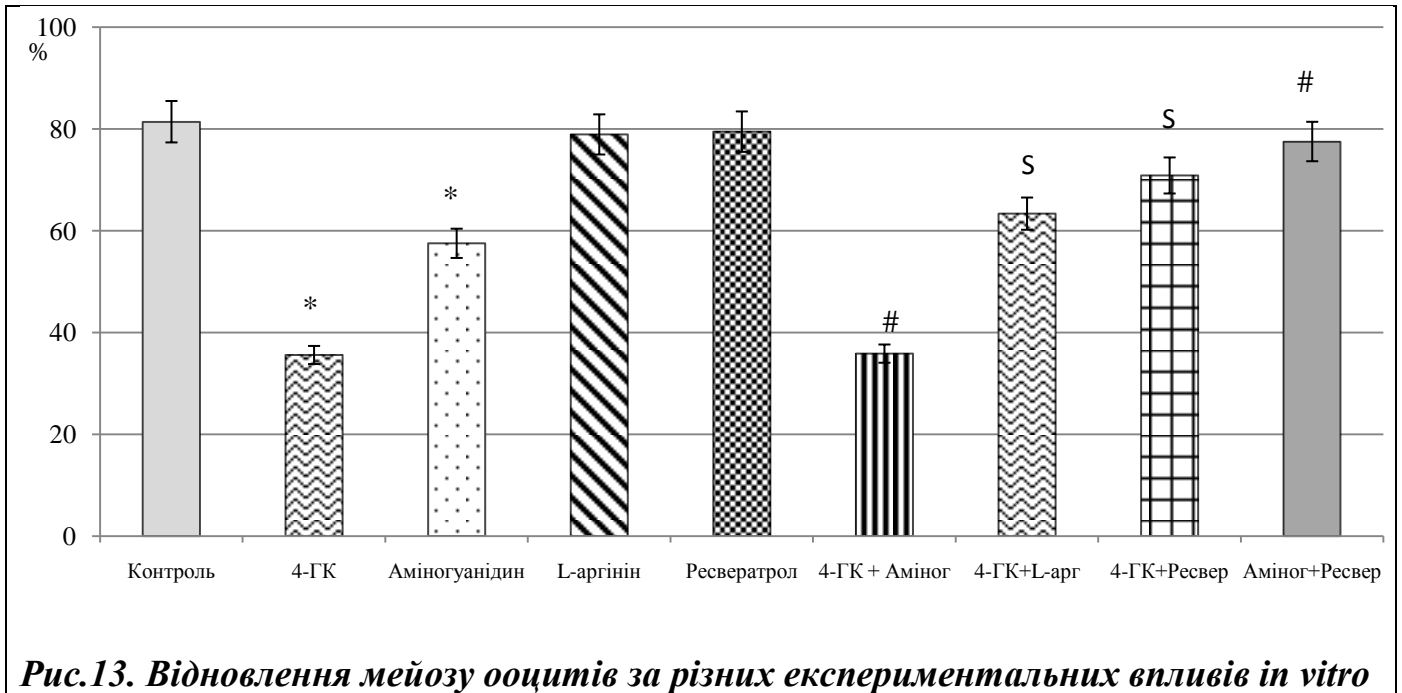
Таким чином, встановлено, що в умовах ЕІУ, введення блокатора iNOS – аміногуанідина покращує параметри мейотичного дозрівання ооцитів, зменшує клітинну загибель та пошкодження геному ФОО, а введення субстрата NOS – L-аргініна чинить в даних умовах пригнічуючий ефект на відновлення мейотичного дозрівання ооцитів. В умовах ЕІУ застосування НЧНЗ зменшує пригнічуючий ефект L-аргініна на ооцити – покращується мейотичне дозрівання ооцитів (метафаза I), а також відмічається зменшення клітинної загибелі ФОО та перерозподіл ОНР ДНК ядер клітин ФОО у бік зменшення пошкодження; спостерігається зменшення клітинної загибелі у лімфатичних вузлах та перерозподіл ОНР ДНК ядер клітин тимуса і лімфатичних вузлів у бік зменшення розривів з максимальним пошкодженням ДНК.

Вплив антиоксиданта (ресвератрол), блокатора ПАРП (4-ГК), субстрата NOS (L-аргінін), блокатора iNOS (аміногуанідин) на *in vitro* відновлення мейотичного дозрівання ооцитів та на розподіл ОНР ДНК ядер ооцитів.

В останні роки зростає кількість публікацій про те, що оксидативно-нітрозативний стрес задіяний в етіології численних захворювань людини [Koskenkorva-Frank T., et al. 2013; Rochette L., et al. 2013; Castro R., et al. 2015; Fatima S., et al. 2016; Lee C., et al. 2016]. Як результат порушення рівноваги відношення окиснювач / антиоксидант відбувається зростання сполук хімічно активного кисню і генерація хімічно активного азоту. Наявність надлишкових активних форм кисню може привести до пошкодження білків, ліпідів і ДНК клітин [Duhig K., et al. 2016; Rani V., et al. 2016; Soory M. 2012].

Серед відомих антиоксидантів ресвератрол отримав численні схвалення, що приведені в публікаціях останнього десятиліття при застосуванні як *in vitro*, так і *in vivo* в нормі та в різних моделях захворювань, в тому числі кардіо- та нейропротекції, імунній регуляції і хіміопрофілактиці раку [Pervaiz S., Holme A. 2009; Liu M., et al. 2013; Sugiyama M., et al. 2015; Torres V., et al. 2016].

Нами вперше показано, що дія 4-ГК (1mM) і аміногуанідина (0,02 mM), відповідно, на 43% ($p < 0,05$, $n=12$) і на 26% ($p < 0,05$, $n=18$) викликає пригнічення відновлення мейотичного дозрівання ооцитів, а L-аргінін (0,04 mM) та ресвератрол (2,0 μ M) не чинять ефекту на відновлення мейозу. За умов сумісного впливу 4-ГК і аміногуанідина (1,0 mM/0,02 mM) спостерігається пригнічення відновлення мейотичного дозрівання ооцитів на 22% ($p < 0,05$, $n=8$) по відношенню до величин в групі аміногуанідина. Проте за умов сумісного впливу аміногуанідина і ресвератрола (0,02 mM/2,0 μ M) відмічається покращення відновлення мейотичного дозрівання на 20% ($p < 0,05$, $n=8$) у порівнянні з величиною в групі аміногуанідина. В умовах сумісної дії 4-ГК і ресвератрола (1 mM/2,0 μ M) встановлено покращення відновлення мейозу на 35% ($p < 0,05$, $n=8$) у порівнянні з показником в групі 4-ГК. А також при сумісній дії 4-ГК і L-аргініна (1,0 mM/0,04 mM) відновлення мейотичного дозрівання покращується на 28% ($p < 0,05$, $n=8$) по відношенню до величин в групі з 4-ГК (рис.13).



Примітки: * - $p < 0,05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі; # - $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі аміногуанідіна; S - $p < 0,05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі 4-ГК.

Репарація ДНК відіграє важливу роль у збереженні життєздатності клітин. Одними з найбільш поширених пошкоджень ДНК є одониткові розриви ДНК [David J., et al. 2000; Bosques C., et al. 2016]. ПАРП-1 – фермент із родини білків ПАРП, який здатен взаємодіяти з різноманітними пошкодженими структурами ДНК. За наявності ОНР ДНК фермент ПАРП-1 активується [D'Amours D., et al. 1999]. Розриви ДНК, спричинені, зокрема, активними формами азоту, активують ПАРП, що є необхідним для процесів репарації [Макогон Н.В. 2012].

Нами вперше встановлено, що за умов впливу, як 4-ГК (1,0 mM), так і аміногуанідіна (0,02mM) відбувається перерозподіл ОНР ДНК ооцитів у бік збільшення пошкодження, так - частка клітин з ядрами 3 і 4-го класів зростає у, відповідно, 2,2 рази ($p < 0,05$, $n=6$) і 5,7 разів ($p < 0,05$, $n=6$) (4-ГК) та 2,1 раз ($p < 0,05$, $n=6$) і 5,3 рази ($p < 0,05$, $n=6$) (аміногуанідин), а частка ооцитів з ядрами 0/1 і 2 класів зменшується у, відповідно, 4,7 рази ($p < 0,05$, $n=6$) і 2,0 рази ($p < 0,05$, $n=6$) (4-ГК) та 3,9 рази ($p < 0,05$, $n=6$) і 1,5 рази ($p < 0,05$, $n=6$) (аміногуанідин) у порівнянні з величинами у негативному контролі, відповідно. Тоді як за умов впливу, як L-аргініна (0,04 mM), так і ресвератрола (2,0 μ M) відбувається перерозподіл ОНР ДНК ооцитів у бік зменшення пошкодження, а саме - частки ядер ооцитів 0/1 класу – збільшуються у, відповідно, 1,3 рази ($p < 0,05$, $n=7$) (L-аргінін) і 1,2 рази ($p < 0,05$, $n=6$) (ресвератрол), а частка ядер 2 класу зменшується у, відповідно, 1,4 рази ($p < 0,05$, $n=7$) (L-аргінін) і 1,5 рази ($p < 0,05$, $n=6$) (ресвератрол) у порівнянні з

величинами в негативному контролі; частки ядер 3 і 4 класів залишаються у межах величин негативного контролю.

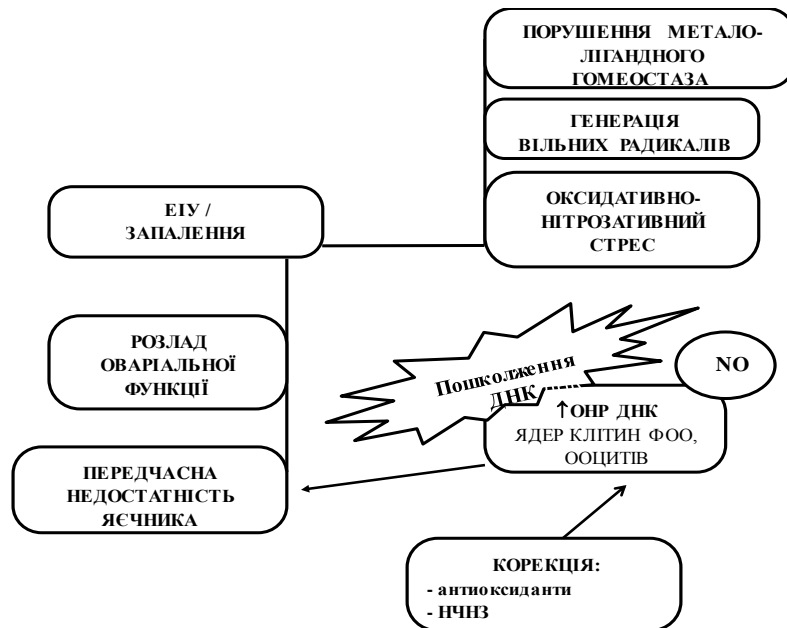
За умов сумісного впливу 4-ГК і аміногуанідина (1mM/0,02mM) відбувається перерозподіл ОНР ДНК ооцитів у бік збільшення пошкодження, - частки ядер 3-го і 4-го класів зростають у, відповідно, 2,1 ($p < 0,05$, $n=6$) і 5,6 разів ($p < 0,05$, $n=6$), а частки 0/1-го і 2-го класів зменшуються в 4,1 ($p < 0,05$, $n=6$) і 1,8 рази ($p < 0,05$, $n=6$) по відношенню до величин в негативному контролі. При сумісному впливі 4-ГК і L-аргініна (1,0 mM/0,04mM) відбувається зменшення пошкодження ДНК ядер ооцитів по відношенню до величин у групі 4-ГК: частки ядер ооцитів 3-го і 4-го класів зменшуються у, відповідно, 1,7 ($p < 0,05$, $n=6$) і 2,1 разів ($p < 0,05$, $n=6$), а частки ядер 0/1-го і 2-го класів зростають у, відповідно, 3,1 ($p < 0,05$, $n=6$) і 1,9 рази ($p < 0,05$, $n=6$). Спільна дії 4-ГК і ресвератрола (1,0 mM/2,0 μ M) призводить до зменшення пошкодження ДНК ооцитів – частка клітин з ядрами 3-го і 4-го класів зменшується у, відповідно, 1,4 ($p < 0,05$, $n=6$) і 1,8 рази ($p < 0,05$, $n=6$), а частки ядер 0/1-го, 2-го класів зростають у, відповідно, 2,6 ($p < 0,05$, $n=6$) і 1,7 рази ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з такими величинами у групі 4-ГК. Аміногуанідин і ресвератрол (0,02mM/2,0 μ M) при їх сумісному впливі зменшують пошкодження ДНК ооцитів, так – частки ооцитів з ядрами 3-го і 4-го класів зменшуються у, відповідно, 1,5 ($p < 0,05$, $n=6$) і 1,4 рази ($p < 0,05$, $n=6$), а частка клітин з ядрами 0/1-го класу зростає у 2,6 рази ($p < 0,05$, $n=6$) по відношенню до величин в групі аміногуанідина.

Таким чином, наявність NO є необхідною умовою для здійснення репарації ОНР ДНК ооцитів, тоді як його надлишок може бути фактором пригнічення репарації (активності ПАРП-1) вже на стадії відновлення мейозу. Надлишок NO викликає збільшення кількості клітин ФОО з ОНР ДНК ядра. З даних літератури відомо, що одним із наслідків дефіцита заліза в організмі може бути зниження використання NO, що узгоджується з отриманими нами даними. Дані про відновлення *in vitro* мейотичного дозрівання ооцитами і розподіл ОНР ДНК ооцитів за умов впливу антиоксиданта (ресвератрол), блокатора ПАРП, субстрата NOS, блокатора iNOS дають підстави стверджувати, що NO бере участь в регуляції репарації ОНР ДНК ооцитів. Отримані нами дані узгоджуються з [Liu Y., et al. 2013; Sugiyama M., et al. 2015].

На основі власних результатів і з урахуванням літературних даних можна запропонувати наступну схему для представлення участі ОНР ДНК у розвитку оваріальної дисфункції.

Спираючись на власні результати та дані літератури, ми вважаємо, що імунізація БСА (як експериментальне імунокомплексне ушкодження) супроводжується оксидативно-нітрозативним стресом і призводить до розвитку системного запального процесу з пошкодженням клітин органів імунної системи (тимусу та лімфатичних вузлів) та порушенням оваріальної функції, а саме пригніченням мейотичне дозрівання ооцитів, посиленням клітинної загибелі ФОО, що частково відображає розлад репродуктивної функції у жінки, а саме ПНЯ.

Схема:



Нами встановлено участь ОНР ДНК клітин ФОО, тимуса і лімфатичних вузлів у розвитку розладу оваріальної функції в умовах ЕІУ, а також запропоновано нові експериментально обґрунтовані способи корекції ПНЯ (антиоксидант, НЧНЗ).

Дані літератури разом з проведеним власним дослідженням дають підстави стверджувати першочергову важливість репарації ОНР ДНК ядер ооцитів і клітин ФОО у забезпеченні оваріальної функції.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та подано нове вирішення наукового завдання в розкритті можливих патогенетичних ланок розвитку ПНЯ, а також запропоновані експериментально обґрунтовані способи її корекції. З використанням моделі експериментального імунокомплексного ушкодження, а також введенням антиоксиданта, блокатора NO-синтази, субстрата NOS та експериментальної субстанції НЧНЗ досліджено параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин їх фолікулярного оточення, а також особливості розподілу ОНР ДНК ядер клітин тимуса, лімфатичних вузлів, ФОО що раніше не було вивчено.

1. Імунізація БСА призводить до пошкодження ДНК клітин органів імунної системи (тимус та лімфатичні вузли) та порушення оваріальної функції – пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів, посилення клітинної загибелі ФОО.

2. Показано, що в умовах ЕІУ введення антиоксиданта покращує параметри мейотичного дозрівання ооцитів на стадіях метафази I і метафази II на, відповідно, 10% і 14%, зменшує клітинну загибель ФОО та пошкодження ДНК ядер клітин ФОО, тимуса і лімфатичних вузлів.

3. Встановлено, що введення експериментальної субстанції НЧНЗ в умовах ЕІУ призводить до покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів на 18% (метафаза I) і 12% (метафаза II) і параметрів життєздатності клітин ФОО, а також спостерігається зниження клітинної загибелі тимуса і лімфатичних вузлів та

послаблення пошкодження ДНК ядер їх клітин за рахунок зменшення в них кількості ОНР ДНК.

4. В умовах ЕІУ введення блокатора iNOS – аміногуанідина покращує мейотичне дозрівання ооцитів, зменшує клітинну загибель та пошкодження геному клітин ФОО, а введення субстрата NOS – L-аргініна за даних умов чинить пригнічуючий ефект на мейотичне дозрівання ооцитів. Застосування НЧНЗ в умовах ЕІУ послаблює пригнічуючий ефект L-аргініна на ооцити, а також знижує клітинну загибель та пошкодження ДНК у ФОО.

5. Дані про відновлення *in vitro* мейотичного дозрівання ооцитів і розподіл ОНР їх ДНК за умов впливу антиоксиданта (ресвератрол), блокатора ПАРП (4-ГК), субстрата NOS (L-аргінін), блокатора iNOS (аміногуанідин) дають підстави стверджувати, що NO задіяне в регуляції репарації ОНР ДНК ооцитів.

6. Встановлена участь ОНР ДНК клітин ФОО, тимуса і лімфатичних вузлів у розвитку ПНЯ, а також запропоновані експериментально обґрунтовані способи її корекції (антиоксидант, НЧНЗ).

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. **Срібна В.О.** Розподіл одностранных розривів ДНК ядер ооцитів в умовах впливу антиоксиданта, блокатора ПАРП, субстрата NOS, блокатора iNOS / **В.О. Срібна, Н.Г. Грушка, О.А. Кондрацька, Т.В. Блашків, Р.І.Янчій** // Вісник проблем біології і медицини – 2017. – випуск 4, том 3(141) – С. 231-235 (*Здобувачем прийнято участь у плануванні експерименту, проведенні експериментального дослідження, статистичній обробці результатів, аналізі та узагальненні даних, написанні статті*).
2. **Срібна В.О.** Ефект наночастинок заліза на ооцити і клітини їх фолікулярного оточення за умов експериментального імунокомплексного ушкодження / **В.О.Срібна** // Здобутки клінічної та експериментальної медицини – 2017. – №1. – С.70-75. Doi:10.11603/1811-2471.2017.v0.i1.7483 (*Здобувачем здійснено планування експерименту, проведення експериментального дослідження, статистичної обробки результатів, аналіз та узагальнення даних, написання статті*).
3. **Срібна В.О.** Характеристика і вплив наночастинок нуль-валентного заліза / **В.О.Срібна, Т.Ю. Вознесенська, Т.В. Блашків** // Вісник проблем біології і медицини – 2017. – №1(135). – С. 56-57 (*Здобувачем прийнято участь у написанні оглядової статті*).
4. **Срибная В.А.** Функциональное состояние яичника, матки, тимуса и лимфатических узлов у мышей с экспериментальным иммунокомплексным повреждением в условиях введения субстанции наночастиц ноль-валентного железа / **В.А. Срибная, А.П.Литвиненко, Л.С. Резниченко, Т.Ю.Вознесенская, Т.В. Блашків, Т.Г. Грузина, З.Р. Ульберг** // Проблемы репродукции – 2016. – №22(4). – С. 20-27.DOI: 10.17116/repro201622420-27 (*Здобувачем прийнято участь у плануванні експерименту, проведенні експериментального дослідження, статистичній обробці результатів, аналізі та узагальненні даних, написанні статті*).

5. **Срібна В.О.** Однониткові розриви ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів за умов експериментального імунного ушкодження та застосування антиоксиданта / **В.О. Срібна**, Н.Г. Грушка, Р.І. Янчій // Вісник проблем біології і медицини – 2016. – випуск 2, том 3(130), – С. 195-199 (*Здобувачем прийнято участь у плануванні експерименту, проведенні експериментального дослідження, статистичній обробці результатів, аналізі та узагальненні даних, написанні статті*).
6. **Срібна В.О.** Зміни параметрів мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин їх фолікулярного оточення за умов експериментального імунного ушкодження / **В.О. Срібна**, Н.Г. Грушка, О.А. Шепель, Т.Ю. Вознесенська, Т.В. Блашків // Експериментальна і клінічна медицина – 2016. – №1(70). – С. 63-67 (*Здобувачем прийнято участь у плануванні експерименту, проведенні експериментального дослідження, статистичній обробці результатів, аналізі та узагальненні даних, написанні статті*).
7. Литвиненко А.П. Мейотичне дозрівання ооцитів і життєздатність клітин їх фолікулярного оточення, тимуса і лімфатичних вузлів за умов моделювання системного імунотоксичного ушкодження / А.П. Литвиненко, **В.О.Срібна**, Н.Г. Грушка, Т.Ю.Вознесенська, Т.В. Блашків // Одеський медичний журнал– 2016. – №1 (153). – С.13-17 (*Здобувачем прийнято участь у аналізі та узагальненні даних, написанні статті*).
8. Литвиненко А.П. Вплив імунізації бичачим сироватковим альбуміном на ооцити, клітини їх фолікулярного оточення, клітини тимуса і лімфатичних вузлів / А.П. Литвиненко, **В.О.Срібна**, Н.Г. Грушка, Т.Ю. Вознесенська, Т.В. Блашків // Досягнення біології та медицини. – 2015. – №2(26). – С. 10-13 (*Здобувачем прийнято участь у аналізі та узагальненні даних, написанні статті*).

Список тез доповідей з'їздів, симпозіумів,

конференцій на яких були апробовані результати дисертації:

1. **Срібна В.О.** Розлад оваріальної функції в умовах експериментального імунотоксичного ушкодження /**В.О.Срібна**, Р.І.Янчій // Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Фізіологія і патологія нейроімуноендокринної регуляції» (м.Чернівці 5-6 жовтня 2017р.). – Клінічна та експериментальна патологія– 2017. –Т.XVI, №3(61), Ч.2. – С. 85-86.
2. **Срібна В.О.** Участь NO в регуляції репарації однониткових розривів ДНК ооцитів / **В.О.Срібна** // Науково-практична конференція молодих учених за участю міжнародних спеціалістів, присвяченої Дню науки в Україні «Медична наука на перетині спеціальностей: сьогодні і майбутнє» (м.Харків, 19 травня 2017р.). – Збірник матеріалів конференції – 2017. – С. 99.
3. **Срібна В.О.** Особливості розподілу однониткових розривів ДНК ядер клітин тимуса і лімфатичних вузлів за умов експериментального імунотоксичного ушкодження і застосуванні нанозаліза / **В.О. Срібна**, Р.І. Янчій, А.Д. Зуєва // Научно-практическая конференция с международным участием «XVI чтения им. В.В. Подвысоцкого» (г.Одесса, 18-19 мая 2017г.). –бюллетень XVI чтений им. В. В. Подвысоцкого –2017. – С. 328-330.

4. **Срібна В.О.** Функціональний стан яєчника, матки, тимуса і лімфатичних вузлів за умов експериментального імунокомплексного ушкодження і застосування субстанції наночастинок нульвалентного заліза / **В.О. Срібна**, А.П. Литвиненко // IV Всеукраїнська наукова конференція студентів та молодих вчених з фізіології з міжнародною участю «Фізіологія – медицині, фармації та педагогіці: актуальні проблеми та сучасні досягнення» (м.Харків, 16-17 травня 2017р.). – Збірник матеріалів конференції – 2017. – С. 116.
5. **Sribna V.A.** Immune premature ovarian insufficiency: mechanisms and new approaches of correction / **V.A.Sribna**, T.V. Blashkiv, R.I. Yanchiy // 6th Annual International Scientific-Practical Conference “Medicine pressing questions” (Baku, Azerbaijan, Mai 10-11, 2017). – Medical Review. – 2017. – vol.4, P. 23-24.
6. **Срибная В.А.** Мейотическое созревание ооцитов в условиях иммунокомплексного повреждения и изменениях в системе NO / **В.А. Срибная** // IV Международная научно-практическая конференция «Наука и медицина: современный взгляд молодежи» (г.Алматы, Казахстан, 20-21 апреля 2017г.). – ISJM. – 2017 (april). – С. 560-561.
7. **Срібна В.О.** Оваріальна дисфункція за умов експериментального імунокомплексного ушкодження і змінах в системі NO / **В.О. Срібна** // IV Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих учених “Іновачії та перспективи сучасної медицини», ВІМСО 2017 (м.Чернівці, 5-7 квітня 2017р.). –Медичний журнал «ХИСТ» – 2017. – С.328.
8. **Срибная В.А.** Экспериментальная преждевременная недостаточность яичников: иммунные механизмы развития и новые подходы коррекции / **В.А. Срибная**, Н.Г. Грушка, Р.И. Янчий // Науково-практична конференція з міжнародною участю «Актуальні проблеми клінічної та фундаментальної медицини» (м.Харків, 13-14 квітня 2017р.) . – Збірник матеріалів конференції –2017. – С.187-188.
9. **Срібна В.О.** Передчасна недостатність яєчників: механізми розвитку і нові підходи щодо корекції / **Срібна В.О.** // Всеукраїнська науково-практична конференція з міжнародною участю «Жіноче здоров'я: імплементація сучасних протоколів в клінічну практику» (м.Тернопіль, 2-3 березня 2017р.). – Збірник матеріалів конференції –2017. – С. 73-74.
10. **Срібна В.О.** Однониткові розриви ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів за умов експериментального імунокомплексного ушкодження / **В.О. Срібна**, А.П. Литвиненко, Н.Г. Грушка, Р.І. Янчий // VII Національний конгрес патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» (м.Харків, 5-7 жовтня 2016 р.).– Збірник тез конференції –2016. – С. 218.
11. **Срібна В.О.** Ефект наночастинок заліза на ооцити і клітини їх фолікулярного оточення / **Срібна В.О.** // VII Науково-практична конференція з міжнародною участю «YouthNanoBioTech-2016. Молодіжний форум з нанобіотехнологій-2016» (м.Київ, 25-26 травня 2016р.). – Український науково-медичний молодіжний журнал. Спец. випуск – 2016. – №2(64) – С. 90.

12. Литвиненко А.П. Мейотичне дозрівання ооцитів, життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів, клітин тимуса і лімфатичних вузлів за умов експериментального системного запалення / А.П. Литвиненко, **В.О.Срібна**, Н.Г. Грушка // Щорічна медична конференція молодих науковців (м.Київ, 15-16 жовтня 2015р.). – Український науково-медичний молодіжний журнал – 2015. – №3(90). – С. 95.
13. Lytvynenko A. BSA immunization effects the oocytes and follicular cells, thymic and lymphnodes cells in female mice / A.Lytvynenko, N.Grushka, **V.Sribna**, T.Blashkiv // International conference on advances in cell biology and biotechnology (Lviv, 11-13 october 2015). – Збірник наукових праць «Advances in cell biology and biotechnology».– 2015. – С. 88.

Патент на корисну модель №112982 / Спосіб оцінки впливу наночастинок нульвалентного заліза на репродуктивну та імунну системи в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження у мишей // В.О.Срібна, А.П.Литвиненко, Т.Ю.Вознесенська, Н.Г.Грушка, Т.В.Блашків (№112982 від 10.01.2017, Бюл.№1).

АНОТАЦІЯ

Срібна В.О. Розлад оваріальної функції в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження. — Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія. Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ, 2018.

У дисертаційній роботі, відповідно до поставленої мети наведено теоретичне узагальнення та подано нове вирішення наукового завдання в розкритті можливих патогенетичних ланок розвитку передчасної недостатності яєчників, а також запропоновані експериментально обґрунтовані способи її профілактики та корекції.

З використанням моделі експериментального імунокомплексного ушкодження (ЕІУ), а також застосуванням антиоксиданта, блокатора NO-синтази, субстрата NOS та експериментальної субстанції НЧНЗ досліджено параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин їх фолікулярного оточення, а також клітинну загибель та особливості розподілу ОНР ДНК ядер клітин тимуса, лімфатичних вузлів, ФОО що раніше не було вивчено.

Встановлено, що в умовах ЕІУ введення антиоксиданта зумовлює покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, як на стадії метафази I, так і на стадії метафази II, а також призводить до зниження клітинної загибелі ФОО, окрім цього, відмічається перерозподіл ОНР ДНК ядер імунокомпетентних клітин (тимус, лімфатичні вузли) і ФОО у бік зменшення пошкодження ДНК.

Введення експериментальної субстанції НЧНЗ зумовлює пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафаза II і не впливає на клітинну загибель ФОО, проте в умовах ЕІУ параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин ФОО покращуються. В органах імунної системи (тимус і лімфатичні вузли) введення НЧНЗ не чинить пригнічуючого ефекту, а в умовах ЕІУ спостерігається покращення параметрів життєздатності клітин тимуса і лімфатичних

вузлів, а також перерозподіл ОНР ДНК їх клітин у бік зменшення пошкодження ДНК.

Отримані дані про відновлення *in vitro* мейотичного дозрівання ооцитами і розподіл одностричкових розривів ДНК ооцитів в умовах впливу антиоксиданта (ресвератрол), блокатора ПАРП, субстрата NOS, блокатора iNOS дають підстави стверджувати, що NO бере участь в регуляції репарації ОНР ДНК ооцитів.

Ключові слова: експериментальне імунокомплексне ушкодження, одностричкові розриви ДНК, ооцити, клітини фолікулярного оточення ооцитів, тимус, лімфатичні вузли.

АННОТАЦИЯ

Срибная В.А. Расстройство овариальной функции в условиях экспериментального иммунокомплексного повреждения. — Квалификационная научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.04 - патологическая физиология. Институт физиологии им. А.А.Богомольца НАН Украины, Киев, 2018.

В диссертационной работе, согласно поставленной цели приведено теоретическое обоснование и представлено новое решение научной задачи в раскрытии возможных патогенетических звеньев развития преждевременной недостаточности яичников, а также предложены экспериментально обоснованные способы ее коррекции.

С использованием модели экспериментального иммунокомплексного повреждения (ЭИП), а также применением антиоксиданта, блокатора NO-синтазы, субстрата NOS и экспериментальной субстанции наночастиц нольвалентного железа (НЧНЖ) исследованы параметры мейотического созревания ооцитов и жизнеспособности клеток их фолликулярного окружения, а также клеточная гибель и особенности распределения одностричковых разрывов (ОНР) ДНК ядер клеток тимуса, лимфоузлов, ФОО, что ранее не было изучено.

Установлено, что в условиях ЭИП введение антиоксиданта приводит к улучшению параметров мейотического созревания ооцитов, как на стадии метафазы I, так и на стадии метафазы II, а также отмечено снижение клеточной гибели ФОО, кроме этого, отмечается перераспределение ОНР ДНК ядер иммунокомпетентных клеток (тимус, лимфоузлы) и ФОО в сторону уменьшения повреждения ДНК.

Введение экспериментальной субстанции НЧНЖ приводит к угнетению мейотического созревания ооцитов на стадии метафаза II и не влияет на клеточную гибель ФОО, однако в условиях ЭИП параметры мейотического созревания ооцитов и жизнеспособности клеток ФОО улучшаются. В органах иммунной системы (тимус и лимфоузлы) введение НЧНЖ не оказывает угнетающего эффекта, а в условиях ЭИП наблюдается улучшение параметров жизнеспособности клеток тимуса и лимфоузлов, а также перераспределение ОНР ДНК их клеток в сторону уменьшения повреждения ДНК.

Полученные данные о *in vitro* возобновлении мейотического созревания ооцитами и распределении ОНР ДНК ооцитов в условиях воздействия антиоксиданта (ресвератрол), блокатора ПАРП, субстрата NOS, блокатора iNOS

дают основания утверждать, что NO участвует в регуляции репарации ОНР ДНК ооцитов.

Ключевые слова: экспериментальное иммунокомплексное повреждение, одностранные разрывы ДНК, ооциты, клетки фолликулярного окружения ооцитов, тимус, лимфатические узлы.

SUMMARY

Sribna V. Ovarian dysfunction under experimental immune complex-mediated failure.- The manuscript.

Thesis for PhD in medicine by speciality 14.03.04 - Pathological Physiology. Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, 2018.

According to the aim and tasks of the research, the effect of BSA immunization on the meiotic maturation of oocytes, viability of the follicular cells surrounding the oocytes (FCs), thymus-derived lymphocytes and lymph nodes (LN) cells and damage of the genome's integrity of immune cells in female mice have been investigated and presented in the thesis.

Immunization of mice was done by increasing doses of antigen - bovine serum albumin (BSA, 150-300 mg/kg of a mouse, Sigma, USA) intravenously once a week for 6 weeks. Control mice were injected with saline. On the seventh day after the last immunization animals were anesthetized and ovaries, inguinal lymph nodes and thymus were removed. It was used for in vitro culture of oocytes, double fluorescent vital assay and DNA-comet assay (alkaline). Comets were separated into 5 classes (0; 1; 2; 3; 4) depending on the value of DNA in the "head" and "tail" of the comet.

Thus, under the condition of BSA immunization oocytes damage was observed, namely the suppression of meiotic maturation, reduction of the number of living cells of LN, thymus and FCs, nuclear DNA damage of the thymus and LN cells. Evaluation of integrated genome integrity, the ratio of DNA material in the "head" and "tail" of the comet, as a measure of genome functioning thymus-derived lymphocytes and LN cells, gives reason to believe that BSA immunization could modify the activity of gene expression associated with reparation displayed as a single-strand DNA break.

The obtained results demonstrated that the administration of etylmetyl-hidroksy-pirydyn-succinate (GS) had no effect on DNA strand breaks of LN cells as well as produced no damaging effects on DNA of FCs and of the thymic cells, but there was an increase in the part of nuclei of the 2nd class, in 2,0 and 1,7 times respectively. Treatment of GS under the condition of BSA immunization led to a decrease in DNA damage, namely, the part of 4th class nuclei of FCs, thymic and LN cells with a maximum DNA damage decreased in 3,6; 2,6 and 1,7 times respectively and the part of 0/1 class nuclei, that were characterized by the absence of primary lesions, increased in 2,0; 7,0 and 2,2 times respectively.

BSA immunization leads to a significant DNA damage by increasing the number of FC, thymic and LN nuclei with maximum DNA damage and reducing the number of nuclei, characterized by the absence of primary lesions. The treatment of GS does not produce damaging effects on DNA FCs and thymic cells, but there is some increase in the portion of 2nd class nuclei. The treatment of GS does not affect DNA stand breaks of LN cells.

The treatment of GS under conditions of BSA immunization leads to a decrease in DNA damage of FCs, thymic and LN cells with maximum DNA damage and increase in the number of nuclei, characterized by the absence of primary lesions.

In this respect are nanoparticles of metals, particularly nanoparticulate zero-valent iron (nZVI) appear to be promising. However, the possible protective mechanisms or the toxic effects of nZVI are not studied enough. Treatment of nZVI leads to inhibition of Metaphase II and doesn't cause significant alteration of cell viability parameters of FCs, but there is some reallocation between nuclei of 0/1 and 2 classes upwards last compared with the corresponding values in the control.

BSA immunization and treatment of L-arginine and nZVI lead to 1) improvement of oocyte meiotic maturation parameters at Metaphase I in relation to the corresponding values of BSA immunization and the introduction of L-arginine, but in relation to the corresponding values in the group under the conditions of BSA immunization and introduction of nZVI inhibition is likely; 2) reduction of cell death, namely, the number of living FCs has increased, the number of cells with morphological signs of necrosis has reduced compared with the values in the BSA immunization and the introduction of L-arginine group.

Data about in vitro resumption of meiotic maturation of oocytes and oocytes DNA-comet assay under the impact of antioxidant (resveratrol), PARP-1 inhibitor, substrate NOS and iNOS inhibitor give grounds to confirm that NO takes part in reparations of the DNA single-strand break of oocytes.

Keywords: experimental immune complex-mediated failure, single-strand DNA break, oocytes, viability of the follicular cells surrounding the oocytes, thymus and lymph nodes.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

4-ГК – 4-гідроксиквіназолін

БСА – бичачий сироватковий альбумін

ГС – етилметилгідроксипіридин сукцинат

ЕІУ – експериментальне імунокомплексне ушкодження

НЧЗ – наночастинки нульвалентного заліза

ОНР – однопіткві розриви

ПАРП – полі(АДФ-рибозо) полімераза

ПНЯ – передчасна недостатність яєчників

ФОО – фолікулярне оточення ооцитів

iNOS – індукційна синтаза оксиду азоту

NOS – синтаза оксиду азоту

NO – оксид азоту