

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

СТУПЧУК МАРІЯ СЕРГІЇВНА

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

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

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Київ – 2019

Дисертацією є рукопис

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

Науковий керівник: доктор біологічних наук,
провідний науковий співробітник відділу
імунофізіології Інституту фізіології
ім.О.О.Богомольця НАН України
Вознесенська Тетяна Юріївна

Офіційні опоненти: член-кореспондент НАН України,
заслужений винахідник України,
доктор біологічних наук, професор,
зав. відділу проблем інтерферону та
імуномодуляторів Інституту мікробіології
і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України,
Співак Микола Якович

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

Захист відбудеться __15 жовтня__ 2019 р. о _16⁰⁰_ 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
та на сайті http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council

Автореферат розісланий «13 » _вересня__ 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої
вченої ради,



к.б.н. Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми та обґрунтування вибору напряму дослідження. Комплексні та багатокомпонентні ефекти різних біологічних процесів, в тому числі і патологічного характеру, на стан та функціонування клітин яєчника відомі та не потребують зайвих коментарів. Сиртуїни (Silent Information Regulator proteins, Sirtuins (Sirt)) є класом білків, що мають властивості гістонових деацетилаз та монорибозил-трансфераз. Ці протеїни виявлені у всіх організмах – від бактерій до людини. Відомо, що сиртуїни регулюють процеси транскрипції та апоптозу. Вони відіграють виключно важливу роль у реакції організмів на стрес [Agarwal et al, 2017; Di Emidio et al, 2014; Elkhwanky et al, 2018; Karahi et al, 2016; O'Callaghan et al, 2017]. Встановлено, що у ссавців SIRT 1 і 6 локалізовані в ядрі, SIRT2 - у цитоплазмі, SIRT3,4,5 – у мітохондріях, SIRT7 – у ядерці; також є відмінності в рівні експресії таких сиртуїнів у різних тканинах [Agarwal et al, 2017; Di Emidio et al, 2014; Haigis et al, 2010; Mouchiroud et al, 2013; Winnik et al, 2012]. Як виявилось, 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) [Takeo et al, 2014; Tatone et al, 2015].

У пошуках стратегій, спрямованих на запобігання оксидативного ушкодження яєчників, активно вивчається роль SIRT 1 і 3 [Ступчук та ін., 2019; Tatone et al, 2018; Morigi et al, 2018]. Ці протеїни експресуються в яєчниках ссавців, клітинах кумулюсного оточення ооцитів та ембріонах [Di Emidio et al, 2014; Lee et al, 2013; Kawamura et al, 2010; Singh et al, 2018], в овульованих ооцитах, що проходять метафазу II (MII) мейотичного дозрівання [Kawamura et al, 2010]. Вважають, що експресія SIRT1 у мишей пов'язана зі зміною конфігурації хроматину в ооцитах під час метафази I (MI) і метафази II миші [97, 98]. Експресія гену, що кодує цей протеїн істотно змінюється при оксидативному стресі і репродуктивному старінні [Di Emidio et al, 2014; Kosebent et al, 2018; Lee et al, 2013]. 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 [Di Emidio et al, 2014; Morigi et al, 2018; Tatone et al, 2018].

На сьогодні визначення ролі SIRT1 і SIRT3 у процесі мейотичного дозрівання ооцитів є перспективним напрямком, що може сприяти отриманню позитивних результатів 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.

У патогенезі низки гінекологічних захворювань, зокрема недостатності яєчників, велику роль відіграють аутоімунні порушення та пов'язаний з ними стрес. Існують припущення, що аутоімунне ураження нирок здатне впливати як прямо, безпосередньо діючи на ооцити та скорочувальну активність матки, так і опосередковано, зокрема, наприклад, впливаючи на клітини фолікулярного оточення ооцитів [Daan, 2016; Rossetti, 2017]. Аутоімунні порушення є серйозною проблемою для нормального функціонування жіночої репродуктивної системи. Це призводить до

значного зниження вірогідності успішного процесу запліднення, навіть у разі застосування ДРТ [Rives et al, 2018].

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 стресового ураження на імунну та репродуктивну системи організму із застосуванням відповідних експериментальних моделей.

В останнє десятиліття надзвичайно широкого використання у медицині, харчовій та фармакологічній промисловості набуло застосування наночастинок металів, зокрема срібла (НЧС) [Zhao et al, 2018; Ferreyra, 2018]. На основі колоїдного срібла створено низку препаратів, що мають антибактеріальні, противірусні і протигрибкові властивості [Barkat et al, 2018; De Jong et al, 2010]. На сьогодні відомо, що можливим механізмом, який лежить в основі дії НЧС, є регуляція рівнів реактивних форм кисню (РФК) – супероксидних, гідроксильних радикалів у клітинах. Для НЧС характерна антиоксидантна активність, їх широко використовують на даний час не тільки як лікарські засоби, але й як харчові добавки для підтримання оптимальних функцій організму [Agarwal et al, 2017; Diamanti-Kandarakis et al, 2017; Duhig, 2016; Park et al, 2011]. Проте ефекти впливу НЧС на репродуктивну систему як в умовах здорового стану організму, так і за наявності аутоімунного ураження, поки не досліджені.

Отже, дослідження впливу модуляторів сиртуїнів та наночастинок срібла на функціональній 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 – цитологічні (культивування клітин *in vitro* – для дослідження ооцитів, які відновили мейотичне дозрівання, розчинили зародковий пухирець (метафаза I) і сформували перше полярне тільце (метафаза II); морфологічні та морфометричні (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); генномолекулярні (метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) – визначення експресії мРНК оваріальних генів в клітинах ФОО); імунологічні (імунофлуоресцентний метод – із застосуванням FITC-мічених антитіл) та фармакологічні (оцінка впливу різноманітних хімічних речовин).

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше показано, що інгібітор сиртуїнів нікотинамід змінює параметри життєздатності клітин ФОО за рахунок його впливу на функціонування мітохондрії. В умовах оксидативного стресу транскрипційний фактор NF-κB відіграє істотну роль у 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 погіршуються характеристики 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 та збільшується рівень первинних пошкоджень ДНК клітин ФОО. Вперше встановлено, що в умовах ЕСАУ застосування активатора сиртуїнів ресвератролу (20 μM) *in vitro* покращуються характеристики мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатність клітин ФОО, а також знижується кількість клітин ФОО із максимальним ступенем пошкоджень ДНК. Вперше показано, що введення НЧС не

впливає на ДНК клітин ФОО; в умовах ЕСАУ параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин ФОО під дією НЧС покращуються, окрім цього зменшується ступінь 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, котрі 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-EI 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,

12 – тези доповідей на міжнародних конференціях і одна у збірнику 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 (228 найменувань). Робота викладена на 143 сторінках машинописного тексту та проілюстрована 24 рисунками та 17 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та 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 проведенні з використанням невагітних статевозрілих (вік 8–12 тижнів) самиць мишей лінії Альбіно (маса тіла 16–22 г) віварію Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України.

Культивування ооцитів *in vitro*. З яєчників мишей без використання ферментативної обробки (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. Визначали стан зародкового

пухирця, перивітелінового простору та цитоплазми, а саме щільність, ступінь гранульованості, ознаки фрагментації і дегенерації. Усі контрольні і експериментальні ооцити культивували в однакових умовах (стерильний бокс, камери по 0,4 мл культурального середовища DME з 15 mM HEPES, концентрація кальцію 1,71 mM, температура 37 °C, тривалість 2 і 20 год). Після 2 год культивування підраховували ооцити (% щодо 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 гранульована цитоплазма та ознаки фрагментації останньої).

Прижиттєве подвійне забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот. Даний метод був використаний з метою оцінки ступеня клітинної загибелі та диференціації ядер живих, некротичних та апоптотичних клітин.

Метод ДНК-комет (лузний). Для виявлення однониткових розривів ДНК ядер фолікулярних клітин використовували метод лузного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет – «DNA-comet assay») [Afanasieva et al, 2010].

Застосування полімеразної ланцюгової реакції. Визначення експресії мРНК оваріальних генів в фолікулярних клітинах проводили методом полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ПЛР).

Експериментальне системне аутоімунне ушкодження (ЕСАУ). Це ушкодження (патент на корисну модель «Спосіб моделювання системного аутоімунного ушкодження у мишей», № 120418 від 25.10.2017, бюл. № 20) відтворювали шляхом імунізації тварин гомогенатом нирки.

Наночастинки срібла (НЧС) мали розмір ~ 30 нм (концентрація 8 мг/мл за металом), сферичну форма та коричневий колір. НЧС були синтезовані в Інституті біологічної хімії ім. Ф.Д.Овчаренка НАН України за оригінальним протоколом (метод хімічної конденсації), не генотоксичні (тест *in vitro* на культурі клітин CHO-K1, 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.

Використані речовини. В експериментах застосовано наступні речовини: нікотинамід - інгібітор сиртуїнів (5,0 mM, Sigma, США); ресвератрол - активатор сиртуїнів (20,0 μM, Carl Roth GmbH + Co. KG, Німеччина); піридоксал-5'-фосфат (PPT) - інгібітор аспартатного мітохондріального переносника - інгібітор аспартат аміотрансферази (30,0 μM, Sigma, США); BAY11-7082 - інгібітор NF-κB (5 μM, Sigma, США); перекис водню (H₂O₂) (100 μM, Україна); повний ад'ювант Фройнда (Sigma, США); субстанція наночастинок срібла (НЧС) (2,0 мг/кг) Інститут біологічної хімії ім.Ф.Д. Овчаренка НАН України).

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 [Гланц, 1998].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив активатора та інгібітора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО в умовах дії інгібітора аспартатних мітохондріальних переносників *in vitro*. Відомо, що процес дозрівання ооцитів ссавців регулюється гормонами, ростовими факторами, циклічними нуклеотидами та іншими речовинами, які впливають на рівні як власне ооцита, так і клітин ФОО, що утворюють із ооцитом метаболічно єдину систему [Byskov et al, 2005]. Мітохондрії інтегрують 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 вважають основними маркерами якості ооцитів, оскільки зниження рівнів мітохондріальної ДНК і АТФ призводить до значного зниження потенціалу розвитку ооцитів [Wai et al, 2010]. Відомо, що мітохондріальні переносники – це сімейство транспортних білків. Останні (за деяким виключенням) виявлені у внутрішніх мембранах мітохондрій і переносять метаболіти, нуклеотиди й кофактори через цю мембрану, тим самим регулюючи функції цитоплазми й матрикса. Малат/аспартатний переносник – головний механізм транспорту NADH із цитоплазми до мітохондрій. Мітохондріальний SIRT3 разом із ядерним SIRT1 регулюють декілька аспектів фізіології мітохондрій шляхом контролю посттрансляційних модифікацій білка цих органел та транскрипції мітохондріальних генів. Це є одним із шляхів покращення мейотичного дозрівання ооцитів [Pirinen E, Sasso G, Best J. 2012]. Ще одним можливим шляхом регуляції мітохондріальних функцій є зворотне ацетилювання лізинових залишків мітохондріальних протеїнів, опосередкованого SIRT3 [Lombard et al, 2011].

*Вплив активатора та інгібітора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО в умовах дії інгібітора аспартатних мітохондріальних переносників (PPT) *in vitro*.* Частка ооцитів, які розчинили зародковий пухирець (метафаза I), помітно, але невірогідно зростала після двох годин культивування ($90,6 \pm 2,3\%$ порівняно з $84,5 \pm 6,2\%$ у контрольній групі), Формування першого полярного тільця ооцитами (метафаза II) вірогідно зростало після 20 год 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. Інтенсивність розчинення зародкового пухирця ооцитами невірогідно зменшувалася ($72,7 \pm 2,9\%$ порівняно з $84,5 \pm 6,2\%$ у контрольній групі), а формування першого полярного тільця значно послаблювалося ($26,3 \pm 4,7\%$ порівняно з $61,9 \pm 4,6\%$ у контролі; $P < 0,01$; $N=7$) та під дією інгібітора аспартатного мітохондріального переносника PPT. Вірогідних відмінностей інтенсивностей розчинення зародкового пухирця та формування першого полярного тільця ооцитами

не спостерігали ($72,1 \pm 3,4\%$ 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 PPT та PPT і ресвератролу ($P > 0,05$; $N=7$).

Оцінено пригнічуючий вплив інгібітора сиртуїнів нікотинаміду на мейотичне дозрівання ооцитів миші *in vitro* в умовах дії інгібітора аспартатних мітохондріальних переносників PPT (Рис.1).

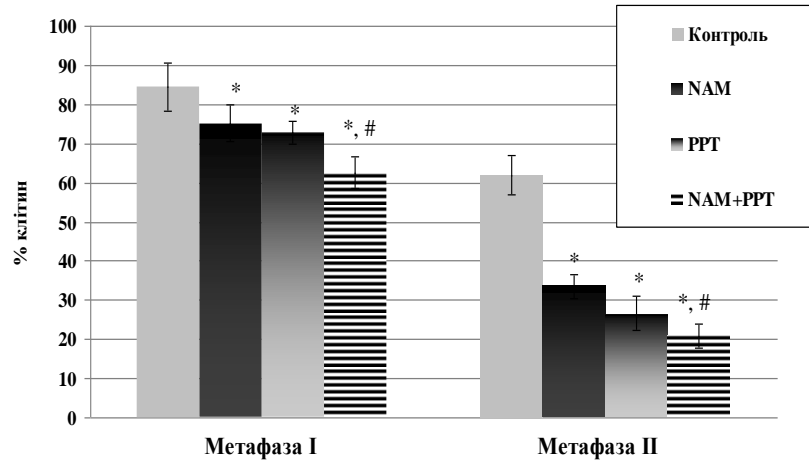


Рис.1. Мейотичне дозрівання ооцитів в умовах дії PPT і нікотинаміду.

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

Отже, отримані результати підтверджують припущення, що модулятори сиртуїнів істотно впливають на мейотичне дозрівання ооцитів не тільки за рахунок їх впливу на мітохондрії, але і шляхом впливу на ядра клітин.

Оцінено також вплив модуляторів сиртуїнів на життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах дії інгібітора аспартатних мітохондріальних переносників (Рис.2).

При порівнянні показників життєздатності клітин ФОО в умовах дії PPT та ресвератрол+PPT статистично вірогідної різниці не відмічали ($P > 0,05$; $N=7$).

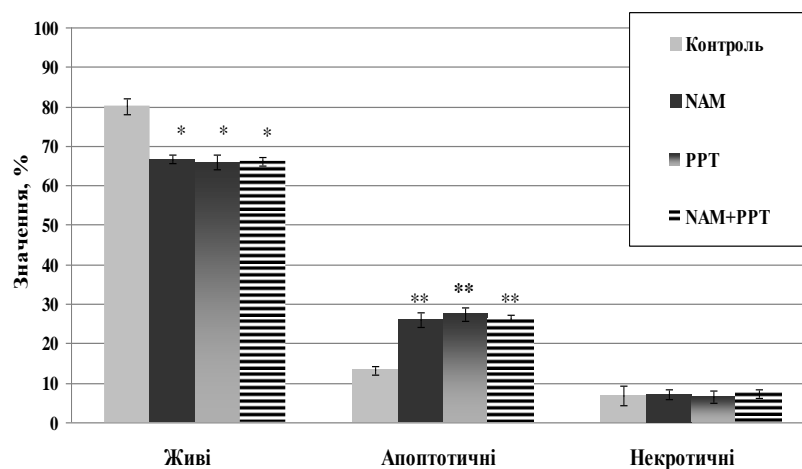


Рис.2. Життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах дії PPT і нікотинаміду.

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

Під дією інгібітора сиртуїнів нікотинаміду та інгібітора аспартатних мітохондріальних переносників РРТ знижується частка живих клітин ФОО та підвищуються показники апоптотичної та некротичної загибелі цих клітин. При цьому в умовах спільної дії нікотинаміду та РРТ не відбувається посилення пригнічуючого впливу інгібітора сиртуїнів нікотинаміду на життєздатність клітин ФОО. Цей факт узгоджується з твердженням, що модулятор сиртуїнів діє на параметри життєздатності клітин ФОО шляхом впливу на систему енергозабезпечення клітин – мітохондрії.

Вплив активатора сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин ФОО в умовах дії інгібітора NF-κB in vitro. Ядерний фактор κB (NF-κB), який є основним індуктором запальних реакцій, був першим описаним фактором транскрипції еукаріотів, здатним безпосередньо реагувати на H₂O₂-індукований оксидативний стрес [Schmidt K, Amstad P, Cerutti P. 1995]. Деацетилювання та інактивація NF-κB за допомогою SIRT1 призводить до пригнічення сигнального шляху, відповідального за розвиток запального процесу і зниження рівня клітинних РФК, таким чином розвиток запального процесу пригнічується [Yeung F, Hoberg J, Ramsey C, et al. 2004; Kauppinen A, Suuronen T, Ojala J, 2013]. З огляду на це, наступним етапом нашого дослідження було встановлення рівня залученості ядерної ланки у механізм дії сиртуїнів.

Оцінювали динаміку мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин їх фолікулярного оточення в умовах дії ресвератролу й інгібітора NF-κB BAY 11-7082 *in vitro*. Так, частка ооцитів, що розчинили зародковий пухирець після 2 год культивування у середовищі з BAY 11-7082, становила 80,0±0,1% порівняно із 84,5±6,2% (P>0,05, N=7) у контрольній групі. Відповідні значення кількості ооцитів, котрі сформували перше полярне тільце після 20 год культивування у середовищі із BAY 11-7082 та без наявності цієї сполуки у середовищі становили 60,0±0,1% та 61,9±4,6%, відповідно (P>0,05, N=7).

Вірогідної різниці кількостей живих клітин ФОО, а також цих клітин з ознаками апоптозу і некрозу від аналогічних величин в умовах впливу як активатора сиртуїнів ресвератролу, так і інгібітора NF-κB BAY11-7082 не спостерігалось.

Отже, встановлено, що впливи активатора сиртуїнів ресвератролу та інгібітора NF-κB BAY 11-7082 є односпрямованими.

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). Реактивні форми кисню (РФК) беруть участь у прямому пошкодженні ДНК клітин та можуть порушувати процеси апоптозу, регуляцію шляхів передачі клітинних сигналів та редокс-баланс у клітинах [Valko et al, 2006]. Також відомо, що аномальні рівні РФК здатні індукувати апоптоз клітин фолікулярного оточення ооцитів шляхом активації транскрипційних факторів FoxO1 [Liu et al, 2015]. Сиртуїни відіграють важливу роль у реакції організмів на стрес шляхом активації антиоксидантної системи [Rajabi et al, 2018]. За рахунок цього вони здатні коригувати негативний вплив різноманітних патологічних процесів, зокрема оксидативного стресу, на процес

мейотчного дозрівання ооцитів [Alcain et al, 2009; Xing et al, 2018]. Ми відтворили модель оксидативного стресу шляхом додавання у середовище культивування ооцитів та клітин ФОО перекису водню (H_2O_2) у концентрації 100 μM [Weng et al, 2016].

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 в умовах оксидативного стресу *in vitro* вірогідно зменшувалися ($P < 0,01$, $N=7$). Так, відновлення мейотичного дозрівання ооцитів мишей після 2 год культивування в умовах оксидативного стресу становило $41,5 \pm 2,5\%$ ($P < 0,01$, $N=7$) порівняно з $84,5 \pm 6,2\%$ у контрольній групі. Формування першого полярного тільця ооцитами після 20 год культивування в умовах оксидативного стресу *in vitro* спостерігали у $10,5 \pm 3,2\%$ випадків ($P < 0,01$, $N=7$) порівняно з $61,9 \pm 4,6\%$ у контролі. Показники мейотичного дозрівання ооцитів вірогідно зростали ($P < 0,01$, $N=7$) у вказаних умовах і після впливу ресвератролу. Так, відновлення мейотичного дозрівання ооцитів мишей після 2 год культивування становило $50,2 \pm 2,9\%$ ($P < 0,01$, $N=7$), а формування першого полярного тільця ооцитами після 20 год культивування – $27,0 \pm 2,7\%$ ($P < 0,01$, $N=7$) в умовах оксидативного стресу *in vitro* і впливу ресвератролу порівняно з такими величинами в умовах ізольованої дії оксидативного стресу.

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

В умовах оксидативного стресу *in vitro* показники життєздатності клітин ФОО вірогідно зменшувалися ($P < 0,01$, $N=7$). Так, зменшувалася кількість живих клітин ФОО ($43,0 \pm 1,3\%$; $P < 0,05$, $N=7$), збільшувалася частка апоптотичних одиниць ($43,3 \pm 1,0\%$; $P < 0,05$, $N=7$) і некротичних клітин ($13,7 \pm 0,8\%$; $P < 0,05$, $N=7$) порівняно з величинами у контрольній групі ($80,5 \pm 6,2\%$, $17,5 \pm 6,2\%$ та $3,5 \pm 6,2\%$). Показники життєздатності клітин ФОО в умовах оксидативного стресу *in vitro* і впливу ресвератролу вірогідно збільшувалися ($P < 0,01$, $N=7$). Так, 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), зменшувалася кількість апоптотичних клітин ($32,3 \pm 0,8\%$; $P < 0,05$, $N=7$ порівняно із $43,3 \pm 1,0\%$ без впливу ресвератролу) і некротичних одиниць ($7,3 \pm 0,8\%$; $P < 0,05$, $N=7$ порівняно із $13,7 \pm 0,8\%$ без впливу ресвератролу).

Таким чином, виявилось, що в умовах оксидативного стресу *in vitro* і впливу ресвератролу покращуються характеристики мейотичного дозрівання ооцитів, а також життєздатність клітин ФОО. Взявши до уваги дані літератури, ми припустили, що ресвератрол, активуючи SIRT1, призводить до деацетилювання останнім FoxO1. Ймовірним результатом цього є зниження рівнів апоптозу та некрозу клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах оксидативного стресу [Costa et al, 2011; Shan et al, 2009].

Вплив активатора сиртуїнів й інгібітора NF- κ B на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах оксидативного стресу in vitro. У вказаних умовах додавання ресвератролу, BAУ 11-7082 та одночасна наявність цих речовин у середовищі культивування призводили до покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів (метафаза I та II) (Рис.3) та збільшення кількості живих клітин ФОО та зменшення часток таких клітин із ознаками апоптозу та некрозу (Рис.4).

Так, ресвертрол збільшував частки проходження ооцитами метафаз I та II у 1,20 та 2,57 разів ($P < 0,05$, $N=7$), БАУ 11-7082 – у 1,29 та 3,85 разів ($P < 0,01$, $N=7$), БАУ 11-7082+ресвератрол – у 1,58 та 4,48 разів ($P < 0,01$, $N=7$), відповідно. Ресвератрол в умовах оксидативного стресу *in vitro* 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 та ресвератролу призводило до збільшення частки живих клітин ФОО у 1,43 рази та зниження апоптозу цих клітин у 1,83 рази.

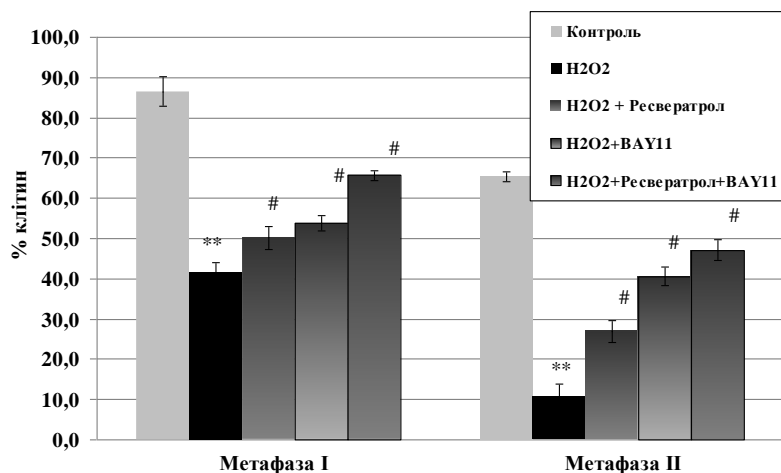


Рис. 3. Вплив ресвератролу та БАУ11-7082 на мейотичне дозрівання ооцитів мишей в умовах оксидативного стресу *in vitro*.

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

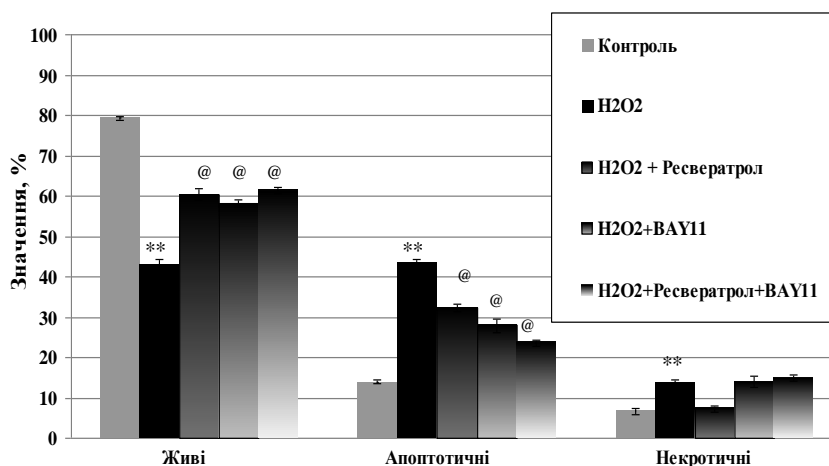


Рис.4. Вплив ресвератролу і БАУ11-7082 на життєздатність клітин ФОО в умовах оксидативного стресу *in vitro*.

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

Отже, встановлено, що в умовах оксидативного стресу *in vitro* спільне застосування інгібітора NF-κB - сполуки ВАУ 11-7082 та активатора сиртуїна 1 ресвератролу призводило до істотного збільшення частки ооцитів, що успішно пройшли метафази I та II мейотичного дозрівання, до відновлення ооцитами мейотичного дозрівання, а також до підвищення життєздатності клітин ФОО.

Зважаючи на отримані результати, для подальших досліджень впливу сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів мишей та життєздатність і цілісність ДНК клітин ФОО, а також для виявлення можливих механізмів подібного впливу в умовах оксидативного стресу у фізіологічних умовах, ми використали методику експериментального системного аутоімунного ушкодження (ЕСАУ) у мишей [деклараційний патент на корисну модель «Спосіб моделювання системного аутоімунного ушкодження у мишей» (№ 120418 від 25.10.2017, бюл. № 20/2017)].

Мейотичне дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах ЕСАУ.

Мейотичне дозрівання ооцитів в умовах ЕСАУ. Кількість ооцитів ($10,3 \pm 0,4$ шт), які виділяли з одного яєчника тварин в умовах ЕСАУ була істотно меншою порівняно з $15,2 \pm 0,4$; $P < 0,01$, $N=6$ у контрольній групі тварин. Частки ооцитів, що розчиняли зародковий пухирець (пройшли стадію метафази I) та формували перше полярне тільце (метафаза II) також були вірогідно меншими. Так, на стадії метафази I відносні їх кількість становила $30,3 \pm 1,1\%$ ($P < 0,001$, $N=14$) порівняно з $76,4 \pm 3,2\%$ у контрольній групі тварин, а на стадії метафаза II - $25,9 \pm 1,5\%$ ($P < 0,001$, $N=14$) порівняно з $53,8 \pm 1,2\%$ в контрольній групі мишей.

Отже, розвиток ЕСАУ призводить до істотного порушення мейотичного дозрівання ооцитів.

Кількість живих клітин ФОО в групі ЕСАУ становила $41,9 \pm 0,5\%$ ($P < 0,001$, $N=14$) порівняно з $74,2 \pm 1,2\%$ в контрольній групі тварин. ЕСАУ також призводить до збільшення кількості клітин ФОО з морфологічними ознаками апоптозу ($40,3 \pm 0,7\%$; $P < 0,001$, $N=14$ порівняно з $19,0 \pm 0,8\%$ клітин в контролі) і некрозу ($17,8 \pm 0,6\%$; $P < 0,001$, $N=14$ порівняно з $6,8 \pm 0,4\%$, відповідно).

Таким чином, в умовах ЕСАУ значно збільшується кількість клітин ФОО з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу, що може бути причиною порушення мейотичного дозрівання ооцитів.

Експресія генів COX2, Grem1 та HAS2 у клітинах ФОО в умовах ЕСАУ. З даних літератури відомо, що гіалуронова синтаза 2 (HAS2), циклооксигеназа-2 (COX2) та білок гремлін 1 (Grem1) істотно задіяні у процес овуляції. HAS2 і COX2 є ключовими ферментами, необхідними для кумулюсного розширення ооцитів. Тому ми дослідили зміни в експресії специфічних генів HAS2, COX2 та Grem1 на рівні мРНК в клітинах ФОО у мишей в умовах ЕСАУ. Нами вперше встановлено, що в таких умовах відбувається зниження експресії гену Grem1 на 32,0% (у 1,47 разів). При цьому рівні експресії HAS2 та COX2 вірогідно не змінювалися (1,14 та 1,06 разів, відповідно) у порівнянні з контролем. Таким чином, зміни в експресії досліджуваних генів у клітинах ФОО можуть бути однією з причин порушення оваріальної функції в умовах ЕСАУ.

Оцінка цілісності ДНК у ядрах клітин ФОО в умовах ЕСАУ. Після ушкодження ДНК може відбутися або її репарація, або клітинна загибель. Пошкодження ДНК на клітинному рівні можна виявити за допомогою мікроелектрофореза лізованих клітин; при цьому фрагментоване ядро утворює на електрофореграмі своєрідний ореол, що схожий на хвіст комети [Afanasieva et al, 2010]. Вважається, що розміри «хвоста ДНК-комети» позитивно корелюють зі ступенем фрагментації ДНК. $I_{\text{ДК}}$ – це загальноприйнятий інтегральний показник, який враховує зміни кількості комет всіх типів із різною інтенсивністю випромінювання, тобто ступенем ушкодження ДНК. Показники клітинної загибелі (частка апоптотичних і некротичних клітин) та $I_{\text{ДК}}$ об'єктивно характеризують ступінь 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 ресурсів, наявності прозапальних факторів тощо). Клітини з максимально ушкодженою ДНК можуть мати як апоптотичний, так і некротичний фенотип.

Ми підраховали, що в умовах ЕСАУ кількість клітин ФОО із пошкодженою ДНК становить 94,5% ($P < 0,01$, $N=9$), а $I_{\text{ДК}} = 3,7$. Це свідчить про драматичне зростання пошкодження ДНК. При цьому $I_{\text{ДК}}$ у контрольній групі тварин становив 0,2. Більшість «комет» ядер клітин ФОО із одностривковими розривами ДНК відносяться до 4-го класу, який характеризує максимальне ушкодження ДНК. В умовах ЕСАУ частка клітин 4-го класу становила $74,7 \pm 4,2\%$ ($P < 0,01$, $N=9$) порівняно з $0,2 \pm 0,5\%$ клітин цього ж класу у контрольній групі. Частка клітин 3-го класу збільшувалася ($19,8 \pm 4,0\%$; $P < 0,01$, $N=9$ при $0,6 \pm 0,9\%$ у контролі), а клітин 2-го класу - до $4,2 \pm 1,6\%$ ($P < 0,01$, $N=9$) порівняно з $2,2 \pm 1,9\%$ клітин у контролі. Кількість клітин 1-го та нульового класів зменшувалась у групі тварин в умовах ЕСАУ і становила $1,1 \pm 1,0\%$ ($P < 0,01$, $N=9$) при $12,4 \pm 2,3\%$ у контролі. Частка одиниць 0-го класу (з відсутністю первинних пошкоджень ДНК) дорівнювала $0,2 \pm 0,1\%$ ($P < 0,01$, $N=9$) при $84,6 \pm 4,0\%$ клітин у контролі. Таким чином, в умовах ЕСАУ катастрофічно підвищується рівень первинних пошкоджень ДНК клітин ФОО.

Іншими словами, імунозпальні процеси в умовах ЕСАУ, викликаного імунізацією антигенної суспензії нирки, котрі призводять до різкого збільшення ушкодження ДНК та клітинної загибелі, можуть спричиняти новий виток посилення некротичних, запальних та аутоімунних процесів в організмі. Таким чином, пошкодження клітин ФОО у цих експериментальних умовах, у результаті чого порушуються метаболічні та електричні зв'язки, можна вважати домінуючим фактором порушення мейотичного дозрівання ооцитів, враховуючи функції цих клітин у регуляції метаболічних процесів у цих клітинах.

Вплив модуляторів сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах ЕСАУ. Відомо, що сиртуїни 1 та 3, забезпечуючи активацію специфічних каскадів реакцій, здатні коригувати негативні впливи низки патологічних процесів, зокрема оксидативного стресу, на процес мейотичного дозрівання ооцитів [Alcain et al, 2009; Xing et al, 2017]. Тому клітинні захисні механізми, в яких беруть участь сиртуїни, можуть бути використані для корекції стану яєчників в умовах оксидативного стресу, що невід'ємно

супроводжує перебіг патофізіологічних процесів в організмі, зокрема аутоімунні ушкодження органів.

Вплив модуляторів сиртуїнів на процес мейотичного дозрівання ооцитів в умовах ЕСАУ. Відносна кількість ооцитів, що розчиняли зародковий пухирець та формували перше полярне тільце у групі тварин в умовах ЕСАУ при застосуванні активатора сиртуїнів ресвератролу збільшувалася (Рис.5). Вірогідних змін кількості ооцитів, що розчиняли зародковий пухирець та формували перше полярне тільце у тварин в умовах ЕСАУ, при застосуванні інгібітора сиртуїнів нікотинаміді не спостерігалось.

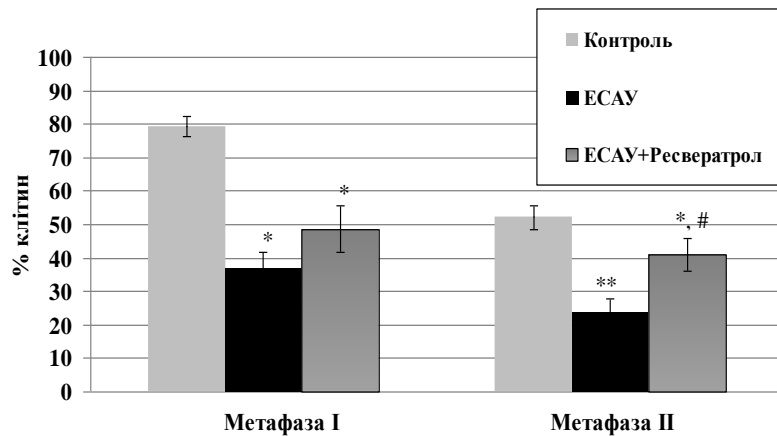


Рис.5. Мейотичне дозрівання (метафази I та II) ооцитів в умовах ЕСАУ та при застосуванні ресвератролу.

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

Таким чином, процес мейотичного дозрівання ооцитів у тварин в умовах ЕСАУ при застосуванні активатора сиртуїнів ресвератролу *in vitro* помітно нормалізується.

Вплив модуляторів сиртуїнів на життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів мишей в умовах ЕСАУ. Кількість живих клітин ФОО у тварин в умовах ЕСАУ при застосуванні активатора сиртуїнів ресвератролу збільшувалася. Так, частка живих клітин при культивуванні з ресвератролом у групи тварин в умовах ЕСАУ становила в середньому $49,7 \pm 0,8\%$ ($P < 0,05$, $N=12$), тоді як у тварин в умовах ЕСАУ за відсутності вказаного модулятора – $39,2 \pm 0,8\%$. Кількість клітин ФОО із морфологічними ознаками апоптозу для групи тварин в умовах ЕСАУ становила $38,5 \pm 2,0\%$, а у тварин з ЕСАУ та при застосуванні ресвератролу – $32,1 \pm 0,7\%$ ($P < 0,05$, $N=12$). Частки клітин з некрозом дорівнювали, відповідно, $22,3 \pm 1,6\%$ та $18,2 \pm 0,3\%$ ($P < 0,05$, $N=12$) в групах тварин в умовах ЕСАУ і з ЕСАУ при застосуванні ресвератролу.

Отже, культивування клітин ФОО у середовищі із активатором сиртуїнів – ресвератролом призводить до збільшення частки живих одиниць та зниження показників апоптотичної та некротичної загибелі клітин ФОО у тварин в умовах ЕСАУ.

Вплив модуляторів сиртуїнів на цілісність ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів мишей в умовах ЕСАУ. При визначенні змін рівня первинних

пошкоджень ДНК ядер клітин ФОО у тварин в умовах ЕСАУ при застосуванні активатора та інгібітора сиртуїнів (Табл. 1). не виявилось вірогідного впливу інгібітора сиртуїнів нікотинамід у культивуванні клітин ФОО тварин з ЕСАУ ($P > 0,05$, $N=7$) на цілісність ДНК ядер цих клітин.

Таблиця 1

Оцінка цілісності ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах ЕСАУ при застосуванні ресвератролу

Група тварин	Клас ушкодження ДНК ядер клітин ФОО, %				
	0	1	2	3	4
Контроль	81,4±2,8	14,6±1,1	2,2±0,1	1,4±0,3	0,4±0,1
ЕСАУ	4,4±0,9*	4,6±1,3*	4,0±0,8*	15,6±2,4*	71,4±2,6*
Ресвератрол	82,0±2,9	14,3±0,8	2,3±0,3	1,4±0,2	0,1±0,1
ЕСАУ+Ресвератрол	6,2±0,7	7,9±0,9#	10,8±0,8#	17,3±1,1	57,8±1,8#

Примітка: * – $P < 0,05$, вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі; # – $P < 0,05$, вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин у групі з ЕСАУ.

Таким чином, при культивуванні клітин ФОО тварин в умовах ЕСАУ при застосуванні активатора сиртуїнів ресвератролу кількість цих клітин із максимальним ступенем ушкодження ДНК була драматично збільшеною.

Отже, оцінюючи вплив модуляторів сиртуїнів на рівень первинних пошкоджень ДНК у ядрах клітин фолікулярного оточення ооцитів, ми можемо констатувати що нікотинамід не впливає, а ресвератрол зменшує рівень первинних пошкоджень ДНК у ядрах клітин ФОО тварин в умовах ЕСАУ.

Вплив введення НЧС на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах ЕСАУ.

Є дані про те, що НЧС впливають на ступінь оксидативного пошкодження та патерн регуляції ферментів, що відповідають за виведення вільних радикалів, змінюють регуляцію шляхів експресії генів, що беруть участь в апоптозі і порушенні регуляції клітинних структур, котрі беруть участь в зберіганні, детоксикації та метаболізмі металів (таких як металотіонеїн 2) [Choi et al, 2010; Nair et al, 2011; Kim et al, 2013; Maillard et al, 2013]. Доза 10 мг/кг маси тіла у мишей еквівалентна дозі 0,81 мг/кг маси тіла для людини. Це відповідає приблизно 50 мг для людини масою 60 кг (відповідно до основних принципів для перерахунку дози від тварин до людини [Reagan-Shaw et al, 2008]). Ми обрали дозу 2 мг/кг маси тіла миші, оскільки ця доза не перевищує використані в попередніх дослідженнях і котрі не викликали значних побічних ефектів у тварин [Park et al, 2011; De Jong et al, 2013].

Вплив внутрішньовенного введення наночастинок срібла на процес мейотичного дозрівання ооцитів та життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах ЕСАУ. Введення НЧС в умовах ЕСАУ призводило до істотного (майже дворазового) зростання кількості ооцитів (Табл.2).

Таблиця 2
Кількість ооцитів, які виділяли з одного яєчника в умовах ЕСАУ і введення наночастинок срібла

Середня кількість ооцитів/яєчник, шт			
Контроль	ЕСАУ	НЧС	ЕСАУ+НЧС
17,3±0,6	9,8±1,3 *	17,4 ± 1,2	15,0 ± 0,8 #

Примітка: * – P<0,05, вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі (N=8); # – P<0,05, вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин в групі тварин в умовах ЕСАУ (N=8).

Уведення НЧС в умовах ЕСАУ забезпечувало зростання кількості ооцитів, що відновили мейоз (стадія метафази I) та сформували перше полярне тільце (стадія метафази II) (рис. 6 А та Б).

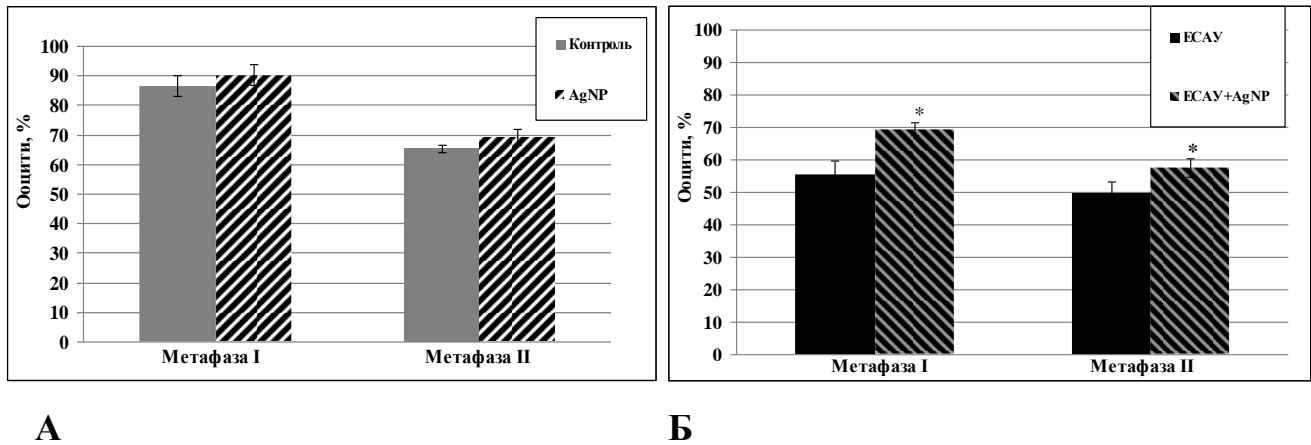


Рис. 6. Вплив уведення НЧС на мейотичне дозрівання ооцитів в умовах ЕСАУ.

Примітка: *–P<0,05, вірогідні відмінності середніх груп даних відносно ЕСАУ.

А – вплив уведення НЧС на клітини тварин контрольної групи; Б – тварин з ЕСАУ.

Під дією ЕСАУ у фолікулярному оточенні ооцитів відбувалося зменшення кількості живих клітин та збільшувалася кількість клітин з морфологічними ознаками апоптотичної та некротичної загибелі. Уведення НЧС в умовах ЕСАУ зумовлювало збільшення кількості живих клітин ФОО та зменшення клітин з морфологічними ознаками апоптотичної загибелі (Табл.3).

Таблиця 3
Вплив введення наночастинок срібла на життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах ЕСАУ

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

Примітка. * – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$, вірогідні відмінності середніх груп даних відносно таких величин в контрольній групі тварин; # – $P < 0,05$, вірогідні відмінності середніх груп даних по відношенню до таких величин в групі в умовах ЕСАУ.

Таким чином, мейотичне дозрівання ооцитів в умовах введення НЧС не пригнічувалося, а життєздатність клітин ФОО не зменшувалася. Уведення НЧС в умовах ЕСАУ призводило *in vitro* до збільшення кількості ооцитів, які відновлюють мейоз та формують перше полярне тільце. Кількість живих клітин збільшувалася, а кількість клітин з морфологічними ознаками апоптотичної загибелі у фолікулярному оточенні ооцитів зменшувалася.

Вплив внутрішньовенного введення НЧС на цілісність ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцита в умовах ЕСАУ. Введення НЧС в умовах ЕСАУ призводило до зменшення ($P < 0,05$, $N=6$) кількості клітин фолікулярного оточення ооцитів з 4-м і 3-м класами ураження і збільшення ($P < 0,05$, $N=6$) кількості ядер з 1-м і 0-м класами пошкодження ДНК (Табл.4).

Таблиця 4

Оцінка цілісності ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах ЕСАУ і введення наночастинок срібла

Група тварин	Клас ушкодження ДНК-комет ядер клітин ФОО, %				
	0	1	2	3	4
Контроль	84,6±4,83	12,4±3,17	2,2±1,23	0,6±0,78	0,2±0,83
ЕСАУ	0,2±0,57 *	1,1±2,26 *	4,2±1,18	19,8±1,14 *	74,7±5,32 *
НЧС	80,7±7,54	8,5±1,67	4,4±1,24	3,9±1,17	2,5±1,22
ЕСАУ+ НЧС	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 величин середніх груп даних відносно таких величин у тварин контролю; # – $P < 0,05$, вірогідні відмінності величин середніх груп даних відносно таких величин у тварин в умовах ЕСАУ.

Таким чином, в умовах ЕСАУ введення НЧС зумовлює помітне зменшення ступенів пошкодження ДНК в ядрах клітин ФОО.

Описані нами результати підтверджують, що оцінка цілісності геному клітин ФОО є чутливим підходом у дослідженнях, пов'язаних з нанотоксикологією. Використання таких тестових систем у майбутньому може сприяти поглибленню інтерпретації можливих ефектів дії наночастинок металів на клітинному і субклітинному рівнях.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

На підставі отриманих результатів та літературних даних ми вважаємо, що експериментальне системне аутоімунне ураження супроводжується інтенсивним оксидативним стресом, що призводить до розвитку системного запального процесу з пошкодженням імунокомпетентних одиниць (клітин тимусу та лімфатичних вузлів) та

порушенням функціонування клітин яєчника. Відбувається значне пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів, посилення загибелі клітин ФОО та пошкодження ДНК ядер клітин ФОО. Ми визначили впливи модуляторів сиртуїнів (ресвератролу, нікотинаміду) та наночастинок срібла на функціонування клітин яєчника в умовах ЕСАУ, а також сформулювали гіпотезу щодо механізмів дії даних модуляторів у різних експериментальних умовах.

З урахуванням літературних даних і власних результатів можна запропонувати наступну вірогідну схему функціонування клітин яєчника в умовах ЕСАУ (Рис.7.).



Рис.7. 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 однострункових 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.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ 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 (Здобувач взяв участь у плануванні експерименту, проведенні досліджень, статистичній обробці отриманих даних, їх аналізі та узагальненні, написанні статті).
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 (Здобувач здійснив планування експерименту, взяв участь у проведенні експериментальних досліджень, статистичній обробці отриманих даних, їх аналізі та узагальненні, написанні статті).
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 (Здобувач взяв участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень статистичній обробці отриманих даних, їх аналізі та узагальненні, написанні статті).
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(Здобувач взяв участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень

статистичній обробці отриманих даних, їх аналізі та узагальненні, написанні статті).

5. **Ступчук МС**, Блашків ОТ, Вознесенська ТЮ. Влияние наночастиц серебра на ооциты и эмбрионы. Пробл репрод. 2017; 23(2): 22-6 (*Здобувач взяв участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень статистичній обробці отриманих даних, їх аналізі та узагальненні, написанні статті).*
6. **Ступчук МС**, Вознесенська ТЮ. Біологічна роль сиртуїнів в еукаріотів. Фізіол журн. 2017; 63(4): 105-13 (*Здобувач взяв участь у написанні оглядової статті).*
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(*Здобувач взяв участь у написанні оглядової статті).*
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. (*Здобувач взяв участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень статистичній обробці отриманих даних, їх аналізі та узагальненні, написанні статті).*
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 (*Здобувач взяв участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень статистичній обробці отриманих даних, їх аналізі та узагальненні, написанні статті).*
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 (*Здобувач взяв участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень статистичній обробці отриманих даних, їх аналізі та узагальненні, написанні статті).*

Список тез доповідей з'їздів, симпозіумів, конференцій та шкіл на яких були апробовані матеріали 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-EJ 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).**

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.

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.

З використанням моделі експериментального системного аутоімунного ушкодження (ЕСАУ) та моделювання оксидативного стресу *in vitro*, а також застосуванням модуляторів сиртуїнів (ресвератролу і нікотинамід), інгібітора NF- κ B (BAY11-7082) і мітохондріального переносника (PPT) та експериментальної субстанції наночастинок срібла (НЧС) досліджено параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин їх фолікулярного оточення, а також особливості розподілу однострессових розривів ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів (ФОО), що раніше не було вивчено. Показано, що інгібітор сиртуїнів нікотинамід змінює параметри життєздатності клітин ФОО за рахунок його впливу на мітохондрії; в умовах оксидативного стресу *in vitro* транскрипційний фактор NF- κ B бере участь в механізмі дії ресвератролу (активатор SIRT1) на процес мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатність клітин ФОО.

Встановлено, що в умовах ЕСАУ відбувається пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів; збільшується кількість клітин ФОО з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу; відбуваються зміни у експресії оваріальних генів *COX2*, *Grem1* та *HAS2* у клітинах ФОО; збільшується рівень первинних пошкоджень ДНК клітин ФОО.

Вперше показано, що в умовах ЕСАУ застосування активатора сиртуїнів ресвератролу *in vitro* покращує параметри мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафази II і життєздатність клітин ФОО, а також призводить до зниження кількості клітин ФОО із максимальним ступенем пошкоджень ДНК.

Введення експериментальної субстанції НЧС не впливає на ДНК клітин ФОО, проте в умовах ЕСАУ параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин ФОО покращуються, окрім цього, відмічається зменшення пошкодження ДНК ядер клітин ФОО.

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

АННОТАЦІЯ

Ступчук М.С. Влияние модуляторов сиртуинов и наночастиц серебра на функционирование клеток яичника мыши - Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук (доктора философии) по специальности 03.00.13 - «Физиология человека и животных» - Институт физиологии им. Богомольца НАН Украины, Киев, 2019.

В диссертационной работе, согласно поставленной цели, приведены теоретическое обобщение и представлены новое решение научной задачи по участию сиртуинов и наноматериалов в оогенезе при различных экспериментальных условиях.

С использованием модели экспериментального системного аутоиммунного повреждения (ЭСАП) и моделирования оксидативного стресса *in vitro*, а также применением модуляторов сиртуинов (ресвератрола и никотинамида), ингибитора NF-κB (ВAУ11-7082) и митохондриального переносчика (PPT) и экспериментальной субстанции наночастиц серебра (НЧС) исследованы параметры мейотического созревания ооцитов и жизнеспособности клеток их фолликулярного окружения, а также особенности распределения одностранных разрывов ДНК ядер клеток фолликулярного окружения ооцитов (ФОО), что раньше не было изучено. Показано, что ингибитор сиртуинов никотинамид меняет параметры жизнеспособности клеток ФОО за счет его влияния на митохондрии; в условиях оксидативного стресса *in vitro* транскрипционный фактор NF-κB участвует в механизме действия ресвератрола (активатор SIRT1) на процесс мейотического созревания ооцитов и жизнеспособность клеток ФОО.

Установлено, что в условиях ЭСАП происходит угнетение мейотического созревания ооцитов; увеличивается количество клеток ФОО с морфологическими признаками апоптоза и некроза; происходят изменения в экспрессии овариальных генов *COX2*, *Grem1* и *HAS2* в клетках ФОО; увеличивается уровень первичных повреждений ДНК клеток ФОО. Впервые показано, что в условиях ЭСАП применения активатора сиртуинов ресвератрола *in vitro* улучшает параметры мейотического созревания ооцитов на стадии метафазы II и жизнеспособность клеток ФОО, а также приводит к снижению количества клеток ФОО с максимальной степенью повреждений ДНК.

Введение экспериментальной субстанции НЧС не влияет на ДНК клеток ФОО, однако в условиях ЭСАП параметры мейотического созревания ооцитов и жизнеспособности клеток ФОО улучшаются, кроме этого, отмечается уменьшение повреждения ДНК ядер клеток ФОО.

Ключевые слова: ооциты, клетки фолликулярного окружения ооцитов, оксидативный стресс, экспериментальное системное аутоиммунное повреждение, наночастицы серебра.

SUMMARY

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 assesed 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.

It has been shown that the sirtuins inhibitor nicotinamide changes the parameters of vitality of FEO cells due to its effect on mitochondria; in conditions of oxidative stress *in vitro*, the transcription factor of NF- κ B is involved in the mechanism of resveratrols impact on the process of oocyte meiotic maturation and vitality of FEO cells. Moreover, 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 increasement in the number of FEO cells with morphological signs of apoptosis and necrosis; an occurance of changes in the levels of expression of *COX2*, *Grem1*, and *HAS2* genes in FEO cells; an increasement in the level of DNA primary damages to of the FEO cells.

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 decreasement in the FEO cells DNA primary damages; it was also shown the increasement 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.

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
ФОО	– фолікулярне оточення ооцитів
SIRT	– сиртуїн
PPT	– піридоксал-5'-фосфат