

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

СРІБНА ВАЛЕНТИНА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК.616-092:618.112:616-092.4

ДИСЕРТАЦІЯ
РОЗЛАД ОВАРІАЛЬНОЇ ФУНКЦІЇ В УМОВАХ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУНОКОМПЛЕКСНОГО УШКОДЖЕННЯ

14.03.04 – Патологічна фізіологія
Медичні науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

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

Науковий керівник: Янчій Роман Іванович, доктор біологічних наук, професор,
заслужений діяч науки і техніки України

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук (доктора філософії) 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 корекції.

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

ЕІУ 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.

Були використані такі методи — культивування ооцитів *in vitro*, цитоморфологічний метод, метод лужного гель-електрофорезу поодиноких клітин (метод ДНК-комет), метод флуоресцентної мікроскопії, статистичні методи обробки результатів.

В умовах імунізації БСА спостерігалось пошкодження ооцитів, а саме пригнічення мейотичного дозрівання, зменшення кількості живих клітин тимуса, ЛВ та клітин ФОО, пошкодження ядерної ДНК клітин тимуса та лімфатичних вузлів. Оцінка цілісності геному, співвідношення матеріалу ДНК у "голові" та "хвості" комети, як міра функціонування генома, дає підстави вважати, що імунізація БСА ймовірно змінює активність експресії генів, пов'язаних з репарацією, що відображається як однострунковий розрив ДНК.

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.

Отримані результати продемонстрували, що введення антиоксиданта етилметилгідроксипіридин-сукцината (ГС) не впливає на розриви ланцюгів ДНК клітин лімфатичних вузлів, а також не чинить дію на ДНК клітин ФОО та тимуса, однак спостерігається збільшення ядер 2-го класу, відповідно, в 2,0 і 1,7 рази. Застосування ГС в умовах ЕІУ призводить до зменшення пошкодження ДНК, а саме, частка ядер 4-го класу клітин ФОО, тимуса та лімфатичних вузлів з максимальним ушкодженням ДНК зменшилася, відповідно, в 3,6; 2,6 і 1,7 рази, а частка ядер класу 0/1, які характеризуються відсутністю первинних уражень, збільшилася, відповідно, в 2,0; 7,0 і 2,2 рази.

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 одониткових розривів ДНК ооцитів в умовах впливу антиоксиданта (ресвератрол), блокатора ПАРП(4-гідроксиквіназолін) , субстрата NOS (L-аргінін), блокатора iNOS (аміногуанідин) дають підстави стверджувати, що NO бере участь в регуляції репарації ОНР ДНК ооцитів.

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

Sribna V. Ovarian dysfunction under experimental immune complex-mediated failure. – Qualification scientific work on the rights of a manuscript.

A PhD thesis in medicine, 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.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Срібна В.О.** Розподіл одониткових 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.
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.
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.
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.
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.
 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.
 7. Литвиненко А.П. Мейотичне дозрівання ооцитів і життєздатність клітин їх фолікулярного оточення, тимуса і лімфатичних вузлів за умов моделювання системного іммунокомплексного 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.
 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.

які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Срібна В.О.** Розлад оваріальної функції в умовах експериментального іммунокомплексного 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 одониткових 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: сьогодення і майбутнє» (м.Харків, 19 травня 2017 р.). – Збірник матеріалів конференції – 2017. – С. 99.
 3. **Срібна В.О.** Особливості розподілу одониткових 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 імунотоксичного 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, May 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 “Іновації 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** // Научно-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 імунного 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 2016 р.). – 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 lymph nodes 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.

які додатко вовідображають наукові результати дисертації:

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).

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	15
ВСТУП.....	17
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	
1.1. Передчасна недостатність яєчників, як розлад оваріальної функції.....	24
1.2. Активні форми кисню і пошкодження ДНК.....	29
1.3. Нітрозативний стрес і зсув у метало-лігандному гомеостазі.....	36
РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ	
2.1. Моделювання експериментального імунокомплексного ушкодження.....	45
2.2. Метод ДНК-комет (лужний).....	49
2.3. Метод культивування ооцитів <i>in vitro</i>	50
2.4. Метод прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот.....	51
2.5. Використані речовини.....	51
2.6. Схема експерименту.....	53
2.7. Статистична обробка результатів.....	60
РОЗДІЛ 3 РОЗЛАД ОВАРІАЛЬНОЇ ФУНКЦІЇ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУНОКОМПЛЕКСНОГО УШКОДЖЕННЯ.....	62

РОЗДІЛ 4 ВПЛИВ ВВЕДЕННЯ АНТИОКСИДАНТА НА МЕЙОТИЧНЕ ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ, ЖИТТЄЗДАТНІСТЬ КЛІТИН ЇХ ФОЛІКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ ТА РОЗПОДІЛ ОДНОНИТКОВИХ РОЗРИВІВ ДНК ЯДЕР КЛІТИН ФОЛІКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ ООЦИТІВ, ТИМУСА І ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУНОКОМПЛЕКСНОГО УШКОДЖЕННЯ

4.1. Вплив введення антиоксиданта і L-норваліна на показники мейотичного дозрівання ооцитів та параметри життєздатності клітин їх фолікулярного оточення в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження 67

4.2. Вплив введення антиоксиданта на розподіл одониткових розривів ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження..... 70

РОЗДІЛ 5 ВПЛИВ ВВЕДЕННЯ НАНОЧАСТИНОК НУЛЬВАЛЕНТНОГО ЗАЛІЗА НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЯЄЧНИКА, ТИМУСА ТА ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ В УМОВАХ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУНОКОМПЛЕКСНОГО УШКОДЖЕННЯ

5.1. Вплив введення наночастинок нульвалентного заліза на функціональний стан яєчника в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження..... 75

5.2. Життєздатність клітин тимуса та особливості розподілу одониткових розривів ДНК їх ядер в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження та застосування наночастинок нульвалентного заліза..... 78

5.3. Життєздатність клітин лімфатичних вузлів та особливості розподілу одониткових розривів ДНК їх ядер в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження та застосування наночастинок нульвалентного заліза.....	81
5.4. Функціональний стан яєчника в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження, введення блокатора iNOS, субстрата NOS і застосування наночастинок нульвалентного заліза.....	84
5.5. Життєздатність клітин тимуса та особливості розподілу одониткових розривів ДНК їх ядер в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження та введення блокатора iNOS, субстрата NOS і застосування наночастинок нульвалентного заліза.....	89
5.6. Життєздатність клітин лімфатичних вузлів та особливості розподілу одониткових розривів ДНК їх ядер в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження та введення блокатора iNOS, субстрата NOS і застосування наночастинок нульвалентного заліза.....	93
РОЗДІЛ 6 ВПЛИВ АНТИОКСИДАНТА, БЛОКАТОРА ПАРП, СУБСТРАТА NOS, БЛОКАТОРА iNOS НА <i>IN VITRO</i> ВІДНОВЛЕННЯ МЕЙОТИЧНОГО ДОЗРІВАННЯ ООЦИТІВ ТА НА РОЗПОДІЛ ОДОНИТКОВИХ РОЗРИВІВ ДНК ЯДЕР ООЦИТІВ	
6.1. Вплив різних концентрацій 4-ГК, АГ, L-аргініна і ресвератрола на відновлення мейозу ооцитами <i>in vitro</i>	97
6.2. Вплив комбінацій речовин 4-ГК і АГ, 4-ГК і L-аргініна, 4-ГК і ресвератрола, АГ і ресвератрола на відновлення мейозу ооцитами <i>in vitro</i>	99

6.3. Вплив 4-ГК (1 mM), АГ (0,02 mM), L-аргініна (0,04 mM), ресвератрола (2,0 μM) та їх комбінацій на розподіл ОНР ДНК ядер ооцитів	101
РОЗДІЛ 7 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	110
ВИСНОВКИ.....	128
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	130
ДОДАТОК 1.....	156

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ І СКОРОЧЕНЬ

4-ГК	– 4-гідроксиквіназолін
АФА	– активні форми азоту
АФК	– активні форми кисню
АГ	– аміногуанідин
БСА	– бичачий сироватковий альбумін
ГС	– етилметилгідроксипіридин сукцинат
ЕІУ	– експериментальне імунокомплексне ушкодження
НЧНЗ	– наночастинки нульвалентного заліза
ЛВ	– лімфатичні вузли
МЛГ	– метало-лігандний гомеостаз
ОНР	– одониткові розриви
ПАР	– полі-АДФ-рибоза
ПАРП	– полі(АДФ-рибозо) полімераза
ПНЯ	– передчасна недостатність яєчників
ФОО	– фолікулярне оточення ооцитів

iNOS – індуцибельна синтаза оксиду азоту

NOS –синтаза оксиду азоту

NO – оксид азоту

ВСТУП

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Передчасна недостатність яєчників (ПНЯ) – розлад оваріальної функції, що настає у жінок до 40 років - активно вивчається. Це захворювання є досить поширеним, особливо в розвинених країнах через відтермінування там материнського віку, і становить сьогодні медико-соціальну проблему.

Відповідно до сучасних уявлень в розвитку ПНЯ провідну роль відводять аутоімунній патології [83, 113, 134, 216]. 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 [83, 85].

ПНЯ вивчають на моделях з використанням гризунів [81, 149, 209]. Основні дослідження спрямовані на корекцію пошкодження яєчників [83, 85, 95, 138].

В останні десять років системне запалення розглядають як чинник аутоімунізації і репродуктивних розладів у жінок [64, 103, 104, 147, 236]. Встановлено, що імунозапальна відповідь, що розвивається внаслідок довготривалої імунізації самиць мишей введенням бичачого сироваткового альбуміну (БСА) характеризується активацією клітинної ланки адаптивного імунітету, а саме антиген-специфічних лімфоцитів, також відбувається зсув лейкоцитарної формули вліво, збільшується індекс активації нейтрофілів, посилюється функціонально-метаболічна активність клітин неспецифічної резистентності та збільшується продукція біологічно активних речовин [14].

Зростає кількість публікацій про те, що оксидативно-нітрозативний стрес задіяний в етіології численних захворювань людини [101, 110, 175, 190, 239]. 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 (АФК) може привести до пошкодження ДНК, ліпідів і білків клітин. Антиоксиданти

захищають клітини від перекисних реакцій, обмежуючи пошкодження і допомагають зберегти цілісність клітинної мембрани [69, 122, 133, 182, 193].

Розриви ДНК, спричинені, зокрема, й активними формами азоту (АФА), активують полі(АДФ-рибозо)полімераза (ПАРП), що є необхідним для процесів репарації. Однак, при сильному ушкодженні ДНК надмірна активація ПАРП може призводити до значного збільшення синтезу прозапальних чинників та посилення загибелі клітин по некротичному типу із розривом плазматичної мембрани. Вихід клітинного вмісту назовні, в свою чергу, активує клітини-ефектори запалення, наслідком чого є синтез прозапальних цитокінів, генерація АФК та АФА, посилення генотоксичного стресу та активація ПАРП [22, 61, 247].

Є дані про пошкодження цілісності ДНК в умовах запалення [96, 135, 197]. А також дані, що описують зв'язок між АФК, запаленням і запрограмованою загибеллю клітин, що викликає інтерес до пошуку нових шляхів, які будуть вивчені і спрямовані в терапевтичних цілях [214].

Через властивості антиоксидантів пом'якшувати будь-яку форму оксидативно-нітрозативного стресу та його наслідків, їх активно використовують на даний час не тільки в якості лікарських засобів, а й як харчові добавки для підтримання оптимальної функції організму. Проте, є загроза, що антиоксиданти можуть проявляти іпрооксидантну активність [101, 110, 239].

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 [163, 213]. Окрім цього редокс-активні метали здатні зв'язуватися з фосфоліпідами, порушуючи цілісність ліпідного бішару і таким чином підвищуючи його сприйнятливості до перекисного окиснення [213], а також входять до складу активних центрів антиоксидантних ферментів, таких як, каталаза і супероксиддисмутаза. Встановлено, що одним із наслідків дефіцита заліза в організмі може бути зниження використання оксиду азота [26, 121, 240, 246].

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) [52]. Відмічено, що НЧНЗ здатні відновлювати нітрат, а також встановлено, що впродовж його відновлення виділяються сполуки азоту [148]. Тим не менше, питання про те, який кінцевий продукт утворюється при відновленні нітратів НЧНЗ все ще викликає суперечки.

Однак, можлива протективна або токсична дія НЧНЗ досліджена недостатньо і дані про оваріальну функцію, життєздатність клітин та пошкодження геному органів імунної системимишей (тимуса і лімфатичних вузлів) в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження (EIY) та введення НЧНЗ – відсутні.

Таким чином, зважаючи на те, що кількість жінок в усьому світі з ПНЯ зростає, встановлення особливостей та розкриття можливих патогенетичних ланок розвитку ПНЯ є важливим завданням для фізіології і медицини. Актуальними на сьогодні є дослідження параметрів мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин ФОО, а також життєздатності та особливостей розподілу одониткових розривів ДНК ядер клітин тимуса і ЛВ в умовах EIY, введення антиоксиданту, блокатору NO-синтази, субстрату NOS та експериментальної субстанції НЧНЗ, що раніше не було вивчено.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Роботу виконано в рамках НДР 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 EIY, 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 – метод ДНК-комет (лужний) - оцінка ступеня пошкодження ДНК (особливостей розподілу ОНР ДНК) ооцитів, клітин ФОО, клітин тимуса та ЛВ; метод культивування ооцитів *in vitro*- для дослідження ооцитів, які відновили мейотичне дозрівання, розчинили зародковий пухирець (метафаза I) і сформували перше полярне тільце (метафаза II); метод прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками - оцінка шляхів клітинної загибелі клітин ФОО, тимуса і ЛВ; статистичні методи обробки отриманих 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: сьогодення і майбутнє» (м.Харків, 19 травня 2017р.); научно-практической конференции с международным участием «XVI чтения В.В. Подвысоцкого» (м.Одеса, 18-19 травня 2017р.); 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.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Передчасна недостатність яєчників як розлад оваріальної функції

ПНЯ - розлад оваріальної функції, що настає у жінок до 40 років і розглядається багатьма дослідниками як багатофакторний синдром, в розвитку якого залучені аутоімунні, генетичні, інфекційно-токсичні, ятрогенні, психологічні чинники, дефекти в структурах гонадотропінів і ферментопатії [66, 120].

В основі ПНЯ будь-якого генезу лежить не властивий репродуктивному віку дефіцит примордіальних фолікулів, аж до повного виснаження оваріального резерву.

У літературі дискутується правомірність використання різних термінів для характеристики ПНЯ: «передчасний клімакс», «синдром виснаження яєчників», «передчасна менопауза», «передчасне виснаження яєчників», проте жоден з них повною мірою не підходить для опису даного стану. Так, доведено, що у пацієток з ПНЯ в 50% випадків спостерігається транзиторне відновлення оваріальної активності, а в 5-10% - може наступити вагітність [165]. Тоді як, більш доцільним замість «синдрому недостатності яєчників» вважають використання терміна «синдром виснаження яєчників», тим самим підкреслюючи, що при недостатності функції будь-якого органу завжди передбачається можливість її компенсації за допомогою патогенетичної терапії [2].

В результаті була висловлена думка про необхідність повернення до запропонованого Albright et. al. (1942) терміну «передчасна недостатність яєчників» [2, 68].

ПНЯ є досить поширеною патологією особливо у розвинених країнах світу, через відтермінування там материнського віку. Так, її частота в популяції становить 1,5%, а в структурі вторинної аменореї - до 10%. В США частота ПНЯ серед 20-літніх пацієток становить близько одного випадку на 10000, серед

30-літніх – на 1000 і серед 40-літніх – на 100 жінок [242]. Більшість випадків ПНЯ спорадичні. Однак приблизно 10-15% пацієнток з ПНЯ мають обтяжений сімейний анамнез [160].

До теперішнього часу патогенез ПНЯ недостатньо вивчений. Описано ряд теорій, що пояснюють причини цієї патології.

Теорія 1. Токсичні ураження, важкі інфекції та інші фактори, що мали місце в антинатальному періоді і в ранньому дитячому віці (високий інфекційний індекс - вірусні інфекції, краснуха); гіпо- і авітамінози; вплив радіації і хімічних агентів. Результати досліджень доводять, що у виникненні ПНЯ грають роль численні фактори як навколишнього середовища, так і спадкові. У переважної більшості (90%) пацієнток виявлено дію несприятливих факторів ще в період внутрішньоутробного розвитку: гестози, екстрагенітальна патологія у матері, голодування і перенесені інфекції в ранньому дитячому пре- і пубертатному періодах [33, 249].

Теорія 2. Дефекти структури гонадотропінів і їх дія: біологічно неактивні гонадотропіни внаслідок дефектів α - і β -субодиниць; порушення пострецепторної дії гонадотропінів [33].

Теорія 3. Стресові ситуації. Хронічний стрес є основним фактором, який ушкоджуючи впливає на ендокринні залози. Стрессова ситуація призводить до розвитку дисбалансу функціонування гіпоталамо-гіпофіз-яєчникової системи. Це проявляється виснаженням яєчників і виражається в періодичному і непередбачуваному порушенні дозрівання фолікулів і епізодами аменореї, які у таких молодих пацієнток можуть тривати протягом багатьох років [47, 248].

Теорія 4. Генетичні аномалії, що призводять до загибелі ооцитів і фолікулів [33, 54, 113].

Теорія 5. Рядом авторів висловлюється думка про роль аутоімунних процесів в патогенезі ПНЯ [95, 226]. Виробляються антитіла, які здатні давати перехресну реакцію з ферментами кори надниркових залоз, яєчників, матки, плаценти, - вказують на роль циркулюючих антиоваріальних антитіл, які,

ймовірно, є маркерами первинних або вторинних імунних процесів в яєчниках [33].

До 55% жінок з діагнозом ПНЯ мають супутні аутоімунні захворювання [86]. Відомо три найбільш поширених поєднань ПНЯ і аутоімунної патології: 1) аутоімунне пошкодження наднирників; 2) аутоімунний процес поза системою наднирників (аутоімунний тиреоїдит, міастенія, ревматоїдний артрит, гломерулонефрит, цукровий діабет 1 типу, перніцитозна анемія, витиліго, хвороба Крона, неспецифічний виразковий коліт, целиакія, первинний міліарний цироз печінки, розсіяний склероз, аутоімунна гемолітична анемія, ідіопатична тромбоцитопенічна пурпура, злоякісна анемія та ін.) 3) ізольована, ідіопатична ПНЯ, яка може бути викликана аутоімунними механізмами, запущеними, можливо, зовнішніми факторами, психічними чинниками. У першому випадку, пов'язаному з аутоімунним пошкодженням надниркової системи, у 60-80% хворих в сироватці крові визначаються антитіла до кількох типів стероїд-продукуючих клітин: кори надниркових залоз, плаценти і яєчників. У випадках з ненаднирковою або з ідіопатичною ПНЯ поширеність таких антитіл значно нижче, приблизно 10% [71, 86, 100, 123, 162, 205].

У пацієнтів з гістологічно встановленою лімфоцитарною інфільтрацією тканини яєчників часто виявляють антитіла до стероїдних-продукуючих клітини [85, 206]. Показано позитивну кореляцію між наявністю аутоімунного оофориту і рівнем сироваткових антитіл кори надниркових залоз та дано рекомендації щодо виміру таких антитіл в сироватці крові хворих на ПНЯ для відбору пацієнтів з можливим аутоімунним оофоритом [82].

ПНЯ є однією зі складових аутоімунного полігландулярного синдрому II типу, для якого, крім змін клітинної ланки імунітету, характерна асоціація з гаплотипами HLA B8, DR3, DR4, DR5 [83, 84, 226]. Точний механізм запуску аутоімунної відповіді в патофізіології даного захворювання залишається неясним, ймовірно, генетичні та екологічні фактори ініціюють активацію імунної системи [86, 167].

Вважають, що пряме вимірювання пулу примордіальних фолікулів на сьогодні поки що неможливе. У той же час, повідомляють, що кількість примордіальних фолікулів непрямо відображає кількість ростучих [139, 145]. Тому фактор, що секретується переважно ростучими фолікулами, як вважають, буде відображати розміри пулу примордіальних фолікулів [11, 74]. Рівень антимюлерового гормону (Anti-Müllerian hormone), який секретується ростучими фолікулами аж до селекції, визначається на 2-3-й день менструального циклу, може бути перспективним маркером для визначення резерву яєчників [170, 192]. Варто відмітити, що антимюлеровий гормон, як маркер старіння яєчників, досліджувався головним чином, як один з основних чинників в регуляції чоловічого статевого диференціювання – продукується клітинами Сертолі ембріональних яєчок – індукує регресію Мюлерових проток, зачатків жіночого репродуктивного тракту [170].

Оваріальний резерв відображає кількість фолікулів, які знаходяться в яєчниках (примордіальний пул і ростучі фолікули) і залежить від фізіологічних і патофізіологічних чинників [11]. Однак, поняття «оваріальний резерв», незважаючи на його широке вживання, сформульовано недостатньо чітко і ясно.

До фізіологічних факторів, що визначають оваріальний резерв, в першу чергу відноситься кількість примордіальних фолікулів (примордіальний пул), що знаходяться в яєчниках дівчинки до моменту становлення менструальної функції. Вважають, що в нормі він становить 270 000-470 000 фолікулів. Показано, що частота елімінації фолікулів подвоюється, коли примордіальний пул скорочується до 25 000 фолікулів, що в нормі відповідає віку 37,5 років. Цей вік визначається як критичний, після якого оваріальний резерв різко знижується [74, 130].

Лікувати безпліддя у жінок, які страждають ПНЯ, вкрай складно [132, 183, 201, 215]. У тих випадках, коли неможливо шляхом замісної гормональної терапії домогтися відновлення репродуктивної функції, єдиний шанс настання вагітності на сьогодні - тільки застосування методу екстракорпорального запліднення, причому обов'язково з використанням донорської яйцеклітини. При цьому спочатку штучно створюють умови для росту ендометрію, вводячи строго

індивідуальні дози естрогенів. Потім імітують умови овуляції, після чого проводять підсадку ембріонів, отриманих шляхом запліднення донорських яйцеклітин спермою чоловіка пацієнтки (донора). Така процедура може бути нездійсненна, якщо в ендометрії вже відбулися незворотні зміни. У таких випадках не відбувається трансформація ендометрія, не здійснюється його підготовка до імплантації ембріонів. Якщо у відповідь на введення естрогенів виявлені зміни в ендометрії, єдиним варіантом стати батьками залишається програма екстракорпорального запліднення з донорською яйцеклітиною і сурогатною матір'ю.

На жаль, на сьогоднішній день не розроблена терапія, що поліпшує функцію яєчників і відновлює фертильність, ефективність якої була б підтверджена контрольованими дослідженнями, і вона була б безпечною і ефективною.

Таким чином, на основі проведеного аналізу даних літератури можна зробити узагальнення про те, що ПНЯ - це розлад оваріальної функції, а, зважаючи на те, що кількість жінок в усьому світі з цією патологією зростає, встановлення особливостей та розкриття можливих її патогенетичних ланок розвитку є важливим завданням для фізіології і медицини.

Необхідно провести дослідження, з використанням експериментальних моделей на тваринах, в яких були б вивчені окремі аспекти даного розладу. Актуальними на сьогодні є дослідження параметрів мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин ФОО, а також життєздатності та особливостей розподілу одониткових розривів ДНК ядер клітин тимуса і ЛВ в умовах імунного ушкодження організму, що раніше не було вивчено.

Вирішення цього завдання дозволить з'ясувати наступні кроки розробки патогенетично обґрунтованих варіантів профілактики і лікування ПНЯ. Можливо, це стане реальним кроком на шляху до відновлення як репродуктивного здоров'я, так і якості життя у даної категорії пацієнтів.

1.2. Активні форми кисню і пошкодження ДНК

Активні форми кисню (АФК). Близько 95% кисню, що надходить в організм в процесі окисного фосфорилування відновлюється в мітохондріях до води. Решта 5% в результаті різних (як правило, ферментативних) реакцій перетворюються в його активні форми [73, 164].

АФК - вільні радикали, прооксиданти - представляють собою молекулярні частинки, що мають непарний електрон на зовнішній орбіті і володіють високою реакційною здатністю, яка полягає в пошкодженні білків, нуклеїнових кислот і ліпідів біологічних мембран клітин [46].

У нормі в здоровому організмі утворення АФК відбувається безперервно. Доведено, що АФК і інші прооксиданти беруть участь у механізмах бактерицидності, в синтезі біологічно активних речовин, в обміні колагену, регуляції проникності мембран та ін. [106].

Генерація вільних радикалів - важливий захисний механізм, що лежить в основі неспецифічного імунітету: фагоцитоз приводить до багатократного збільшення вмісту вільних радикалів в фагоцитуючих клітинах з одночасним підвищенням споживання кисню в 20 і більше разів (так званий «дихальний вибух») [18].

Разом з тим АФК є основою патогенезу багатьох патологічних процесів, мають антигенні властивості, запускають аутоімунні процеси пошкодження тканин, викликають бронхоконстрикцію і т.д. [18, 228].

Слід зазначити, що негативний вплив факторів навколишнього середовища (тютюновий дим, забруднення повітря викидами транспорту і промислових підприємств, радіаційне і ультрафіолетове випромінювання, ксенобіотики, в тому числі ліки, анестетики, пестициди, промислові розчинники та ін.), надмірне фізичне навантаження, стрес, перевтома супроводжуються збільшенням утворенням вільних радикалів [117].

АФК включають нестійкі супероксидні радикали, гідроксильні радикали і вільно дифундований і відносно довгоживучий перекис водню, які можуть

продукуватися з різних джерел- внутрішньоклітинно або екзогенно. Так, АФК зазвичай виробляються мітохондріями, хлоропластами або пероксисомами під час як прокаріотичного, так і еукаріотичного метаболізму, або в цитозолі, в основному, в якості побічного продукту аеробного дихання. Однак дана парадигма була піддана сумніву [191], Nohl Н. і співавтори стверджують, що продукція АФК під час клітинного дихання виміряна в мітохондріях тільки *in vitro* з використанням інвазивних методів не може бути інтерпретована на весь організм. Дослідники виявляли АФК тільки тоді, коли відбувалися нефізіологічні зміни в мембранах [191].

Продукція АФК ініціюється також позаклітинними джерелами, такими як ультрафіолетове випромінювання або надходження металів, у тому числі і заліза [195]. Так, коли наночастинки Fe_2O_3 були додані до культури клітин, рівні АФК збільшувалися в 50 разів [129].

Крім того, посилена продукція АФК в мітохондріях може ініціювати, описане як АФК–індуковане АФК-вивільнення. Це спричиняє відкриття мітохондріальних каналів і здатне призвести до колапсу мітохондріального мембранного потенціалу. Наслідком може бути тимчасово збільшене вироблення АФК з ланцюга перенесення електронів, викликаючи серйозні пошкодження або клітинну загибель [212, 256].

Слід зазначити, що АФК можуть бути і корисними, наприклад, в якості вторинних месенджерів внутрішньоклітинної сигналізації, як регулятори під час клітинної диференціації і підтриманні гомеостазу [185, 255].

АФК здатні ініціювати перекисне окиснення ліпідів, яке починається після видалення водню з ланцюга ненасиченої жирної кислоти. Отриманий радикал жирної кислоти може реагувати з киснем і генерувати ліпідні перекисні радикали, які далі поширюють ланцюгову реакцію перекисного окиснення ліпідів [140]. «Окиснені» мембрани втрачають селективну проникність і, в екстремальних умовах, можуть втратити свою цілісність. Продукт перекисного окиснення ліпідів, гідропероксид ліпиду, може розкладатися на кілька радикалів, які здатні реагувати з ДНК викликаючи модифікацію основи, що може бути однією з

причин мутацій [188, 253]. Водорозчинні продукти перекисного окиснення ліпідів (наприклад, альдегіди) здатні дифундувати з мембран в цитозоль та інші клітинні структури та діяти в якості зшиваючих агентів і викликати агрегацію білка. Встановлено, що коли редокс-активне залізо додають до гомогенату мембран *in vitro*, перекисне окиснення відбувається набагато швидше [169, 174].

За високих рівнів оксидативного стресу, захисна відповідь переходить у прозапальну реакцію, яка індукує окислювально-відновні сигнальні шляхи. На найвищому рівні пошкодження ланцюга перенесення електронів у мембрані мітохондрій може призвести до апоптозу клітин та гострої токсичності [60, 111, 169]. Таким чином, процес перекисного окиснення ліпідів, та відповідно гіперпродукція АФК, може бути серйозною загрозою для життєздатності клітин.

Антиоксидантні системи захисту До основних складових системи антиоксидантного захисту відносять супероксиддисмутази, зокрема, її мітохондріальну і цитоплазматичну ізоформи, каталазу, глутатіон і сечову кислоту. У нормі в клітинах і тканинах організму концентрація супероксиддисмутази на два порядки перевищує концентрацію NO. Це створює перешкоду для створення ONOO незважаючи на те, що можливість контакту O- з ферментом менша, ніж з NO через обмеженість його дифузії всередині клітини, а швидкість синтезу ONOO- значно вища, ніж швидкість усунення O- в супероксиддисмутазній реакції [23].

Класичні каталази містять групи гема і перетворюють (конвертують) H_2O_2 в H_2O і O_2 в два етапи [235]. На першому, одна молекула H_2O_2 зводиться до води і Fe^{3+} -каталази перетворюється в $cat(Fe[V]O)$: на другому - $cat(Fe[V]O)$ молекула перетворюється назад в Fe^{3+} , тоді як інша молекула H_2O_2 переходить у H_2O і O_2 .

Важливо відзначити, що в літературі активно обговорюють структуру і механізми дії білків, які на сьогодні були об'єднані в сімейство тіолових специфічних антиоксидантів або пероксиредоксинів, що захищають клітини різних організмів від дії перекису водню [244].

Пошкодження ДНК. Вважають, що мітохондріальні ДНК через свою близькість до основного джерела генерації окислювача, більш чутливі до окислювальних пошкоджень, ніж ядерні. Найбільш небезпечними є гідроксильні радикали, які здатні атакувати основи та сахаридні фрагменти ДНК, спричиняючи фрагментацію і сахаридні розриви ланцюгів ДНК [179]. Атака АФК призводить близько до 50 різних замін основ ДНК.

За останні роки все більше отримано результатів, які демонструють, що репарація ДНК відіграє важливу роль у збереженні життєздатності клітин, тоді як стійке пошкодження ДНК може провокувати мутагенез, а також грубі хромосомні перебудови. Така нестабільність геному є суттєвим кроком до розвитку раку і ймовірно сприяє старінню та розвитку вікових захворювань [144, 161, 171, 181, 210, 252].

Таким чином, постійне збереження генома має важливе значення для життєздатності і довголіття здорового організму.

Двониткові розриви ДНК. Серед пошкоджень ДНК двониткові розриви є одними з найбільш летальних форм, оскільки вони активують клітинну відповідь на загибель та провокують нестабільність геному, таку як транслокації [90, 158].

Двониткові розриви ДНК можуть виникати ендогенно через дію АФК, які виробляються в результаті нормального клітинного метаболізму, впродовж реплікації пошкодженої ДНК або впродовж поєднаних репарацій. Окрім того, вони індукуються екзогенними факторами, такими як радіоактивне випромінювання або хіміотерапевтичні засоби (зокрема протиракові препарати).

Репарацію двониткових розривів ділять на два основні шляхи: гомологічна рекомбінація і негомологічне з'єднання кінців (NHEJ). Гомологічна рекомбінація відбувається у проліферуючих клітинах в S-фазі, оскільки для її здійснення необхідний гомологічний сестринський хроматин, в той час як негомологічне з'єднання кінців (NHEJ) може проходити, як у проліферуючих, так і у непроліферуючих клітинах незалежно від клітинного циклу. Повідомляється, що деякі захворювання людини виникають через недоліки у гомологічній рекомбінації або NHEJ і проявляються, як неврологічні, імунологічні порушення

розвитку, а також як підвищена радіаційна чутливість, передчасне старіння фенотипів і схильність до раку [72, 116, 128, 144].

Однониткові розриви (ОНР) ДНК. Одними з найбільш поширених пошкоджень ДНК є ОНР, які виникають орієнтовно десятками тисяч на клітину в день [176, 184].

У формуванні ОНР залучені різні механізми, один з яких – пряма реакцій між дезоксирибозою ДНК і ендogenous АФК, а саме гідроксильним радикалом. Постійні ОНР можуть призвести до поломки реплікаційних вилок під час дублювання хромосом та до формування однокінцевого двохниткового розриву ДНК, а також до блокування транскрипції.

Щоб запобігти пошкоджувальним наслідкам від ОНР, у тому числі геномної нестабільності і активації реакцій клітинної загибелі, клітини містять спеціалізовані ферменти, такі як APE1, PNKP, тирозил-ДНК фосфодіестеразу 1 (TDP1), апратаксин (APTX) і ДНК-лігази, які працюють для створення відповідних 3' і 5' кінців для зшивки таких розривів. Враховуючи частоту, з якою відповідні субстрати утворюються ендogenous, передбачається, що вищевказані білки присутні в усьому клітинному циклі і є важливими як для проліферуючих, так і для непроліферуючих клітин [77, 223, 224, 237].

У більшості еукаріотичних клітин, мітохондрії є основним джерелом енергії, генеруючи АТФ за допомогою процесу окисного фосфорилування. Оскільки мітохондрії підтримують свій власний геном, більшість мітохондріальних білків кодується ядерним геномом. Тим не менш, підтримання цілісності мітохондріальної ДНК є важливою умовою для збереження функції мітохондрій. Власне, все більше і більше даних про те, що деякі репараційні білки, які працюють всередині ядра, а також у мітохондріях, часто транслокуються до цієї органели в якості окремої ізоформи білка [107, 108, 208].

Репарація ОНР ДНК. ДНК організму, залежно від оточуючого середовища і внутрішніх факторів (метаболічних процесів), може пошкоджуватися, за різними оцінками, в межах від 1000 до 1 000 000 разів на клітину за день. У тому числі,

припускають, що на частку вільних радикалів припадає близько 10 000 пошкоджень. У відповідь на відповідні зміни у структурі ДНК клітина повинна коректно реагувати: зупинити клітинний цикл, призупинити транскрипцію, встановити рівень уражень і здійснити адекватну відповідь шляхом активації репараційних механізмів або, у разі виявлення значної кількості пошкоджень, ініціювати процеси апоптозу. Вважають, що одну із провідних функцій у даних процесах відіграє саме ПАРП-1 [70, 198].

ПАРП-1 – це фермент із родини білків ПАРП, який здатен взаємодіяти з різноманітними пошкодженими структурами ДНК. За наявності ОНР ДНК ПАРП-1 активується. Так, у відповідь на утворений комплекс цього ензиму з ДНК відбуваються конформаційні зміни за участю “цинкових пальців” ферменту, що і призводить до її активації [166, 198, 203]. У результаті внесення значного від’ємного заряду, ПАРильовані білки від’єднуються від ДНК, звільняючи місце для дії наступних репараційних білків [131, 143]. Однак, при постійному пошкодженні ДНК ПАРильовання може відбуватися постійно, змінюючи лише місця локалізації у структурі ДНК, призводячи до значних енергетичних втрат клітиною. Відомо, що при таких патологічних процесах, як запалення, інфаркт міокарда та ішемічний інсульт, саме некроз є переважаючим типом клітинної загибелі. Тому для лікування таких захворювань було запропоновано використання селективних інгібіторів ПАРП-1 [93].

Подальші дослідження продемонстрували участь ПАРП-1 у регулюванні транскрипції низки генів, яка відбувається у відповідь на біологічні, хімічні або фізичні стимули [70, 141]. Є дані, які вказують на те, що ПАРП-1 може взаємодіяти з ДНК-метилтрансферазою-1 (Dnmt1), регулюючи активність останньої, що, у свою чергу, впливає на активацію/інактивацію генів на рівні структури ДНК [97].

Одним із найважливіших значень ПАРП-1 вважають її здатність взаємодіяти й активувати транскрипційний фактор κB (NF- κB), який регулює експресію генів, відповідальних за запальні процеси та імунні відповіді, причому така взаємодія відбувається без участі формування ПАР [63, 168].

Як відомо, активація експресії даного гена спостерігається при розвитку патологічних ускладнень за участі запальних процесів. Так, у ПАРП –/– нокаутних мишей не розвиваються ускладнення, пов'язані із запальними процесами, що є наслідком зниженої транскрипції деяких NF-κB-залежних прозапальних генів, таких як iNOS, макрофагальний запальний білок 2 [63, 168].

Останніми результати показано, що здатність інгібіторів ПАРП, які використовуються в клінічній практиці для руйнування пухлинних клітин, не корелює з їх здатністю запобігати продукції ПАР, а, швидше, зі спроможністю посилювати зв'язування ДНК, що, в свою чергу, повинно залучати аллостеричний зв'язок між сайтом зв'язування інгібітора і ДНК-зв'язуючими доменами ПАРП-1 [112, 155, 243].

Таким чином, на основі проведеного аналізу даних літератури зроблено такі узагальнення:

запальні процеси здатні збільшувати перекисне окиснення ліпідів, ушкодження білків та ДНК. Наявність надлишкових АФК може призвести до пошкодження ДНК, ліпідів і білків клітин. Антиоксиданти захищають клітини від перекисних реакцій, обмежуючи пошкодження і допомагають зберегти цілісність клітинної мембрани.

За останні роки все більше отримано результатів, які демонструють, що репарація ДНК відіграє важливу роль у збереженні життєздатності клітин. Стійке пошкодження ДНК може провокувати мутагенез, а також грубі хромосомні перебудови. Така нестабільність геному є суттєвим кроком до розвитку раку і, ймовірно, сприяє старінню та розвитку вікових захворювань. Окрім цього, пошкодження ДНК може сприяти розвитку імунозапальної відповіді на клітинну загибель.

При оцінці функціонального стану органів жіночої репродуктивної та імунної систем актуальності набуває оцінка цілісності ДНК ооцитів, клітин ФОО, тимуса і ЛВ з використанням тварин, у яких буде експериментально змодельовано імунокомплексне ушкодження.

Актуальним є дослідження за умов імунного ушкодження організму впливу введення антиоксиданта, субстрату NOS, блокатора iNOS на параметри мейотичного дозрівання ооцитів, життєздатності клітин ФОО, а також на пошкодження ДНК ядер клітин ФОО, клітин тимуса і ЛВ.

Перспективним є вивчення механізмів регуляції репарації ДНК клітин (ооцитів) в умовах *in vitro*, що може забезпечити поступ як у розумінні як розвивається безпліддя, так і розробці нових препаратів для його корекції.

1.3. Нітрозативний стрес і зсув в метало-лігандному гомеостазі

Активні форми азоту (АФА). Оксид азоту (NO) є газоподібною сполукою. Малі розміри і відсутність заряду забезпечують NO високу проникність через мембрани клітин і субклітинних структур [17].

Середній час життя молекули NO в біологічних тканинах - 5-6 с ($T_{1/2}$ в ниркової тканини щурів - 6,41 с, в міокарді - 0,1 с, в крові - 0,05-0,18 с, в фізіологічному розчині - від 6 до 30 с, а в воді, з якої видалений кисень, NO зберігається протягом декількох діб [16]. NO швидко окислюється до двоокису азоту (NO_2), яка у водних розчинах перетворюється в нітрит (NO_2^-) або нітрат (NO_3^-) [21].

Наявність одного неспареного електрона на зовнішній π -орбіталі надає NO високу реакційну здатність. Взаємодіючи з вільними радикалами, монооксид азоту утворює ковалентні зв'язки. Оксид азоту формує стабільні комплекси з гемоглобіном, сироватковим альбуміном, негемовими залізо-сірчаними білками [32]. Головна мішень NO - розчинна гуанілатциклаза, що містить 4 гема, які є рецепторами для NO [17, 32].

В біохімічній взаємодії NO лежать три основні реакції: взаємодія з гемовим і негемовим залізом; реакції з SH- і NH_2 -групами; участь в процесах вільно-радикального окиснення [23]. Вільнорадикальна природа NO дозволяє йому як активувати ланцюгові вільно-радикальні реакції, так і пригнічувати їх [57].

Антиоксидантні та прооксидантні властивості NO. NO збільшує активність антиоксидантних ферментів і експресію генів, що їх кодують [53]. NO може уповільнювати перекисне окиснення ліпідів, діючи як скавенджер кисневих радикалів. NO ефективно перехоплює такі небезпечні радикали, як $O\bullet$ -, $OH\bullet$, $ROO\bullet$, тиольний GS \bullet . Цей своєрідний антиоксидантний ефект NO дозволив припустити, що взаємодія між супероксид-аніоном і NO може бути біологічно важливим шляхом детоксикації потенційно небезпечних АФК.

Більшість АФК, як і NO, мають на своїй зовнішній орбіті неспарений електрон і є вільними радикалами кисню. До них відносяться супероксидний аніон ($O_2\bullet$ -), гідроксильний радикал ($OH\bullet$), оксид азоту ($NO\bullet$) і ліпідні радикали ($R\bullet$, $RO\bullet$, $ROO\bullet$). Інші АФК – перекис водню (H_2O_2), пероксинітрит ($ONOO$ -) і гіпохлорна кислота ($HOCl$) виявляють сильні оксидантні властивості [21, 53]. Показано, що супероксид-аніон має здатність гальмувати експресію і активність eNOS, а також зв'язувати і інактивувати NO [23].

У розвитку пошкодження клітин беруть участь такі високоактивні молекули, як іони гіпохлориду, синглетний кисень. Поряд з АФК, істотну роль в патологічних процесах відіграють АФА і їх метаболіти [251]. Первинні активні форми кисню, азоту та метали сприяють протіканню переважно фізіологічних процесів (наприклад, синтез білка), вторинні продукти АФК чинять пригнічуючий вплив на різні клітинні функції.

До АФА відносяться оксид азоту ($NO\bullet$), нітроксільний аніон (NO -), катіон нітрозонія (NO +), пероксинітрит ($ONOO$ -), діоксид азоту ($NO_2\bullet$), нітрит аніон (NO_2 -), також інші фізіологічно значущі похідні NO.

NO і його похідні можуть викликати перекисне окиснення фосфоліпідів і окиснення тиольних груп білків мітохондріальної мембрани, приводячи до вивільнення в цитозоль апоптогенних факторів. Більшість цитотоксичних ефектів $NO\bullet$ належить пероксинітриту ($ONOO$ -), який утворюється в реакції з O_2 , що обумовлено дуже високою швидкістю їх взаємодії ($2 \times 10^{10} \text{ м-1с-1}$) [137].

Висока біологічна активність різних АФК та азоту, їх взаємодія зумовили необхідність постійного функціонування в організмі спеціальних механізмів

антиоксидантного біологічного захисту. NO-ергічна система, як і антиоксидантна система, відіграє важливу роль в стресових і адаптивних відповідях організму, є універсальним регулятором фізіологічних функцій та клітинного метаболізму [23].

Метало-лігандний гомеостаз (МЛГ). Представлення про метало-лігандний гомеостаз виникло з появою перших повідомлень про існуючу «заборону» для металів перебувати в організмі у незв'язаному з лігандами стані. Функцію останніх виконують транспортні та депонуючі білки, металоензими, пептиди, амінокислоти або більш складні молекули (наприклад, гемоглобін). Без ризику незворотніх ушкоджень допустимі лише «слідові» концентрації (пікограми) «вільних», незв'язаних з лігандами, металів. Це стосується, як есенціальних - залізо, мідь, цинк і ін., так і «токсичних» металів – ртуть, кадмій, свинець та ін. Проте визначення «токсичні», яке відносять лише до невеликої групи металів, навряд чи виправдано, оскільки вільні іони есенціальних металів не менше токсичні для клітини. Обов'язкова умова для біологічного циклу металів - вступати в постійні або тимчасові зв'язки з іншими (в першу чергу, білковими) молекулами. Від їх присутності залежить нормальне функціонування та каталітична активність металоензимів [30].

Постійні внутрішньо- і міжклітинні переміщення металів, взаємообмін між тканинними /клітинними і позаклітинними (плазма, лімфа) пулами, безперервне надходження і вихід їх назовні через шлунково-кишковий тракт, а також втрати зі зроговілим епідермісом і придатками шкіри є найважливішими характеристиками МЛГ, що визначають його динамічність. Існують численні фактори, які можуть розглядатися в якості найбільш ймовірних причин, що викликають кількісні зрушення в МЛГ. Їх відмінна риса - здатність активувати або деактивувати, аж до повної блокади, іонні канали - водні пори трансмембранних білків, які відповідають за переміщення металів. В залежності від способу активації розрізняють механо-чутливі, потенціал-активовані і ліганд-активовані іонні канали. Активація останніх може відбуватися за рахунок редокс-модифікації

тіолових груп цистеїну в молекулі білків-транспортів АФК і АФА, продукція яких помітно зростає в умовах оксидативного/нітрозативного стресу: супероксид аніон-радикала (O_2^-), нітроксида (NO), пероксинітриа ($ONOO^-$) і ін. [30].

Повідомляється про результати кількісної оцінки вмісту NO і заліза в дериватах епідермісу (волосся). Виявлено, що інтенсивність NO-радикального сигналу на спектрограмі залежить від рівня заліза, причому, не тільки в досліджуваному субстраті, а й організмі в цілому. Існування такого зв'язку видається цілком ймовірним, якщо врахувати, що в клітині для продовження медіаторного ефекту NO постійно функціонує трьохкомпонентна біосистема, що складається з 1) NO, 2) негемового Fe^{2+} і 3) низькомолекулярних тіолів. Ця система здатна до авторегулювання свого складу за рахунок взаємотрансформації динітрозильних комплексів заліза з тіолвмісними лігандами, які утворюються в ній ($\{(RS^-)_2Fe+(NO^+)_2\}^+$) і S-нітрозотіолів (RS-NO). Її нормальна робота забезпечується постійним надходженням необхідних компонентів (замість витрачених) і, очевидно, не може не залежати від їх достатнього представництва в клітині. Тому припускають, що при нестачі заліза можливі збої в роботі цієї системи і, як наслідок, зниження біодоступності NO [26, 121, 240].

Відомо, що нестача заліза призводить до зменшення загального пулу постійних акцепторів нітроксида - гемопротейнів, тому надлишок NO що утворився при наявності в клітині достатньої кількості супероксида (O_2^-) може виявитися «потрібним» для зв'язування з O_2^- в молекулі пероксинітриа ($ONOO^-$). Поява ж при залізодефіциті деякого надлишку O_2^- цілком очікувана, оскільки в таких умовах виявляється помітно зниженим вміст феритину, що володіє супероксиддисмутазаною активністю. Пов'язане з цим ослаблення контролю над продукцією O_2^- в клітині може, мабуть, стати причиною збільшення пулу супероксидного радикала, синтезу $ONOO^-$ і подальшого обмеження біодоступності нітроксида. Про можливий зв'язок активності NO-радикала з рівнем заліза свідчать і виявлені зрушення в МЛГ епідермальних клітин у ліквідаторів Чорнобильської аварії, характерні для нітрозативного стресу: концентрація есенціальних елементів у них була достовірно нижче норми, а

рівень «токсичних» металів (в тому числі заліза) перевищував нормальні значення [26].

Роль заліза в організмі жінки. Залізо є незамінним мікроелементом, що відіграє важливу роль у функціонуванні клітин багатьох систем організму, основна з яких - участь у процесах тканинного дихання.

За оцінками Всесвітньої організації охорони здоров'я близько 30% невагітних і більше 42% вагітних жінок страждають анемією, яка в свою чергу, здатна призводити до розвитку плацентарної недостатності, гестозу, слабкості родових сил та передчасних пологів [59, 256]. Дефіцит заліза в кінці гестаційного процесу розвивається у всіх без винятку вагітних або в прихованій, або в явній формі. За таких умов жінки більш сприйнятливі до інфекційних та запальних захворювань, так як залізо бере участь в окисному фосфорилуванні, роботі імунної системи та ін. [12].

Гіпохромна анемія без крововтрат, асоційована з запаленням і/або злюякісним ростом, зобов'язана своєю появою не дефіциту заліза в організмі, а зсуву в МЛГ перерозподільного характеру: зменшення гемового або кістковомозгового пулу заліза за рахунок збільшеного резерву феритинового заліза в макрофагах [30].

Характеристика наночастинок нульвалентного заліза (НЧНЗ). Сьогодні нанотехнології займають провідне місце в науково-практичній діяльності людини і набувають все більшого застосування в діагностиці та лікуванні захворювань різної етіології, формуючи новий розділ фармакології – нанофармакологію, в якій наночастинок використовуються в якості субстанції для новітніх лікарських засобів. Перспективними в цьому аспекті є наночастинок металів, зокрема нанозалізо. Останнє представляє собою матеріал з розмірами менше 100 нм на основі заліза: наночастинок нульвалентного заліза, наночастинок оксиду заліза або суперпарамагнітні наночастинок оксиду заліза, композитні наноматеріали [52]. Завдяки своїм характеристикам нанометали стають центром інтенсивних досліджень, оскільки все ще залишаються невідомими можливі екологічні ризики

та вплив на живі організми, що в даний час є вагомою перешкодою для комерціалізації [78].

Нестача досліджень, які оцінюють ефект НЧНЗ на здоров'я нації та її генофонд, а також відсутність відомостей про механізми взаємодії цих частинок з клітинами і субклітинними структурами та про їх вплив на генетичний матеріал клітин ставить завдання оцінки біобезпечності та впливу нанозаліза на організм, яке є особливо актуальним і вимагає ретельних досліджень.

У навколишньому середовищі залізо існує переважно в окисненому стані, тоді як відновлені НЧНЗ є штучно створеним матеріалом [118].

Наночастинки заліза зазвичай представлені структурою за схемою «ядро-оболонка». Ядро складається з нульвалентного (металічного) заліза, а оболонка представлена оксидами або гідроксидами заліза Fe(II) та Fe(III), що утворюються внаслідок окиснення металічного заліза. «Ядерне» залізо у хімічних реакціях виступає донором електронів, тоді як оболонка бере участь в хемосорбції (утворенні хімічних комплексів) [118]. Крім різних органічних молекул [234], оболонка може бути утворена оксидами Fe^{2+} і Fe^{3+} , як результат окиснення.

Серед наноматеріалів, НЧНЗ - нове покоління продуктів, які вже використовуються для стратегій з відновлення навколишнього середовища і вважаються допустимим варіантом для очистки забруднених ґрунтів і ґрунтових водних систем [52, 80, 114, 152]. Вважають, що механізми, за допомогою яких НЧНЗ призводить до пошкодження життєздатності клітин можна розділити на дві групи. Перша – це механізми пов'язані з безпосереднім прямим впливом наночастинки на клітину [65]. Друга – це непрямий вплив [151]. Так, адсорбція НЧНЗ на зовнішній поверхні клітинних мембран може призвести до підвищення їх проникності або навіть до порушення мембранного бішару ліпідів [87]. Крім того, НЧНЗ можуть також призводити до швидкого утворення вільних радикалів. Редокс-активні НЧНЗ реагують з киснем або водою з вивільненням Fe^{2+} [254].

У клітинах за умов сильного окисного стресу, спричиненого впливом високих концентрацій нанозаліза, відбуваються різні дисфункції мембранних ліпідів, білків і ДНК [186]. Fe^{2+} , вивільнений від нанозаліза, здатний проникати в

клітину шляхом активного клітинного поглинання або шляхом витоку через сайти з обмеженою цілісності мембрани. Окисне пошкодження викликане насамперед високою реакційною здатністю гідроксильних радикалів в результаті реакції Fe^{2+} з перекисом водню. Саме Fe^{2+} може безпосередньо пошкоджувати ДНК клітини [142].

Вплив наночастинок нульвалентного заліза (НЧНЗ). Встановлено, що НЧНЗ є токсичним для чистих культур мікроорганізмів вже при низьких концентраціях, таких як декілька мг на літр [119].

У досліджах *in vitro* при вивченні ефекту часткового окиснення («старіння») та модифікації поверхні НЧНЗ на нейротоксичність в культурах клітин мікроглії (BV2) і нейронів (N27) гризунів було встановлено, що найвища активність оксидативного стресу, зумовленого НЧНЗ, виявлено в клітинах мікроглії порівняно із наночастинками магнетиту (Fe_3O_4), НЧНЗ з модифікованою поверхнею, а також «старими», частково окисненими НЧНЗ, синтезованими більш ніж 11 місяців тому. При цьому в клітинах мікроглії відмічалось набухання мітохондрій та прояви апоптозу. Таким чином, часткове або повне окиснення НЧНЗ зумовлює зниження їх окисно-відновної активності, що в свою чергу, ймовірно, зменшує прояви токсичності відносно клітинних культур ссавців [199].

Встановлено статеву залежність гострої токсичності НЧНЗ при внутрішньовенному введенні мишам: LD_{50} для самок, самців і обох статей становить $207,5 \pm 10,6$ мг/кг, $231,4 \pm 8,1$ мг/кг і $220,3 \pm 7,1$ мг/кг відповідно. Після внутрішньовенного введення мишам НЧНЗ у токсичних дозах протягом першої доби спостерігали дозозалежні порушення з боку серцево-судинної, дихальної і нервової систем. Однак введення найменших рівнів доз (130 мг/кг для самок і 180 мг/кг для самців) призводило до незначного й короткотривалого порушення загального стану тварин. Після внутрішньовенного введення летальних доз НЧНЗ спостерігали три періоди смертності піддослідних мишей: перший (найгостріший) – протягом перших 1–60 хв після введення, другий (гострий) – протягом 1 доби, третій (підгострий) – протягом 2–4 діб на фоні значного зменшення маси тіла [9].

Досліджені НЧНЗ (сферичні, розміром 40 нм, отримані за допомогою методу хімічної конденсації у водному середовищі) є біобезпечною субстанцією, яка має протективний ефект на скоротливість міометрія при використанні за умов експериментальної залізодефіцитної анемії, проте при розладах імунного генезу проявляють пригнічуючу дію [3].

Таким чином, на основі проведеного аналізу даних літератури **зроблено такі узагальнення:**

окрім АФК в останні роки дослідниками все більше уваги приділяється і АФА, зокрема, NO і його ролі в якості універсального трансмітера в розвитку різних патологічних станів. Фізіологічний ефект взаємодії АФК і NO залишається предметом активних дебатів. Незважаючи на досягнуті успіхи у вивченні ролі процесів перекисного окиснення, антиоксидантного статусу організму, функціонування NO-ергічної системи і їх взаємозв'язку в нормі і при патології, багато питань залишаються актуальними і вимагають проведення подальших досліджень.

Метаболіти оксиду азоту в залежності від системи окисного метаболізму можуть стимулювати окиснення, будучи могутніми прооксидантами, і в той же час як сам NO представляє собою частину ендогенної системи антиоксидантного захисту організму. NO здійснює важливу дію на численні фізіологічні процеси в організмі. При несприятливих умовах метаболізму NO може розвиватися нітрозитивний стрес. Основними реактивними формами азоту, які при їх надмірному синтезі *in vivo* спричиняють розвиток нітрозативного і оксидативного стресу є діазот тетраоксид і пероксинітрит. В умовах наростаючого оксидативного стресу за рахунок генерації АФК спостерігається зниження активності ендотеліальної NO-синтази.

Механізми і ефекти взаємодії про- і антиоксидантних систем і NO, що мають важливе значення для розуміння їх ролі в патогенезі хвороб, можуть стати основою для розробки і використання методів, спрямованих на регуляцію цих взаємодій в організмі, що може виявитися ефективним способом попередження і

лікування багатьох захворювань, пов'язаних зі зміною продукції NO і порушенням антиоксидантного статусу організму. Таким чином, наявні на сьогодні дані дозволяють вважати, що як в реакціях окисного стресу, так і в механізмах антиоксидантного захисту бере участь NO, утворення якого доведено практично для всіх типів клітин.

Численні захворювання 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 сприйнятливість до перекисного окиснення. Одним із наслідків дефіцита заліза в організмі може бути зниження біодоступності NO.

Завдяки унікальним біологічним властивостям, наночастинки заліза виступають багатофункціональними кофакторами білків у окисно-відновних реакціях, проте водночас є цитотоксичними, адже призводять до розвитку окисного стресу. На сьогодні біологічний вплив НЧНЗ за умов *in vitro* та *in vivo* є досліджений недостатньо і потребує подальшого вивчення.

Перспективним є вивчення більш тонких механізмів взаємодії наночастинок із клітиною, а саме встановлення можливої участі NO в ефекті НЧНЗ, що може забезпечити поступ у розробці нових препаратів на основі наночастинок заліза нульової валентності.

Вирішення цього завдання дозволить з'ясувати наступні кроки розробки патогенетично обґрунтованих варіантів профілактики і лікування ПНЯ. Можливо, це стане реальним кроком на шляху до відновлення як репродуктивного здоров'я, так і якості життя у даної категорії пацієнтів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

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

Експерименти проведені з використанням невагітних статевозрілих (віком 8-12 тижнів) самиць мишей лінії СВА масою 16–22 г.

2.1. Модель експериментального імунокомплексного ушкодження (ЕІУ)

В дослідженнях використовували спосіб моделювання системного імунокомплексного ушкодження у мишей, яке здійснювалося шляхом довготривалої імунізації самиць мишей зростаючою дозою ксеногенного білка – бичачого сироваткового альбуміну (БСА, «Sigma», США) за такою схемою: 1-й тиждень – введення внутрішньовенно (в/в) 150 мг БСА/кг; 2-й - (в/в) 175 мг/кг; 3-й - (в/в) 200 мг/кг; 4-й - (в/в) 200 мг/кг; 5-й - (в/в) 250 мг/кг; 6-й - (в/в) 300 мг/кг маси миші [28].

Модель характеризується утворенням і накопиченням імунних комплексів в тканинах, причому в більшій мірі в кліренсних органах із значною кількістю клітин природного і адаптивного імунітету (селезінка, печінка), зсувом лейкоцитарної формули крові вліво, активацією клітинної ланки адаптивного імунітету, зокрема антиген-специфічних лімфоцитів, а також посиленням функціонально-метаболічної активності клітин неспецифічної резистентності - нейтрофілів периферичної крові [14].

Посилена активність клітин-ефекторів запалення із збільшенням продукції біологічно активних речовин, в тому числі АФК, є одним з важливих патогенетичних механізмів ушкодження різних тканин за умов імунокомплексної

патології [36, 71, 138, 157]. Окрім цього, відбувається активація фагоцитозу. Це супроводжується збільшенням генерації АФК - відомих цитотоксичних чинників; останні, сприяючи збільшенню бактерицидної здатності фагоцитів, відіграють і негативну роль як модулятори, які можуть посилювати запальні процеси й призводити до розвитку хронічного запалення [14].

Функціональний стан яєчника в умовах ЕІУ

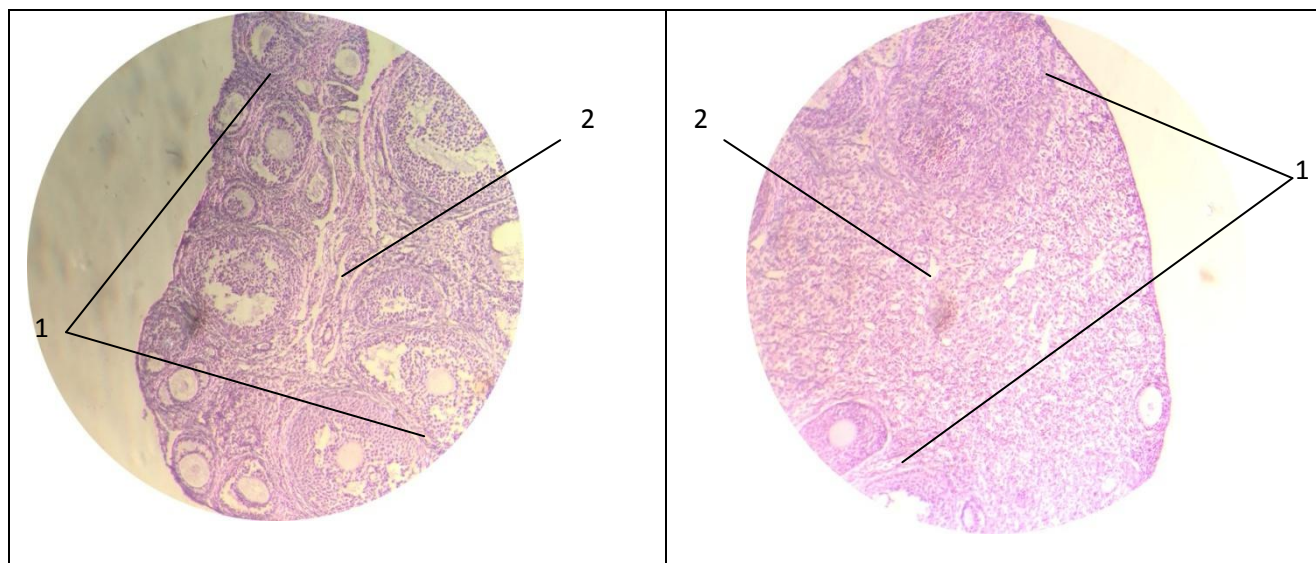
Маса яєчника. Оцінювали масу яєчника у самок мишей на 7-й день після останньої імунізації у порівнянні з такою величиною у контролі. В умовах ЕІУ маса яєчника зменшується на 67% у порівнянні з величиною у контрольних тварин (відповідно, $1,91 \pm 0,09$ мг і $2,87 \pm 0,18$ мг, $p \leq 0,05$, $N=9$) [42].

Кількість ооцитів, які виділяються з одного яєчника. Визначали кількість ооцитів, які виділяються з одного яєчника у порівнянні з такою величиною у контрольних тварин. В умовах ЕІУ на 64% зменшується кількість ооцитів, які виділяються з одного яєчника миші у порівнянні з такою в контролі (відповідно, $11,14 \pm 0,27$ шт/яє. і $17,17 \pm 0,32$ шт/яє., $p \leq 0,05$, $N=8$) [42].

Морфологічні особливості тканини яєчника. При оглядовій мікроскопії проводили морфологічний аналіз структурних компонентів тканини яєчників, після чого підраховували: кількість різних типів фолікулів і жовтих тіл в кірковій речовині яєчника при збільшенні 10×10 , 40×10 . Фото препаратів проводили з допомогою цифрової камери USMOS01300KPA (Sigeta, Корея).

Для гістологічного дослідження зразки тканин яєчників фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну. За загальноприйнятою методикою Саноцького И.В. (1970) і Семченка В.В. (2006) зафіксовані зразки після промивання в проточній воді піддавали зневодненню шляхом занурення досліджуваного матеріалу в спирти зростаючої концентрації з подальшим заливанням у парафін. Готували гістологічні поперечні зрізи товщиною 6 мкм по 20 шт з одного яєчника та фарбували їх гематоксиліном і еозином. Зразки тканин вивчали за допомогою світлооптичного мікроскопу Amplival (Carl Zeiss Jena, Німеччина).

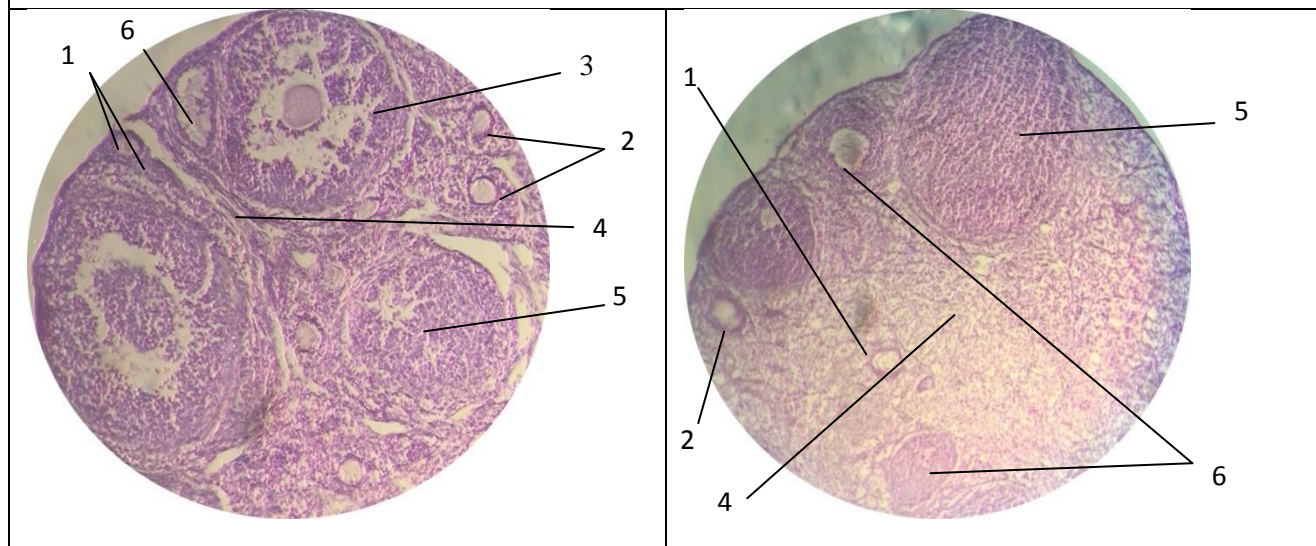
Гістологічний аналіз окремих зрізів яєчника.



А

Б

Рисунок 2.1. Поперечний зріз яєчника (А-контроль, Б-дослід): 1 - кіркова речовина яєчника; 2 - мозкова речовина яєчника. Забарвлення гематоксилін-еозин. Збільшення об. 10 × ок. 10.



А

Б

Рисунок 2.2. Кіркова речовина яєчника (А-контроль, Б-дослід): 1 - первинні фолікули; 2- вторинні фолікули; 3 - третинні фолікули; 4 - сполучнотканинна основа; 5 - жовте тіло; 6-атретичний фолікул. Забарвлення гематоксилін-еозин. Збільшення об. 10 × ок. 10.

Як видно із проілюстрованого матеріалу, у контрольних тварин добре визначаються кірковий і мозковий шари яєчника, білкова оболонка слабо васкуляризована та має однорідну структуру, мозкова речовина яєчника в порівнянні з кірковою невелика і добре васкуляризована (рис. 2.1А).

В ході проведених досліджень встановлено, що після довготривалої імунізації мишей зростаючою дозою ксеногенного білка – БСА (ЕІУ) білкова оболонка яєчника має більш щільну структуру. Відзначається збільшення обсягу мозкової речовини по відношенню до кіркової та атрофія останньої (рис. 2.1Б).

У контрольних тварин в кірковій речовині яєчника фолікули знаходяться на різних стадіях розвитку: від примордіальних до зрілих третинних фолікулів. Примордіальні фолікули в переважній більшості розташовуються у вигляді компактних груп безпосередньо під білковою оболонкою. Місцями зустрічаються атретичні фолікули. В більшості випадків фолікули мають круглу форму. Між фолікулами розташовується сполучнотканинна строма яєчника, клітини якої мають веретеноподібну форму. Жовті тіла мають округлу або овальну форму. Вони покриті сполучнотканинною капсулою, від якої до центру направляються тонкі прошарки, що містять кровоносні і лімфатичні судини. (рис. 2.2А).

Примордіальні фолікули в кірковій речовині яєчника дослідної групи тварин (ЕІУ) розташовуються переважно поодинокі. Окрім того, привертає увагу високий вміст атретичних фолікулів. Атретії частіше піддаються вторинні фолікули, рідше третинні. Кількість жовтих тіл значно менша ніж у контролі та вони мають неправильну форму (рис. 2.2Б).

Підрахунок кількості фолікулів примордіальних і первинних (з одним шаром фолікулярних клітин) проводили на кожному 10-му зрізі, а результат множили на 10. Фолікули з двома і більше шарами гранулярних клітин (вторинні і третинні), а також атретичні фолікули і жовті тіла підраховували в кожному п'ятому зрізі, а результат множили на 5.

У експериментальних тварин щодо контрольних встановлено зменшення кількості примордіальних фолікулів на 56% (відповідно, $15,41 \pm 0,82$ і $27,52 \pm 1,41$, $p \leq 0,05$), первинних на 69% (відповідно, $11,83 \pm 0,73$ і $17,18 \pm 1,14$, $p \leq 0,05$),

вторинних на 42% (відповідно, $7,05 \pm 0,69$ і $16,72 \pm 0,96$, $p \leq 0,05$), третинних на 62% (відповідно, $5,96 \pm 0,63$ і $9,64 \pm 0,77$, $p \leq 0,05$), збільшення атретичних у 2,01 рази (відповідно, $10,41 \pm 0,16$ і $5,16 \pm 0,78$, $p \leq 0,05$) і зменшення жовтих тіл на 44% (відповідно, $1,10 \pm 0,62$ і $4,15 \pm 0,68$, $p \leq 0,05$) [42].

Естральний цикл. Встановлення стадії естрального циклу у самиць мишей здійснювали за клітинним складом їх вагінальних мазків через день після завершення імунізації протягом 6 днів у порівнянні з такими показниками у контрольних тварин. Так, тварини дослідної групи перебували на стадії дієструсу $5,50 \pm 0,27$ днів ($p < 0,01$, $N=8$) у порівнянні з $1,67 \pm 0,21$ днів у контролі та не досягали стадію еструсу по відношенню до контрольних тварин, які вступили в еструс на $3,50 \pm 0,71$ день [42].

Таким чином, в умовах ЕІУ (імунізація БСА) відбувається зменшення маси яєчника; зменшенням кількості ооцитів, які виділяються з одного яєчника; зменшення кількості примордіальних, первинних, вторинних і третинних фолікулів і жовтих тіл; збільшення атретичних фолікулів; порушення естрального циклу: збільшується тривалість перебування тварин на стадії дієструсу і відсутність настання стадії еструсу у порівнянні з контрольними тваринами.

Є підстави стверджувати, що імунізація БСА призводить до порушенням оваріальної функції і вважати, що дана модель (ЕІУ) певною мірою відображає розлад репродуктивної функції у жінки, а саме ПНЯ є адекватною для подальшого вивчення її патогенетичних ланок розвитку та можливих способів профілактики і корекції.

2.2. Метод ДНК-комет (лужний)

Для виявлення ОНР ДНК ядер ооцитів, клітин тимуса, ЛВ та ФОО використовували метод лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет – «DNA-comet assay») за Afanasieva та співавтори [67].

Суть методу полягає в тому, що при електрофорезі лізованих клітин в агарозному гелі петлі і фрагменти пошкодженої ДНК витягуються в

електричному полі в напрямку до анода, що надає їм вигляд комет. Розміри хвоста ДНК-комети позитивно корелюють зі ступенем ушкодження ДНК [75].

Електрофорез препаратів (після їх стабілізації протягом 20 хв в лужному 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 ЛЮМАМ И-1 (Росія) при застосуванні водно-імерсійного об'єктива ($\times 30$).

На кожному мікропрепараті аналізували від 100 до 400 окремо розташованих ДНК-комет. За співвідношенням ДНК у “голові” та “хвості” комети поділяли на 5 класів (0-4) [109].

2.3. Метод культивування ооцитів *in vitro*

З яєчників мишей неферментативно (механічно) виділяли ооцити. Ооцити від мишей однієї групи збирали та розподіляли в окремі камери, по 10-20 ооцитів у кожній. Усі контрольні та експериментальні ооцити культивували в однакових умовах (стерильний бокс, камери по 400 мкл культурального середовища DME з 15 mM HEPES, концентрація Ca^{2+} 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, а саме щільність, ступінь гранульованості, ознаки фрагментації і дегенерації. Після 2 год (4 год – подано в розділі 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).

2.4. Метод прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот

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

Після виділення клітин проводили їх морфологічну оцінку рутинним методом виключення барвника – трипанового синього (0,2% розчин на 0,9% NaCl) [13]. Підрахунок живих та мертвих клітин здійснювали в камері Горяєва.

Забарвлення флуоресцентними барвниками проводили в натрій-фосфатному буфері (phosphate buffered saline, PBS). Клітини інкубували в темряві у термостаті при t 37°C в присутності ядерних барвників Хехст 33342 та пропідіум йодид у кінцевій концентрації 10 мкмоль/л протягом 10хв, з подальшим двократним відмиванням клітин в PBS під час центрифугування (2000 об/хв, 7 хв) з наступною фіксацією 5%-м формаліном в PBS (2 хв). Забарвлені клітини відмивали в PBS, ресуспендували і робили мазки.

Підрахунок живих, некротичних та апоптотичних клітин здійснювали за допомогою люмінесцентного мікроскопу „Люам І-1” (ЛОМО, Росія) з водно-імерсійним об’єктивом x85 та окуляром x5. Проводили оцінку не менш ніж 200 клітин [156].

2.5. Використані речовини

- бичачий сироватковий альбумін, BSA (Sigma, USA) в зростаючій дозі 150, 175, 200, 200, 250, 300 мг/кг;

- культуральне середовища DME з 15 mM HEPES, концентрація Ca^{2+} 1,71mM (Sigma, USA);

- L-норвалін – специфічний блокатор аргінази II (Sigma, США), 50мг/кг;

- етилметилгідроксипіридин сукцинат, ГС (препарат «Мексидол», "Фармасофт", Російська Федерація) – антиоксидант, 100 мг/кг;

- L-аргінін гідрохлорид - субстрат NOS (Sigma, USA), 150мг/кг; в концентраціях 0,0004 mM, 0,04 mM, 4,0 mM, 40,0 mM;

- аміногуанідин, АГ- специфічний блокатор iNOS (Sigma, USA), 25мг/кг; в концентраціях 0,0002 mM, 0,02 mM, 2,0 mM, 20,0 mM;
- 4-ГК – блокатор ПАРП-1 (Sigma, USA) в концентраціях (0,0001 mM, 0,01 mM, 1,0 mM, 10,0 mM);
- ресвератрол - антиоксидант (Sigma, USA) в концентраціях (0,002 μ M, 2,0 μ M, 0,2 mM, 2,0 mM).
- субстанція наночастинок нульвалентного заліза, НЧНЗ (Інститут біоколоїдної хімії ім.Ф.Д. Овчаренка НАН України) – сферичної форми, розміром 40 нм та зі 100% вмістом заліза (Fe), 1,68 мг/кг.

НЧНЗ синтезовані в Інституті біоколоїдної хімії ім. Ф.Д.Овчаренка НАН України за оригінальним протоколом методом хімічної конденсації у водному середовищі шляхом відновлення хлориду заліза (III). На рис. 2.3 представлені результати рентгеноструктурного мікроаналізу (рис. 2.3, I) та трансмісійної електронної мікроскопії (рис. 2.3, II), що характеризують хімічний склад, розмір та форму використаної в роботі субстанції НЧНЗ.

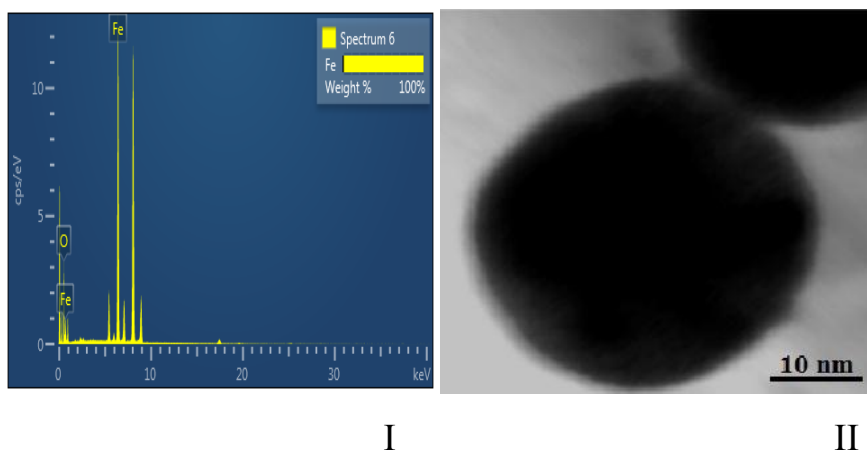


Рис. 2.3. Фізико-хімічна характеристика НЧНЗ

Примітка: I – рентгеноструктурний мікроаналіз хімічного складу частинки;
II – електронно-мікроскопічне зображення.

Згідно з критеріями та протоколами Методичних рекомендацій «Оцінка безпеки лікарських нанопрепаратів», затверджених Науково-експертною радою Державного експертного центру МОЗ України (протокол №8 від 26.09.2013 р.) [48] субстанція НЧНЗ охарактеризована, як біобезпечна і біосумісна за показниками цитотоксичності, генотоксичності, мутагенності, фізіологічного маркера «стан мікрофлори шлунково-кишкового тракту людини» та біохімічних параметрів (АТФ-азна і лактатдегідрогеназна активність) і належить до V класу токсичності (практично нетоксичних речовин) – LD₅₀ при внутрішньошлунковому введенні самицям мишей лінії BALB/c перевищує 5000 мг/кг [9, 45].

2.6. Схема експерименту

У першій серії експериментів досліджували особливості оваріальної функції та пошкодження ДНК ядер клітин ЛВ, тимуса в умовах ЕІУ. Розподіл тварин по групах та схема експерименту представлені в табл. 2.1.

Таблиця 2.1.

Дослідження особливостей оваріальної функції та пошкодження ДНК ядер клітин ЛВ, тимуса в умовах ЕІУ

Групи тварин	І гр. – контроль (в/в введення фізіологічного розчину (фіз. р-ну) у відповідному об'ємі замість БСА, згідно зі схемою імунізації), N=8; ІІ гр. – імунізація БСА (в/в, шестикратно, 1 раз на тиждень, зростаючою дозою антигену - 150, 175, 200, 200, 250, 300 мг/кг), N=8;
Забір матеріалу	На 7 добу після останньої імунізації тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники, тимус, пахові ЛВ.
Об'єкт	Досліджувані показники:
Яєчник: ооцити,	Параметри мейотичного дозрівання ооцитів <i>in</i>

клітини ФОО	<i>vitro</i> (розчинення зародкового пухирця-метафаза I, формування першого ролярного тільця- метафаза II) Параметри життєздатності та шляхи загибелі клітин ФОО.
Тимус, пахові ЛВ	Розподіл ДНК-комет ядер клітин за класами (0-4) у %.

У другій серії експериментів дослідження були направленні на:

1) вивчення функціонального стану яєчника в умовах ЕІУ і застосування антиоксиданта, антиоксиданта і блокатора аргінази II (табл.2.2.);

Таблиця 2.2.

Дослідження функціонального стану яєчника в умовах ЕІУ й застосування антиоксиданта і блокатора аргінази II

Групи тварин	<p>I гр. – контроль (в/в введення фіз. р-ну у відповідному об'ємі замість БСА, згідно схеми імунізації), N=8;</p> <p>II гр. – імунізація БСА (в/в, шестикратно, 1 раз на тиждень, зростаючою дозою антигену - 150, 175, 200, 200, 250, 300 мг/кг), N=8;</p> <p>III гр. – введення тваринам, що імунізуються БСА, антиоксиданта – ГС шестикратно, в/о, 1 раз на тиждень, у дозі 100 мг/кг, за 1 год до введення БСА, згідно схеми імунізації N=8;</p> <p>IV гр. – введення L-норваліну за умов дії антиоксиданта ГС при імунізації БСА (шестикратно, в/в, 1 раз на тиждень, у дозі 50 мг/кг, в день після введення БСА і ГС згідно</p>
--------------	---

	схеми імунізації), N=8.
Забір матеріалу	На 7 добу після останньої імунізації тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники
Оцінка функціонального стану яєчника	
Об'єкт	Досліджувані показники:
Яєчник: ооцити, клітини ФОО	Параметри мейотичного дозрівання ооцитів <i>in vitro</i> (розчинення зародкового пухирця- метафаза I, формування першого полярного тільця- метафаза II) Параметри життєздатності та шляхи загибелі клітин ФОО.

2) встановлення особливостей розподілу ОНР ДНК ядер клітин тимуса, ЛВ і ФОО в умовах ЕІУ та використання антиоксиданта (табл.2.3).

Таблиця 2.3.

Вивчення особливостей розподілу ОНР ДНК ядер клітин тимуса, ЛВ і ФОО в умовах ЕІУ та використання антиоксиданта

Групи тварин	<p>I гр. – контроль (в/в введення фіз. р-ну замість БСА, згідно схеми імунізації), N=8;</p> <p>II гр. – імунізація БСА (в/в, шестикратно, 1 раз на тиждень, зростаючою дозою антигену - 150, 175, 200, 200, 250, 300 мг/кг), N=8;</p> <p>III гр. – введення антиоксиданта –ГС , в/о, один раз на тиждень, у дозі 100 мг/кг згідно схеми імунізації, N=8;</p> <p>IV - імунізація БСА за схемою та введення антиоксиданта – ГС згідно схеми імунізації,</p>
--------------	---

	в/о, 1 раз на тиждень, в дозі 100 мг/кг, за 1 год до БСА, N=8.
Забір матеріалу	На 7 добу після останньої імунізації тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники тимус, пахові ЛВ.
Об'єкт	Метод ДНК-комет (лужний)
Яєчник: клітини ФОО; тимус, пахові ЛВ.	Розподіл ДНК-комет ядер клітин за класами (0-4) у %.

У третій серії експериментів вивчали функціональний стан яєчника, тимуса та ЛВ в умовах ЕІУ і

1) застосування НЧНЗ (табл.2.4);

Таблиця 2.4.

Дослідження функціонального стану яєчника, тимуса та ЛВ в умовах ЕІУ і введення НЧНЗ

Групи тварин	<p>I гр. – контроль (в/в введення фіз. р-ну замість БСА, згідно схеми імунізації), N=6;</p> <p>II гр. – імунізація БСА (в/в, шестикратно, 1 раз на тиждень, зростаючою дозою антигену - 150, 175, 200, 200, 250, 300 мг/кг), N=6;</p> <p>III- введення НЧНЗ (в/в, шестикратно, 1 раз на тиждень, в дозі 1,68 мг/кг), N=6;</p> <p>IV- імунізація БСА і введення НЧНЗ (за 1 год перед кожною імунізацією в/в, в дозі 1,68 мг/кг, згідно схеми імунізації), N=6.</p>
Забір матеріалу	На 7 добу після останньої імунізації тварин

	піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники, тимус та пахові ЛВ
Функціональний стан яєчника, тимуса та ЛВ	
Об'єкт	Досліджувані показники:
Яєчник:клітини ФОО; тимус, пахові ЛВ.	Параметри мейотичного дозрівання ооцитів <i>in vitro</i> (розчинення зародкового пухирця - метафаза I, формування першого пролярного тільця - метафаза II). Параметри життєздатності та шляхи загибелі клітин ФОО, тимуса і ЛВ. Розподіл ДНК-комет ядер клітин ФОО, тимуса і ЛВ за класами (0-4) у %.

2) застосування НЧНЗ та введення блокатора iNOS, субстрату NOS (табл.2.5.)

Таблиця 2.5.

Дослідження функціонального стану яєчників, тимуса і ЛВ в умовах ЕІУ та застосування НЧНЗ і введення блокатора iNOS, субстрата NOS

Групи тварин	<p>I гр. – контроль (в/в введення фіз. р-ну замість БСА, згідно схеми імунізації), N=8;</p> <p>II гр. – імунізація БСА (в/в, шестикратно, 1 раз на тиждень, зростаючою дозою антигену - 150, 175, 200, 200, 250, 300 мг/кг), N=8;</p> <p>III - введення НЧНЗ (в/в, шестикратно, 1 раз на тиждень, у дозі 1,68 мг/кг), N=8;</p> <p>IV - імунізація БСА і введення НЧНЗ (за 1 год перед кожною імунізацією в/в, в дозі 1,68 мг/кг, згідно схеми імунізації), N=8;</p>
--------------	---

	<p>V – імунізація БСА і введення АГ (в/о, 25 мг/кг, 1 раз на тиждень, за 1 год до БСА, N=8),</p> <p>VI – імунізація БСА і введення L-аргініну (в/о, шестикратно, 1 раз на тиждень, в дозі 150 мг/кг, за 1 год після БСА), N=8;</p> <p>VII – імунізація БСА та введення L-аргініну (в/о, шестикратно, 1 раз на тиждень, в дозі 150 мг/кг, 1 год після БСА) і НЧНЗ - (шестикратно, в/в, 1 раз на тиждень, у дозі 1,68 мг/кг, за 1 год до введення БСА згідно схеми імунізації) N=8;</p>
Забір матеріалу	На 7 добу після останньої імунізації тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники, тимус та пахові ЛВ
Об'єкт	Досліджувані показники:
Яєчник: ооцити, клітини ФОО; тимус; пахові ЛВ	<p>Параметри мейотичного дозрівання ооцитів <i>in vitro</i> (розчинення зародкового пухирця - метафаза I, формування першого ролярного тільця - метафаза II).</p> <p>Параметри життєздатності та шляхи загибелі клітин ФОО, тимуса і ЛВ.</p> <p>Розподіл ДНК-комет ядер клітин ФОО, тимуса і ЛВ за класами (0-4) у %.</p>

У четвертій серії експериментів після 4 год культивування ооцитів досліджували *in vitro* відновлення мейотичного дозрівання ооцитів (дослід 1 і 2) та розподіл ДНК-комет їх ядер за класами (0-4) у % (дослід 3А, 3Б, 3В) за різних експериментальних умов (табл.2.6.).

Таблиця 2.6.

Відновлення мейотичного дозрівання ооцитів та розподіл ДНК-комет ядер ооцитів за класами за різних експериментальних умов

Забір матеріалу	Тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники
Об'єкт	Досліджувані показники:
Яєчник: ооцити	Параметри відновлення мейотичного дозрівання ооцитів <i>in vitro</i> (розчинення зародкового пухирця).
Дослід 1 в умовах впливу	Відновлення мейотичного дозрівання ооцитів: - 4-ГК – блокатор ПАРП-1 (Sigma, USA) в концентраціях (0,0001 mM, 0,01 mM, 1,0 mM, 10,0 mM); - L-аргінін гідрохлорид – субстрат NOS (Sigma, USA) в концентраціях (0,0004 mM, 0,04 mM, 4,0 mM, 40,0 mM); - аміногуанідин, АГ- специфічний блокатор iNOS (Sigma, USA) в концентраціях (0,0002 mM, 0,02 mM, 2,0 mM, 20,0 mM); - ресвератрол - антиоксидант (Sigma, USA) в концентраціях (0,002 μM, 2,0 μM, 0,2 mM, 2,0 mM).
Дослід 2 в умовах впливу	Відновлення мейотичного дозрівання ооцитів: - 4-ГК (1mM) і АГ (0,02 mM); - 4-ГК (1,0 mM) + L-аргінін (0,04 mM); - 4-ГК (1,0 mM) + ресвератрол (2,0 μM); - АГ (0,02 mM) + ресвератрол (2,0 μM).

Об'єкт	Метод ДНК-комет (лужний)
Яєчник: ооцити,	Розподіл ДНК-комет ядер клітин за класами (0-4) у %.
Дослід 3А	Розподіл ОНР ДНК ядер: 1) ооцитів свіжовиділених, 2) ооцитів за умов культивування протягом 4 год 3) ооцитів які після періоду 4 год культивування піддавались впливу H_2O_2 (за температури 4°C, 250 mM, 5 хв)
Дослід 3Б за умов впливу	Розподіл ОНР ДНК ядер ооцитів: 4-ГК (1 mM), АГ (0,02 mM), L-аргінін (0,04 mM), ресвератрол (2,0 μ M)
Дослід 3В за умов впливу	Розподіл ОНР ДНК ядер ооцитів: 4-ГК (1,0 mM) + Аміногуанідин (0,02 mM); 4-ГК (1,0 mM) + L-аргінін (0,04 mM); 4-ГК (1,0 mM) + ресвератрол (2,0 μ M); Аміногуанідин (0,02 mM) + ресвератрол (2,0 μ M).

2.7. Статистична обробка результатів

Перевірку отриманих даних на нормальність розподілу проводили за тестом Колмогорова - Смирнова. 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, San Diego California, USA). Результати виражали як середнє \pm стандартне відхилення; $p < 0,05$ вважалося статистично вірогідним [7].

РОЗДІЛ 3

Розлад оваріальної функції в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження

Першим завданням цієї роботи було дослідити вплив імунізації БСА на оваріальну функцію, а саме на зміни параметрів мейотичного дозрівання ооцитів та загибель клітин їх фолікулярного оточення, а також на особливості розподілу ОНР ДНК ядер клітин тимуса і ЛВ з метою оцінки моделі ЕІУ як адекватної для подальшого вивчення особливостей розвитку та корекції ПНЯ.

3.1. Мейотичне дозрівання ооцитів в умовах ЕІУ

В умовах ЕІУ відбувається пригнічення мейотичного дозрівання як на стадії метафаза I, так і на стадії метафаза II, а саме, зменшується кількість ооцитів, які розчинили зародковий пухирець (метафаза I) і сформували перше полярне тільце (метафаза II), що складає, відповідно, $62,16 \pm 4,89\%$ ($p < 0,05$, $n=8$) і $41,09 \pm 4,38\%$ ($p < 0,05$, $n=8$), тоді як у контролі, відповідно, $84,05 \pm 3,50\%$ і $56,99 \pm 1,17\%$ (рис.3.1. і рис. 3.2.) [6, 35, 94].

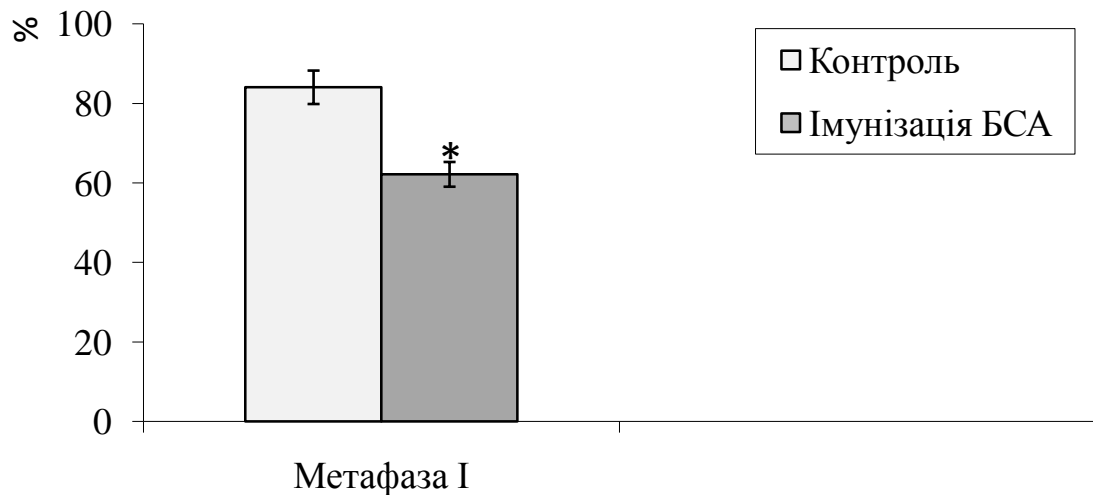


Рисунок 3.1.

Мейотичне дозрівання ооцитів (метафаза I) в умовах ЕІУ.

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

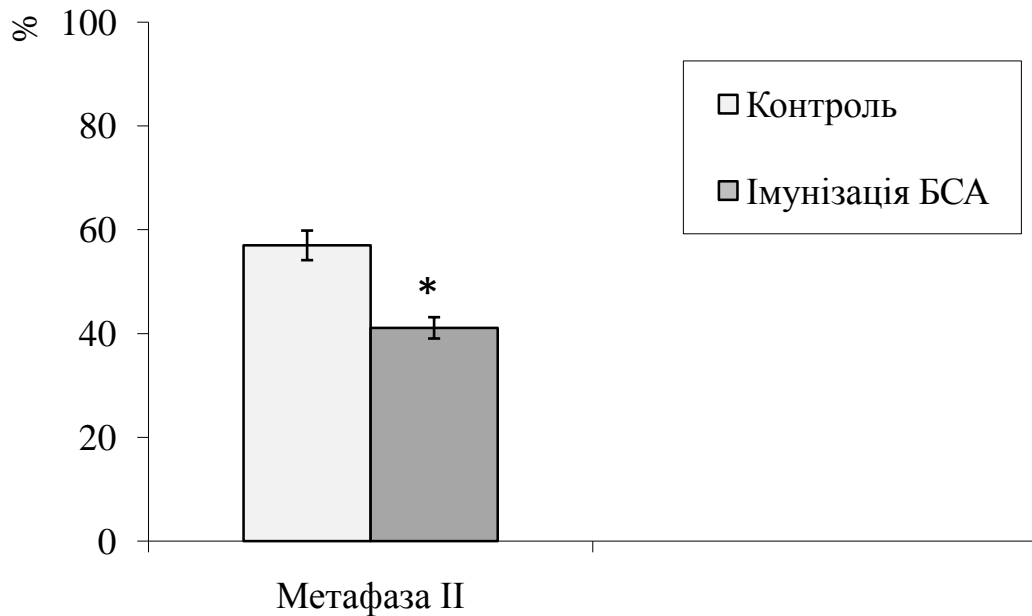


Рисунок 3.2.

Мейотичне дозрівання ооцитів (метафаза II) в умовах ЕІУ.

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

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

3.2. Життєздатність та шляхи загибелі клітин ФОО в умовах ЕІУ

В умовах ЕІУ спостерігається посилення клітинної загибелі: кількість живих клітин ФОО зменшується до $66,13 \pm 0,97\%$ ($p < 0,01$, $n=8$) у порівнянні з $83,00 \pm 2,48\%$ у контролі [6, 35, 94].

Встановлено збільшення кількості клітин ФОО з морфологічними ознаками апоптозу до $22,00 \pm 0,91\%$ ($p < 0,01$, $n=8$) у порівнянні з $8,11 \pm 0,59\%$ в контролі, тоді як кількість клітин з ознаками некрозу вірогідно не змінюється по відношенню з контрольною величиною і складає, відповідно, $9,88 \pm 0,48\%$ і $8,89 \pm 1,39\%$ (рис.3.3) [6, 35, 94].

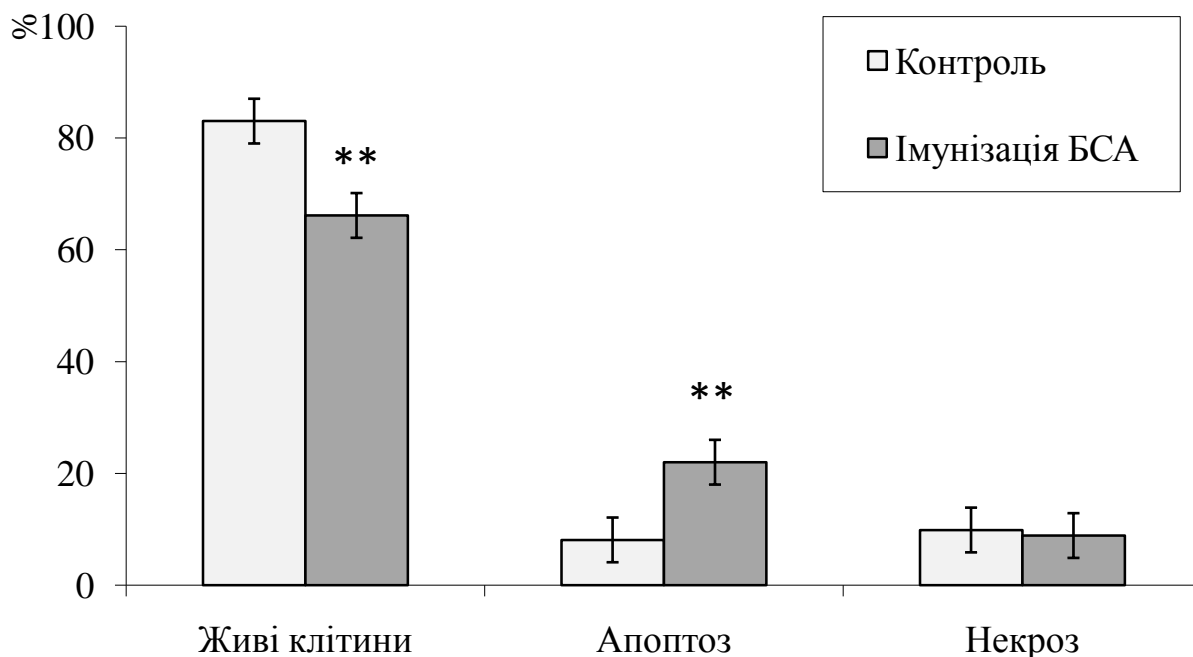


Рисунок 3.3.

Життєздатність клітин ФОО та шляхи їх загибелі в умовах ЕІУ.

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

Таким чином, в умовах ЕІУ відбувається пригнічення параметрів життєздатності клітин ФОО, а саме зменшується частка живих клітин, а частка клітин з морфологічними ознаками апоптозу зростає.

3.3. Особливості розподілу ОНР ДНК ядер клітин тимуса та ЛВ в умовах ЕІУ

В умовах ЕІУ відбувається ушкодження ДНК ядер клітин тимуса: зменшується кількість клітин тимуса з ядрами 0/1-го класу до $9,86 \pm 3,01\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з $30,80 \pm 7,65\%$ у контролі, а частка клітин з ядрами 4-го класу зростає до $47,64 \pm 4,99\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з $21,41 \pm 7,60\%$ в контролі. Доля

ядер 2-го і 3-го класів залишається у межах контрольних величин і складає, відповідно, $13,66 \pm 6,49\%$ і $28,84 \pm 4,10\%$ (рис.3.4) [6, 35, 94].

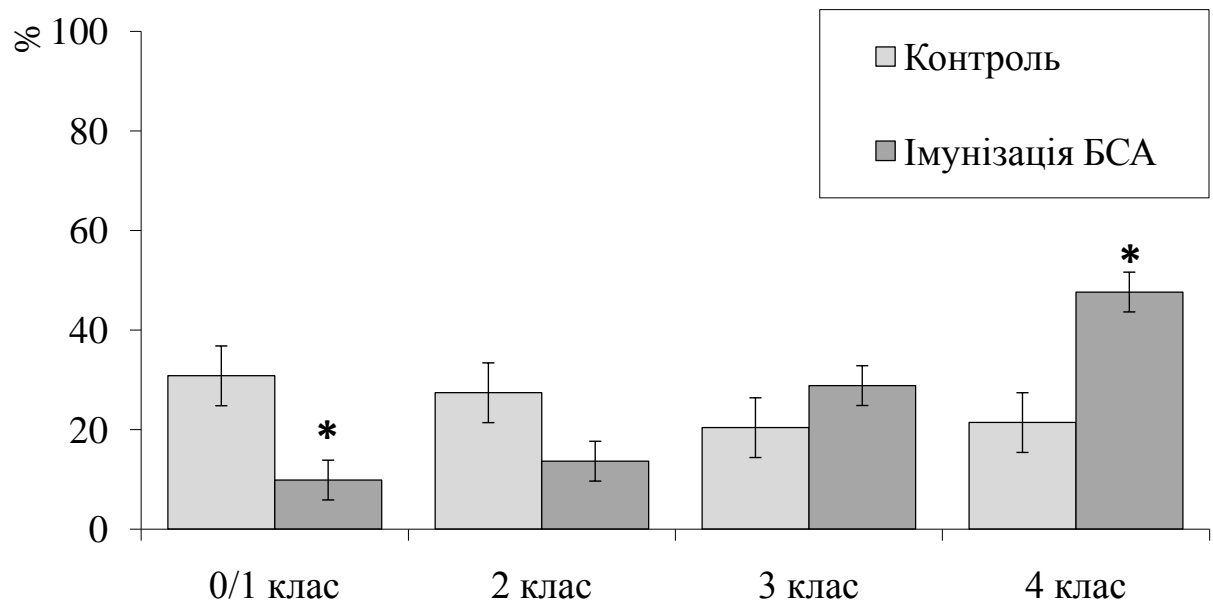


Рисунок 3.4.

Розподіл ОНР ДНК ядер клітин тимуса в умовах ЕІУ.

Розподіл комет за класами у %.

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

В умовах ЕІУ відбувається ушкодження ДНК клітин ЛВ: зменшується кількість клітин ЛВ з ядрами 0/1-го і 2-го класів до, відповідно, $17,13 \pm 5,99\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) і $12,92 \pm 3,03\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з, відповідно, $39,18 \pm 5,87\%$ і $27,25 \pm 5,94\%$ в контролі, а частка клітин з ядрами 4-го класу зростає до $47,03 \pm 5,38\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з $13,03 \pm 5,72\%$ в контролі. Частка ядер 3-го класу залишається у межах контрольних величин і становить $22,88 \pm 10,67\%$ (рис.3.5) [6, 35, 94].

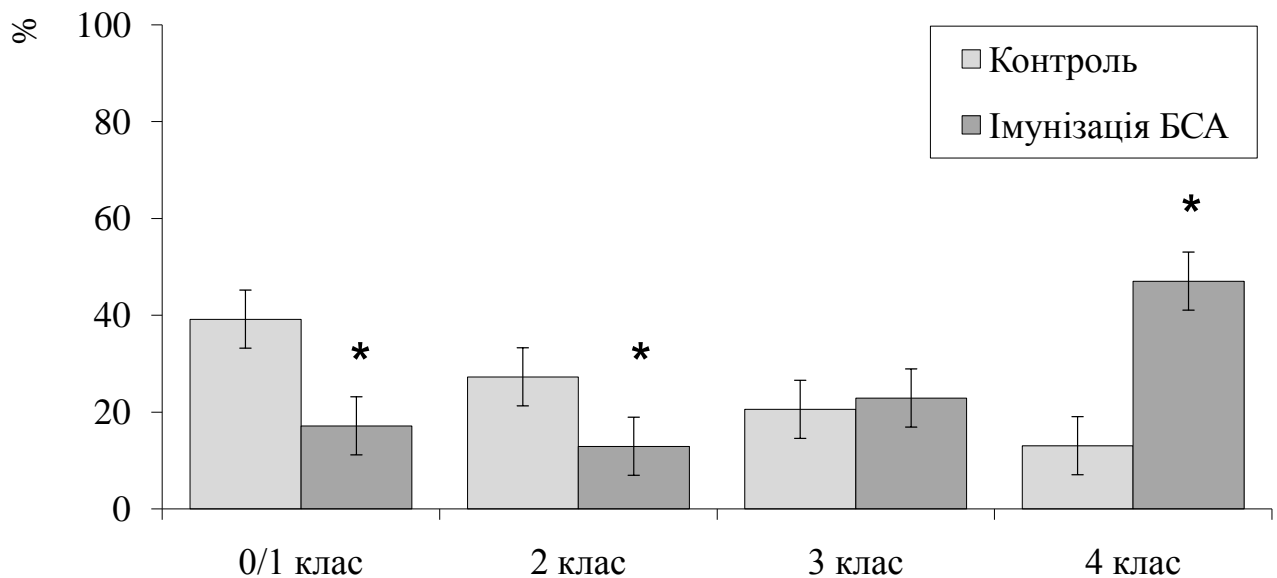


Рисунок 3.5.

Розподіл ОНР ДНК ядер клітин ЛВ в умовах ЕІУ.

Розподіл комет за класами у %.

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

Таким чином, імунізація БСА призводить до збільшення кількості ОНР ДНК ядер клітин тимуса і ЛВ, що свідчить про пошкодження ДНК цих клітин в умовах ЕІУ.

Отже, оцінюючи функціональний стан яєчника тимуса, ЛВ та в умовах ЕІУ зроблено наступні узагальнення:

Імунізація тварин БСА (модель ЕІУ) призводить до пошкодження геному клітин органів імунної системи (тимус, ЛВ).

В репродуктивній системі відмічається розлад оваріальної функції, а саме спостерігається пошкодження ооцитів – пригнічення їх мейотичного дозрівання *in vitro* на обох стадіях (метафаза I, метафаза II), а також відбувається ослаблення життєздатності клітин ФОО: зменшується частка живих клітин і зростає частка клітин з морфологічними ознаками апоптозу.

РОЗДІЛ 4

Вплив введення антиоксиданта на мейотичне дозрівання ооцитів, життєздатність клітин їх фолікулярного оточення та розподіл ОНР ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів в умовах ЕІУ

Наступне завдання полягало у дослідженні ефекту введення антиоксиданта ГС і блокатора аргінази II L-норваліна в умовах ЕІУ на параметри мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин їх фолікулярного оточення та вивченні в умовах ЕІУ впливу введення ГС (як можливого засобу корекції ПНЯ) на розподіл одониткових розривів ДНК ядер клітин ФОО, тимуса і ЛВ.

4.1. Вплив введення антиоксиданта ГС і L-норваліна на показники мейотичного дозрівання ооцитів та параметри життєздатності клітин їх фолікулярного оточення в умовах ЕІУ

Встановлено, що в умовах ЕІУ введення ГС призводить до збільшення частки ооцитів, які розчинили зародковий пухирець і сформували перше полярне тільце до, відповідно, $82,69 \pm 1,94\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) і $47,00 \pm 4,55\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з, відповідно, $72,65 \pm 2,26\%$ і $32,67 \pm 2,12\%$ у групі імунізація БСА [41,233].

Введення L-норваліна і ГС в умовах ЕІУ зумовлює зменшення частки ооцитів, які розчинили зародковий пухирець і становить $74,88 \pm 0,77\%$ ($p < 0,05$, $n=8$) в порівнянні з $82,69 \pm 1,94\%$ в групі імунізація БСА і введення ГС [13, 35].

Дані про вплив введення ГС і L-норваліна в умовах ЕІУ на показники мейотичного дозрівання ооцитів представлено на рис. 4.1. і рис.4.2.

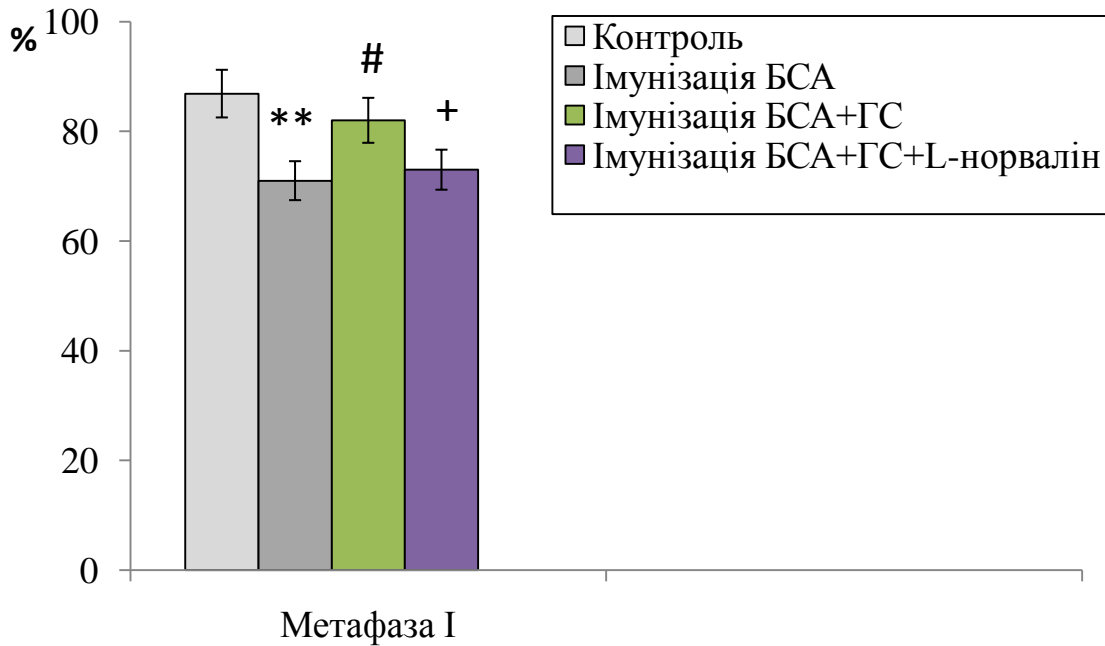


Рисунок 4.1.

Мейотичне дозрівання ооцитів (метафаза II) в умовах ЕІУ, введення ГС і L-норваліна.

Примітки: ** - $p < 0,01$ - 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; + - $p < 0,05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі імунізація і введення ГС.

Таким чином, в умовах ЕІУ введення ГС зумовлює покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, як на стадії метафаза I, так і на стадії метафаза II по відношенню до величин групи імунізація. Проте, введення L-норваліна разом з ГС в умовах ЕІУ зумовлює пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафаза I у порівнянні з величинами в групі імунізація БСА і ГС.

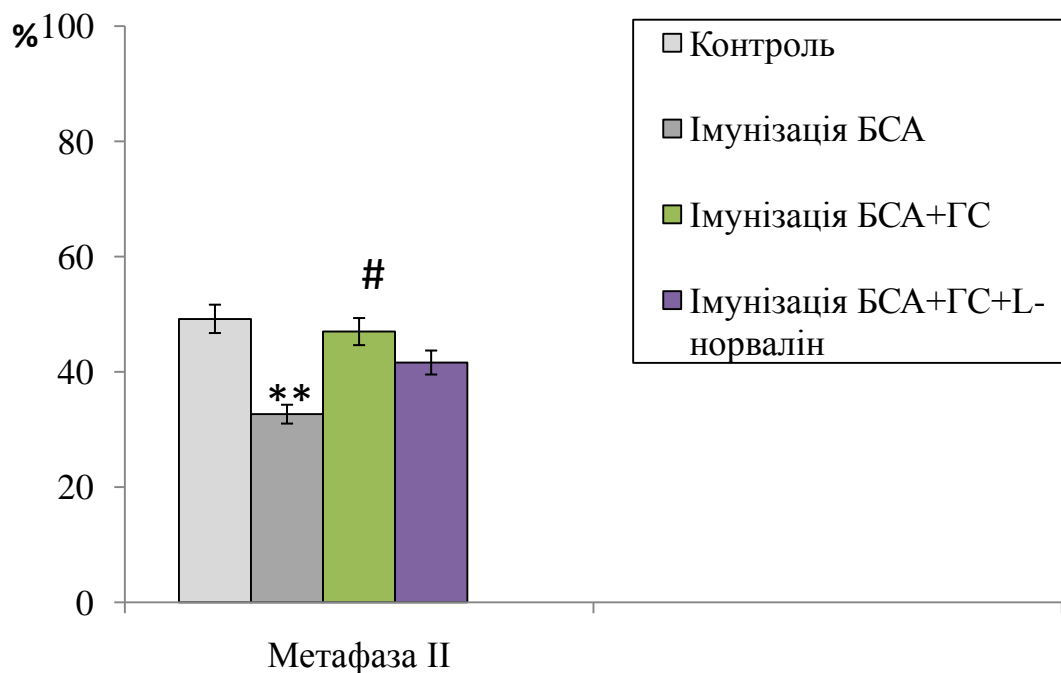


Рисунок 4.2.

Мейотичне дозрівання ооцитів (метафаза II) в умовах ЕІУ, введення ГС і L-норваліна.

Примітки: ** - $p < 0,01$ - 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.

В ФОО в умовах ЕІУ застосування ГС призводить до зниження клітинної загибелі - збішується кількість живих клітин, а частка клітин з морфологічними ознаками апоптозу зменшується у порівнянні з величинами у групі імунізації; введення L-норваліна разом з ГС при ЕІУ призводить до зменшення частки живих клітин і збільшення частки клітин з морфологічними ознаками некрозу по відношенню до величини в групі імунізація і ГС (табл.4.1) [13, 35, 233].

Таблиця 4.1.

Частка клітин ФОО з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу
в умовах ЕІУ, введення ГС і L-норваліна

Група тварин	Живі клітини, %	Апоптоз, %	Некроз, %
Контроль (n=9)	83,0±1,52	8,11±1,76	8,89±1,39
Імунізація БСА (n=8)	66,13±2,75 **	22,00±2,56**	11,87±2,29
Імунізація БСА+ГС (n=9)	79,31±2,34 #	6,36±1,06 #	14,33±1,63
Імунізація БСА+ГС+ L-норвалін (n=8)	67,12±1,81+	5,88±0,99 #	27,00±1,60 #+

Примітки: ** - $p < 0,01$ - 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; + - $p < 0,05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі імунізація і введення ГС; n - кількість повторів.

4.2. Вплив введення антиоксиданта на розподіл одониткових розривів ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів в умовах ЕІУ

Встановлено, що в умовах ЕІУ введення ГС призводить до збільшення частки клітин ФОО з ядрами 0/1-го до 58,69±3,00% ($p < 0,01$, n=5) по відношенню до 28,67± 2,66% у групі імунізація та до зменшення частки клітин з ядрами 3-го та 4-го класів, що становить, відповідно, 9,97±1,95% ($p < 0,01$, n=5) і 8,58±1,13% ($p < 0,01$, n=5) відносно величин у групі імунізація, відповідно, 25,17±1,83% і 32,00±2,61% (табл.4.2) [27, 35, 41, 233].

Застосування ГС не призводить до вірогідних змін в кількості клітин ФОО з ядрами 0/1-го, 3-го і 4-го класів, відповідно, $75,40 \pm 1,52\%$, $5,40 \pm 0,55\%$, $2,20 \pm 0,84\%$, але відмічається збільшення відсотка клітин з ядрами 2-го класу до $17,00 \pm 1,00\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) при $8,17 \pm 1,17\%$ у контролі (табл.4.2) [27, 35, 39, 41, 233].

Таблиця.4.2.

Вплив введення ГС на розподіл ОНР ДНК ядер клітин ФОО в умовах ЕІУ.

Розподіл ДНК-комет за класами у %

Група тварин	0/1 клас	2 клас	3 клас	4 клас
Контроль (n=6)	$80,17 \pm 1,47$	$8,17 \pm 1,17$	$8,17 \pm 0,75$	$3,50 \pm 0,84$
Імунізація БСА (n=6)	$28,67 \pm 2,66^{**}$	$14,17 \pm 1,47$	$25,17 \pm 1,83^{**}$	$32,00 \pm 2,61^{**}$
ГС (n=5)	$75,40 \pm 1,52$	$17,00 \pm 1,00^{*}$	$5,40 \pm 0,55$	$2,20 \pm 0,84$
Імунізація БСА +ГС (n=5)	$58,69 \pm 3,00^{##}$	$22,76 \pm 1,38$	$9,97 \pm 1,95^{##}$	$8,58 \pm 1,13^{##}$

Примітки: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ - вірогідності відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі; ## - $p < 0,01$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі імунізація; n - кількість повторів.

Таким чином, введення ГС в умовах ЕІУ призводить до зменшення пошкодження ДНК, а саме до перерозподілу ОНР ДНК ядер клітин ФОО: зменшується частка клітин з ядрами 3-го, 4-го класу та збільшується частка клітин з ядрами, які характеризуються відсутністю первинних пошкоджень (0/1-го класу). Введення ГС не чинить пошкоджуючого впливу на ДНК ядер клітин ФОО, відзначається зростання частки ядер 2-го класу.

Встановлено, що у тимусі в умовах ЕІУ введення ГС призводить до зменшення долі клітин з ядрами 3-го і 4-го класу до, відповідно, $17,60 \pm 2,19\%$ ($p < 0,01$, $n=6$) і $15,20 \pm 1,92\%$ ($p < 0,01$, $n=6$) при, відповідно, $34,17 \pm 2,71\%$ і $39,17 \pm 3,06\%$ клітин з ядрами цього ж класу в групі імунізація БСА; частка клітин з ядрами 2-го класу залишається без вірогідних змін по відношенню до відповідної величини у групі імунізація БСА і складає $21,40 \pm 3,05\%$; відсоток клітин з ядрами 0/1-го класу збільшується і становить $45,80 \pm 2,05\%$ ($p < 0,01$, $n=6$) при $6,33 \pm 1,03\%$ у групі імунізація БСА (рис.4.3) [27, 35, 39, 41, 233].

При введенні ГС частки клітин тимуса з ядрами 0/1-го, 3-го і 4-го класів залишаються у межах контрольних величин і складають, відповідно, $63,00 \pm 2,92\%$, $15,40 \pm 1,67\%$ і $4,00 \pm 1,87\%$. Однак спостерігається збільшення ядер 2-го класу до $17,60 \pm 1,52\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) при $10,33 \pm 2,50\%$ у контролі (рис.4.3).

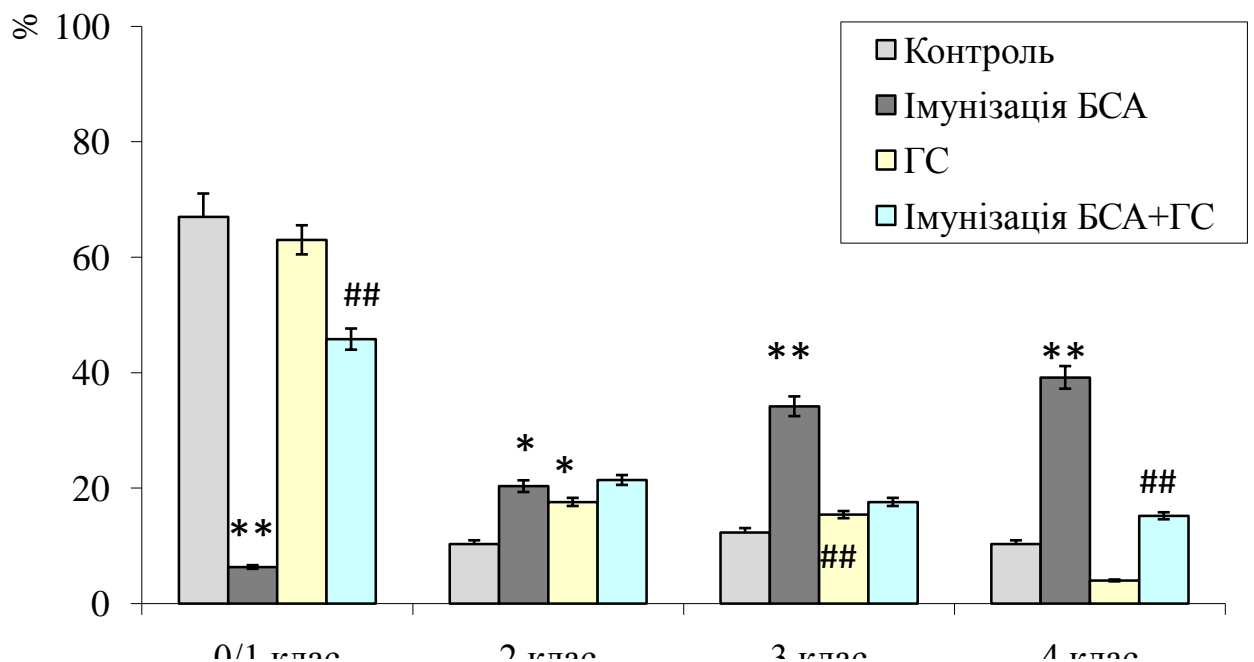


Рисунок 4.3.

Вплив введення ГС на розподіл ОНР ДНК ядер клітин тимуса в умовах ЕІУ.

Розподіл ДНК-комет за класами у %.

Примітки: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$ - вірогідності відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі; ## - $p < 0,01$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі імунізація; n - кількість повторів.

Таким чином, введення ГС в умовах ЕІУ призводить до зменшення пошкодження ДНК, а саме до перерозподілу ОНР ДНК ядер клітин тимуса: зменшується кількість клітин з ядрами 3-го, 4-го класу та зростає частка ядер, які характеризуються відсутністю первинних пошкоджень (0/1-го класу). Введення ГС не чинить пошкоджуючого впливу на ДНК ядер клітин тимуса, відзначається зростання частки ядер 2-го класу.

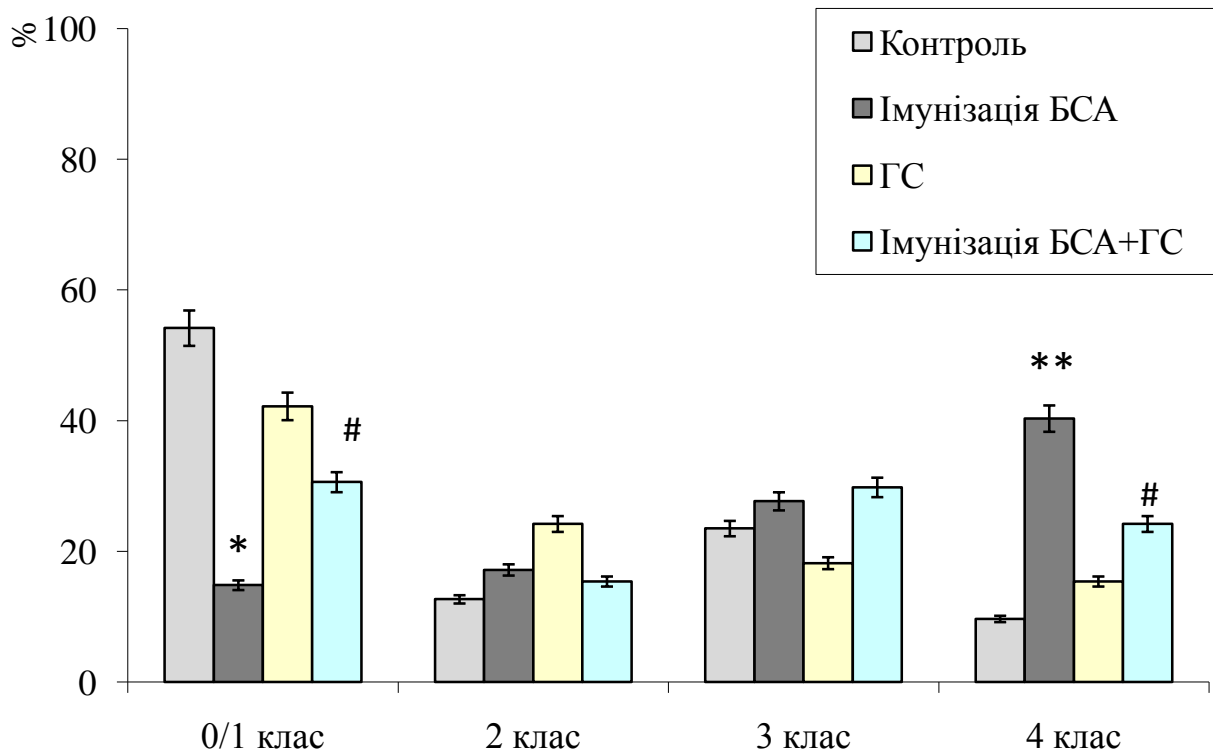


Рисунок 4.4.

Вплив введення ГС на розподіл ОНР ДНК ядер клітин ЛВ в умовах ЕІУ. Розподіл ДНК-комет за класами у %.

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

Встановлено, що у ЛВ в умовах ЕІУ введення ГС призводить до зменшення кількості ядер 4-го класу (для яких характерне максимальне пошкодження ДНК), до $24,20 \pm 2,59\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) порівняно з $40,33 \pm 4,41\%$ клітин цього ж класу у групі імунізації; частки клітин з ядрами 3-го і 2-го класів залишається у межах величин групи імунізація і складають, відповідно, $29,80 \pm 4,15\%$ і $15,40 \pm 1,14\%$; частка клітин з ядрами 0/1-го класу збільшується і становить $30,60 \pm 1,95\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) при $14,83 \pm 4,79\%$ у групі імунізація (рис.4.4).

При введенні ГС частки клітин ЛВ з ядрами 0/1-го, 2-го, 3-го і 4-го класів залишаються у межах контрольних величин і складають, відповідно, $42,20 \pm 3,63\%$, $24,20 \pm 1,92\%$, $18,20 \pm 1,48\%$ і $15,40 \pm 1,14\%$ (рис.4.4).

Таким чином, введення ГС не впливає на розподіл ОНР ДНК ядер клітин ЛВ. Однак, його введення в умовах ЕІУ знижує пошкодження ДНК: зменшується кількість ядер з максимальним ушкодженням ДНК (4-го класу) та збільшується кількість ядер для яких характерна відсутність первинних пошкоджень ДНК (0/1-го класу) [27, 35, 39, 41, 233].

Отже, оцінюючи функціональний стан яєчника в умовах ЕІУ і введення антиоксиданта (ГС) і блокатора аргінази II (L-норваліна), **зроблено наступні узагальнення:**

введення ГС зумовлює покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, як на стадії метафаза I, так і на стадії метафаза II, а також зумовлює зниження клітинної загибелі ФОО та зменшення частки клітин з морфологічними ознаками апоптозу.

Введення L-норваліну і ГС спричиняє пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафази I, а також призводить до збільшення клітин ФОО з морфологічними ознаками некрозу.

Введення ГС не справляє пошкоджувального впливу на ДНК ядер клітин ЛВ, ФОО і тимуса, а в умовах ЕІУ призводить до перерозподілу ОНР ДНК ядер клітин ФОО, тимуса і ЛВ у бік зменшення пошкодження ДНК.

РОЗДІЛ 5

Вплив введення НЧНЗ на функціональний стан яєчника, тимуса та лімфатичних вузлів в умовах ЕІУ

У цьому розділі представлено результати дослідів, у котрих вивчали зміни параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів та ступінь пошкодження ДНК їх ядер в умовах ЕІУ та застосуванні НЧНЗ, а також введенні блокатора iNOS аміногуанідина, субстрата NOS L-аргініна.

5.1. Вплив введення НЧНЗ на функціональний стан яєчника в умовах ЕІУ

Мейотичне дозрівання ооцитів. Встановлено, що введення тваринам НЧНЗ не впливає на кількість ооцитів які розчинили зародковий пухирець і становить $78,47 \pm 1,28\%$ у порівнянні з $80,99 \pm 0,79\%$ в контролі, однак відмічається зменшення частки ооцитів, які сформували перше полярне тільце (досягли метафази II), що складає $30,69 \pm 1,96\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з контрольною величиною $46,67 \pm 2,13\%$ (рис. 5.1. і рис.5.2) [20, 24, 29, 35, 44].

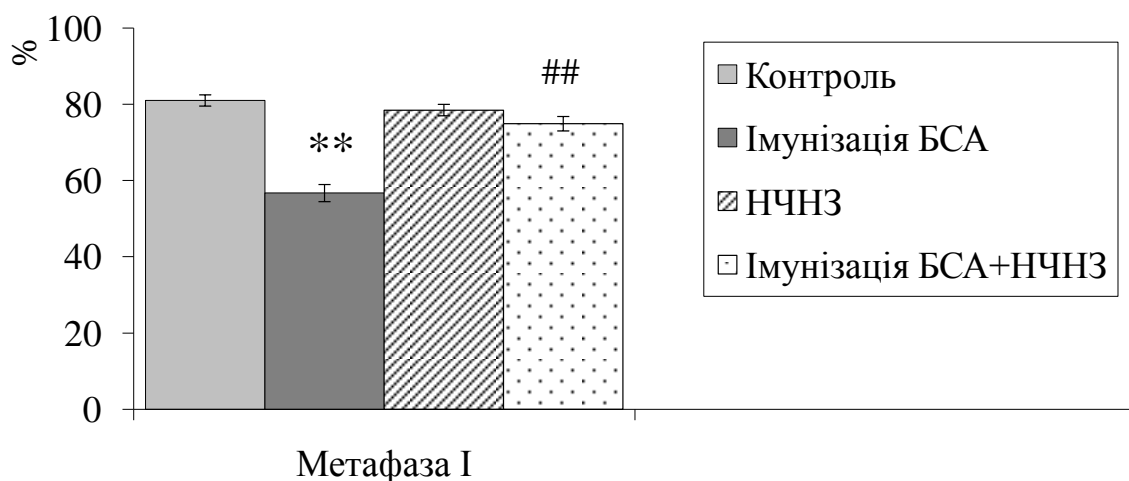


Рисунок 5.1.

Мейотичне дозрівання (метафаза I) ооцитів в умовах ЕІУ та застосування НЧНЗ. Примітки: ** - $p < 0,01$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних

відносно таких величин у контролі; ## - $p < 0,01$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі імунізація БСА.

В умовах ЕІУ застосування НЧНЗ призводить до покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів: частка ооцитів які розчинили зародковий пухирець та сформували перше полярне тільце збільшується до, відповідно, $74,89 \pm 1,66\%$ ($p < 0,01$, $n=6$) і $37,29 \pm 2,14\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з, відповідно, $56,70 \pm 2,81\%$ і $25,33 \pm 1,69\%$ в групі імунізація БСА (рис. 5.1. і рис.5.2) [20, 24, 29, 35, 44, 50, 233].

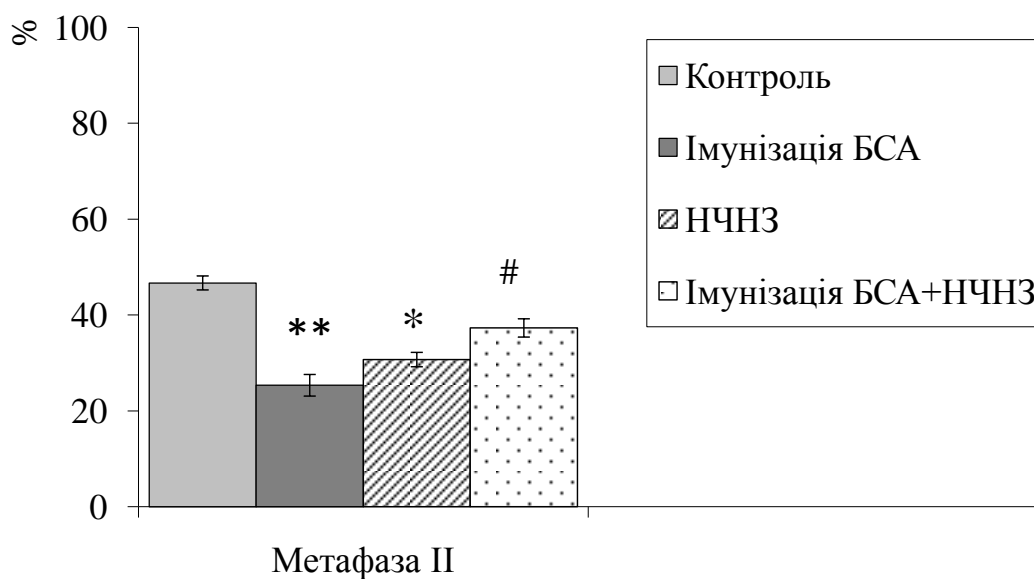


Рисунок 5.2.

Мейотичне дозрівання (метафаза II) ооцитів в умовах ЕІУ та застосування НЧНЗ.

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

Життєздатність та шляхи загибелі клітин ФОО. Встановлено, що введення тваринам НЧНЗ не призводить до вірогідних змін в кількості живих клітин ФОО, клітин з морфологічними ознаками апоптозу та некрозу і становить, відповідно, $81,80 \pm 1,64\%$, $15,80 \pm 1,11\%$ та $2,40 \pm 0,36\%$ (рис.5.3).

В умовах ЕІУ застосування НЧНЗ супроводжується зменшенням пригнічення параметрів життєздатності клітин ФОО, а саме кількість живих клітин збільшується до $70,40 \pm 1,07\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з $58,14 \pm 1,24\%$ в групі імунізація, а частка клітин з морфологічними ознаками некрозу зменшується і складає $4,80 \pm 0,46\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) порівняно з $12,00 \pm 0,82\%$ в групі імунізація. Кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу по відношенню до величини в групі імунізація вірогідно не відрізняється і становить $24,80 \pm 0,97\%$ (рис.5.3) [20, 24, 29, 35, 44, 50, 233].

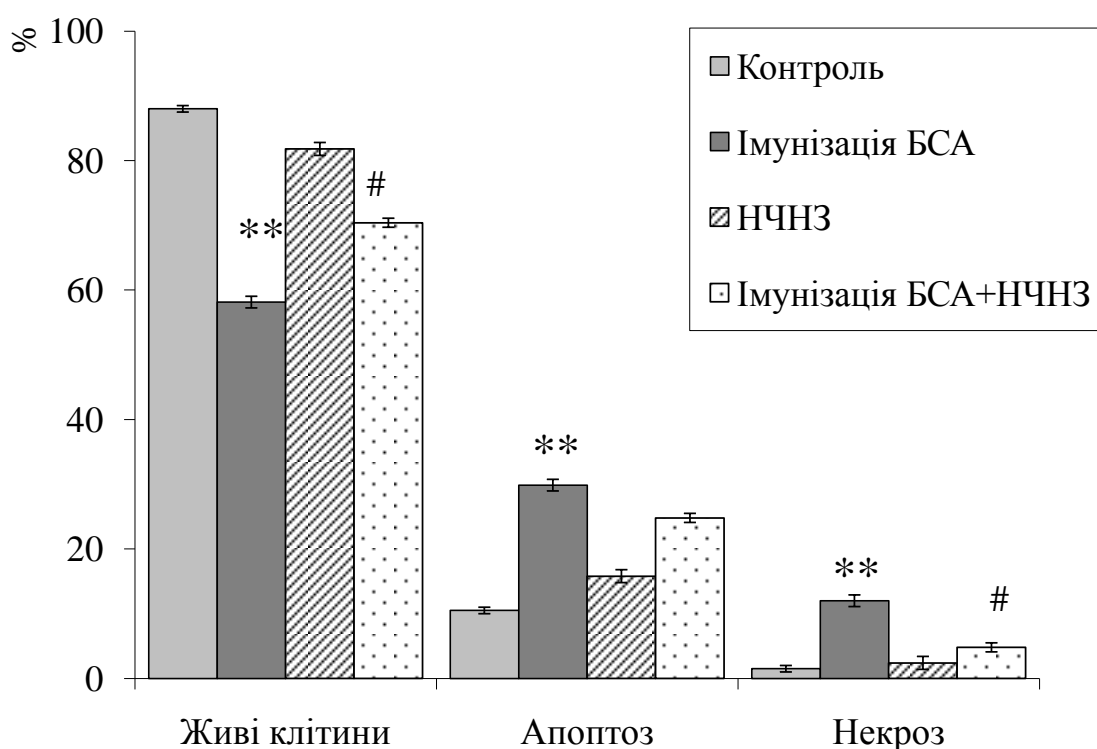


Рисунок.5.3.

Життєздатність клітин ФОО та шляхи їх загибелі за умов ЕІУ
та застосування НЧНЗ

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

Таким чином, введення тваринам НЧНЗ не впливає на параметри життєздатності клітин ФОО, але відмічається пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії формування зародкового пухирця (метафаза II). Однак, в умовах ЕІУ застосування НЧНЗ зумовлює покращення мейотичного дозрівання ооцитів, як на стадії метафаза I (до рівня контрольних значень), так і стадії метафаза II, а також до зменшення клітинної загибелі ФОО.

5.2. Життєздатність клітин тимуса та особливості розподілу ОНР ДНК їх ядер в умовах ЕІУ та застосування НЧНЗ

Життєздатність та шляхи загибелі клітин тимуса. Встановлено, що введення НЧНЗ не призводить до вірогідних змін в кількості живих клітин та клітин з морфологічними ознаками некрозу, в той час як кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу збільшується до $11,40 \pm 0,81\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з $5,57 \pm 0,53\%$ у контролі (рис.5.4) [29, 35, 44].

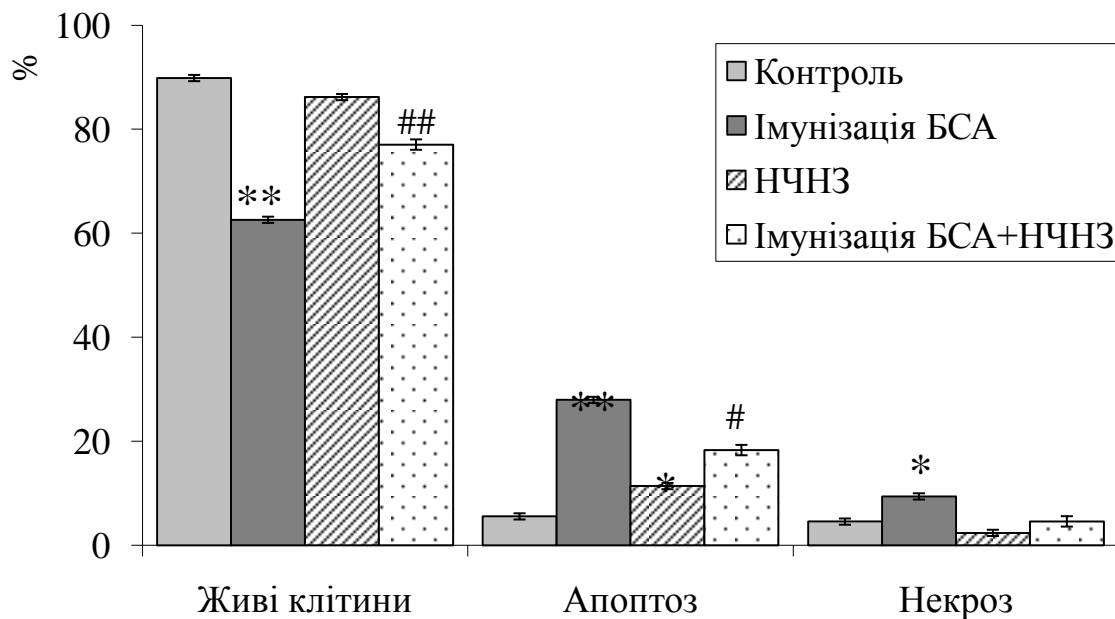


Рисунок 5.4.

Життєздатність та шляхи загибелі клітин тимуса в умовах ЕІУ та застосування НЧНЗ.

Примітки: * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ - вірогідності відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі; # - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$ -

вірогідності відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі імунізація БСА.

В умовах ЕІУ застосування НЧНЗ зумовлює зменшення пригнічення клітинної загибелі у тимусі, а саме збільшується частка живих клітин до $77,07 \pm 0,81\%$ ($p < 0,01$, $n=6$) по відношенню до $62,64 \pm 0,43\%$ у групі імунізація та зменшується кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу до $18,32 \pm 0,78\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з $27,96 \pm 0,95\%$ в групі імунізація. Кількість клітин тимуса з морфологічними ознаками некрозу вірогідно не змінюється і становить $4,61 \pm 1,78\%$ (рис.5.4) [20, 24, 29, 35, 44, 50, 233].

Розподіл ОНР ДНК ядер клітин тимуса. Встановлено, що введення НЧНЗ не призводить до збільшення кількості ОНР ДНК ядер клітин тимуса: частки клітин з ядрами 0/1-го, 2-го і 3-го класів залишаються в межах контрольних величин і становлять, відповідно, $72,17 \pm 8,53\%$, $22,67 \pm 8,91\%$ і $5,17 \pm 3,43\%$. Кількість клітин тимуса з ядрами 4-го класу зменшується аж до повної відсутності ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з $10,41 \pm 3,41\%$ в контролі.

В умовах ЕІУ застосування НЧНЗ супроводжується зміною розподілу ОНР ДНК ядер клітин тимуса у бік зменшення пошкодження: зростає кількість клітин з ядрами 0/1-го і 2-го класів до, відповідно, $29,51 \pm 7,63\%$ ($p < 0,01$, $n=6$) і $48,55 \pm 11,13\%$ ($p < 0,01$, $n=6$) у порівнянні з, відповідно, $8,36 \pm 6,72\%$ і $17,53 \pm 3,20\%$ у групі імунізація БСА; частка клітин з ядрами 4-го класу зменшується і складає $0,29 \pm 0,76\%$ ($p < 0,01$, $n=6$) по відношенню до $37,80 \pm 10,61\%$ в групі імунізація БСА. Кількість клітин з ядрами 3-го класу вірогідно не відрізняється від відповідної величини в групі імунізація і становить $21,65 \pm 5,82\%$ [20, 24, 29, 35, 44, 50, 233].

Дані про розподіл ОНР ДНК ядер клітин тимуса в умовах ЕІУ та застосування НЧНЗ представлено рис. 5.5.

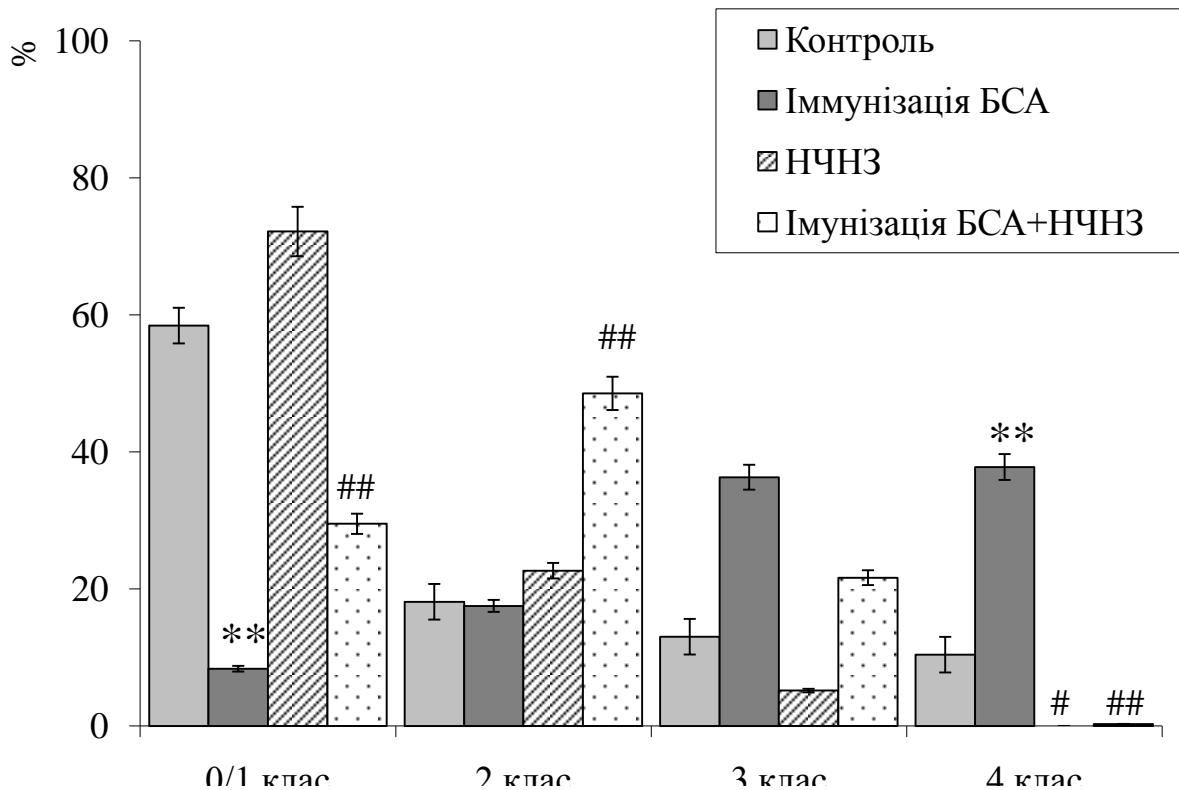


Рисунок 5.5.

Розподіл ОНР ДНК ядер клітин тимуса в умовах ЕІУ та застосування НЧНЗ. Примітки: ** - $p < 0,01$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольних тварин; # - $p < 0,05$; ## - $p < 0,01$ - вірогідності відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у тварин в групі імунізація БСА.

Таким чином, введення тваринам НЧНЗ зумовлює збільшення частки клітин тимуса з морфологічними ознаками апоптозу та не призводить до перерозподілу одониткових розривів ДНК.

В умовах ЕІУ застосування НЧНЗ спричиняє покращення параметрів життєздатності клітин тимуса – зростає частка живих клітин, знижується кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу, а також відмічається зниження кількості ОНР ДНК, що відповідає зменшенню ступеня пошкодження ДНК клітин тимуса.

5.3. Життєздатність клітин лімфатичних вузлів та особливості розподілу ОНР ДНК їх ядер в умовах ЕІУ та застосування НЧНЗ

Життєздатність та шляхи загибелі клітин ЛВ. Встановлено, що при веденні НЧНЗ відбувається збільшення кількості живих клітин ЛВ до $93,05 \pm 2,70\%$ ($p < 0,01$, $n=6$) та зменшення клітин з морфологічними ознаками апоптозу, до $5,43 \pm 1,90\%$ ($p < 0,01$, $n=6$), у порівнянні з, відповідно, $82,14 \pm 1,50\%$ та $13,57 \pm 3,20\%$ у контролі. Частка клітин з морфологічними ознаками некрозу залишається в межах контрольних величин і становить $1,50 \pm 1,95\%$ (рис. 5.6) [20, 24, 29, 35, 44].

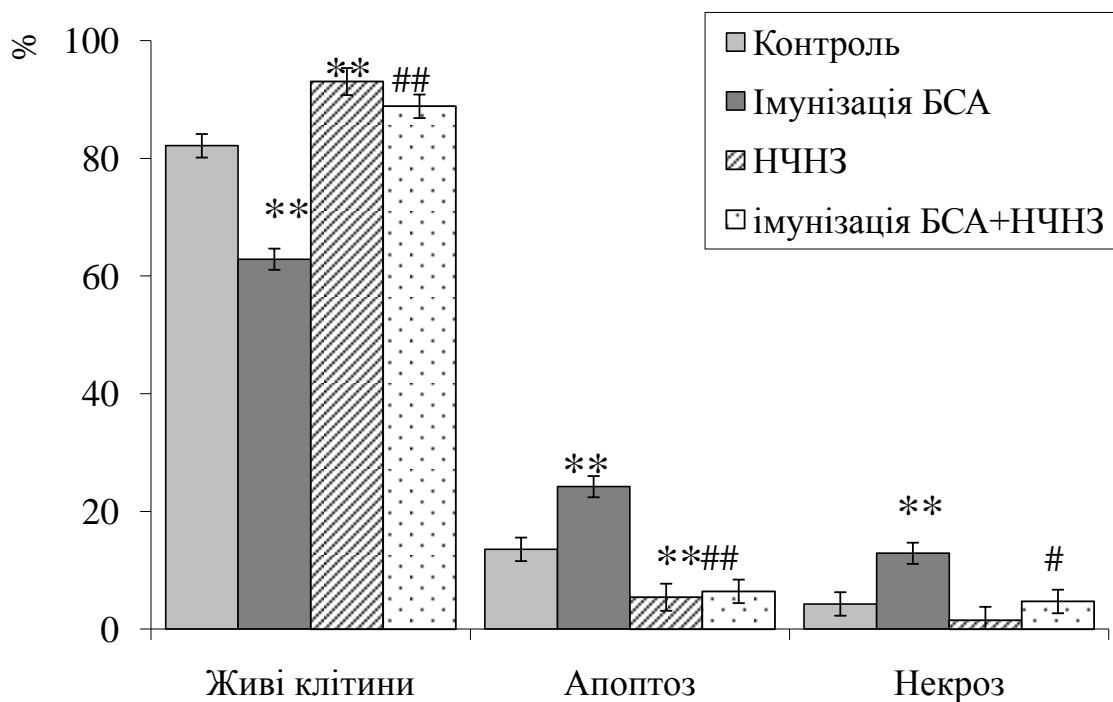


Рисунок 5.6.

Життєздатність та шляхи загибелі клітин ЛВ в умовах ЕІУ та застосування НЧНЗ.

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

В умовах ЕІУ і застосуванні НЧНЗ спостерігається зменшення клітинної загибелі у ЛВ. Частка живих клітин зростає до $88,85 \pm 2,13\%$ ($p < 0,01$, $n=6$) по відношенню до $62,87 \pm 1,27\%$ у групі імунізація БСА, а частки клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу зменшуються до, відповідно, $6,43 \pm 0,91\%$ ($p < 0,01$, $n=6$) і $4,71 \pm 2,90\%$ ($p < 0,01$, $n=6$) у порівнянні з, відповідно, $24,22 \pm 2,23\%$ і $12,92 \pm 1,73\%$ в умовах ЕІУ (рис. 5.6) [20, 24, 29, 35, 44, 50].

Розподіл ОНР ДНК ядер клітин ЛВ. Встановлено, що введення НЧНЗ не чинить вплив на кількість ОНР ДНК ядер клітин ЛВ: частки клітин ЛВ з ядрами 0/1-го, 2-го, 3-го і 4-го класів залишаються в межах контрольних величин і складають, відповідно, $55,71 \pm 5,32\%$, $27,39 \pm 5,61\%$, $16,90 \pm 3,19\%$ і $0 \pm 0\%$ (рис. 5.7) [20, 24, 29, 35, 44].

В умовах ЕІУ застосування НЧНЗ призводить до зниження пошкодження ДНК клітин ЛВ. Частка клітин з ядрами 4-го класу зменшується до $14,40 \pm 7,02\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з $35,43 \pm 5,97\%$ в групі імунізація. Кількість клітин з ядрами 0/1-го, 2-го, 3-го класів вірогідно не відрізняються від таких величин в групі імунізація і складають, відповідно, $25,00 \pm 5,56\%$, $27,40 \pm 5,41\%$ і $33,20 \pm 8,61\%$ (рис. 5.7) [50, 233].

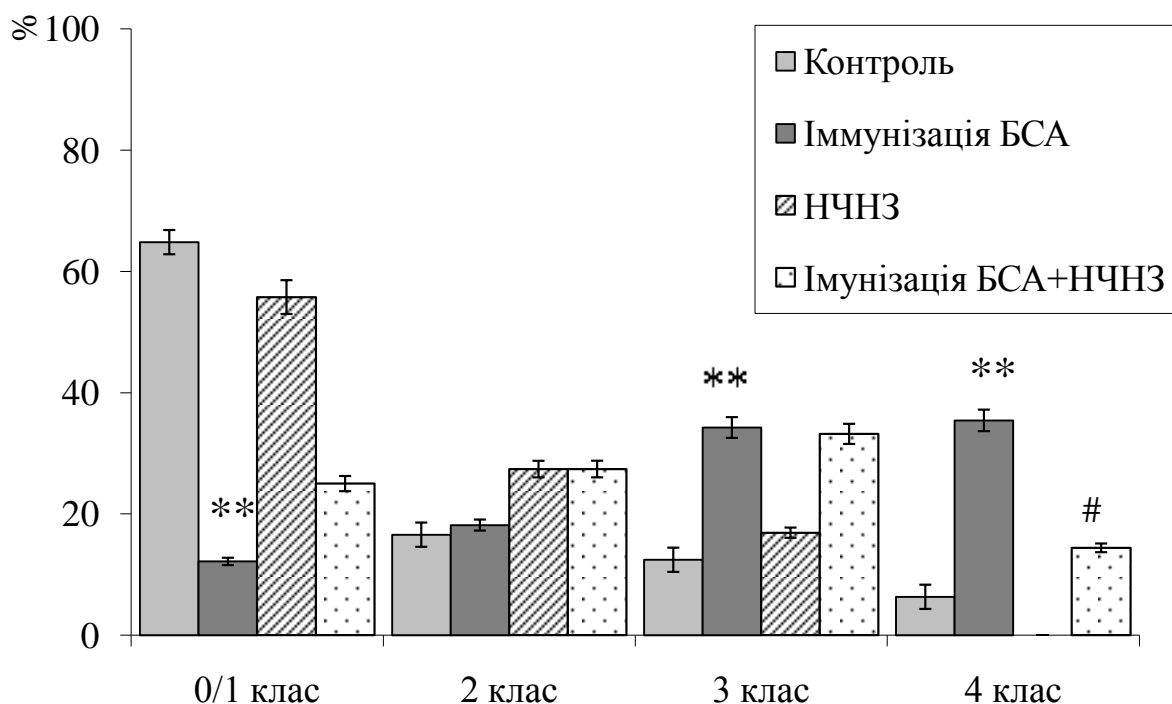


Рисунок 5.7.

Розподіл ОНР ДНК ядер клітин ЛВ в умовах ЕІУ та застосування НЧНЗ.

Примітки: ** - $p < 0,01$ - 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 імунізація БСА.

Таким чином, введення НЧНЗ призводить до збільшення у ЛВ живих клітин та зменшення клітин з морфологічними ознаками апоптозу та не чинить впливу на кількість ОНР ДНК ядер клітин ЛВ.

В умовах ЕІУ застосування НЧНЗ викликає зменшення клітинної загибелі у ЛВ та перерозподіл ОНР ДНК ядер клітин в бік зменшення пошкодження ДНК.

5.4. Функціональний стан яєчника в умовах ЕІУ, введення блокатора iNOS, субстрата NOS і застосування НЧНЗ

Мейотичне дозрівання ооцитів. Встановлено, що в умовах ЕІУ:

1) введення АГ (блокатор iNOS) зумовлює зменшення пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафаза I. Кількість ооцитів, які розчинили зародковий пухирець збільшується і становить $66,88 \pm 2,96\%$ ($p < 0,05$, $n=11$) у порівнянні з $53,69 \pm 2,20\%$ в групі імунізації. Частка ооцитів, що сформували перше полярне тільце вірогідно не відрізняється від такої величини в групі імунізація і складає $40,82 \pm 4,94\%$ (рис.5.8, рис.5.9);

2) введення L-аргініна (субстрат NOS) посилює пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафаза I, а саме: кількість ооцитів, які розчинили зародковий пухирець зменшується і становить $35,29 \pm 1,20\%$ ($p < 0,05$, $n=11$) у порівнянні з $53,69 \pm 2,20\%$ в групі імунізація БСА. Кількість ооцитів які сформували перше полярне тільце вірогідно не відрізняється від такої величини в групі імунізація і становить $37,67 \pm 3,18\%$ (рис.5.8, рис.5.9);

3) застосування НЧНЗ і введення L-аргініна покращує параметри мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафаза I. Кількість ооцитів, які розчинили зародковий пухирець зростає і становить $44,54 \pm 2,69\%$ ($p < 0,05$, $n=11$) у порівнянні з $35,29 \pm 1,20\%$ в групі імунізації та введення L-аргініна. Частка ооцитів, що сформували перше полярне тільце вірогідно не відрізняється від такої величини в групі імунізація та введення L-аргініна і становить $36,18 \pm 2,86\%$ (рис.5.8, рис.5.9) [34, 36-38, 41].

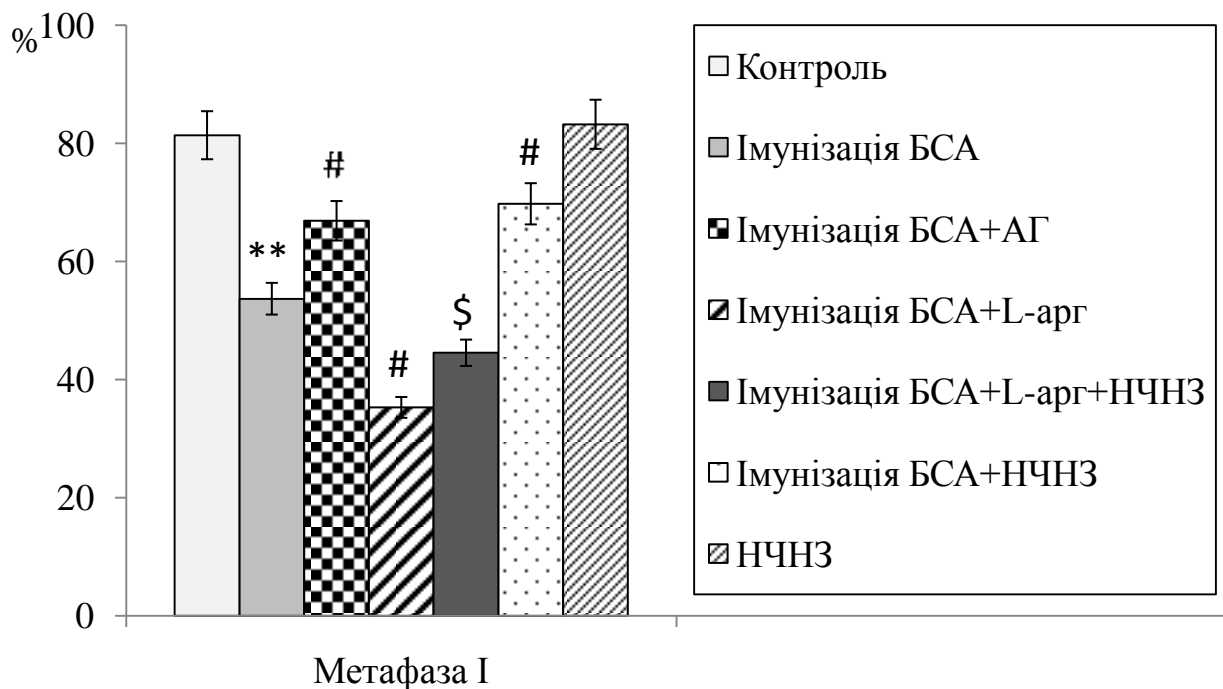


Рисунок 5.8.

Мейотичне дозрівання ооцитів (метафаза I) в умовах EIU, введення АГ, L -аргініна і застосування НЧНЗ.

Примітки: ** $p < 0,01$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі; # $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин в групі імунізація; \$ $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин в групі імунізація та введення L-аргініна.

Таким чином, при EIU: 1) застосування блокатора iNOS (АГ) зумовлює зменшення пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафаза I, тоді як, введення субстрата NOS (L-аргініна) за таких умов, – до його посилення по відношенню до відповідних величин в групі імунізація 2) застосування НЧНЗ разом з L-аргініном покращує параметри мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафаза I по відношенню до відповідних величин у групі імунізація та введення L-аргініна.

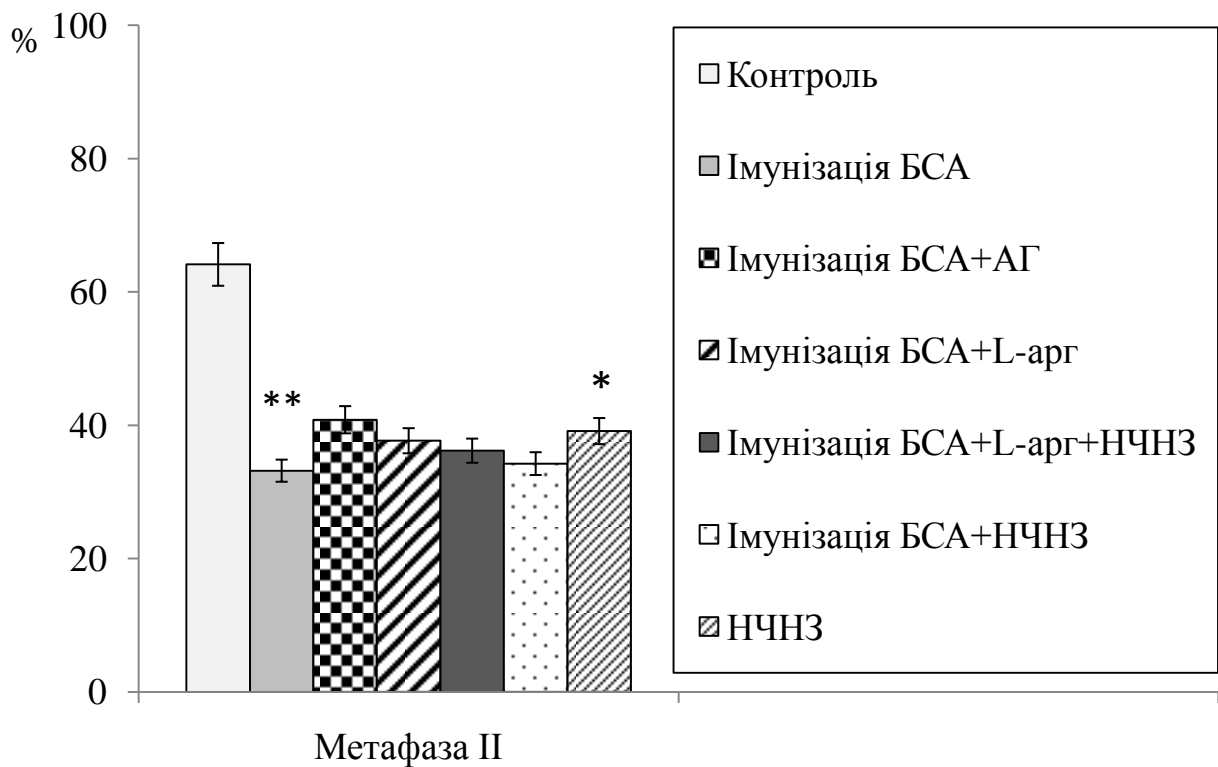


Рисунок 5.9.

Мейотичне дозрівання ооцитів (метафаза II) в умовах ЕІУ, введення АГ, L-аргініна і застосування НЧНЗ.

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

Життєздатність клітин ФОО та шляхи їх загибелі. Встановлено, що в умовах ЕІУ:

1) введення АГ спричиняє збільшення кількості живих клітин ФОО до $84,66 \pm 1,36\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з $60,92 \pm 1,06\%$ в групі імунізація та до зменшення частки клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу до, відповідно, $12,09 \pm 1,15\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) і $3,25 \pm 0,25\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з, відповідно, $21,25 \pm 1,75\%$ і $17,83 \pm 0,60\%$ в умовах ЕІУ (рис.5.10);

2) введення L-аргініна (субстрат NOS) не призводить до вірогідних змін в кількості живих клітин, клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу по відношенню до відповідних величин в групі імунізація, що становить, відповідно, $62,00 \pm 1,66\%$, $20,50 \pm 1,08\%$ і $15,50 \pm 1,47\%$ (рис.5.10);

3) застосування НЧНЗ і введення L-аргініна зумовлює зменшення клітинної загибелі, а саме: кількість живих клітин ФОО зростає до $73,06 \pm 1,50\%$ ($p < 0,05$, $n=8$) у порівнянні з $62,00 \pm 1,66\%$ при імунізації та введенні L-аргініна, кількість клітин з морфологічними ознаками некрозу зменшується до $6,31 \pm 0,92\%$ ($p < 0,05$, $n=8$) у порівнянні з $15,50 \pm 1,47\%$ за умов імунізації та введення L-аргініна. Частка клітин з морфологічними ознаками апоптозу вірогідно не відрізняється від відповідної величини за умов імунізації та введенні L-аргініна, і складає $22,63 \pm 1,06\%$ (рис.5.10) [36-38, 41].

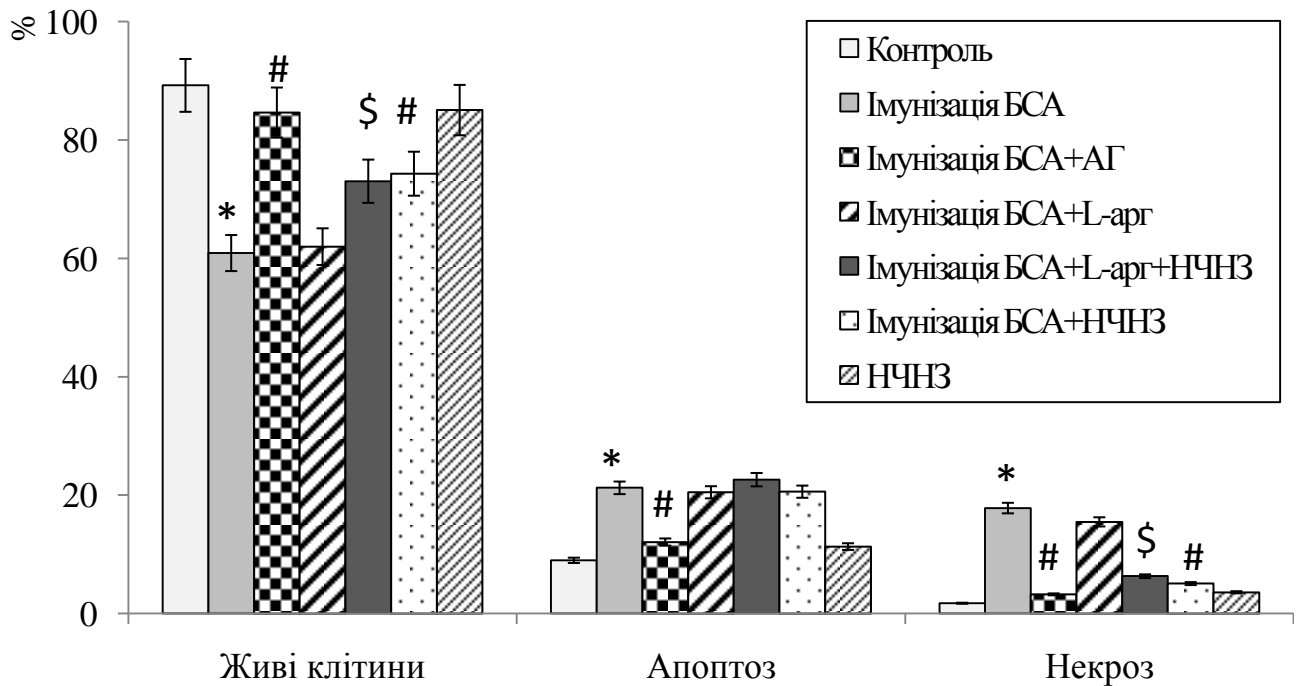


Рисунок 5.10.

Життєздатність клітин ФОО та шляхи їх загибелі в умовах ЕІУ, введення АГ, L-аргініна і застосування НЧНЗ.

Примітки: * $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі; # $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин в групі імунізація; \$ $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин в групі імунізація та введення L-аргініна.

Таким чином, в умовах ЕІУ: 1) введення АГ знижує клітинну загибель ФОО, а саме: збільшується частка живих клітин, а частки клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу зменшуються по відношенню до відповідних величин в групі імунізація; 2) введення L-аргініна вірогідно не впливає на параметри життєздатності клітин ФОО по відношенню до відповідних величин в групі імунізації; 3) застосування НЧНЗ і введення L-аргініна зумовлює зменшення клітинної загибелі ФОО. Кількість живих клітин зростає, а кількість клітин з морфологічними ознаками некрозу знижується у порівнянні з відповідними величинами в групі імунізація та введення L-аргініна.

Розподіл ОНР ДНК ядер клітин ФОО.

Встановлено, в умовах ЕІУ введення АГ, як і L-аргініна призводить до зменшення кількості ОНР ДНК, що свідчить про зниження пошкодження ДНК клітин ФОО. Застосування НЧНЗ і введення L-аргініна в умовах ЕІУ зумовлює збільшення частки клітин ФОО з ядрами 2-го класу та зменшення частки клітин з ядрами 3-го по відношенню до величин у групі імунізація і введення L-аргініна [36, 38, 41].

Дані про розподіл ОНР ДНК ядер клітин ФОО в умовах ЕІУ, введення АГ, L-аргініна і застосування НЧНЗ представлено у таблиці 5.1.

Таблиця 5.1.

Розподіл ОНР ДНК ядер клітин ФОО в умовах ЕІУ, введення АГ, L-аргініна і застосування НЧНЗ. Розподіл ДНК-комет за класами у %.

Група тварин	0/1 клас	2 клас	3 клас	4 клас
Контроль n=6	64,33±1,40	16,25±1,86	13,58±1,88	5,83±0,82
Імунізація БСА n=6	17,42±0,97**	27,25±1,72	28,00±1,70*	27,33±1,72**
Імунізація БСА + АГ n=6	36,83±1,37##	34,92±1,24	18,67±1,47#	9,58±1,39#
Імунізація БСА + L-арг n=6	16,08±4,38	38,75±2,38#	31,58±1,46	13,58±1,11#
Імунізація БСА + L-арг + НЧНЗ n=6	20,58±0,58	51,42±1,32\$	18,08±2,29\$	9,92±1,16
НЧНЗ n=6	42,10±3,86*	37,32±3,04*	12,66±1,05	7,92±0,72
Імунізація БСА+НЧНЗ n=6	27,96±1,22#	52,04±3,18#	8,26±1,63#	11,74±1,09#

Примітки: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – вірогідності відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ – вірогідності відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин в групі імунізація; \$ $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин в групі імунізація та введення L-аргініна; n-кількість повторів.

5.5. Життєздатність клітин тимуса та особливості розподілу ОНР ДНК їх ядер в умовах ЕІУ та введення блокатора iNOS, субстрата NOS і застосування НЧНЗ

Життєздатність клітин тимуса. Встановлено, що в умовах ЕІУ:

1) введення АГ призводить до зниження клітинної загибелі, а саме: кількість живих клітин збільшується до $85,08 \pm 1,29\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з $67,33 \pm 2,15\%$ в групі імунізація, а частка клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу зменшується до, відповідно, $10,92 \pm 0,92\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) і $4,00 \pm 0,25\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з, відповідно, $22,42 \pm 1,07\%$ і $10,25 \pm 0,90\%$ у групі імунізація;

2) введення L-аргініна не чинить пригнічуючого впливу на параметри життєздатності клітин тимуса по відношенню до величин групи імунізація БСА. Частка живих клітин становить $75,86 \pm 0,80\%$, а клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу, відповідно, $15,71 \pm 1,01\%$ і $6,43 \pm 0,48\%$.

3) застосування НЧНЗ і введення L-аргініна не чинить впливу на параметри життєздатності клітин тимуса. Частки живих клітин, клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу вірогідно не відрізняються від величин в групі імунізація БСА та введення L-аргініна і складають, відповідно, $81,81 \pm 0,86\%$, $14,56 \pm 1,27\%$ і $3,63 \pm 0,33\%$ [41].

Таким чином, в умовах ЕІУ: при введенні блокатора iNOS зменшується клітинна загибель у тимусі, а саме збільшується частка живих клітин і зменшується частка клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу; введення L-аргініна не чинить пригнічуючого впливу на параметри життєздатності клітин тимуса по відношенню до величин групи імунізація.

Дані про зміни параметрів життєздатності клітин тимуса в умовах ЕІУ, введення АГ, L-аргініна і застосування НЧНЗ представлено на рисунку 5.11 [41].

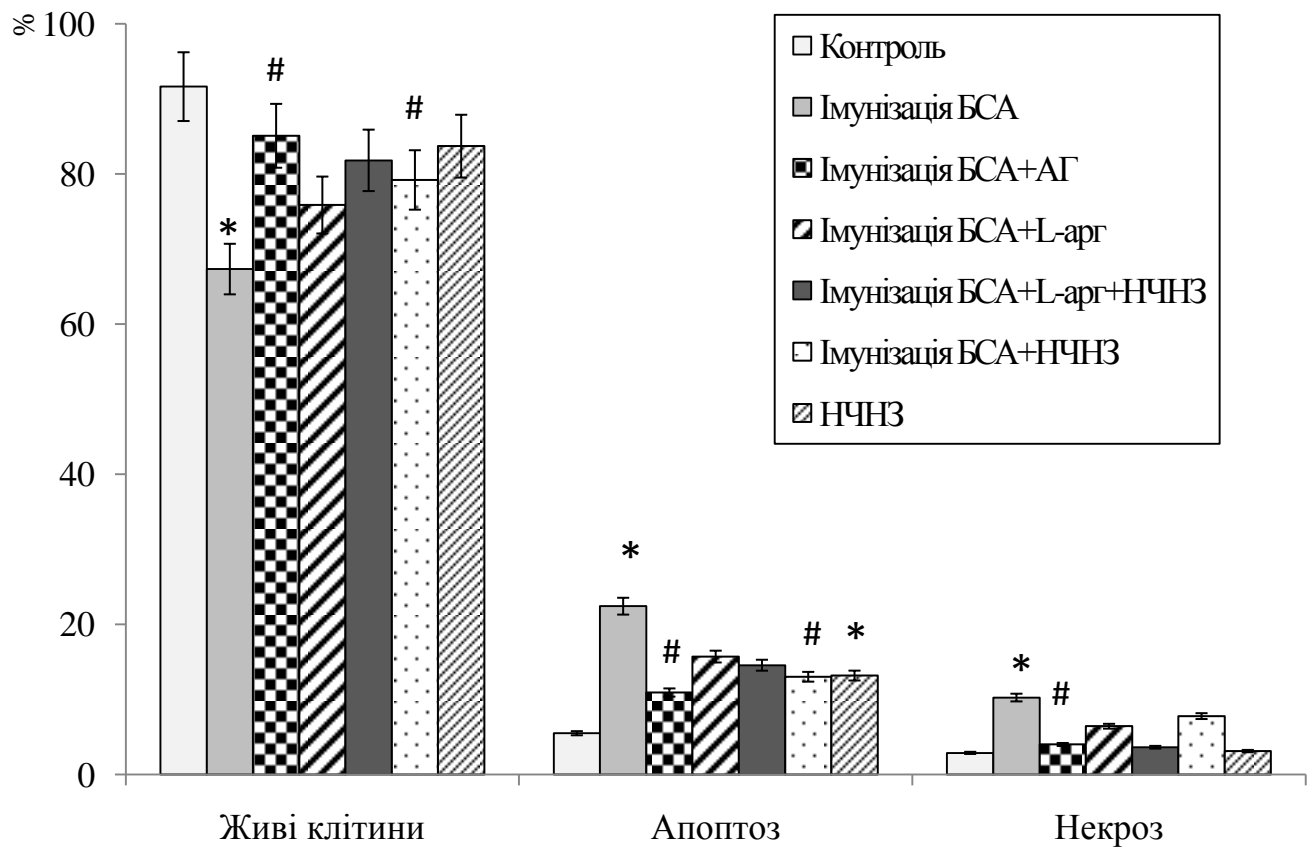


Рисунок 5.11.

Кількість клітин тимуса з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу в умовах ЕІУ, введення АГ, L-аргініна і застосування НЧНЗ.

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

Розподіл одноститкових розривів ДНК ядер клітин тимуса. Дані про розподіл ОНР ДНК ядер клітин тимуса в умовах ЕІУ, введення АГ, L-аргініна і застосування НЧНЗ представлені у таблиці 5.2.

Таблиця 5.2.

Розподіл ОНР ДНК ядер клітин тимуса в умовах ЕІУ, введення АГ, L-аргініна і застосування НЧНЗ. Розподіл ДНК-комет за класами у %.

Група тварин	0/1 клас	2 клас	3 клас	4 клас
Контроль n=6	70,17±1,72	15,67±1,03	8,83±0,75	5,33±1,03
Імунізація БСА n=6	9,00±0,91*	8,00±0,31*	37,50±0,58*	45,50±1,26*
Імунізація БСА+АГ n=6	50,67±2,89#	23,08±3,33#	11,26±0,44#	15,06±0,42#
Імунізація БСА + L-арг n=6	15,67±3,44	25,00±2,45#	36,00±2,54	23,33±1,03#
Імунізація БСА + L-арг+НЧНЗ n=6	27,50±2,17\$	36,67±1,75\$	25,50±1,52\$	10,33±1,03\$
НЧНЗ n=6	68,15±5,62	20,94±2,20	10,91±0,93	0±0
Імунізація БСА + НЧНЗ n=6	26,48±2,96#	50,02±4,10#	20,61±0,60#	2,89±0,15#

Примітки: * $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі; # $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин в групі імунізація; \$ $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин в групі імунізація та введення L-аргініна; n-кількість повторів.

Встановлено, що в умовах ЕІУ: 1) введення АГ призводить до зменшення частки ядер клітин тимуса з максимальним пошкодженням ДНК (ядра 3-го і 4-го класів); 2) введення L-аргініна зумовлює збільшення частки клітин тимуса з ядрами 2-го класу та зменшення з ядрами 4-го класу; 3) застосування НЧНЗ і введення L-аргініна викликає зменшення клітин тимуса з ядрами 3-го, 4-го класів, що свідчить про зниження пошкодження їх ДНК [40-41].

5.6. Життєздатність клітин лімфатичних вузлів та особливості розподілу ОНР ДНК їх ядер в умовах ЕІУ та введення блокатора iNOS, субстрата NOS і застосування НЧНЗ

Життєздатність клітин ЛВ. Встановлено, що в умовах ЕІУ:

1) ведення АГ призводить до зниження клітинної загибелі, а саме: кількість живих клітин ЛВ збільшується до $78,80 \pm 2,57\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з $60,25 \pm 3,07\%$ в групі імунізація; кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу зменшується до, відповідно, $15,80 \pm 1,47\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) і $5,40 \pm 0,37\%$ ($p < 0,05$, $n=6$) у порівнянні з, відповідно, $25,42 \pm 2,16\%$ і $14,33 \pm 0,95\%$ у групі імунізація (рис.5.12).

2) введення L-аргініна не чинить пригнічуючого впливу на параметри життєздатності клітин ЛВ по відношенню до величин групи імунізація БСА. Частка живих клітин становить $79,09 \pm 2,05\%$, а клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу, відповідно, $16,22 \pm 1,49\%$ і $4,69 \pm 0,31\%$ (рис.5.12).

3) застосування НЧНЗ і введення L-аргініна зумовлює зменшення клітинної загибелі. Частка живих клітин ЛВ зростає до $79,09 \pm 2,05\%$ ($p < 0,05$, $n=8$) у порівнянні з $70,00 \pm 1,77\%$ в групі імунізація та введення L-аргініна, а частка клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу зменшується до, відповідно, $16,22 \pm 1,49\%$ ($p < 0,05$, $n=8$) і $4,69 \pm 0,31\%$ ($p < 0,05$, $n=8$) у порівнянні з, відповідно, $21,33 \pm 1,20\%$ і $8,67 \pm 0,24\%$ в групі імунізація та введення L-аргініна (рис.5.12) [41].

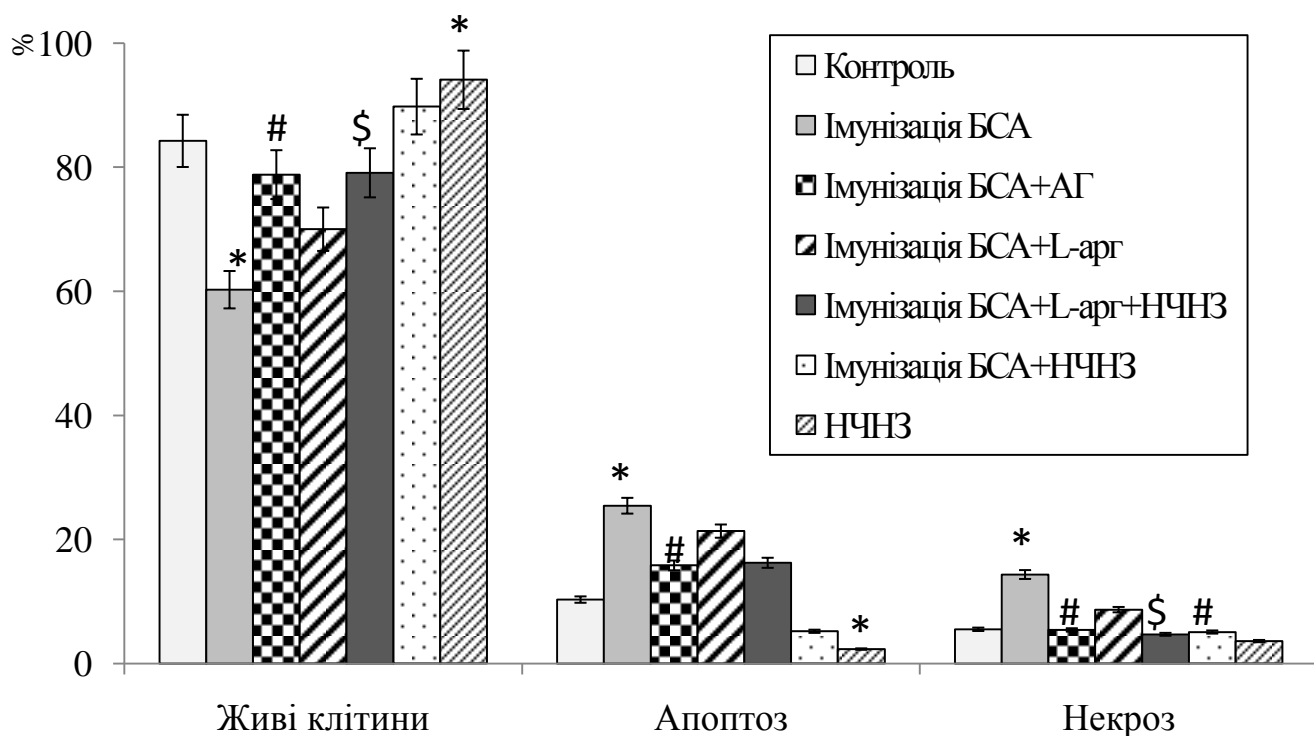


Рисунок 5.12.

Життєздатність та шляхи загибелі клітин ЛВ в умовах ЕІУ, введення АГ, L-аргініна і застосування НЧНЗ.

Примітки: * $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі; # $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин в групі імунізація; \$ $p < 0,05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин в групі імунізація та введення L-аргініна.

Розподіл ОНР ДНК ядер клітин ЛВ. Встановлено, що в умовах ЕІУ: 1) введення АГ, як і L-аргініна призводить до змін у розподілі ядер клітин ЛВ з ОНР ДНК у бік зменшення пошкодження; 2) застосування НЧНЗ і введення L-аргініна призводить до зменшення частки клітин ЛВ з ядрами 4-го класу та збільшення частки з ядрами 0/1-го [40, 41].

Дані про розподіл ОНР ДНК ядер клітин ЛВ в умовах ЕІУ, введення АГ, L-аргініна і застосування НЧНЗ представлені у таблиці 5.3.

Таблиця 5.3.

Розподіл ОНР ДНК ядер клітин ЛВ в умовах ЕІУ, введення АГ, L-аргініна і застосування НЧНЗ. Розподіл ДНК-комет за класами у %.

Група тварин	0/1 клас	2 клас	3 клас	4 клас
Контроль n=6	63,13±7,94	14,05±3,12	14,97±1,39	7,85±0,62
Імунізація БСА n=6	6,65±0,39 *	15,33±3,96	41,00±6,16 *	37,02±2,43 *
Імунізація БСА+АГ n=6	28,32±3,80 #	31,11±6,43 #	27,55±2,50 #	13,02±2,01 #
Імунізація БСА + L-арг n=6	13,83±1,71	28,50±1,72 #	32,00±4,12	25,67±2,34 #
Імунізація БСА + L-арг+НЧНЗ n=6	26,33±2,59\$	29,33±4,62	29,67±7,37	14,67±2,31\$
НЧНЗ n=6	58,26±5,16	24,50±2,50	17,24±1,60	0±0 *
Імунізація БСА + НЧНЗ n=6	27,20±2,90 ##	20,12±5,20	34,46±4,14	18,22±1,52 #

Примітки: * $p<0.05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контрольній групі; # $p<0.05$, ## $p<0.01$ – вірогідності відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин в групі імунізація; \$ $p<0.05$ – вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин в групі імунізація та введення L-аргініна; n-кількість повторів.

Отже, оцінюючи функціональний стан яєчників, тимуса і ЛВ в умовах ЕІУ та застосуванні НЧНЗ зроблено наступні узагальнення:

Введення тваринам НЧНЗ не впливає на параметри мейотичне дозрівання ооцитів на стадії метафази I, але спричиняє пригнічення на стадії формування

зародкового пухирця (метафаза II); не змінює клітинну загибель у ФОО, тимусі і ЛВ та не впливає на розподіл ОНР ДНК ядер клітин органів імунної системи.

Застосування НЧНЗ в умовах ЕІУ зменшує пригнічення параметрів життєздатності клітин ФОО, клітин тимуса і ЛВ – зростає кількість живих клітин, а частка клітин з морфологічними ознаками некрозу і апоптозу знижується. Окрім цього, зменшується ступінь пошкодження ДНК клітин тимуса і ЛВ; мейотичне дозрівання ооцитів відновлюється до рівня контрольних значень, тоді як на стадії формування першого полярного тільца (метафаза II) пригнічення залишається вірогідним (на 9%) відносно контрольних величин.

В умовах ЕІУ введення блокатора iNOS АГ покращує відновлення мейотичного дозрівання ооцитів та зменшує клітинну загибель ФОО, а також відмічається перерозподіл ОНР ДНК ядер клітин ФОО у бік зменшення кількості ядер, яким відповідає максимальне ушкодження ДНК; введення субстрата NOS L-аргініна за даних експериментальних умов спричиняє пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафаза I та не впливає на життєздатність клітин ФОО, однак відмічається перерозподіл ОНР ДНК ядер клітин ФОО у бік зменшення пошкодження.

В умовах ЕІУ і введення блокатора iNOS АГ спостерігається покращення параметрів життєздатності клітин тимуса і ЛВ та зменшується ступінь пошкодження їх ДНК. При застосуванні субстрата NOS L-аргініна за даних експериментальних умов не супроводжується посиленням клітинної загибелі в тимусі і ЛВ, відмічається зменшення кількості ОНР ДНК у їх ядрах, що свідчить про зменшення пошкодження ДНК.

В умовах ЕІУ, введення субстрата NOS L-аргініна і застосування НЧНЗ чинить позитивний ефект на мейотичне дозрівання ооцитів (метафаза I), окрім цього спостерігається зменшення клітинної загибелі та ступеня пошкодження ДНК клітин ФОО; у ЛВ відмічається зменшення клітинної загибелі; у ЛВ і тимусі ступінь пошкодження ДНК знижується.

РОЗДІЛ 6

Вплив антиоксиданта, блокатора ПАРП, субстрата NOS, блокатора iNOS на *in vitro* відновлення мейотичного дозрівання ооцитів та на розподіл одониткових розривів ДНК ядер ооцитів

Нами, з використанням моделі EIU та введенням антиоксиданта, блокатора iNOS, субстрата NOS та експериментальної субстанції НЧНЗ було досліджено особливості розподілу ОНР ДНК ядер клітин ФОО, тимуса і лімфатичних вузлів (результати приведені у розділах 3, 4, 5).

Дані представлені в сучасній літературі, що описують зв'язок між АФК, запаленням і запрограмованою загибеллю клітин, а також отримані нами дані дають підстави сформулювати таку *робочу гіпотезу*: NO бере участь в регуляції репарації ОНР ДНК ядра клітин (як соматичних, так і герменативних).

Тому наступним завданням було дослідження впливу антиоксиданта (ресвератрол), блокатора ПАРП-1 (4-ГК), субстрата NOS (L-аргініна), блокатора iNOS (АГ) на відновлення мейотичного дозрівання ооцитами і розподіл одониткових розривів ДНК ооцитів *in vitro*.

6.1. Вплив різних концентрацій 4-ГК, АГ, L-аргініна і ресвератрола на відновлення мейозу ооцитами *in vitro*

Встановлено, що 4-ГК в концентраціях 0,0001 mM, і 0,01 mM не чинить впливу на відновлення мейотичного дозрівання ооцитів. Однак, у більш високих концентраціях – 1,0 mM, 10,0 mM препарат має дозозалежну супресивну дію та призводить до пригнічення ($p < 0.05$, $n=6$) відновлення мейотичного дозрівання ооцитів у порівнянні з величиною у контролі (таб. 6.1.).

Після 4 год культивування ооцитів разом з L-аргініном в концентраціях 0,0004 mM і 0,04 mM нами не було відмічено вірогідних відмінностей у досягненні ними метафази I по відношенню до контролю, проте в концентраціях 4,0 mM і

40,0 mM спостерігається дозозалежне пригнічення ($p<0.05$, $n=6$) відновлення мейотичного дозрівання (таб. 6.1.).

АГ в концентрації 0,0002 mM не чинить впливу на відновлення мейотичного дозрівання ооцитів, але в концентраціях 0,02 mM, 2,0 mM і 20,0 mM призводить до зменшення ($p<0.05$, $n=6$) частки ооцитів, що розчинили зародковий пухирець порівняно з показником у контролі (таб. 6.1.).

При дії ресвератрола в концентраціях 0,002 μ M, 2,0 μ M і 0,2 mM не спостерігаються зміни у відновленні мейотичного дозрівання ооцитів. Однак, у значно вищій концентрації – 2,0 mM, останній пригнічує ($p<0.05$, $n=7$) відновлення мейотичного дозрівання ооцитів у порівнянні з величиною у контролі (таб. 6.1.)

Таблиця 6.1.

Вплив різних концентрацій 4-ГК, АГ, L-аргініна і ресвератрола на ооцити

Речовина (концентрація) / МЕТАФАЗА І (%)			
Контроль, n=8		80,00±2,67	
4-ГК			
0,0001 mM , n=6	0,01 mM , n=6	1,0 mM , n=6	10,0 mM , n=7
76,00± 2,39	73,33±3,09	36,67±1,54 *	21,43±2,26 *
L-аргінін			
0,0004mM , n=6	0,04mM , n=6	4,0 mM , n=6	40,0 mM , n=6
79,44±1,83	78,89±1,50	45,56±1,50 *	24,44±1,50 *
Аміногуанідин			
0,0002 mM , n=6	0,02 mM , n=6	2,0 mM , n=6	20,0 mM , n=6
76,67±1,09	55,56±1,63 *	47,78±1,50 *	20,00±1,26 *
Ресвератрол			
0,02μM , n=6	2,0 μM , n=6	0,2 mM , n=6	2,0 mM , n=7
76,00±2,03	86,67±1,78	74,44±1,49	55,24±1,65 *

Примітки: * - $p<0.05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у контролі; n- загальна кількість повторів

Таким чином, у подальших дослідженнях будуть використані речовини в наступних концентраціях: 4-ГК – 1 mM; АГ – 0,02 mM; L-аргінін – 0,04 mM; ресвератрол – 2,0 μM.

6.2. Вплив комбінацій речовин 4-ГК і АГ, 4-ГК і L-аргініна, 4-ГК і ресвератрола, АГ і ресвератрола на відновлення мейозу ооцитами *in vitro*

Нами показано, що і 4-ГК (1mM) і АГ (0,02 mM) пригнічують відновлення мейотичного дозрівання ооцитів. Частка ооцитів, що розчинила зародковий пухирець зменшується до, відповідно, $35,56 \pm 1,50\%$ ($p < 0.05$, $n=12$) і $57,50 \pm 1,19\%$ ($p < 0.05$, $n=18$) у порівнянні з $81,39 \pm 1,13\%$ в контролі (рис.6.1.)

Не встановлено ефекту впливу L-аргініна (0,04 mM) та ресвератрола (2,0 μM) на відновлення мейозу, частка ооцитів, що розчинила зародковий пухирець складає, відповідно, $78,89 \pm 1,50\%$ і $79,44 \pm 1,52\%$ та вірогідно не відрізняється від величини у контролі (рис.6.1.).

За умов сумісного впливу 4-ГК (1mM) і АГ (0,02 mM) спостерігається пригнічення відновлення мейотичного дозрівання ооцитів, а саме частка ооцитів, що розчинила зародковий пухирець зменшується до $35,83 \pm 1,75\%$ ($p < 0.05$, $n=8$) по відношенню до величин за умов впливу АГ (0,02 mM) - $57,50 \pm 1,19\%$. При сумісному впливі АГ (0,02 mM) і ресвератрола (2,0 μM) частка ооцитів, що розчинила зародковий пухирець зростає до $77,50 \pm 2,16\%$ ($p < 0.05$, $n=8$) у порівнянні з $57,50 \pm 1,19\%$ за умов дії АГ (0,02 mM). За умов сумісного впливу 4-ГК (1 mM) і ресвератрола (2,0 μM) частка ооцитів, що розчинила зародковий пухирець зростає до $70,83 \pm 1,75\%$ ($p < 0.05$, $n=8$) у порівнянні з $35,56 \pm 1,50\%$ за умов культивування з 4-ГК (1 mM). За сумісного впливу 4-ГК (1 mM) і L-аргініна (0,04 mM) частка ооцитів, що розчинила зародковий пухирець зростає до $63,33 \pm 2,18\%$ ($p < 0.05$, $n=8$) у порівнянні з $35,56 \pm 1,50\%$ за умов культивування з 4-ГК (1 mM) (рис.6.1).

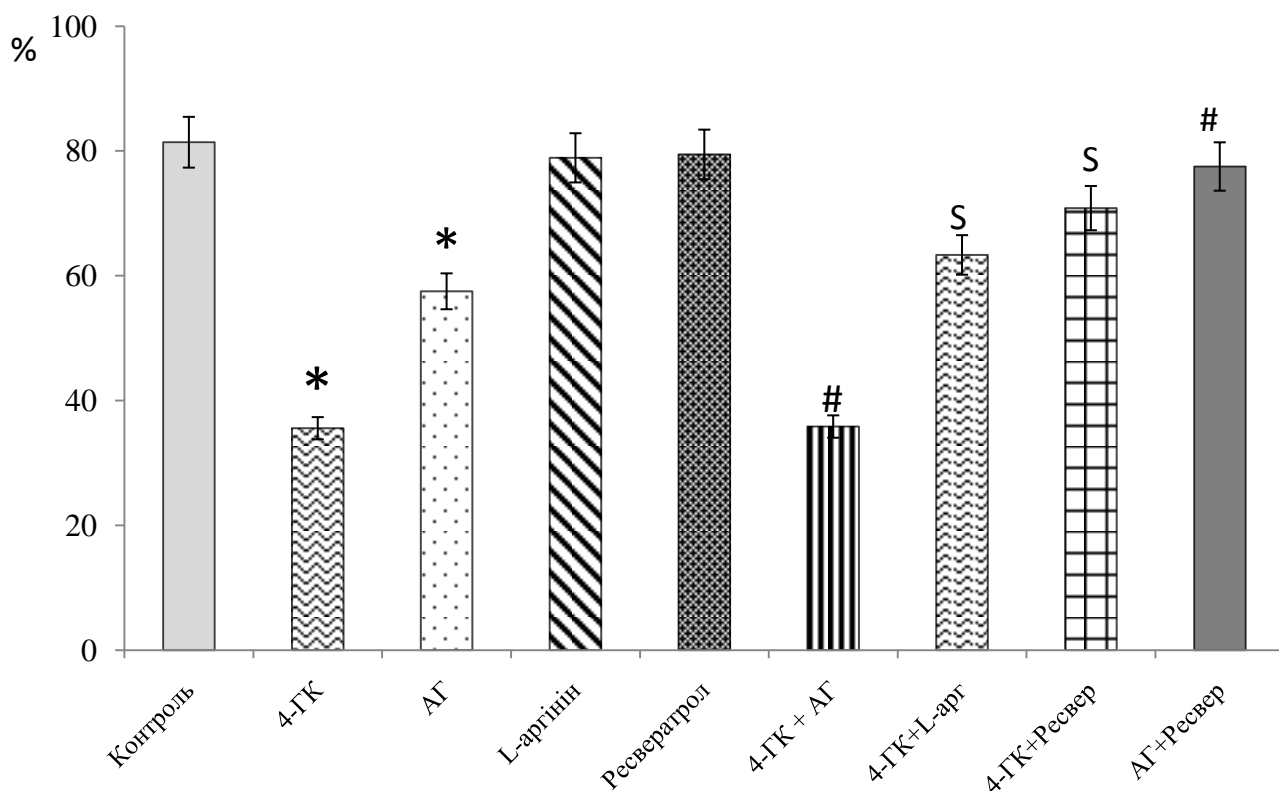


Рисунок 6.1.

Відновлення мейозу ооцитів за умов впливу 4-ГК (1 mM), АГ (0,02 mM), L-аргініна (0,04 mM), ресвератрола (2,0 μ M), а також комбінацій 4-ГК і АГ (1 mM/0,02 mM), 4-ГК і L-аргініна (1,0 mM/0,04mM), 4-ГК і ресвератрола (1,0 mM/2,0 μ M), АГ і ресвератрола (2,0 μ M/0,02mM).

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 АГ; S - $p < 0.05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі 4-ГК.

Таким чином, 4-ГК (1mM) і АГ (0,02 mM) вірогідно пригнічують відновлення мейотичного дозрівання ооцитів. L-аргінін (0,04 mM) та ресвератрол не впливають на відновлення мейозу ооцитами *in vitro* (2,0 μ M). За умов сумісного впливу 4-ГК (1mM) і АГ (0,02 mM) спостерігається пригнічення відновлення мейотичного дозрівання ооцитів, проте за умов впливу комбінацій АГ (0,02 mM) і ресвератрола (2,0 μ M), 4-ГК (1 mM) і ресвератрола (2,0 μ M),

4-ГК (1 mM) і L-аргініна (0,04 mM) - зростає частка ооцитів, що розчинили зародковий пухирець.

6.3. Вплив 4-ГК (1 mM), АГ (0,02 mM), L-аргініна (0,04 mM), ресвератрола (2,0 μ M) та їх комбінацій на розподіл ОНР ДНК ядер ооцитів

Встановлено, що при культивуванні ооцитів протягом 4 год (негативний контроль) відбувається зміни у розподілі ОНР ДНК ядер, а саме частка ядер 2-го класу збільшується до $29,11 \pm 2,56\%$ ($p < 0.05$, $n=10$), а 0/1-го класу зменшується до $48,00 \pm 3,22\%$ ($p < 0.05$, $n=10$) по відношенню до, відповідно, $21,78 \pm 1,97\%$ і $62,56 \pm 2,62\%$ у свіжовиділених ооцитів (рис.6.2.).

Відповідно до протоколу досліджень був застосований позитивний контроль - культивовані протягом 4 год ооцити, які після періоду культивування піддавали впливу H_2O_2 (за температури $4^\circ C$, 250mM, протягом 5 хв).

Для подальших дослідів використовували клітини за умов культивування протягом 4 год (негативний контроль).

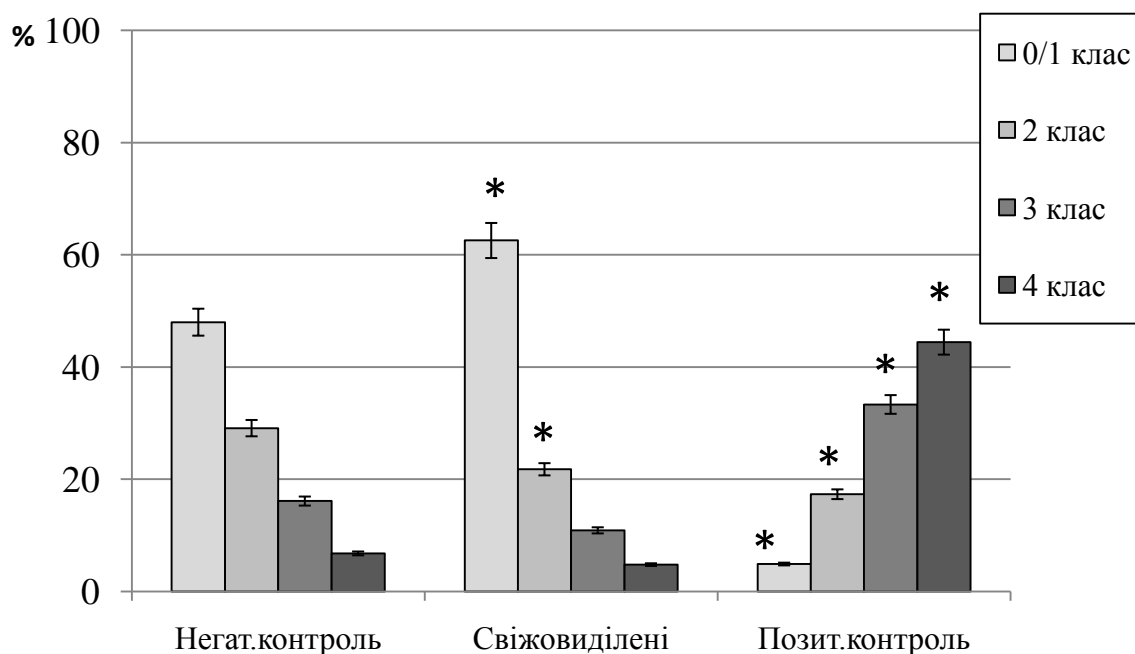


Рисунок 6.2.

Розподіл ОНР ДНК ядер експериментальних груп ооцитів.

Примітки: *- $p < 0.05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у негативному контролі.

Встановлено, що за умов впливу 4-ГК (1,0 mM) відбувається пошкодження ДНК ооцитів, а саме - частка клітин з ядрами 3-го і 4-го класів зростає до, відповідно, $36,00 \pm 1,69\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) і $38,89 \pm 1,57\%$ ($p < 0.05$, $n=6$), а з ядрами 0/1-го і 2-го класів зменшується до, відповідно, $10,22 \pm 2,41\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) і $14,89 \pm 1,49\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) у порівнянні з величинами у негативному контролі, відповідно, $16,11 \pm 1,98\%$ і $6,78 \pm 2,19\%$ та $48,00 \pm 3,22\%$ і $29,11 \pm 2,56\%$ [31, 43].

За умов впливу АГ (0,02 mM) спостерігається збільшення кількості ОНР ДНК ооцитів, що свідчить про пошкоджуючий вплив АГ у концентрації 0,02 mM на ДНК. Частка клітин з ядрами 3-го і 4-го класів зростає до, відповідно, $32,96 \pm 1,67\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) і $35,93 \pm 1,67\%$ ($p < 0.05$, $n=6$), а з ядрами 0/1-го і 2-го класів зменшується до, відповідно, $12,22 \pm 2,72\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) і $18,89 \pm 1,22\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) у порівнянні з величинами у негативному контролі, відповідно, $16,11 \pm 1,98\%$ і $6,78 \pm 2,19\%$ та $48,00 \pm 3,22\%$ і $29,11 \pm 2,56\%$ [31, 43].

L-аргінін (0,04 mM) призводить до збільшення частки ядер ооцитів 0/1-го класу до $61,39 \pm 3,10\%$ ($p < 0.05$, $n=7$) і зменшення ядер 2-го класу до $20,60 \pm 2,53\%$ ($p < 0.05$, $n=7$) у порівнянні з величинами в негативному контролі, відповідно, $48,00 \pm 3,22\%$ і $29,11 \pm 2,56\%$; частки ядер 3-го і 4-го класів залишаються у межах величин негативного контролю і складають, відповідно, $13,33 \pm 2,64\%$ і $4,68 \pm 1,63\%$ [31, 43].

Ресвератрол (2,0 μ M) зумовлює збільшення частки ядер ооцитів 0/1-го класу до $58,52 \pm 1,81\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) і зменшення ядер 2-го класу до $19,63 \pm 1,67\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) у порівнянні з величинами в негативному контролі, відповідно, $48,00 \pm 3,22\%$ і $29,11 \pm 2,56\%$; частки ядер 3-го і 4-го класів залишаються у межах величин негативного контролю і складають, відповідно, $13,70 \pm 1,67\%$ і $8,15 \pm 1,15\%$ (рис. 6.3) [31, 43].

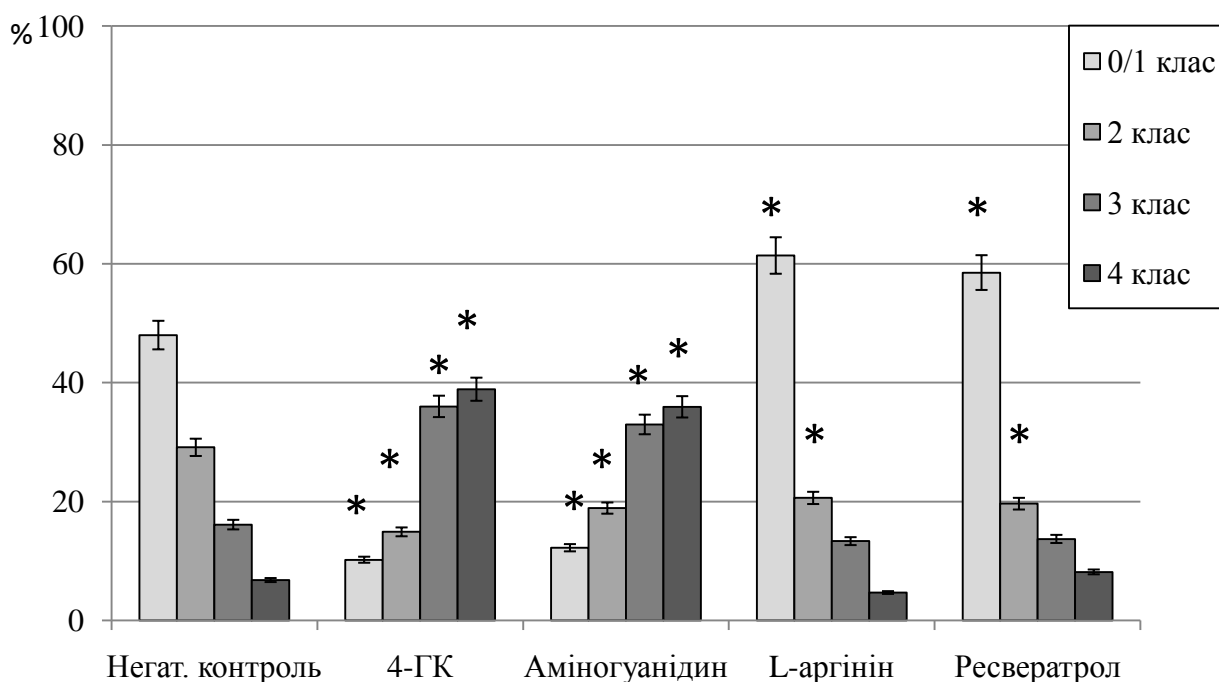


Рисунок 6.3.

Вплив 4-ГК, АГ, L-аргініна, ресвератрола на розподіл ОНР ДНК ядер ооцитів.

Примітки: * - $p < 0.05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у негативному контролі.

Встановлено, що за умов сумісного впливу 4-ГК і АГ (1 mM/ 0,02 mM) спостерігається вірогідне посилення пошкодження ДНК ооцитів, - частки ядер 3-го і 4-го класів зростають до, відповідно, $33,70 \pm 2,30\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) і $37,88 \pm 1,86\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) у порівнянні з $16,11 \pm 1,98\%$ і $6,78 \pm 2,19\%$ у негативному контролі, а частки 0/1-го і 2-го класів зменшуються до, відповідно, $11,85 \pm 1,67\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) і $16,67 \pm 2,22\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) по відношенню до величин у негативному контролі, відповідно, $48,00 \pm 3,22\%$ і $29,11 \pm 2,56\%$ (рис.6.4) [31, 43].

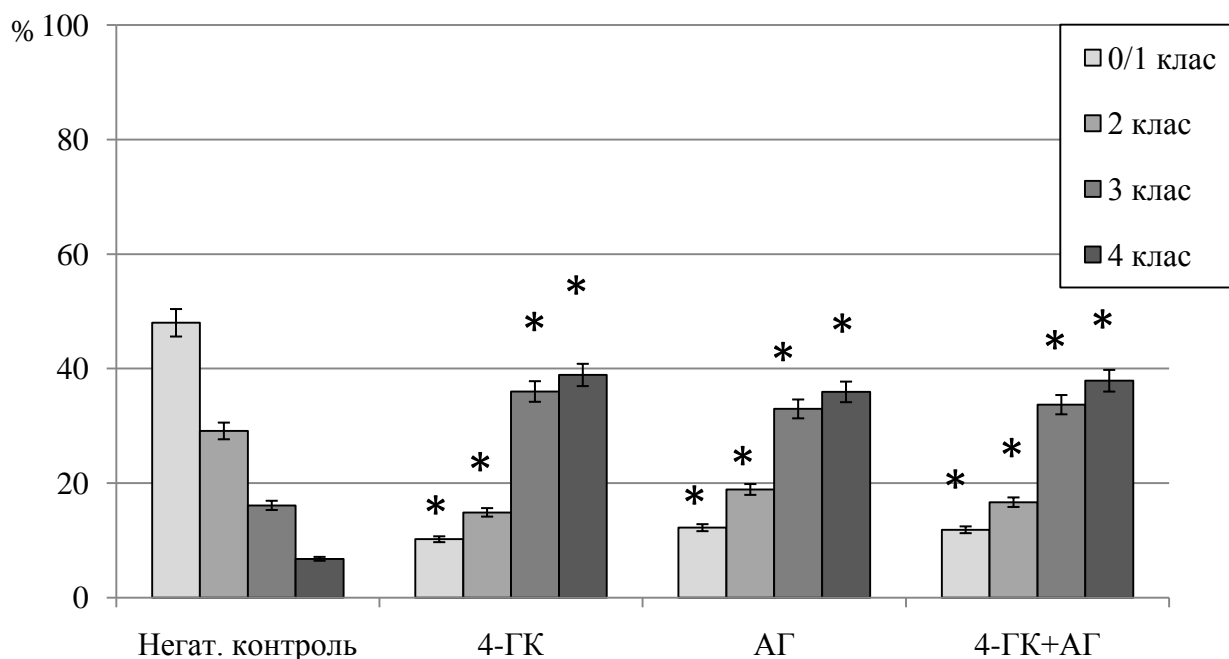


Рисунок 6.4.

Вплив 4-ГК і АГ на розподіл ОНР ДНК ядер ооцитів.

Примітки: * - $p < 0.05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у негативному контролі.

Встановлено, що при сумісному впливі 4-ГК і L-аргініна (1,0 mM/0,04mM) відбувається вірогідне зменшення пошкодження ДНК ядер ооцитів по відношенню до величин у групі 4-ГК. Частки ядер ооцитів 3-го і 4-го класів зменшуються до, відповідно, $21,67 \pm 3,50\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) і $18,89 \pm 4,55\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) у порівнянні з, відповідно, $36,00 \pm 1,69\%$ і $38,89 \pm 1,57\%$ у групі 4-ГК, а частки ядер 0/1-го і 2-го класів зростають до, відповідно, $31,67 \pm 6,24\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) і $27,78 \pm 2,72\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) у порівнянні з, відповідно, $10,22 \pm 2,41\%$ і $27,78 \pm 2,72\%$ у групі 4-ГК (рис.6.5) [31, 43].

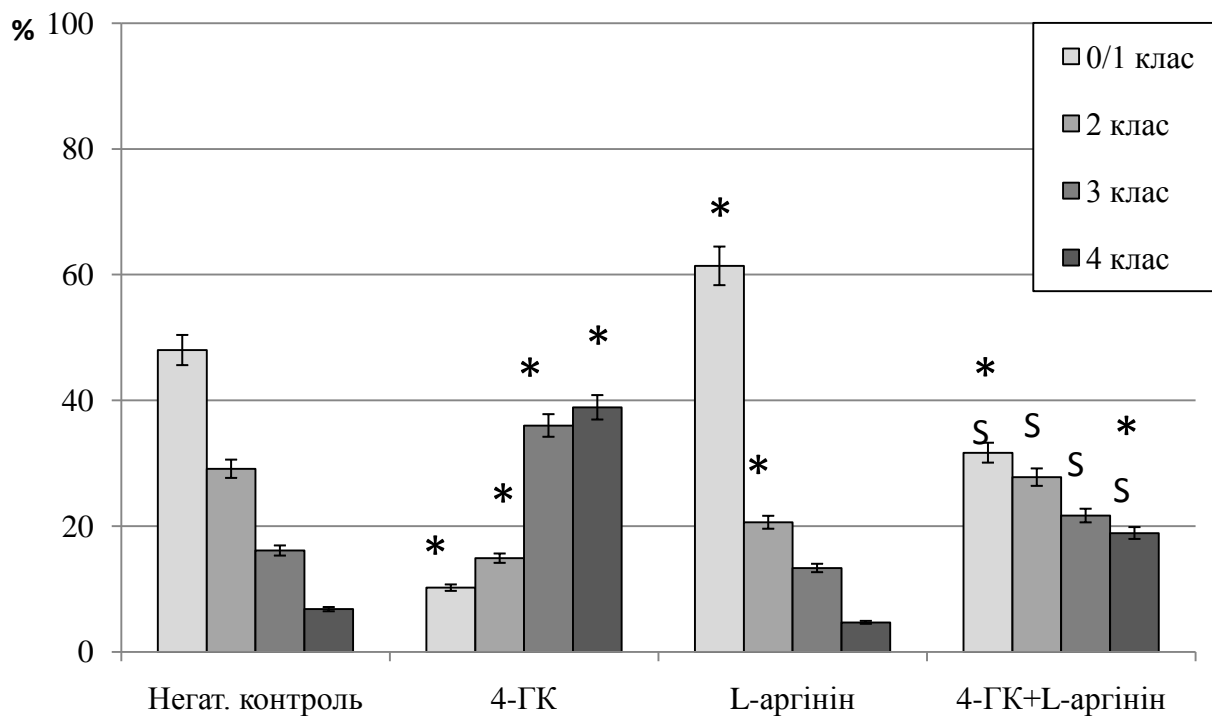


Рисунок 6.5.

Вплив 4-ГК і L-аргініна на розподіл ОНР ДНК ядер ооцитів

Примітки: * - $p < 0.05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у негативному контролі, S - $p < 0.05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі 4-ГК.

Встановлено, що за умов сумісного впливу 4-ГК і ресвератрола (1,0 mM/2,0 μM) відмічається вірогідне зменшення ступеня пошкодження ДНК ооцитів, а саме – частки клітин з ядрами 3-го і 4-го класів зменшуються до, відповідно, $26,67 \pm 2,98\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) і $22,22 \pm 2,72\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) у порівнянні з, відповідно, $36,00 \pm 1,69\%$ і $38,89 \pm 1,57\%$ за умов культивування з 4-ГК, а частки ядер 0/1-го, 2-го класів зростають до, відповідно, $26,11 \pm 3,90\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) і $25,00 \pm 3,50\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) по відношенню до величин за умов культивування з 4-ГК, відповідно, $10,22 \pm 2,41\%$ і $14,89 \pm 1,49\%$ (рис.6.6) [31, 43].

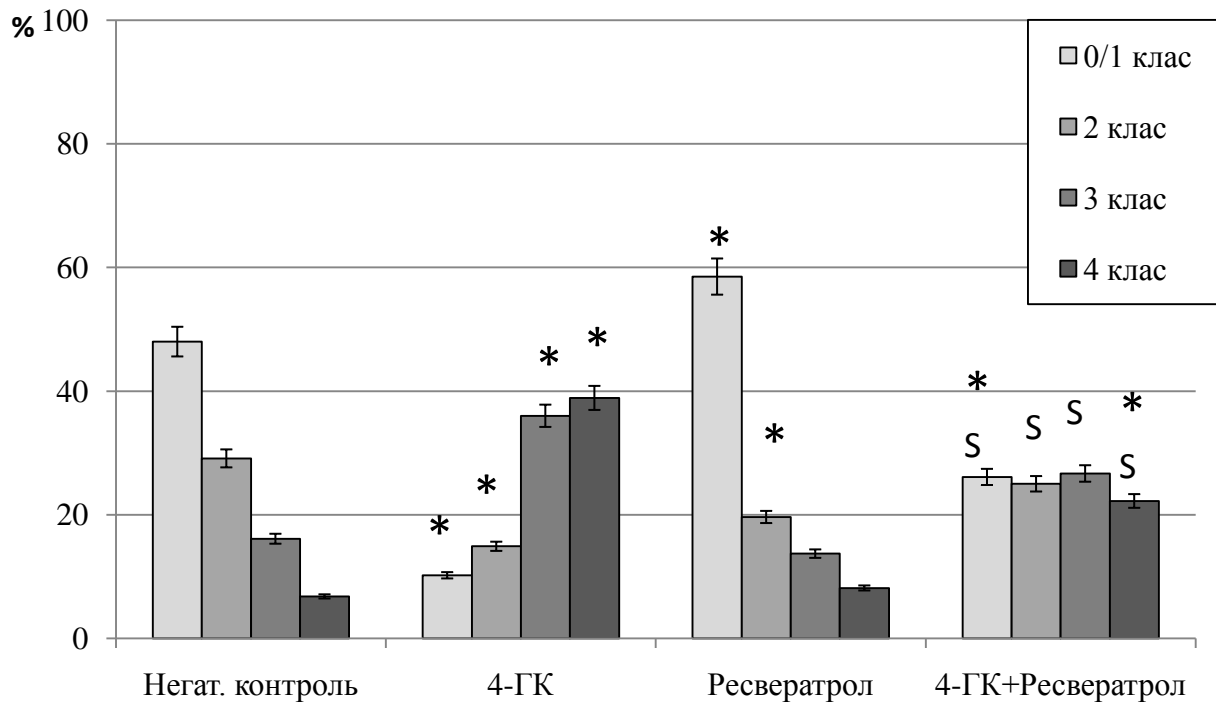


Рисунок 6.6.

Вплив 4-ГК і ресвератрола на розподіл ОНР ДНК ядер ооцитів.

Примітки: * - $p < 0.05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у негативному контролі, S - $p < 0.05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі 4-ГК.

Встановлено, що при сумісному впливі АГ і ресвератрола (0,02mM/ 2,0 μ M) відбувається вірогідне зменшення пошкодження ДНК ооцитів. Частки клітин з ядрами 3-го і 4-го класів зменшуються до, відповідно, $22,78 \pm 1,53\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) і $25,19 \pm 1,67\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) у порівнянні з, відповідно, $32,96 \pm 1,67\%$ і $35,93 \pm 1,67\%$ за умов культивування з АГ, а ядер 0/1-го класу зростає до $31,85 \pm 1,67\%$ ($p < 0.05$, $n=6$) по відношенню до величини за умов культивування з АГ - $12,22 \pm 2,72\%$. Частка ооцитів з ядрами 2-го класу по відношенню до таких, що культивувалися з АГ, залишається без вірогідних змін і становить $20,19 \pm 1,78\%$ (рис.6.7) [31, 43].

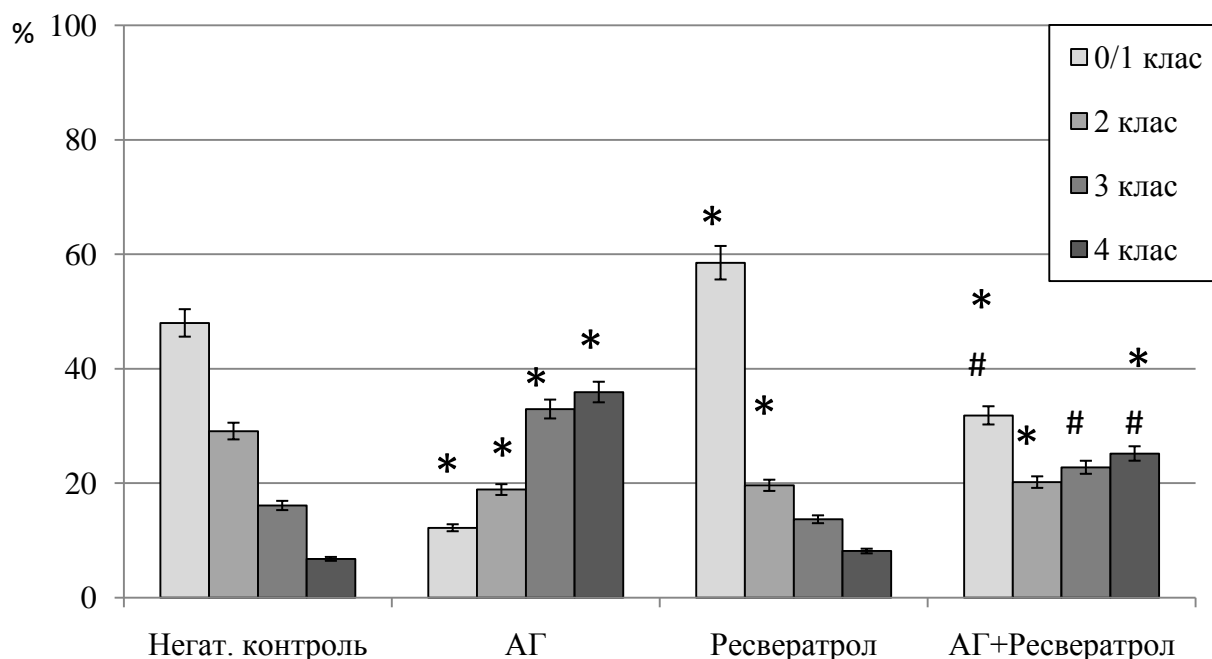


Рисунок 6.7.

Вплив АГ і ресвератрола на розподіл ОНР ДНК ядер ооцитів.

Примітки: * - $p < 0.05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у негативному контролі, # - $p < 0.05$ - вірогідність відмінностей величин середніх груп даних відносно таких величин у групі АГ.

Таким чином, у цьому розділі представлені результати дослідження інтегральної цілісності генома ооцитів з використанням антиоксиданта (ресвератрол), блокатора ПАРП-1 (4-ГК), субстрата NOS (L-аргінін), блокатора iNOS (аміногуанідин), що спрямовані на встановлення NO-залежного механізму регуляції репарації ДНК, що відображається як одонитковий розрив. Оримані дані забезпечать обґрунтування новітніх підходів корекції ПНЯ у жінок, спрямованих на зменшення пошкодження ДНК.

Отже, оцінюючи відновлення мейотичного дозрівання ооцитів *in vitro* та розподіл ДНК-комет ядер ооцитів за умов впливу антиоксиданта, блокатора ПАРП, субстрата NOS, блокатора iNOS зроблено наступні узагальнення:

1. 4-ГК (1mM) і АГ (0,02 mM) пригнічують відновлення мейотичного дозрівання ооцитів. Не встановлено ефекту впливу L-аргініна (0,04 mM) та ресвератрола (2,0 μM) на відновлення мейозу.

2. За умов сумісного впливу 4-ГК і АГ (1,0 mM/0,02 mM) спостерігається пригнічення відновлення мейотичного дозрівання ооцитів, але при сумісному впливі АГ і ресвератрола (0,02 mM/2,0 μM), 4-ГК і ресвератрола (1 mM/2,0 μM), 4-ГК і L-аргініна (1,0 mM/0,04 mM) - зростає частка ооцитів, що розчинила зародковий пухирець.

3. При культивуванні ооцитів протягом 4 год (негативний контроль) відмічаються зміни у розподілі ОНР ДНК ядер ооцитів, а саме частка ядер 0/1-го класу – зменшується, а ядер 2-го класу – збільшується відносно до величин для свіжовиділених ооцитів, що свідчить про незначне збільшення ОНР ДНК у ооцитів через 4 год культивування по відношенню до таих у ДНК свіжовиділених ооцитів.

4. Встановлено, що за умов впливу, як 4-ГК (1,0 mM), так і АГ (0,02 mM) відбувається збільшення пошкодження ДНК ооцитів, а саме - частки клітин з ядрами 3-го і 4-го класів зростають, а з ядрами 0/1-го і 2-го класів зменшується у порівнянні з величинами у негативному контролі, відповідно. Тоді як за умов впливу L-аргініна (0,04 mM), так і ресвератрола (2,0 μM) зменшується пошкодження ДНК ооцитів. Частки ядер ооцитів 0/1-го класу – збільшуються, а 2-го класу зменшуються у порівнянні з такими величинами в негативному контролі.

5. Встановлено, що при сумісному впливі 4-ГК і АГ (1 mM/0,02 mM) вірогідно посилюється пошкодження ДНК ооцитів, - частки ядер 3-го і 4-го класів зростають, а частки 0/1-го і 2-го класів зменшуються по відношенню до величин в негативному контролі; за умов сумісного впливу 4-ГК і L-аргініна (1,0 mM/0,04mM) спостерігається зменшення пошкодження ДНК ядер ооцитів по відношенню до величин у групі 4-ГК: частки ядер ооцитів 3-го і 4-го класів

зменшуються, а ядер 0/1-го і 2-го класів зростають; за умов сумісного впливу 4-ГК і ресвератрола (1,0 mM/2,0 μM) відбувається зменшення пошкодження ДНК ооцитів, а саме – частки клітин з ядрами 3-го і 4-го класів зменшуються, а частки ядер 0/1-го, 2-го класів зростають у порівнянні з такими за умов культивування з 4-ГК; за умов сумісного впливу АГ і ресвератрола (0,02 mM/2,0 μM) відмічається вірогідне зменшення пошкодження ДНК ооцитів – частки клітин з ядрами 3-го і 4-го класів зменшуються, 0/1-го класу зростають по відношенню до таких, що культивувалися з АГ.

РОЗДІЛ 7

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Розлад оваріальної функції в умовах ЕІУ.

Відомо, що системні запальні процеси впливають на органи репродуктивної системи, зокрема на скоротливість матки [4, 25, 51], що може призводити до порушення імплантації та передчасних пологів, а також є однією з причин безпліддя та супроводжуються активацією імунокомпетентних клітин як центральної, так і периферичної ланок імунної системи із посиленою продукцією прозапальних чинників. За таких умов збільшується генерація АФК та експресія iNOS, що призводить до відповідного збільшення утворення АФА [159, 227], які в свою чергу, можуть бути причиною пошкодження ДНК клітин.

Для дослідження особливостей патогенезу ПНЯ існує ряд експериментальних підходів з застосуванням моделей з використанням гризунів [81, 149, 209]. В окрему групу варто виділити моделі імунного ушкодження на яких нещодавно отримано нові дані [83, 85, 95, 138].

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 [83, 85].

Нещодавно отримано нові дані про те, що імунізація самиць мишей введенням БСА призводить до запуску імунозапальної відповіді, яка характеризується активацією клітинної ланки адаптивного імунітету, а саме антиген-специфічних лімфоцитів. При цьому відбувається зсув лейкоцитарної формули вліво, збільшується індекс активації нейтрофілів, посилюється функціонально-метаболічна активність клітин неспецифічної резистентності та зростає продукція біологічно активних речовин [14]. Проте, дані про вплив довготривалої імунізації БСА тварин на оваріальну функцію – відсутні.

Тому, першим етапом цієї роботи було дослідити вплив імунізації БСА (як модель експериментального імунокомплексного ушкодження) на оваріальну

функцію – зміни параметрів мейотичного дозрівання ооцитів та клітинну загибель їх фолікулярного оточення, а також на пошкодження геному імунокомпетентних клітин тимусу і лімфатичних вузлів, а саме на кількість ОНР ДНК їх ядер з метою оцінки моделі ЕІУ як адекватної для подальшого вивчення особливостей розвитку, профілактики та корекції ПНЯ.

Нами встановлено, що за умов імунізації БСА у мишей зменшується кількість ооцитів із розчиненим зародковим пухирцем (метафаза І) на 22% та сформованим першим полярним тільцем (метафаза ІІ) на 16% по відношенню до контролю, а також відмічається посилення клітинної загибелі ФОО - кількість живих клітин зменшується в 1,3 рази, а клітин з морфологічними ознаками апоптозу збільшується в 2,7 рази у порівнянні з контролем.

Раніше у відділі імунофізіології Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН Укрвіни було детально досліджено і описано дві моделі ушкодження яєчників імунного генезу. Перша – за допомогою імунізації алогенним антигеном яєчників. За таких умов відбувався сенсibilізація до власних антигенів через антигенну подібність своїх і чужорідних антигенів та запуск аутоімунного процесу в результаті відкриття закритих раніше внутрішньоклітинних антигенів внаслідок некротичної загибелі клітин при запальному процесі. Друга – за допомогою введення ксеногенних антитіл до антигенів яєчників, що в результаті відтворювало кінцевий етап аутоімунного процесу, який розвивається за гуморальним типом і було встановлено, що імунне ураження яєчників у мишей обома шляхами призводило до порушення мейотичного дозрівання ооцитів і зменшення кількості живих фолікулярних клітин [49, 55].

Отримані нами дані узгоджуються з даними, що були одержані з використанням двох інших моделей, розроблених у відділі імунофізіології Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України та описаних вище.

Раніше встановлено, що пригнічення відновлення мейозу ооцитів може відбуватися: 1) специфічною реакцією антиген-антитіло; 2) впливом пригнічуючих неспецифічних факторів білкової природи; 3) при блокуванні кальцієвих каналів L-типу (ооцитів мишей на стадіях як дієструс, так і еструс І);

4) при блокуванні кальцієвих каналів Т-типу (ооцитів мишей на стадії еструс І). Одночасний вплив кількох перерахованих чинників може запускати дію інших механізмів відновлення мейозу, які не досягали ефекту за цих умов [250].

Відомо, що деякі імуноопосередковані захворювання супроводжуються ушкодженням ДНК [135, 153, 231], хоча при системній імунокомплексній патології ці зміни практично не досліджені. З цією метою нами був застосований метод ДНК- комет, згідно якого розміри та інтенсивність світіння хвоста ДНК- комети позитивно корелюють зі ступенем ушкодження ДНК [230].

Вперше встановлено, що імунізація БСА призводить до ушкодження ДНК ядер клітин тимуса і ЛВ: частка ядер клітин тимуса 0/1-го класу зменшується в 3,1 рази, в той час як частка ядер 4-го класу збільшується в 2,2 рази у порівнянні з контролем; кількість клітин з ядрами 0/1-го і 2-го зменшується в, відповідно, 2,3 і 2,1 рази, а кількість клітин з ядрами 4-го класу збільшується в 3,6 рази у порівнянні з контролем.

Ми вважаємо, що за умов імуноопосередкованих запальних процесів, зокрема пов'язаних із імунними комплексами, зміна параметрів мейотичного дозрівання ооцитів та клітинної загибелі їх фолікулярного оточення, а також пошкодження ДНК ядер клітин тимуса і ЛВ може бути обумовлена виробленням прозапальних цитокінів та ейкозаноїдів [62, 150], АФК й азоту з наступним розвитком оксидативного й нітрозативного стресів.

Спираючись на власні результати, а також на дані літератури, є підстави стверджувати, що імунізація БСА призводить до розвитку системного запального процесу з пошкодженням геному клітин органів імунної системи (тимусу та ЛВ) та порушенням оваріальної функції, що проявляється пригніченням мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафази І та метафази ІІ, посиленням клітинної загибелі ФОО, що частково відображає розлад оваріальної функції у жінки – ПНЯ.

Таким чином, можна вважати, що модель ЕІУ є адекватною для подальшого вивчення патогенетичних ланок розвитку ПНЯ та можливих способів її профілактики і корекції.

Оцінка інтегральної цілісності генома клітин тимуса і ЛВ дає підстави припустити, що за умов ПНЯ змінюється активність експресії генів асоційованих з репарацією, що відображається як ОНР ДНК.

Вплив введення антиоксиданта на мейотичне дозрівання ооцитів, життєздатність клітин їх ФОО, розподіл однопітків розривів 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 АФК може привести до пошкодження ДНК, ліпідів і білків клітин. Антиоксиданти чинять захисний ефект на клітини від продуктів перекисних реакцій, обмежуючи їх пошкодження і допомагають зберегти цілісність клітинної мембрани [62, 122, 133, 182, 193].

Етилметилгідроксипіридин сукцинат (ГС, препарат «Мексидол») - речовина з антиоксидантними та мембранопротекторними властивостями. За останні роки її почали активно використовувати в різних галузях медицини (хірургії, стоматології, неврології, ін.). Однак який вплив ГС чинить на мейотичне дозрівання ооцитів та життєздатність клітин їх фолікулярного оточення в умовах імунокомплексної патології не вивчено.

Нещодавно отримано дані про те, що в умовах імунокомплексемії застосування антиоксиданта (ГС) проявляло різнонаправлені ефекти: в оваріальному відділі матки спостерігалось зниження величин амплітуди та індексу скоротливості, у цервікальному – навпаки їх зростання. В цілому, ГС сприяв нормалізації окремих параметрів скоротливості, змінених за умов імунізації БСА [19].

Нашими дослідженнями показано, що в умовах ЕІУ введення антиоксиданта (ГС) зумовлює покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, як на стадії метафаза I, так і на стадії метафаза II, а також призводить до зниження клітинної загибелі ФОО; однак застосування антиоксиданта і введення блокатора

аргінази II (L-норваліну) зумовлює пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафаза I, а також спричиняє збільшення частки клітин ФОО з морфологічними ознаками некрозу.

Відомо, що фізіологічна роль аргінази II зумовлена її участю в чисельних метаболічних процесах у клітині. Даний ензим модулює імунну відповідь та належить до важливої ланки в розвитку багатьох патологічних станів організму, зокрема аутоімунних захворювань [79]. Вважають, що високий рівень активності даного ферменту свідчить про гуморальну відповідь імунної системи на антиген. Причиною зростання активності аргінази можуть бути цитокіни IL-4, IL-10, IL-13, ФНП- α , які виділяються Т-лімфоцитами і макрофагами у відповідь на розвиток патологічного процесу [5].

Ми вважаємо, що імунізація БСА стимулює секрецію потужних вазоактивних і прозапальних чинників, зокрема, збільшується генерація АФК та експресія iNOS, що за літературними даними призводить до відповідного збільшення утворення реактивних форм азоту [222], 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 [55], а застосування антиоксиданта (ГС) в даних умовах призводить до покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів і зниження клітинної загибелі ФОО.

Спираючись на отримані нами результати про пошкодження ДНК імунокомпетентних клітин тимуса і ЛВ в умовах ЕІУ та дані літератури про пошкодження цілісності ДНК в умовах запалення [96, 135, 197] можна припустити, що подібні зміни відбуваються через порушення репарації ОНР молекул ДНК, як наслідок генерації і пошкоджуючого впливу надмірної кількості АФК та АФА.

Відомо, що антиоксиданти, як екзогенні так і ендогенні, спричиняють зменшення будь-якого ступеня оксидативного стресу та його наслідків, а їх використання у формі харчової добавки стає все більш популярною практикою для підтримки оптимальної функції організму [101, 110, 190]. Проте, дані про вплив антиоксиданта в умовах ЕІУ на ДНК клітин ФОО, тимуса і ЛВ на сьогодні відсутні.

Тому наступне наше дослідження було спрямоване на встановлення ефекту введення антиоксиданта в умовах ЕІУ на розвиток пошкодження ДНК клітин ФОО, тимуса і ЛВ.

Слід відмітити, що механізми дії антиоксиданта ГС продовжують активно вивчати. Так, один з шляхів дії ГС може бути пов'язаний з NO, який регулює Ca^{2+} -транспортувальні системи плазматичної мембрани, саркоплазматичного ретикулуму і мітохондрій міомеріа. NO спричинює зростання проникності сарколеми для Ca^{2+} , стимулює пасивний транспорт катіона у міоцити крізь дигідропіридинчутливі канали, стимулює Na^+ , K^+ -АТР-азу [8]. В дослідях *in vitro* показано, що ГС знижує активність iNOS [58].

Нами експериментально встановлено, що введення антиоксиданта ГС не впливає на кількість одониткових розривів ДНК ядер клітин ЛВ та не справляє пошкоджувального впливу на ДНК ядер клітин ФОО і тимуса. Проте, в умовах ЕІУ введення ГС призводить до зменшення пошкодження ДНК. Так, частка ядер клітин ФОО, тимуса і ЛВ 4-го класу, якому відповідає максимальне ушкодження ДНК, зменшується, відповідно, в 3,7, 2,6 і 1,7 рази, натомість частка ядер 0/1-го класу, які характеризуються відсутністю первинних пошкоджень, зростає, відповідно, в 2,0, 7,2 і 2,1 разів.

Таким чином, введення антиоксиданта ГС не справляє пошкоджувального впливу на ДНК ядер клітин тимуса, ЛВ і ФОО, а в умовах ЕІУ призводить до перерозподілу ОНР ДНК ядер імунокомпетентних клітин (тимус, ЛВ) і ФОО у бік зменшення пошкодженням ДНК. Наші результати доповнюють і розширюють відомості про ефект ГС на тканини.

Вплив введення НЧНЗ на функціональний стан яєчника, тимуса та лімфатичних вузлів в умовах ЕІУ.

На теперішній час нанотехнології займають чільне місце в науково-практичній діяльності людини і набувають широкого застосування в лікуванні та діагностиці захворювань різної етіології. Новітнім напрямком нанофармакології є використання нанопрепаратів як субстанції для нових лікарських засобів. Перспективними в цьому аспекті є наночастинки металів, зокрема НЧНЗ [187].

Проте, можлива протективна або токсична дія НЧНЗ досліджена недостатньо, а дані про оваріальну функцію, життєздатність клітин ФОО, тимуса і ЛВ, а також дані про пошкодження геному клітин органів імунної системи мишей за умов моделювання системного імунокомплексного ушкодження та введення НЧНЗ – відсутні.

Нами показано, що введення мишам НЧНЗ не впливає на параметри життєздатності клітин ФОО, але спричиняє пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії формування зародкового пухирця (метафаза II) на 16%. Проте, за умов моделювання системного імунокомплексного ушкодження спостерігається зменшення пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів як на стадії розчинення зародкового пухирця (метафаза I), так і на стадії формування першого полярного тільца (метафаза II) на, відповідно, 18% і 12% у порівнянні з такими величинами за умов ЕІУ.

У тимусі введення НЧНЗ, зумовило деяке збільшення кількості клітин з морфологічними ознаками апоптозу, натомість у ЛВ відмічено покращення параметрів життєздатності клітин, а саме кількість живих клітин зросла, а кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу знизилась.

Експериментально встановлено, що введення НЧНЗ не призводить до пошкодження ДНК клітин тимуса і ЛВ, а навіть зумовлює зменшення кількості клітин тимуса з ядрами 4-го класу у порівнянні з контролем.

Дослідження останніх двох десятиліть показали, що порушення гомеостазу іонів редокс-активних металів, таких як залізо, мідь, хром, кобальт та інші можуть

призвести до збільшення продукції АФК, гідроксильних радикалів, супероксидних радикалів, перекису водню, оксиду азота [126, 163], які в свою чергу можуть спричинити окисне пошкодження біологічних макромолекул, таких як ДНК, білки і ліпіди [213], викликаючи таким чином системне запалення, і зумовити клінічні прояви численних захворювань, включаючи рак, серцево-судинні захворювання, цукровий діабет 2 типу, атеросклероз, хвороба Альцгеймера, хвороба Паркінсона [163, 204].

Раніше встановлено, що НЧНЗ є біобезпечною субстанцією, яка має протективний ефект на скоротливість міометрія при використанні за умов експериментальної залізодефіцитної анемії, проте при розладах імунного генезу проявляє пригнічуючу дію [10].

Нашими результатами показано, що введення експериментальної субстанції НЧНЗ не впливає на життєздатність клітин ФОО, клітин тимуса і ЛВ, а також не викликає ушкодження ДНК ядер клітин тимуса і ЛВ, проте відбувається пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів на стадії формування першого полярного тільця (метафаза II).

На сьогодні активно вивчають механізми дії різних типів НЧНЗ та наночастинок оксиду заліза. Так, в умовах *in vitro* показано, що під впливом НЧНЗ та продуктів їхнього окиснення (Fe^{2+} та Fe^{3+}) відбувається утворення АФК й окисне пошкодження епітеліальних клітин слизової оболонки бронхів у людини [194]. У дослідженні характеру особливостей впливу часткового окиснення («старіння») та модифікації поверхні НЧНЗ на потенційну нейротоксичність в умовах *in vitro* на культурах клітин мікроглії (BV2) і нейронів (N27) гризунів встановлено, що часткове або повне окиснення НЧНЗ призводить до зменшення їхньої окисно-відновної активності, що ймовірно понижує їх токсичність відносно клітинних культур ссавців. Крім того, НЧНЗ знижують вміст АТФ у нейронах. При цьому в клітинах мікроглії спостерігались набухання мітохондрій та прояви апоптозу, а в нейронах – перинуклеарні включення та гранульованість цитоплазми [199]. Автори зазначають виражену залежність особливостей біологічної дії досліджених наночастинок від їх фізико-хімічних

властивостей, таких як розмір, заряд поверхні, наявність та тип модифікаторів поверхні тощо [199].

В літературі є дані про те, що можливий механізм, який лежить в основі дії редокс-активних металів (зокрема, заліза), включає утворення супероксидного радикала, гідроксильного радикала та інших реактивних форм кисню, зрештою призводить до вироблення мутагенного і канцерогенного малондіальдегіда, 4-гідроксиноненала та інших екзоциклічних ДНК-аддуктів [213]. Отримані нами результати дають підстави стверджувати, що ефект від введення наноструктурованого нульвалентного заліза кардинально відрізняється від макроскопічного у ефектах на клітини і, мабуть, у механізмах дії – що потребує подальшого вивчення.

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.

Відомо, що одним із наслідків дефіцита заліза в організмі може бути зниження біодоступності NO. 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 [30, 240]. Біологічна продукція NO в організмі також має вирішальне значення для неспецифічного захисту організму [196].

Відомо, що NO присутній у багатьох тканинах, важливий між- і внутрішньоклітинний посередник, задіяний у регуляції чисельних фізіологічних процесів. Дослідження концентрацій нітрату в плазмі крові, які вивчалися під час фолікулярного циклу, досягали пікового рівня при овуляції [105, 128]. Згідно інших досліджень, циркулюючі концентрації нітратів зростають під час розвитку фолікула й зменшуються після овуляції [189]. Стверджують, що саме NO запускає збільшення притоку крові в яєчнику і це є важливою умовою для здійснення овуляції [154].

Блокатори NO-синтаз знижують овуляторну продуктивність [125, 157]. Встановлено, що інгібування iNOS призводить до редукції овуляції на 50%, такий ефект відміняється донацією NO [189].

Проте даних про вплив введення блокатора iNOS – АГ, субстрата NOS – L-аргініна в умовах EIU на оваріальну функцію та функціональний стан тимуса і ЛВ немає.

Нашими результатами показано, що в умовах EIU 1) введення блокатора iNOS - АГ зумовлює покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафаза I на 13%, тоді як, введення субстрата NOS - L-аргініна за таких умов, – до його пригнічення на 18%; 2) в ФОО при введення АГ спостерігається зниження клітинної загибелі. Так, кількість живих клітин збільшується в 1,4 рази, а клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу зменшується у, відповідно, 1,8 і 5,5 рази; введення L-аргініна – не посилює клітинну загибель ФОО; 3) введення АГ, як і L-аргініна призводить до перерозподілу одониткових розривів ДНК ядер клітин ФОО у бік зменшення пошкодження.

Згідно літературним даним, з використанням донора NO та інгібітора NOS – NO продукований кумулюсними клітинами має регулятивний вплив на рівень мітохондріальної полярності в субплазмолемальній цитоплазмі відповідного ооцита. Культивування ізольованих і оточених клітинами кумулюса ооцитів у низьких і високих концентраціях кисню передбачає, що конкуренція між киснем і NO може регулювати рівень мітохондріальної полярності і підтримувати мітохондріальний гомеостаз у преовуляторному ооциті, а також зсувати його до більш високих значень (полярності), які реєструються після овуляції [245].

Відомо, що NO збільшує рівень цГМФ у клітинах-мішенях [180]. Вважають, що саме цГМФ за допомогою активації ооцитарної цАМФ-фосфодіестерази зменшує рівень цАМФ і запускає дозрівання ооцитів [146]. Є дані і про те, що локація цГМФ у фолікулярному оточенні ооцитів не пов'язана з ефектами NO на мейотичне дозрівання ооцитів [88], а тимчасове зменшення внутрішньооцитарного рівня NO може викликати відновлення мейотичного дозрівання ооцитів ссавців [211].

Відомо, що низькі концентрації NO запобігають апоптозу, тоді як високі концентрації NO, так і посилена генерація пероксинітриту через нестачу аргініну, сприяють апоптозу фолікулярних клітин фолікула [225].

NO відомий також як ендотелій релаксуючий фактор, який виконує роль міжклітинного месенджера у всіх хребетних і є сигнальною молекулою, що бере участь в різноманітних фізіологічних та патологічних процесах [200].

Нами експериментально встановлено, що в органах імунної системи введення АГ зумовлює зменшення клітинної загибелі. Так, частка живих клітин тимуса і ЛВ зростає в, відповідно, 1,2 і 1,3 рази, а клітин з морфологічними ознаками некрозу зменшується у, відповідно, 1,7 і 2,7 разів, у ЛВ зменшується частка клітин з морфологічними ознаками апоптозу у 1,6 разів; введення L-аргініна – не чинить пригнічуючого ефекту на параметри життєздатності клітин тимуса і ЛВ; 2) ведення як АГ, так і L-аргініна зумовлює перерозподіл ОНР ДНК ядер у бік зменшення пошкодження.

Відомо, що ендогенно NO синтезується з L-аргініну за участі синтаз оксиду азоту (NOS). На сьогоднішній день, ідентифіковано три основні ізоформи NOS, дві з яких є конститутивними, - їх активність залежить від кальцію, - це нейрональна NOS, що формується в основному, в центральній і периферичній нервовій системі, і ендотеліальна NOS, яка експерсується різними клітинами, в тому числі легневими ендотеліоцитами судин і має важливе значення для підтримки кровоплину в життєво важливих органах, таких як серце, легені, печінка і нирки [89, 115]. Третьою ізоформою NOS є кальцій-незалежна індукцибельна NOS. Активність iNOS індукується різноманітними прозапальними цитокінами, включаючи фактор некрозу пухлин, інтерферон гамма і інтерлейкін-1. Експресія iNOS також індукується як *in vivo* так і *in vitro* шляхом введення/додавання бактеріального ендотоксину [89, 102, 115], однак, її регуляція може змінюватися в залежності від конкретного типу клітин або експериментальної моделі тварин.

Відмічено, що НЧНЗ здатні відновлювати нітрат, а також встановлено, що впродовж його відновлення виділяються сполуки азоту. Тим не менше, питання

про те, який кінцевий продукт утворюється при відновленні нітратів НЧНЗ все ще викликає суперечки [148].

В цій роботі ми досліджували застосування НЧНЗ і введення L-аргініна в умовах ЕІУ. І нами було показано, що в умовах ЕІУ застосування НЧНЗ і введення L-аргініна призводить до покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів на стадії метафаза I на 9%, зменшення клітинної загибелі ФОО. За таких умов частка живих клітин ФОО зростає у 1,2 рази, а клітин з морфологічними ознаками некрозу зменшується у 2,5 рази, а також спостерігається зменшення кількості ОНР ДНК ядер ФОО, що свідчить про зменшення пошкодження ДНК – збільшується частка клітин з ядрами 2-го класу у 1,3 рази та зменшується частка клітин з ядрами 3-го класу у 1,7 рази по відношенню до відповідних величин у групі імунізація БСА та введення L-аргініна. При ЕІУ та застосуванні НЧНЗ і L-аргініна відбувається зменшення клітинної загибелі в ЛВ, а саме частка живих клітин зростає у 1,1 рази, а клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу зменшується у, відповідно, 1,3 і 1,8 рази, також спостерігається перерозподіл одониткових розривів ДНК ядер клітин органів імунної системи у бік зменшення пошкодження ДНК – у тимусі частка клітин з ядрами 0/1-го, 2-го класів збільшується у, відповідно, 1,8 і 1,5 рази, а з ядрами 3-го,4-го класів зменшується у, відповідно, 1,4 і 2,3 рази; у ЛВ частка клітин з ядрами 0/1-го класу збільшується у 1,9 разів, а з ядрами 4-го зменшується у і 1,7 рази.

Таким чином застосування НЧНЗ в умовах ЕІУ зменшує пригнічуючий ефект L-аргініну на оваріальну функцію.

Вплив антиоксиданта, блокатора ПАРП, субстрата NOS, блокатора iNOS на in vitro відновлення мейотичного дозрівання ооцитів та на розподіл одониткових розривів ДНК ядер ооцитів.

В останні роки зростає кількість публікацій про те, що оксидативно-нітрозативний стрес задіяний в етіології чисельних захворювань людини [101,110,

175, 190, 239]. Як результат порушення рівноваги відношення окиснювач / антиоксидант відбувається зростання сполук хімічно активного кисню і генерація хімічно активного азоту. Наявність надлишкових АФК може привести до пошкодження білків, ліпідів і ДНК клітин [122, 193, 229].

Все більше отримано результатів, які демонструють, що репарація ДНК відіграє важливу роль у збереженні життєздатності клітин, тоді як його стійке пошкодження може провокувати мутагенез, а також грубі хромосомні перебудови [161, 173, 238]. Одними з найбільш поширених пошкоджень ДНК є одониткові розриви (ОНР) [91, 184].

ПАРП-1 – фермент із родини білків ПАРП, який здатен взаємодіяти з різноманітними пошкодженими структурами ДНК. За наявності ОНР ДНК ПАРП-1 активується [166, 203].

Відомо, що генерація пошкодження ДНК вважається важливою початковою подією в канцерогенезі. Існує багато методів для виявлення різних генотоксичних ефектів та дослідження впливу генотоксичних агентів на довкілля чи виробничі умови. Деякі тести мають обмежене застосування через складність технічної установки або через те, що можуть використовуватись лише для певних типів клітин. Гель-електрофорез поодиноких клітин (метод ДНК-комет) є технічно простим, відносно швидким, дешевим методом, окрім цього пошкодження ДНК можна вивчити практично у всіх типах клітин ссавців без потреби в культурі клітин. З його допомогою виявляють ланцюгові розриви ДНК. Згідно протоколу даного методу досліджувані клітини заливаються агарозою і піддаються дії лізуючих агентів, генеруючи, таким чином, нуклеоїди. Після лужного електрофорезу нитка ДНК мігрує до анода. Ступінь міграції залежить від кількості розривів у нуклеоїді. Міграція аналізується у флуоресцентному мікроскопі після фарбування [136].

Таким чином, дані літератури, що охоплюють вище описану методику, показують, що такий аналіз є надійним методом для виявлення пошкоджень ДНК в досліджуваних клітинах. ДНК-комети є універсальним, економічно ефективним

і швидким методом для виявлення пошкодження ДНК і репарації в будь-якій тканині.

Нами з використанням моделі EIU, а також введення антиоксиданта, блокатора NO-синтази, субстрата NOS та експериментальної субстанції НЧНЗ було досліджено особливості розподілу ОНР ДНК ядер клітин ФОО, тимуса і ЛВ (результати приведені у розділах 3, 4, 5) та встановлено, що в цих умовах відбувається збільшення кількості клітин ФОО, тимуса і ЛВ з максимальним пошкодженням ДНК, а також відмічається пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів, чере їх погану якість. Отримані негативні ефекти впливу імунізації БСА на оваріальну функцію та функціональний стан органів імунної системи (тимус, ЛВ) послаблюються застосуванням антиоксиданта (ГС), блокатора NO-синтази (АГ), через ймовірне зменшення проявів оксидативно-нітрозативного стресу.

Тому подальші наші дослідження інтегральної цілісності генома ооцитів з використанням антиоксиданта (ресвератрол), блокатора ПАРП (4-ГК), субстрата NOS (L-аргінін), блокатора iNOS (АГ) направлені на встановлення можливого (NO-залежного) механізму регуляції репарації ДНК, що відображається як односторонній розрив. А також забезпечать обґрунтування новітніх підходів, спрямованих на зменшення пошкодження ДНК, а отже й в терапевтичних цілях для корекції ПНЯ у жінок.

Отримані нами дані свідчать про те, що за умов впливу, як 4-ГК (1,0 mM), так і АГ (0,02 mM) відбувається перерозподіл ОНР ДНК ооцитів у бік збільшення пошкодження. Так, частка клітин з ядрами 3-го і 4-го класів зростає у, відповідно, 2,2 рази і 5,7 разів (4-ГК) і 2,1 раз і 5,3 рази (АГ), а з ядрами 0/1 і 2 класів зменшується у, відповідно, 4,7 рази і 2,0 рази (4-ГК) і 3,9 рази і 1,5 рази (АГ) у порівнянні з величинами у негативному контролі, відповідно. Тоді як за умов впливу, як L-аргініна (0,04 mM), так і ресвератрола (2,0 μM) відбувається перерозподіл ОНР ДНК ооцитів у бік зменшення пошкодження, а саме - частки ядер ооцитів 0/1 класу – збільшуються у, відповідно, 1,3 рази (L-аргінін) і 1,2 рази (ресвератрол), а ядер 2 класу зменшуються у, відповідно, 1,4 рази (L-аргінін) і 1,5

рази (ресвератрол) у порівнянні з величинами в негативному контролі; частки ядер 3 і 4 класів залишаються у межах величин негативного контролю.

При поєднаному впливі 4-ГК і АГ (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 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 у негативному контролі. За сумісного впливу 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 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 дія 4-ГК і ресвератрола (1,0 mM/2,0μM) призводить до зменшення пошкодження ДНК ооцитів – частки 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 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. АГ і ресвератрол (0,02mM/2,0μM) 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 АГ.

Експерименти з використанням методу ДНК-комет активно проводять протягом останнього десятиліття, що зробило його дійсно надійним методом з широкими можливостями застосувань [76, 92, 232, 241].

Антиоксиданти захищають клітини від перекисних реакцій, обмежуючи пошкодження клітин і допомагають зберегти цілісність клітинної мембрани [172]. Недавні експериментальні дослідження показали, що ресвератрол володіє цілим рядом переваг, які включають в себе як протиракові і протизапальні ефекти на додаток до здатності зворотного ожиріння, послаблюють гіперглікемію та гіперінсулінемію, захищають серце і функцію ендотелію, і можуть збільшити

тривалість життя. Однак, на сьогодні відсутня достатня кількість клінічних доказів на підтримку вказаних ефектів [99, 202].

Таким чином, дані, що представлені в літературі підкреслюють високий ступінь різноманітності з точки зору сигнальних мереж і клітинних ефекторних механізмів, які активуються ресвератролом. Ресвератрол викликає підвищений інтерес до досліджень, спрямованих на застосування його в клінічних умовах.

Так, довгострокове-пероральне введення ресвератрола покращує народжуваність у старіючих мишей. Так, молоді миші, яким протягом 12 місяців додавали у щоденний раціон ресвератрол зберігають здатність до розмноження, в той час як відповідні за віком контрольні не народжують. З'ясовано, що миші, які отримували ресвератрол протягом 12 місяців показали більший запас фолікулів в порівнянні з контрольними [218].

Спираючись на те, що виснаження оваріального резерву високоякісних ооцитів характерно для жінок з ПНЯ, ми вважаємо, що результати, отримані нами з використанням експериментальної моделі миші є актуальними та можуть стати початком для проведення попередніх доклінічних випробувань.

Є дані про те, що ресвератрол впливає як на ооцити так і на гранулярні клітини, отримані від старих корів і покращує якість ооцитів *in vitro* через покращення регуляції біогенезу і деградації мітохондрій ооцитів, що дозрівають (культивуються) з клітинами ФОО [221]. Показано, що ресвератрол чинить захисний ефект на ооцити від метил-гліюксал-індукованої цитотоксичності (methylglyoxal-induced cytotoxicity), і це відбувається за рахунок корекції параметрів АФК [219].

Ресвератрол може полегшити манкозоб-індуковане безпліддя, і це, як вважають, відбувається в основному за рахунок корекції апоптозу [207]. Окрім цього, він здатен збільшувати фолікулярні резерви, підтримувати регулярні естральні цикли у щурів раннього похилого віку, тим самим затримувати клімакс [220].

Показано, що ресвератрол у концентрації 10 μ M покращує *in vitro* дозрівання ооцитів шляхом зниження рівня АФК та збільшення внутрішньоклітинного глутатіону [217].

Синтетичний аналог ресвератрола – AR33 поліпшує розвиток ембріонів великої рогатої худоби в культуральному середовищі, що містить 2,5% FCS в атмосфері 5% CO₂ в повітрі. Концентрація 2,5 μ M AR33 може бути вибором для подальших досліджень [124]. Отримані нами дані узгоджуються з даними отриманими в інших експериментах з застосуванням ресвератролу [217, 219, 221].

Нами експериментально доведено, що дія 4-ГК (1mM) і АГ (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 АГ (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 АГ. Проте, за умов сумісного впливу АГ 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 АГ. При сумісній 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 за умов сумісного впливу 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.

Разом з тим, отримані дані про відновлення *in vitro* мейотичного дозрівання ооцитами і розподіл ОНР ДНК ооцитів за умов впливу антиоксиданта (ресерватрол), блокатора ПАРП (4-ГК), субстрата NOS (L-аргінін), блокатора iNOS (АГ) дають підстави стверджувати, що NO приймає участь в регуляції репарації ОНР ДНК ооцитів.

Отже, в роботі розкрита можлива патогенетична ланка розвитку ПНЯ - одониткові розриви ДНК клітин ФОО, тимуса і ЛВ, а в умовах *in vitro* встановлено участь NO в регуляції репарації одониткових розривів ДНК ооцитів;

запропоновані експериментально обґрунтовані способи корекції ПНЯ – застосування антиоксиданта, а також НЧНЗ.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі, відповідно до поставленої мети 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 введення антиоксиданту, 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, ЛВ, ФОО що раніше не було вивчено.

У відповідності до сформульованих завдань і отриманих результатів дослідження зроблені наступні висновки:

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).

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Антиоксидантное и прооксидантное действие доноров и метаболитов оксида азота / Л.Л. Гудков, К.Б. Шумаев, Е.И. Каленникова [и др.] // Биофизика. – 2007. – Т.52, № 3. – С.503-508.
2. Веропотвелян П.Н. Современный взгляд на синдром преждевременной недостаточности яичников / П.Н.Веропотвелян, Н.П.Веропотвелян, А.А.Бондаренко // Медичні аспекти здоров'я жінки – 2012. – №3-1(55). – С.48-56.
3. Влияние перорального введения субстанции наночастиц железа на функциональное состояние органов репродуктивной системы самок мышей с экспериментальной железодофицитной анемией / А.П.Литвиненко, Л.С.Резниченко, Т.Ю.Вознесенская [и др.] // Проблемы репродукции – 2015. – № 5. – С.23-28.
4. Вознесенська Т.Ю. Функціонування органів репродуктивної системи в умовах експериментального імунного ушкодження яєчника у мишей / Т.Ю.Вознесенська, О.М.Калейнікова, Т.В.Блашків – Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – № 2. – С.125-128.
5. Воробець З.Д. Аргіназна система в організмі людини при розвитку патологічних процесів / З.Д.Воробець, У.П.Єфремова, О.І.Якубець // Клінічна та експериментальна патологія. – Чернівці: Буковинський держ. мед. ун-т. – 2012. – Том 11, № 3(ч.2). – С.153–160.
6. 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 [та ін.] // Досягнення біології та медицини. – 2015. – №2(26). – С. 10-13
7. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С.Гланц. – М.: Практика, 1998. — 459с.
8. Данилович Ю.В. Оксид азоту як регулятор внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в міозитах матки / Ю.В.Данилович // Укр. біохім. журнал. –2012. – № 84(3). – С. 5–25.

9. Дорошенко А.М. Дослідження гострої токсичності наночастинок заліза при внутрішньошлунковому та внутрішньовенному шляхах введення / А. М.Дорошенко // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2014. – № 1. – С. 48-57.
10. Експериментальна залізодефіцитна анемія: вплив субстанції наночастинок заліза на мейотичне дозрівання ооцитів і скоротливість матки / А.П. Литвиненко, Т.В. Блашків, Л.С. Резніченко [та інші] // Світ медицини та біології – 2015. – №3 (52). – С.118-121.
11. Жорданидзе Д.О. Состояние овариального резерва при некоторых формах функционального бесплодия / Д.О.Жорданидзе, Т.А.Назаренко, Э.Р.Дуринян, Т.Ю. Иванец // Акушерство и гинекология. – 2010. – № 5. – С.25-31.
12. Запорожан В.М. Залізодефіцитна анемія у вагітних: проблеми стандартизації якості медичної допомоги / В.М.Запорожан, І.А.Анчева // Ліки України плюс. – 2014. – №3 (20). – С.14–17.
13. 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 [та ін.] // Експериментальна і клінічна медицина – 2016. – №1(70). – С. 63-67
14. Імуноморфологічна характеристика моделі системної патології імунокомплексного генезу у мишей / С.І.Павлович, А.П.Литвиненко, Н.В.Макогон, [та інші] // Вісник морфології - 2014. – №2. – С.496-500.
15. Клаус Д. Лимфоциты. Методы / Д.Клаус – М.: Мир,1990. – 50с.
16. Козина О.В. Образование и биологическая роль NO при аллергическом воспалении / О.В. Козина, Л.М. Огородова // Бюлл. сиб. мед. – 2009. – № 3. – С.95–105.
17. Кузнецова В.Л. Оксид азота: свойства, биологическая роль, механизмы действия / В.Л.Кузнецова, А.Г.Соловьева // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 4. – С.24–29.

18. Курашвили В.А. Новые возможности предотвращения оксидативного стресса / В.А.Курашвили, Л. Майлэм // Журнал натуральной медицины. – 2001. – № 1. – С.7-14.
19. Литвиненко А.П. Вплив препарату «Мексидол» на скоротливість міометрію цервікального відділу матки у мишей / А.П.Литвиненко, О.А.Шепель, О.М.Калейнікова // Досягнення біології та медицини. – 2014. – № 1(23). – С.21-24.
20. 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 // Український науково-медичний молодіжний журнал – 2015. – №3(90). – С. 95.
21. Луцкий М.А. Свободнорадикальное окисление липидов и белков– универсальный процесс жизнедеятельности организма / М.А.Луцкий [и др.] // Успехи современного естествознания. – 2014. – №12. – С. 24–28.
22. Макогон Н.В. Полі(АДФ-рибозо) полімераза 1: фізіологічна та патофізіологічна роль // Н.В.Макогон, І.М. Алексеева // Фізіологічний журнал – 2012. – Т.58, №3. – С.95-112.
23. Малахов В.А. Проблема оксиду азоту в неврології: монографія / В.А.Малахов – Суми: Видавництво СумДПУ ім.А.С.Макаренка, 2009. – 242с.
24. Мейотичне дозрівання ооцитів і життєздатність клітин їх фолікулярного оточення, тимуса і лімфатичних вузлів за умов моделювання системного імунокомплексного ушкодження / А.П. Литвиненко, В.О.Срібна, Н.Г. Грушка [та ін.] // Одеський медичний журнал– 2016. – №1 (153). – С.13-17
25. Моделювання хронічного запалення яєчників / Н.О.Волкова, М.С.Юхта, Т.О.Юрчук [та інші] – Патологія. – 2014. – № 1. – С.100-104.
26. Нитрозативный стресс и сдвиги в металло-лигандном гомеостазе эпидермальных клеток / В.И.Петухов, Л.Х.Баумане, Е.В.Дмитриев [и др.] // Вестник ОГУ. – 2011. – №15(134). – С.101-106.
27. Однониткові розриви ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів за умов експериментального імунного ушкодження /

- В.О. Срібна, А.П. Литвиненко, Н.Г. Грушка, Р.І. Янчій // Збірник тез конференції –2016. – С. 218.
28. Пат. №93351 МПК(2014.01), Україна. Спосіб моделювання системного імунокомплексного ушкодження у мишей / Н.В.Макогон, Т.Ю.Вознесенська, С.І.Павлович [та інші] // Заявка u201404698 від 25.09.2014, бюл. №18.
29. Пат. №112982 МПК(2016.01), Україна. 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 [та інші] // Заявка u201605924 від 10.01.2017, бюл.№1.
30. Петухов В.И. Об оправданности экстраполяции данных элементного анализа волос человека на весь организм / В.И.Петухов, А.Н.Щуков // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2015. – №6 (181). – С.165-171.
31. Розподіл одониткових розривів ДНК ядер ооцитів в умовах впливу антиоксиданта, блокатора ПАРП, субстрата NOS, блокатора iNOS / В.О. Срібна, Н.Г. Грушка, О.А. Кондрацька [та ін.] // Вісник проблем біології і медицини – 2017. – випуск 4, том 3(141) – С. 231-235
32. Рязанцева Н.В. Внутриклеточные газовые посредники оксид азота, монооксид углерода и сульфид водорода участвуют в регуляции апоптоза / Н.В.Рязанцева [и др.] // Цитология. – 2012. –№ 2 (54). – С.105–111.
33. Сметник В.П. Неоперативная гинекология / В.П.Сметник, Л.Г.Тумилович – М.: Медицинское информационное агентство, 2006. – 632с.
34. Срибная В.А. Мейотическое созревание ооцитов в условиях иммунокомплексного повреждения и изменениях в системе NO / В.А. Срибная //ISJM. – 2017 (april). – С. 560-561.
35. Срибная В.А. Экспериментальная преждевременная недостаточность яичников: иммунные механизмы развития и новые подходы коррекции / В.А. Срибная, Н.Г. Грушка, Р.И. Янчий // Збірник матеріалів конференції –2017. – С.187-188.

36. 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
37. Срібна В.О. Ефект наночастинок заліза на ооцити і клітини їх фолікулярного оточення / Срібна В.О. // Український науково-медичний молодіжний журнал. Спец. випуск – 2016. – №2(64) – С. 90.
38. Срібна В.О. Оваріальна дисфункція за умов експериментального імунокомплексного ушкодження і змінах в системі NO / В.О. Срібна // Медичний журнал «ХИСТ» – 2017. – С.328.
39. 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
40. Срібна В.О. Особливості розподілу однониткових розривів ДНК ядер клітин тимуса і лімфатичних вузлів за умов експериментального імунокомплексного ушкодження і застосуванні нанозаліза / В.О. Срібна, Р.І. Янчій, А.Д. Зуєва // Бюллетень XVI чтений им. В. В. Подвысоцкого –2017. – С. 328-330.
41. Срібна В.О. Передчасна недостатність яєчників: механізми розвитку і нові підходи щодо корекції / Срібна В.О. // Збірник матеріалів конференції –2017. – С. 73-74.
42. Срібна В.О. Розлад оваріальної функції в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження / В.О.Срібна, Р.І.Янчій // Клінічна та експериментальна патологія– 2017. –Т.XVI, №3(61), Ч.2. – С. 85-86.
43. Срібна В.О. Участь NO в регуляції репарації однониткових розривів ДНК ооцитів / В.О.Срібна // Збірник матеріалів конференції – 2017. – С. 99.
44. 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 // Збірник матеріалів конференції – 2017. – С. 116.

45. 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
46. Суханова Г.А. Биохимия клетки. / Г.А.Суханова, В.Ю.Серебров // Томск: - Чародей. – 2000. – С. 91-142.
47. Татарчук Т.Ф. Эндокринная гинекология (клинические очерки) / Т.Ф.Татарчук, Я.П.Сольский // К.: – 2003. – Ч. 1. – 248с.
48. Трахтенберг І.М. Наночастинки металів, методи отримання, сфери застосування, фізико-хімічні та токсичні властивості / І.М.Трахтенберг, Н.М.Дмитруха // Український журнал з проблем медицини праці. – 2013. – №4(37). – С.62–74.
49. Участь фактору некрозу пухлини-б в розвитку експериментального імунного ураження яєчників у мишей / Т.Ю.Вознесенська, О.А.Шепель, Т.М.Бризгіна, [та ін.] // Загальна патологія та патологічна фізіологія – 2010. – №5(2). – С.1-11.
50. 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, [и др.]// Проблемы репродукции – 2016. – №22(4). – С. 20-27.DOI: 10.17116/repro201622420-27
51. Функционирование органов репродуктивной системы в условиях экспериментального иммунного повреждения / Т.Ю. Вознесенська, О.М. Калейнікова, Т.В. Блашків, [та ін..] // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – №1(2). – С. 24-29
52. Чекман І.С. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація / І.С. Чекман, З.Р. Ульберг, В.О. Маланчук — К.: Поліграф плюс, 2012. — 328с.
53. Чеснокова Н.П. Молекулярно-клеточные механизмы индукции свободнорадикального окисления в условиях патологии / Н.П. Чеснокова, Е.В. Понукалина, М.Н. Бизенкова // Современные проблемы науки и образования. – 2006. – № 6. – С.21–26.

54. Шамилова Н.Н. Ген FMRI: новые возможности оценки овариального резерва / Н.Н. Шамилова, А.А. Марченко // Акушерство и гинекология. – 2011. – № 2. – С.58-64,
55. Шляхи загибелі фолікулярних клітин яєчника у мишей при порушенні оогенезу імунного походження / Т.Ю.Вознесенська, Н.В.Макогон, Т.М.Бризгіна, [та ін.] // Фізіологічний журнал – 2006. – №52(3). – С.52-57.
56. Шмагель К. В. Молекулярные основы иммунокомплексной патологии / К. В. Шмагель, В.А. Черешнев // Биохимия. - 2009. - Т. 74, № 5. - С.581-592.
57. Шумаев К.Б. Взаимодействие связанных с альбумином динитрозильных комплексов железа и активных форм кис-лорода / К.Б.Шумаев // Биофизика. – 2007. – № 3 (52). – С.534–538.
58. Щулькин А.В. Влияние мексидола на развитие феномена эксайтотоксичности нейронов in vitro // Журнал неврологии и психиатрии. – 2012. – № 2. – С.35–39.
59. A critical role for murine transferrin receptor 2 in erythropoiesis during iron restriction / D.F. Wallace, E.S. Secondes, G. Rishi [et al.] // Br J Haematol. – 2015. – Vol.168, №6. – P. 891–901.
60. A predictive toxicological paradigm for the safety assessment of nanomaterials. / H. Meng , T. Xia , S. George , A Nel // ACS Nano. – 2009. – №3(7) – P.1620-1627.
61. A review on PARP1 inhibitors: Pharmacophore modeling, virtual and biological screening studies to identify novel PARP1 inhibitors / S. Singh, J. Sarma, L. Narasu [et al.] // Curr Top Med Chem. – 2014. – №14(17) –P. 2020-2030.
62. Abdel-Mageed A. Effects of different TLR ligands on the expression of proinflammatory cytokines and avian β -defensins in the uterine and vaginal tissues of laying hens. / A. Abdel-Mageed, N. Isobe, Y. Yoshimura // Vet Immunol Immunopathol. –2014. – №162(3-4) – P.132-141.
63. Acetylation of poly(ADP-ribose)polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription / P. O. Hassa, S. S. Haenni, C. Buerki, [et al.] // J. Biol. Chem. –2005. – Vol.280, №49. P.40450–40464.

64. Adiposity and chronic inflammation in young women predict inflammation during normal pregnancy in the Philippines / T. McDade , J. Borja , F. Largad , [et al.] // J Nutr. – 2016. – 146(2) –P. 353-357.
65. Adsorbed polymer and NOM limits adhesion and toxicity of nano scale zerovalent iron to E. coli / Z.Li, K.Greden, P.Alvarez [et al.] // Environ. Sci. Technol. – 2010. – Vol. 44. – P. 3462–3467.
66. Aetiological profile of women presenting with premature ovarian failure to a single tertiary care center in Oman / V. Gowri, M. Al Shukri, F. Al-Farsi [et al.] // Post Reprod Health. – 2015. – 21(2) –P. 63-68.
67. Afanasieva K. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments /. K. Afanasieva, M. Zazhytska, A.Sivolob // Electrophoresis. – 2010.– №31 – P.512-519.
68. Albright F. A syndrome characterized by primary ovarian insufficiency and decreased stature / F. Albright., P. Smith, R. Fraser // Am. J. Med. Sci. – 1942. – №204 – P.625-648.
69. Al-Gubory K. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes / K. Al-Gubory, P. Fowler, C.Carrel // Int J Biochem Cell Biol. – 2010. – №42(10) – P.1634-1650.
70. Ame J. C. The PARP superfamily / J.C. Ame, C. Spenlehauer, G. de Murcia. // Bioessays. – 2004. – Vol.26. № 8. – P.882–893.
71. An immunological insight into premature ovarian failure (POF) / S. Dragojević-Dikić , D. Marisavljević , A. Mitrović , [et al.] // Autoimmun Rev. – 2010. – №9(11) – P.771-774.
72. An overview of three new disorders associated with genetic instability: LIG4 syndrome, RS-SCID and ATR-Seckel syndrome / M.O'Driscoll, A.R. Gennery, J. Seidel, [et al.] // DNA Repair (Amst) – 2004. – №3– P.1227–1235.
73. Andersen J. Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? / J. Andersen // Nature Reviews Neuroscience. – 2004. – №5. – P.18-25.

74. Anti-Müllerian hormone and assessment of ovarian reserve after ovarian toxic treatment: a systematic narrative review / A. Iwase, T.Nakamura, T. Nakahara, [et al.] // *Reprod Sci.* – 2015. – №22(5) – P.519-526.
75. Application of single-cell gel electrophoresis (comet) assay for assessing levels of DNA damage in canine and feline leukocytes / P.R.Heaton, R. Ransley, C.J. Charlton, [et al.] // *J Nutr.* – 2002. – №132(6 Suppl 2) – P.1598-1603.
76. Application of the comet assay method in clinical studies / P. Fikrová, R. Stětina, M. Hronek, [et al.] // *Wien Klin Wochenschr.* – 2011. – №123(23-24) – P.693-699.
77. Aprataxin localizes to mitochondria and preserves mitochondrial function / P.Sykora, D. L. Croteau, V.A. Bohr, D.M. Wilson // *Cell Biology.* – 2011. – №108(18) – P.7437–7442.
78. Aquatic Ecotoxicity Testing of Nanoparticles-The Quest To Disclose Nanoparticle Effects / L.Skjolding, S.Sørensen, N.Hartmann [et al.] // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* – 2016. – Vol. 55 (49). – P. 15224-15239
79. Arginine and citrulline and the immune response in sepsis / K. Wijnands, T. Castermans , M. Hommen , [et al.] // *Nutrients.* – 2015. – №7(3) – P.1426-1463.
80. Assessing the impact of zero-valent iron (ZVI) nanotechnology on soil microbial structure and functionality: a molecular approach / C.Fajardo, L.Ortíz, M.Rodríguez-Membibre [et al.] // *Chemosphere.* – 2012. – Vol.86 (8). – P.802-808.
81. Autoantibodies to heat-shock protein, HSPA5, and epitope spreading: high-dose dexamethasone therapy rescues ovarian function in experimental autoimmune ovarian insufficiency mouse model / K. Kadam , P. Mande , N. Gawas , [et al.] // *Am J Reprod Immunol.* – 2016. – №75(5) – P.580-593.
82. Autoimmune oophoritis as a mechanism of follicular dysfunction in women with 46XX spontaneous premature ovarian failure / V. Bakalov , J. Anasti, K. Calis , [et al.] // *Fertil Steril.* – 2005. – №84(4) – P.958-965.
83. Autoimmune polyglandular syndrome type 3 (APS-3) among patients with premature ovarian insufficiency (POI) / K. Szlendak-Sauer, D. Jakubik, M.Kunicki, [et al.] // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* – 2016. – №203 – P.61-65.

84. Autoimmune polyglandular syndrome: an unusual presentation with empty sella, premature ovarian failure, and Hashimoto's thyroiditis associated with thyroid cancer / C. Leães , M. Rios , J. Passaglia , [et al.] // *Gynecol Endocrinol.* – 2012. – №28(12) – P.999-1001.
85. Autoimmune primary ovarian insufficiency / C. Silva, L. Yamakami, N. Aikawa, [et al.] // *Autoimmun Rev.* – 2014. – №13(4-5). – P.427-430.
86. Autoimmunity and antigenic targets in ovarian pathology / T. Forges, P. Monnier-Barbarino , G. Faure , M. Bene // *Hum Reprod Update* – 2004. – №10(2) – P.163-175.
87. Bactericidal effect of zero-valent iron nanoparticles on *Escherichia coli* / C.Lee, J.Kim, W.Lee [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2008. – Vol. 42(13). – P.4927–4933.
88. Bilodeau-Goeseels S. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption in vitro / S. Bilodeau-Goeseels // *Theriogenology.* – 2007. – Vol. 68, №5. – P.693-701.
89. Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an up date. / C.Bogdan // *Trends Immunol.* – 2015. – №36 – P.161–178.
90. Bohgaki T. DNA double-strand break signaling and human disorders / T.Bohgaki, M. Bohgaki, R. Hakem // *Genome Integr.* – 2010. – №1(1) – 15p.
91. Bosques C.J. Fc-gamma receptors: Attractive targets for autoimmune drug discovery searching for intelligent therapeutic designs / C.J. Bosques, A.M. Manning // *Autoimmun Rev.* – 2016. – №15(1) – P.80-88.
92. Bowman L. Single cell gel electrophoresis assay (comet assay) for evaluating nanoparticles-induced DNA damage in cells / L. Bowman, V.Castranova, M. Ding // *Methods Mol Biol.* – 2012. – №906 – P.415-422.
93. Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism / M. Brownlee // *Diabetes.* – 2005. – Vol.54. №6. – P.1615–1625.
94. BSA immunization effects the oocytes and follicular cells, thymic and lymphnodes cells in female mice / A.Lytvynenko, N.Grushka, V.Sribna, T.Blashkiv // *Збірник наукових праць «Advances in cell biology and biotechnology».* – 2015. – С. 88.

95. Bukovsky A. Immunoregulation of follicular renewal, selection, POF, and menopause in vivo, vs. neo-oogenesis in vitro, POF and ovarian infertility treatment, and a clinical trial / A. Bukovsky , M. Caudle // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2012. – №10– P.97- 112.
96. Bystander effects as manifestation of intercellular communication of DNA damage and of the cellular oxidative status / H. Klammer, E. Mladenov, F.Li, G. Iliakis // *Cancer Lett.* – 2015. – №356(1) – P.58-71.
97. Caiafa P. Epigenetics: poly(ADP-ribosyl)ation of PARP-1 regulates genomic methylation patterns / P. Caiafa, T. Guastafierro, M. Zampieri // *FASEB J.* – 2009. – Vol.23. №3. – P.672–678.
98. Calculation on spectrum of direct DNA damage induced by low-energy electrons including dissociative electron attachment / W. Liu, Z. Tan, L.Zhang, C. Champion // *Radiat Environ Biophys.* – 2017. – №56(1) – P.99-110.
99. Cardiovascular Protective Effects and Clinical Applications of Resveratrol / S. Cho, K. Namkoong, M. Shin, [et al.] // *J Med Food.* – 2017. – №20(4) – P.323-334.
100. Carp H. The autoimmune bases of infertility and pregnancy loss / H. Carp, C. Selmi , Y. Shoenfeld // *J Autoimmun.* – 2012. – 38(2-3) – P.266-274.
101. Castro R. A systematic review of observational studies on oxidative/nitrosative stress involvement in dengue pathogenesis. R. Castro , H. Pinzón , N. Alvis-Guzman // *Colomb Med (Cali).* – 2015. – №46(3) – P.135-143.
102. CD93 and GIPC expression and localization during central nervous system inflammation / C. Liu, Z. Cui, S. Wang, D. Zhang // *Neural Regen Res.* – 2014. – №9– P.1995–2001.
103. Cervera R. Autoimmunity and recurrent pregnancy losses / R. Cervera , J.Balasch // *Clin Rev Allergy Immunol.* – 2010. – №39(3) – P.148-152.
104. Cervera R. Bidirectional effects on autoimmunity and reproduction / R.Cervera, J. Balasch // *Hum Reprod Update.* – 2008. – №14(4)3 – P.59-366.
105. Circulating levels of nitric oxide in fertile women in relation to hemenstrual cycle / E. Cicinelli, L. Ignarro, M. Lograno [et al.] // *Fertil. Steril.* – 1996. – Vol.66, №6. – P.1036-1038.

106. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress / J. Frijhoff, P.Winyard, N. Zarkovic, [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2015. – №23(14) – P.1144-1170.
107. Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy / M. Scheibye-Knudsen, M Ramamoorthy, P. Sykora, [et al.] // *J. Exp. Med.* – 2012. – №209 – P.855–869.
108. Cockayne syndrome group B protein promotes mitochondrial DNA stability by supporting the DNA repair association with the mitochondrial membrane / M.D. Aamann, M.M. Sorensen, C. Hvitby, [et al.] // *FASEB J.* – 2010.– №24 – P.2334–2346.
109. Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations / A.R. Collins // *Mol Biotechnol.* – 2004. – №26(3) – P.249-261.
110. Combined treatment of epigallocatechin gallate and Coenzyme Q10 attenuates cisplatin-induced nephrotoxicity via suppression of oxidative/nitrosative stress, inflammation and cellular damage / S. Fatima, N. Al-Mohaimed, Y. Al-Shaikh, [et al.] // *Food Chem Toxicol.* – 2016. – №94– 213-220.
111. Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties / T. Xia, M. Kovoichich, M. Liong, [et al.] // *ACS Nano.* – 2008. – №2(10) – P.2121-2134.
112. Conformational activation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon DNA binding revealed by small-angle X-ray scattering / S. Mansoorabadi, M. Wu, Z. Tao, [et al.] // *Biochemistry* – 2014.– №53 – P.1779–1788.
113. Copy number variation analysis detects novel candidate genes involved in follicular growth and oocyte maturation in a cohort of premature ovarian failure cases / O. Tšuiiko, M. Nõukas, O. Žilina [et al.] // *Hum Reprod.* – 2016. – №31(8). – P.1913-1925.
114. Crane R. Nanoscale zero-valent iron: future prospects for an emerging water treatment technology / R. Crane, T. Scott // *J. Hazard. Mater.* – 2012. – Vol.211-212. – P.112-125.
115. Culotta E. NO news is good news / E. Culotta, D. Koshland // *Science* – 1992. – №258– P.1862–1865

116. D'Amours D. The Mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signaling / D. D'Amours, S.P. Jackson // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2002. – №3 – P.317–327.
117. Davies K. The Oxygen Paradox, oxidative stress, and ageing / K. Davies // *Arch Biochem Biophys.* – 2016. – №595 – P.28-32.
118. Determination of the oxide layer thickness in core-shell zerovalent iron nanoparticles / J.Martin, A.Herzing, W.Yan [et al.] // *Langmuir.* – 2008. – Vol.24. – P.4329–4334.
119. Diao M. Use of zero-valent iron nanoparticles in inactivating microbes / M.Diao, M. Yao // *Water Res.* – 2009. – Vol. 43. – P.5243–5251.
120. Different therapeutic effects of cells derived from human amniotic membrane on premature ovarian aging depend on distinct cellular biological characteristics / C. Ding, H. Li, Y. Wang, [et al.] // *Stem Cell Res Ther.* – 2017. – №8(1) – P.173-181.
121. Dinitrosyl iron complexes with glutathione as NO and NO⁺ donors / R.Borodulin, L. Kubrina, V. Mikoyan, [et al.] // *Nitric Oxide* – 2013. – №29 – P.4-16.
122. Duhig K. Oxidative stress in pregnancy and reproduction / K. Duhig, L.Chappell, A. Shennan // *Obstet Med.* – 2016. – 9(3): 113-116.
123. Ebrahimi M. The role of autoimmunity in premature ovarian failure / M. Ebrahimi, A. Asbagh // *Iran J Reprod Med.* – 2015. – №13(8) – P.461-472.
124. Effect of resveratrol analogue on development of in vitro-fertilized bovine embryos / T. Patrocínio, C. Fernandes, L. Amorim, [et al.] // *Reprod Fertil Dev.* – 2016. – №29(1) – P.183-187.
125. Effects of nitric oxide on ovulation and ovarian steroidogenesis and prostaglandin production in the rabbit / J. Yamauchi, T. Miyazaki, S.Iwasaki, [et al.] // *Endocrinology.* – 1997. – Vol.138, №9. – P.3630-3637.
126. Ercal N. Toxic metals and oxidative stress part I: mechanisms involved in metal-induced oxidative damage / N. Ercal, H. Gurer-Orhan, N. Aykin-Burns // *Curr Top Med Chem* – 2001. – №1(6) – P.529-539.

127. Evidence for nitric oxide mediation of contractile activity in isolated strips of the human Fallopian tube / E. Ekerhovd, M. Brännström, M.Alexandersson, A. Norström // Hum. Reprod. – 1997. – Vol.12, №2. – P.301-305
128. Evidence for replicative repair of DNA double-strand breaks leading to oncogenic translocation and gene amplification / M.J. Difilippantonio, S.Petersen, H.T. Chen, [et al.] // Exp. Med. – 2002. – №196– P.469–480.
129. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. L. Limbach, P. Wick, P. Manser, [et al.] // Environ Sci Technol. – 2007. – №41(11) –P.4158-63.
130. Faddy M. A mathematical model of follicle dynamics in the human ovary / M. Faddy, R. Gosden // Hum. Reprod. – 1995. – Vol.10. – P.770-775.
131. Faraone-Mennella M. Chromatin architecture and functions: the role(s) of poly(ADP-RIBOSE) polymerase and poly(ADPribose)ylation of nuclear proteins / M. Faraone-Mennella // Biochem Cell Biol. – 2005. – №83(3) – P.396-404.
132. Favorable immune phenotype predicts successful implantation and pregnancy / V. Chernyshov , B. Dons'koi , I. Sudoma , Y. Goncharova // Immunol Lett. – 2014. – №162(2) – P.217-221.
133. Garrel C. Developmental changes in antioxidant enzymatic defences against oxidative stress in sheep placentomes / C. Garrel, P. Fowler, K. Al-Gubory // J Endocrinol. – 2010. – №205(1) – P.107-116.
134. Genetics of primary ovarian insufficiency / R. Rossetti, I. Ferrari, M. Bonomi, L. Persani // Clin Genet. – 2017. – №91(2). – P.183-198.
135. Genomic instability in chronic airway inflammatory diseases / Z. Bao, J. Xiong, W. Li [et al.] // Biomed J. – 2015. – Vol.38(2) – P.117-124.
136. Gleit M. Comet assay: an essential tool in toxicological research / M.Gleit, T. Schneider, W. Schlörmann // Arch Toxicol. – 2016. – №90(10) – P.2315-2336.
137. Global profiling of reactive oxygen and nitrogen species in biological systems: high-throughput real-time analyses / J. Zielonka, M. Zielonka, A.Sikora, [et al.] // J Biol Chem. – 2012. – №287(5) – P.2984-2995.

138. Growth hormone treatment of premature ovarian failure in a mouse model via stimulation of the Notch-1 signaling pathway / T. Liu, S. Wang, L. Zhang, [et al.] // *Exp Ther Med.* – 2016. – №12(1) – P.215-221.
139. Guzel Y. Understanding follicle growth in vitro: Are we getting closer to obtaining mature oocytes from in vitro-grown follicles in human? / Y. Guzel, O. Oktem // *Mol Reprod Dev.* – 2017. – №84(7) – P.544-559.
140. Halliwell B. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance / B. Halliwell, S. Chirico, J. Am // *Clin Nutr.* – 1993. – №57(5) – P.715-724.
141. Hassa P.O. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases / P.O. Hassa, M.O. Hottiger // *Front. Biosci.* – 2008. – Vol.13. – P.3046–3082.
142. Henle E. Formation, prevention, and repair of DNA damage by iron/hydrogen peroxide / E.Henle, S.Linn // *J. Biol. Chem.* – 1997. – Vol.272. – P.19095–19098.
143. Histone shuttling by poly ADPriboseylation / F.R. Althaus, L. Hofferer, H.E. Kleczkowska [et al.] // *Mol. Cell Biochem.* – 1994. – Vol.138. №1–2. – P.53–59.
144. Hoeijmakers J. DNA damage, aging, and cancer / J. Hoeijmakers // *N. Engl. J. Med.* – 2009. – 361 – P.1475–1485.
145. Horan C. Oocyte stem cells: fact or fantasy? / C. Horan, S. Williams // *Reproduction.* 2017. – №154(1) – P.23-35.
146. Hubbard C. The effects of follicle-stimulating hormone and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate on cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-phosphodiesterase and resumption of meiosis in hamster cumulus-oocyte complexes / C. Hubbard, J. Price // *Biol. Reprod.* – 1988. – Vol.39, №4. – P.829-838.
147. Humoral and cellular autoimmunity in women with recurrent pregnancy losses and repeated implantation failures: A possible role of vitamin D / J. Kwak-Kim, A. Skariah, L. Wu, [et al.] // *Autoimmun Rev.* – 2016. – №15(10) – P.943-947.
148. Hwang Y.H. Mechanism study of nitrate reduction by nano zero valent iron / Y.H. Hwang, D.G. Kim, H.S. Shin // *J Hazard Mater.* – 2011. – №185(2-3) – P.1513-1521.

149. Hydrogen-rich Water Exerting a Protective Effect on Ovarian Reserve Function in a Mouse Model of Immune Premature Ovarian Failure Induced by Zona Pellucida3 / X. He, S. Wang, C. Yin, [et al.] // Chin Med J. – 2016. – №129(19) – P.2331-2337.
150. IL-1 β and TNF α promote monocyte viability through the induction of GM-CSF expression by rheumatoid arthritis synovial fibroblasts / C. Darrieutort-Laffite, M. Boutet, M. Chatelais, [et al.] // Mediators Inflamm. – 2014. – Vol.2014 – P.74-84.
151. Impact of nanoscale zero valent iron on geochemistry and microbial populations in trichloroethylene contaminated aquifer materials / T.Kirschling, K. Gregory, E. Minkley [et al.] // Environ. Sci. Technol. – 2010. – Vol.44. – P.3474–3480.
152. Inactivation of Escherichia coli by nanoparticulate zerovalent iron and ferrous ion / J.Kim, H.Park, C.Lee [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – Vol.76 (22). – P.7668-7670.
153. Increased reactive oxygen species formation and oxidative stress in rheumatoid arthritis / S. Mateen, S. Moin, A.Q. Khan, [et al.] // PLoS One. – 2016. – Vol.4, №11(4): e0152925.
154. Inhibition of nitric oxide: effects on interleukin-1 beta-enhanced ovulation rate, steroid hormones, and ovarian leukocyte distribution at ovulation in the rat / N. Bonello, K. McKie, M. Jasper, [et al.] // Biol. Reprod. – 1996. – Vol.54, №2. – P.436-445.
155. Investigating the allosteric reverse signalling of PARP inhibitors with microsecond molecular dynamic simulations and fluorescence anisotropy / J.Marchand, A. Carotti, D. Passeri, [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2014.– №1844 – P.1765–1772.
156. Involvement of ICE family proteases in apoptosis induced by reoxygenation of hypoxic hepatocytes / S. Shimizu, Y. Eguchi, W. Kamiike, [et al.] // Am.J.Phisiol. – 1996. – №271(6) – P.949-958.
157. Jablonka-Shariff A. The role of nitric oxide in oocyte meiotic maturation and ovulation: meiotic abnormalities of endothelial nitric oxide synthase knock-out mouse oocytes / A. Jablonka-Shariff, L.Olson // Endocrinology. – 1998. – Vol.139, №6. – P.2944-2954.

158. Jackson S.P. The DNA-damage response in human biology and disease / S.P. Jackson, J. Bartek // *Nature* – 2009. – №461 – P.1071–1078.
159. Jancar S. Immune complex-mediated tissue injury: a multistep paradigm / S. Jancar, S.Crespo // *Trends Immunol.* – 2005. – №26(1) – P.48-55.
160. Jankowska K. Premature ovarian failure / K. Jankowska // *Prz Menopauzalny* – 2017. – №16(2) – P.51-56.
161. Jeppesen D.K. DNA repair deficiency in neurodegeneration / D.K. Jeppesen, V.A. Bohr, T. Stevnsner // *Prog. Neurobiol.* – 2011. – №94 – P.166–200.
162. Jha A. Premature ovarian failure: an association with autoimmune diseases / A. Jha, D. Goswami // *J Clin Diagn Res.* – 2016. – №10(10) – P.10-12.
163. Jomova K. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease / K. Jomova, M. Valko // *Toxicology* – 2011. – №283(2-3) – P.65-87.
164. Jones D. Redox pioneer: professor Helmut Sies. / D. Jones, R. Radi // *Antioxid Redox Signal.* – 2014. – №21(18) – P.2459-2468.
165. Kalu E. Spontaneous premature ovarian failure: management challenges / E. Kalu, N. Panay // *Gynecol Endocrinol.* – 2008. – №24(5). – P.273-279.
166. Kim M. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. / M. Kim, T. Zhang, W. Kraus // *Genes Dev.* – 2005. – №19(17) – P.1951-1967.
167. Komorowska B. Autoimmune premature ovarian failure / B.Komorowska // *Prz Menopauzalny.* – 2016. – №15(4) – P.210-214.
168. Kraus W.L. PARP goes transcription / W.L. Kraus, J.T. Lis // *Cell.* – 2003. – Vol.113, №6. – P. 677–683.
169. Krieger-Liszkay A. Singlet oxygen production in photosynthesis / A.Krieger-Liszkay // *J Exp Bot.* – 2005. – №56(411) – P.337-346.
170. Kruszyńska A. Anti-Müllerian hormone (AMH) as a good predictor of time of menopause / A. Kruszyńska, J.Słowińska-Srzednicka // *Prz Menopauzalny.* – 2017. – №16(2) – P.47-50.
171. Kulkarni A. The involvement of DNA-damage and -repair defects in neurological dysfunction / A. Kulkarni, D.M. Wilson // *Am. J. Hum. Genet.* – 2008. – №82 – P.539–566.

172. Kurutas E. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state / E.Kurutas // *Nutr J.* – 2016. – №15(1) – 71p.
173. Leandro G. The impact of base excision DNA repair in age-related neurodegenerative diseases. / G. Leandro, P. Sykora, V. Bohr // *Mutat Res.* – 2015. – №776 – P.31-39.
174. Ledford H. Acclimation to singlet oxygen stress in *Chlamydomonas reinhardtii* / H. Ledford, B. Chin, K. Niyogi // *Eukaryot Cell.* – 2007. – №6(6) – P.919-930.
175. Lee C. Nitroxide antioxidant as a potential strategy to attenuate the oxidative/nitrosative stress induced by hydrogen peroxide plus nitric oxide in cultured neurons / C. Lee, L. Yu, J. Wang // *Nitric Oxide.* – 2016. – №54 – P.38-50.
176. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA / T.Lindahl // *Nature.* – 1993. – №362 – P.709–715.
177. Lucas R. Arginase in the vascular endothelium: friend or foe? / R. Lucas, D.Fulton, R.W. Caldwell [et al.] // *Front Immunol.* – 2014. – №5. – P. 589–580.
178. Mahajan A. Deficiency and cell death pathways: a model for the pathogenesis of SLE / A. Mahajan, M. Herrmann, Muñoz L.E. Clearance // *Front Immunol.* – 2016. – Vol.7 – 135-170.
179. Martinez A. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps / A. Martinez, R. Kolter // *J Bacteriol.* – 1997 – №179(16) – P.5188-5194.
180. Mayer B. Nitric oxide/cyclic GMP-mediated signal transduction / B. Mayer // *Ann. NY. Acad. Sci.* – 1994. – Vol. 733. – P. 357-364.
181. McKinnon P.J. DNA repair deficiency and neurological disease / P.J.McKinnon // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2009. – №10 – P.100–112.
182. Mechanisms in endocrinology: Nutrition as a mediator of oxidative stress in metabolic and reproductive disorders in women / E. Diamanti-Kandarakis, O. Papalou, E. Kandaraki, G. Kassi // *Eur J Endocrinol.* – 2017. – №176(2) – P.79-99.

183. Multiple immune deviations predictive for IVF failure as possible markers for IVIG therapy / V. Chernyshov, B. Dons'koi, I. Sudoma, Y. Goncharova // *Immunol Lett.* – 2016 – №176 – P.44-50.
184. Mutation of a BRCT domain selectively disrupts DNA single-strand / David J. Moore, Richard M. Taylor, P. Clements, W. Keith Caldecott // *Cell biology* – 2000. – Vol. 97, №25 – P.13649–13654.
185. NADPH oxidases NOX-1 and NOX-2 require the regulatory subunit NOR-1 to control cell differentiation and growth in *Neurospora crassa* / N.Cano-Domínguez, K. Alvarez-Delfín, W. Hansberg, J. Aguirre // *Eukaryot Cell.* – 2008. – №7(8) – P.1352-1361.
186. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects // S. Klaine, P. Alvarez, G. Batley [et al.] // *Environ. Toxicol. Chem.* – 2008. – Vol. 27. – P.1825–1851.
187. Nanotehnolohiyi, nanomedicine: prospects of research and implementation of their results in the medical practice / L.G. Rosenfeld, V.F.Moskalenko, I.S. Chekman, B.A. Movchan // *Ukr. med. Journal* – 2008.– №67 (5) – P.63-68.
188. Niki E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material / E. Niki // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – №1840(2) – P.809-817.
189. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery / H. Maul, M. Longo, G. Saade, R. Garfield // *Curr. Pharm. Des.* – 2003. – Vol. 9, №5. – P.359-380.
190. Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets? / L. Rochette, J. Lorin, M. Zeller [et al.] // *Pharmacol Ther.* – 2013. – №140(3) – 239-257.
191. Nohl H. Intracellular generation of reactive oxygen species by mitochondria / H. Nohl, L. Gille, K. Staniek // *Biochem Pharmacol.* – 2005. – №69(5) – P.719-723.
192. Oktem O. Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function / O. Oktem, K. Otay // *Obstet. and Gynecol.* – 2007. – Vol.15. – P. 2222-2229.

193. Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies / V. Rani, G. Deep, R. Singh, [et al.] // *Life Sci.* – 2016. – 148 – P.183-193.
194. Oxidative stress induced by zero-valent iron nanoparticles and Fe(II) in human bronchial epithelial cells / C.R. Keenan, R. Goth-Goldstein, D. Lucas [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – № 43 (12). – P.4555–4560.
195. Oxidative stress responses in the marine antarctic diatom *Chaetoceros brevis* (Bacillariophyceae) during photoacclimation / P. Janknegt, W. Van De Poll, R. Visser, [et al.] // *J Phycol.* – 2008. – №44(4) – P.957-966.
196. Pacher P. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. / P.Pacher, J. Beckman, L. Liaudet // *Physiol Rev.* – 2007. – №87 – P.315–424.
197. Pálmai-Pallag T. Inflammation-induced DNA damage and damage-induced inflammation: a vicious cycle / T. Pálmai-Pallag, C. Bachrati // *Microbes Infect.* – 2014. – №16(10) – P.822-832.
198. PARP inhibitors: review of mechanisms of action and BRCA1/2 mutation targeting / K. Dziadkowiec, E. Gusiorowska, E. Nowak-Markwitz, A. Jankowska // *Prz Menopauzalny.* – 2016. – №15(4) – P.215-219.
199. Partial oxidation ("aging") and surface modification decrease the toxicity of nanosized zerovalent iron / T.Phenrat, T.Long, G.Lowry [et al.] // *Environ. Sci. Technol.* – 2009. – Vol.43(1). – P.195-200.
200. Penile erectile dysfunction after brachial plexus root avulsion injury in rats / G. Fu, B. Qin, L. Jiang [et al.] // *Neural Regen Res.* – 2014. – №9(20) – P.1839-1843.
201. Peripheral blood natural killer cells activation status determined by CD69 upregulation predicts implantation outcome in IVF / B. Donskoi, V.Chernyshov, V. Sirenko [et al.] // *Immunobiology.* – 2014. – №219(3) – P.167-171.
202. Pervaiz S. Resveratrol: its biologic targets and functional activity / S.Pervaiz, A. Holme // *Antioxid Redox Signal.* – 2009. – №11(11) – P.2851-2897.
203. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions / D. D'Amours, S. Desnoyers, I. D'Silva, G. Poirier // *Biochem J.* – 1999. – №342(2) – 249-268.

204. Polyphenol stilbenes: molecular mechanisms of defence against oxidative stress and aging-related diseases / M. Reinisalo, A. Kårlund, A. Koskela, K. Kaarniranta // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* – 2015. – 24p.
205. Premature ovarian failure: autoimmunity and natural history / C. Betterle, A. Rossi, S. Dalla Pria, [et al.] // *Clin Endocrinol (Oxf)*. – 1993. – №39(1) – P.35-43.
206. Primary ovarian insufficiency due to steroidogenic cell autoimmunity is associated with a preserved pool of functioning follicles / A. La Marca, S. Marzotti, A. Brozzetti, [et al.] // *J Clin Endocrinol Metab*. – 2009. – №94(10) – P.3816-3823.
207. Protective effects of resveratrol against mancozeb induced apoptosis damage in mouse oocytes / Y. Liu, Y. Wang, S. He, [et al.] // *Oncotarget*. – 2017 – №8(4) – P.6233-6245.
208. Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging / Y. Kamenisch, M. Fousteri, J. Knoch, [et al.] // *J. Exp. Med*. – 2010 – №207 – P.379–390.
209. Psychosocial vulnerability, resilience resources, and coping with infertility: a longitudinal model of adjustment to primary ovarian insufficiency / M. Driscoll, M. Davis, L. Aiken, [et al.] // *Ann Behav Med*. – 2016. – №50(2) – P.272-284.
210. Rass U. Defective DNA repair and neurodegenerative disease / U. Rass, I. Ahel., S. West // *Cell* – 2007. – №130 – P.991–1004.
211. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene-arrestin mammalian oocytes / A. Pandey, A. Tripathi, K. Premkumar [et al.] // *J. Cell. Biochem*. – 2010. – Vol.111, №3. – P.521-528.
212. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes / D. Zorov, C. Filburn, L. Klotz, [et al.] // *J Exp Med*. – 2000 – №192(7) – P.1001-1014.
213. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease / M. Valko, K. Jomova, C. Rhodes [et al.] // *Arch Toxicol*. – 2016. – №90(1) – 1-37.

214. Redox signaling and oxidative stress: Cross talk with TNF-related apoptosis inducing ligand activity / R. Voltan, P. Secchiero, F. Casciano , [et al.] // *Int J Biochem Cell Biol.* – 2016. – 81(B) – P.364-374.
215. Repeated cupping manipulation temporary decreases natural killer lymphocyte frequency, activity and cytotoxicity / B. Dons'koi, V.Chernyshov, D. Osypchuk, S. Baksheev / *J Integr Med.* – 2016. – №14(3) – P.197-202.
216. Reproductive characteristics of women diagnosed with premature ovarian insufficiency. // N. Daan, A. Hoek, E. Corpeleijn [et al.] // *Reprod Biomed Online.* – 2016. – №32(2). – P.225-232.
217. Resveratrol during in vitro maturation improves the quality of bovine oocyte and enhances embryonic development in vitro / V. Torres, L. Muñoz, R. Urrego, [et al.] // *Reprod Fertil Dev.* – 2016. – №29(1) – P.199-203.
218. Resveratrol protects against age-associated infertility in mice / M. Liu, Y. Yin, X. Ye, [et al.] // *Hum Reprod.* – 2013. – №28(3) – P.707-717.
219. Resveratrol protects mouse oocytes from methylglyoxal-induced oxidative damage / Y. Liu, X. He, X. Huang, [et al.] // *PLoS One.* – 2013. – №8(10) – P.779-806.
220. Resveratrol, an effective regulator of ovarian development and oocyte apoptosis. X. Kong, Y. Fu, J. Xu, [et al.] // *J Endocrinol Invest.* – 2011 – №34(11) – P.374-381.
221. Resveratrol-induced mitochondrial synthesis and autophagy in oocytes derived from early antral follicles of aged cows / M. Sugiyama, R.Kawahara-Miki, H. Kawana, [et al.] // *J Reprod Dev.* – 2015. – №61(4) – P.251-259.
222. Retinol, β -carotene and oxidative stress in systemic inflammatory response syndrome / C. Nogueira, F. Borges, E. Lameu, [et al.] // *Rev Assoc Med Bras.* – 2015. – №61(2) – P.116-120.
223. Role of human DNA glycosylase Nei-like 2 (NEIL2) and single strand break repair protein polynucleotide kinase 3'-phosphatase in maintenance of mitochondrial genome / S.M. Mandal, M.L. Hegde, A. Chatterjee, [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – №287 – P.2819–2829.

224. Role of tyrosyl-DNA phosphodiesterase (TDP1) in mitochondria / B.B. Das, T.S. Dexheimer, K. Maddali, Y. Pommier // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, – 2010. – №107 – P.19790–19795.
225. Rosselli M. Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction / M. Rosselli, P. Keller, R. Dubey // *Hum. Reprod. Update.* – 1998. – Vol.4, №1. – P.3-24.
226. Saif A. Premature ovarian failure could be an alarming sign of polyglandular autoimmune dysfunction / A. Saif , M. Assem // *Endocr Regul.* – 2017. – №51(2) – P.114-116.
227. Shmagel K. Molecular bases of immune complex pathology / K.Shmagel, V. Chereshevnev // *Biochemistry (Mosc).* – 2009. – №74(5) – P.469-479.
228. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. / H. Sies // *Redox Biol.* – 2015. – №4 – P.180-183.
229. Soory M. Inflammatory mechanisms and redox status in periodontal and cardiometabolic diseases: effects of adjunctive nutritional antioxidants and statins / M. Soory // *Infect Disord Drug Targets.* – 2012. – №12(4) – P.301-315.
230. Sorochinska J. Application of the comet assay for the DNA damage assessment caused by different inveroental agents / J.Sorochinska, V.Mikhailenko // *Oncology.* – 2008. – Vol.10, №3. – P.303-308.
231. Souliotis V.L. Increased DNA double-strand breaks and enhanced apoptosis in patients with lupus nephritis / V.L. Souliotis, P.P. Sfikakis // *Lupus.* 2015. – Vol.24, № 8. – P.804-815.
232. Speit G. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair / G. Speit, A. Rothfuss // *Methods Mol Biol.* – 2012. – №920 – P.79-90.
233. Sribna V.A. Immune premature ovarian insufficiency: mechanisms and new approaches of correction / V.A.Sribna, T.V. Blashkiv, R.I. Yanchiy // – *Medical Review.* – 2017. – vol.4, P. 23-24.
234. Stabilization of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions by anionic polyelectrolytes: adsorbed anionic polyelectrolyte layer properties and their effect on

- aggregation and sedimentation / T. Phenrat, N. Saleh, K.Sirk [et al.] // J. Nanopart. Res. – 2008. – Vol.10. – P.795–814
235. Structure of catalase-A from *Saccharomyces cerevisiae* / M.J. Maté, M. Zamocky, L.M. Nykyri, [et al.] // J. Mol. Biol. – 1999. – №286 – P.135-139.
236. Systemic inflammation and autoimmunity in women with chronic endometritis / V. Kushnir, S. Solouki, T. Sarig-Meth, [et al.] // Am J Reprod Immunol. – 2016. – №75(6) – P.672-677.
237. Tahbaz N. Role of polynucleotide kinase/phosphatase in mitochondrial DNA repair / N. Tahbaz, S. Subedi, M. Weinfeld // Nucleic Acids Res. – 2012. – №40 – 3484–3495.
238. Tawarahara H. Facile preparation of a fluorescent probe to detect the cellular ability of nucleotide excision repair / H. Tawarahara, I. Kuraoka, S.Iwai. // Anal Biochem. – 2017. – №1(526) – 71-74.
239. The complex interplay of iron metabolism, reactive oxygen species, and reactive nitrogen species: insights into the potential of various iron therapies to induce oxidative and nitrosative stress / T. Koskenkorva-Frank, G. Weiss, W. Koppenol, S. Burckhardt // Free Radic Biol Med. – 2013. – №65 – P.1174-1194.
240. The mechanisms of S-nitrosothiol decomposition catalyzed by iron / A. Vanin, A. Papina, V. Serezhenkov, W. Koppenol // Nitric Oxide – 2004. – №10(2) – P.60-73.
241. The next three decades of the comet assay: a report of the 11th International Comet Assay Workshop / G. Koppen, A. Azqueta, B. Pourrut, [et al.] // Mutagenesis. – 2017. – №32(3) – P.397-408.
242. The prevalence and phenotypic characteristics of spontaneous premature ovarian failure: a general population registry-based study / K.Haller-Kikkatalo, R. Uibo, A. Kurg, A. Salumets // Hum Reprod. – 2015. – №30(5) – P.1229-1238.
243. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors / J.Murai, S. Huang, B. Das, [et al.] // Cancer Res. – 2012. – №72(21) – P.5588-5599.
244. Tuning of Peroxiredoxin Catalysis for Various Physiological Roles / A. Perkins, L.B. Poole, P.A. Karplus // Biochemistry. – 2014. – № 53(49) – P.7693–7705.

245. Van Blerkom J. Regulation of mitochondrial polarity in mouse and human oocytes: the influence of cumulus derived nitric oxide / J. Van Blerkom, P.Davis, V.Thalhammer // *Mol. Hum. Reprod.* – 2008. – Vol.14, №8. – P.431-444.
246. Vanin A. Dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands as a "working form" of endogenous nitric oxide / A. Vanin // *Nitric Oxide.* – 2016. – №54 – P.15-29.
247. Veith S. RecQ helicases and PARP1 team up in maintaining genome integrity / S. Veith, A. Mangerich // *Ageing Res Rev.* – 2015. – №23(A) – P.12-28.
248. Vermeulen A. Environment, human reproduction, menopause and andropause / A. Vermeulen // *Environmental Health Perspectives Supplements.* – 1993. – №101(2) – P.91-100.
249. Very low doses of heavy oxygen ion radiation induce premature ovarian failure / B. Mishra, R. Ripperdan, L. Ortiz, U. Luderer // *Reproduction* – 2017. – №154(2) – P.123-133.
250. Voznesenskaya T.Yu. Involvement of the T-type Ca²⁺ channels in the formation of the first polar body by murine oocytes / T.Yu.Voznesenskaya, I.M. Alekseeva // *Neurophysiology* – 2000. – №32(3). – P.145-146.
251. Weidinger A. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction / A. Weidinger, A.V.Kozlov // *Biomolecules.* – 2015. – № 5. – P.472–484.
252. Wilson D.M. The mechanics of base excision repair and its relationship to aging and disease / D.M. Wilson, V.A. Bohr. // *DNA Repair (Amst)* – 2007. – №6 – P.544–559.
253. Yoshida Y. Lipid peroxidation biomarkers for evaluating oxidative stress and assessing antioxidant capacity in vivo / Y. Yoshida, A. Umeno, M.Shichiri // *J Clin Biochem Nutr.* – 2013. – №52(1) – P.9-16.
254. Zhang W. Nanoscale iron particles for environmental remediation: an overview / W. Zhang // *J. Nanopart. Res.* – 2003. – Vol.5(3-4). – P.323–332.
255. Zorov D. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release / D. Zorov, M. Juhaszova, S. Sollott // *Physiol Rev.* – 2014. – №94(3) – P.909-950.

256. Zorov D. Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review / D. Zorov, M. Juhaszova, S. Sollott // *Biochim Biophys Acta*. – 2006. – №1757(5-6) – P.509-517.
257. Zupanic- Krmek D. Anemia of chronic disease: illness or adaptive mechanism / D. Zupanic- Krmek, M. Sucic , D. Bekic // *Acta Clin Croat*. – 2014. – Vol.53, №3. – P.348–354.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. **Срібна В.О.** Розподіл одониткових 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.
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.
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.
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.
5. **Срібна В.О.** Одониткові 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.

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.
7. Литвиненко А.П. Мейотичне дозрівання ооцитів і життєздатність клітин їх фолікулярного оточення, тимуса і лімфатичних вузлів за умов моделювання системного імунокомплексного 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.
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.

які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. **Срібна В.О.** Розлад оваріальної функції в умовах експериментального імунокомплексного 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 – **Усна доповідь.**
2. **Срібна В.О.** Участь NO в регуляції репарації одониткових 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: сьогодення і майбутнє» (м.Харків, 19 травня 2017 р.). – Збірник матеріалів конференції – 2017. – С. 99 – **Публікація тез.**

3. **Срібна В.О.** Особливості розподілу одониткових розривів ДНК ядер клітин тимуса і лімфатичних вузлів за умов експериментального імунокомплексного 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 – **Усна доповідь.**
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 – **Усна доповідь.**
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-PracticaConference “Medicine pressing questions” (Baku, Azerbaijan, Mai 10-11, 2017). – Medical Review. – 2017. – vol.4, P.23-24 – **Усна доповідь.**
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 – **Публікація тез.**
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 “Іновації та перспективи сучасної медицини», BIMCO 2017

- (м.Чернівці, 5-7 квітня 2017р.). – Медичний журнал «ХИСТ» –2017. – С.328 – **Публікація тез.**
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 – **Публікація тез.**
 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 – **Публікація тез.**
 - 10.**Срібна В.О.** Однониткові розриви ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів за умов експериментального імунного 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 – **Усна доповідь.**
 - 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 2016 р.). – Український науково-медичний молодіжний журнал. Спец. випуск – 2016. – №2(64) – С.90 – **Усна доповідь.**
 - 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 – **Усна доповідь**.

- 13.Lytvynenko A. BSA immunization effects the oocytes and follicular cells, thymic and lymph nodes 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 – **Публікація тез**.

які додатко вовідображають наукові результати дисертації:

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).