DOI 10.29254/2077–4214–2017–4–3–141–231-234

УДК: 616-092:618.112:618.112:616-092.4

Срібна В. О., Грушка Н. Г., Кондрацька О. А., Блашків Т. В., Янчій Р. І.

РОЗПОДІЛ ОДНОНИТКОВИХ РОЗРИВІВ ДНК ЯДЕР ООЦИТІВ В УМОВАХ ВПЛИВУ АНТИОКСИДАНТА, БЛОКАТОРА ПАРП, СУБСТРАТА NOS, БЛОКАТОРА iNOS

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (м. Київ)

valia-z@ukr.net

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).

Вступ. Проблема передчасної недостатності яєчників (ПНЯ) у сучасному суспільстві стає все більш актуальною через відстрочку материнського віку та становить одну із причин безпліддя, а також значно погіршує якість життя молодих жінок.

В основі ПНЯ будь-якого ґенезу лежить невластивий репродуктивному віку дефіцит примордіальних фолікулів, аж до повного виснаження оваріального резерву. Незважаючи на те що у деяких жінок може спостерігатися ріст власних фолікулів, якість яйцеклітини при цьому різко знижено [1].

ПНЯ вивчають на моделях з використанням гризунів [6,12,13], основні дослідження спрямовані на корекцію пошкодження яєчників [7,8,10,11].

Раніше нами, з використанням моделі експериментального імунного ушкодження, яка частково відображає ПНЯ, було встановлено пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів та посилення пошкодження ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів (збільшення одноніткових розривів (ОНР) ДНК), а також показано, що ці досліджувані показники покращуються при застосуванні антиоксиданту, блокатора NO-синтази, через ймовірне зменшення проявів оксидативно-нітрозативного стресу[3,4].

Виходячи із мовленого вище, актуальними на сьогодні є вивчення можливого (NO-залежного) механізму регуляції репарації ДНК, що відображається як ОНР, а саме дослідження особливостей розподілу ОНР ДНК ядер ооцитів в експериментальних умовах впливу *in vitro* антиоксиданта, блокатора полі (АДФ-рибозо) полімерази (ПАРП), блокатора NO-синтази, субстрату NOS, що раніше не було вивчено.

Мета роботи полягала у дослідженні розподілу ОНР ДНК ядер ооцитів *in vitro* в умовах впливу антиоксиданта (ресвератрол), блокатора ПАРП (4- гідроксиквіназолін), субстрата NOS (L-аргінін гідрохлорид), блокатора iNOS (аміногуанідин).

Об'єкт і методи дослідження. Досліди проводили на статевозрілих самицях мишей лінії СВА масою 18-22 г з дотриманням вимог Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, (Страсбург, 1986) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006).

Ооцити неферментативно (механічно) виділяли з яєчників мишей та культивували протягом 4 год. в окремих камерах по 400 мкл культурального середовища DME з 15 mM HEPES, концентрація CaI^{2+} 1,71 mM, температура 37°C з наступними речовинами: L-аргінін гідрохлорид – субстрат NOS у концентрації 0,04 mM; аміногуанідин, АГ- специфічний блокатор iNOS у концентрації 0,02 mM; 4- гідроксиквіназолін4-ГК – блокатор ПАРП-1 у концентрації 1,0 mM; ресвератрол – антиоксидант у концентрації 2,0 μM. Всі використані речовини виробництва фірми «Sigma»,США.

Для виявлення ОНР ДНК ядер ооцитів використовували метод лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет – «DNA-comet assay») [9]. Згідно методиці за позитивний контроль використовували ооцити, які після періоду культивування (4 год.) піддавали впливу H2O2 (температура 4єС, 250mM, 5 хв.). Негативний контроль – культивовані протягом 4 год. ооцити в середовищі DME з 15 мМ HEPES. Аналіз ДНК-комет, забарвлених Хехст 33342 (700 мкмоль/л), здійснювали візуально, використовуючи люмінесцентний мікроскоп ЛЮМАМ И-1 (Росія) при застосуванні водно-імерсійного об'єктива (Ч30). На кожному мікропрепараті аналізували не менше 30 окремо розташованих ДНК-комет. За співвідношенням ДНК у "голові" та "хвості" комети поділяли на 5 класів (0-4).

Результати обробляли статистично в програмі Graph Pad Prism version 5.00 for Windows (Graph Pad Soft ware, California USA). Після перевірки на нормальність розподілу аналіз груп даних проводили з використанням one-way ANOVA з подальшим множинним порівнянням за допомогою пост-хок тесту Newman-Keuls. Відмінності вважали статистично значущими при $p<0,05$. Результати виражали як M±m (середнє ± стандартна похибка).

Результати дослідження та їх обговорення. Встановлено, що блокатор ПАРП-1 – 4-ГКі блокатор iNOS- АГ, а також їх комбінація, призводять до перерозподілу ОНР ДНК ооцитів у бік збільшення пошкодження ДНК. Субстат NOS L-аргінін та антиоксидант ресвератрол не чинили пошкоджувального впливу на ДНК ооцитів, навпаки відмічалось певне збільшення кількості клітин з ядрами 0/1 класу **(рис. 1).**

Відомо, що розриви ДНК, спричинені, зокрема, й активними формами азоту, активують ПАРП, що є необхідним для процесів репарації. Однак, при сильному ушкодженні ДНК надмірна активація ПАРП може призводити до значного збільшення синтезу проза-

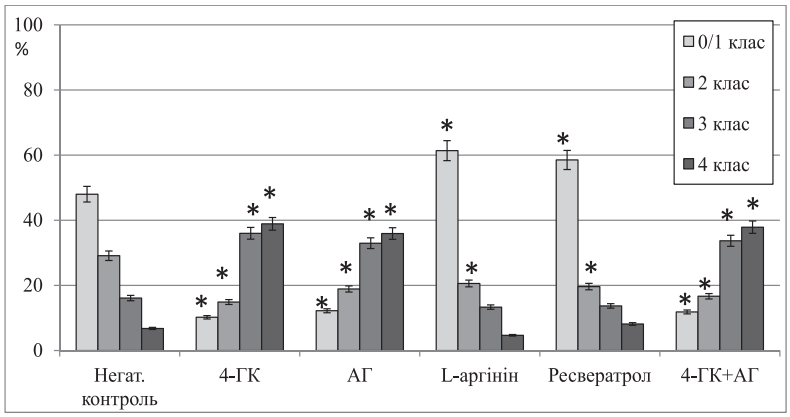

Рис. 1. Вплив 4-ГК, АГ, L-аргініна, ресвератрола на розподіл ОНР ДНК ядер ооцитів.

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

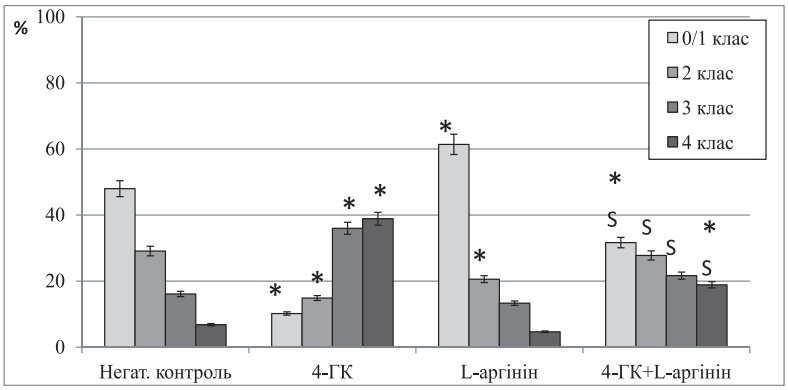

Рис. 2. Вплив 4-ГК і L-аргініна на розподіл ОНР ДНК ядер ооцитів.

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.

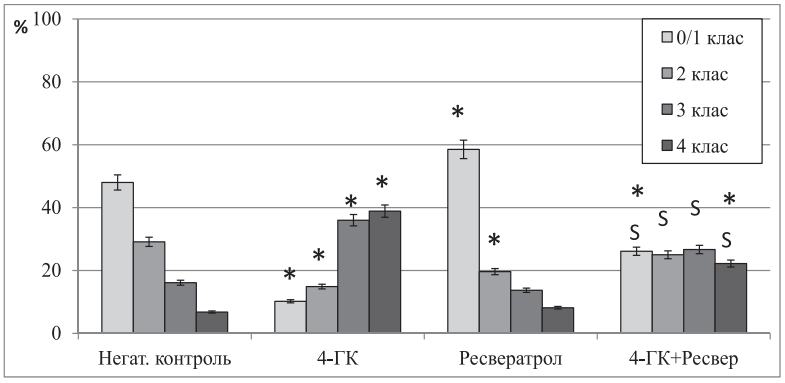

Рис. 3. Вплив 4-ГК і ресвератрола на розподіл ОНР ДНК ядер ооцитів.

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.

пальних 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 активних форм кисню та азоту, посилення генотоксичного стресу та активація ПАРП [2,5,17].

Нами вперше отримано дані, які свідчать про те, що за умов впливу 4-ГК і L-аргініна (відповідно 1,0 mM/0,04mM) відбувається зменшення пошкодження ДНК ядер ооцитів по відношенню до величин у групі 4-ГК: частки ядер ооцитів 3 і 4 класів зменшуються у, відповідно, 1,7 рази і 2,1 рази, а ядер 0/1 і 2 класів зростають у, відповідно, 3,1 рази і 1,9 рази; за умов впливу 4-ГК і ресвератрола (відповідно 1,0 mM/2,0μM) відбувається зменшення пошкодження ДНК ооцитів, а саме – частка клітин з ядрами 3 і 4 класу зменшується у, відповідно, 1,4 рази і 1,8 рази, а частки ядер 0/1, 2 класів зростають у, відповідно, 2,6 рази і 1,7 рази у порівнянні з такими за умов культивування з 4-ГК **(рис. 2, 3).**

За умов впливу АГ і ресвератрола (відповідно 0,02 mM/ 2,0 μM) відбувається зменшення пошкодження ДНК ооцитів, а саме – частка клітин з ядрами 3 і 4 класу зменшується до, відповідно, 22,78±1,53% (p<0.05, n=6) і 25,19±1,67% (p<0.05, n=6) у порівнянні з, відповідно, 32,96±1,67% і 35,93±1,67% за умов культивування з АГ, а ядер 0/1 класу зростає до 31,85±1,67% (p<0.05, n=6) по відношенню до величини за умов культивування з АГ – 12,22±2,72%.

Отримані нами дані узгоджуються з [14-16] і можуть забезпечити в майбутньому обґрунтування новітніх підходів, спрямованих на зменшення пошкодження ДНК, а отже і в терапевтичних цілях – на корекцію ПНЯ у жінок.

Таким чином, отримані дані про розподіл ОНР ДНК ооцитів в умовах впливу антиоксиданта (ресвератрол), блокатора ПАРП (4-ГК), субстрата NOS (L-аргінін), блокатора iNOS(АГ) і їх аналіз дають підстави стверджувати, що NO бере участь в регуляції репарації ОНР ДНК ооцитів.

Висновки. Представлені результати дослідження інтегральної цілісності генома ооцитів з використанням антиоксиданту (ресвератрол), блокатору ПАРП-1 (4-ГК), субстрата NOS (L-аргінін), блокатору iNOS (АГ) дають підстави стверджувати NO-залежність регуляції репарації ДНК, що відображається як однонитковий розрив.

Перспективи подальших досліджень. Необхідно окремо детально вивчити розподіл ОНР ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах впливу антиоксиданта (ресвератрол), блокатора ПАРП, субстрата NOS, блокатора iNOS.

Література

1. Kas'yan Ye.S. Problema prezhdevremennoy yaichnikovoy nedostatochnosti. Sovremennyye podkhody k diagnostike i lecheniyu / Ye.S. Kas'yan // Slovo o zdorov'ye. – 2017. – № 11. – S. 35-40.
2. Makogon N.V. Polн(ADF-ribozo) polнmeraza 1: fнznologнchna ta patofнznologнchna rol' / N.V. Makogon, H.M. Alekseyeva // Fнznologнchniy zhurnal – 2012. – T. 58, № 3. – S. 95-112.
3. Srнbna V.O. Odnonitkovн rozrivi DNK yader klнtin folнkulyarnogo otochennya ootsitнv, timusa н lнmfatichnikh vuzlнv za umov yeksperimental'nogo нmunnogo ushkodzhennya ta zastosuvannya antioksidanta / V.O. Srнbna, N.G. Grushka, R.H. Yanchнy // Vнsnik problem bнologнн н meditsini. – 2016. – № 2, tom 3 (130). – S. 195-199.
4. Funktsional'noye sostoyaniye yaichnika, matki, timusa i limfaticheskikh uzlov u myshey s eksperimental'nym immunokompleksnym povrezhdeniyem v usloviyakh vvedeniya substantsii nanochastits nol'-valentnogo zheleza / V.A. Sribnaya, A.P. Litvinenko, L.S. Reznichenko [ta нn.] // Problemy reproduktsii. – 2016. – № 22 (4). – S. 20-27.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Autoimmune primary ovarian insufficiency / C. Silva, L. Yamakami, N. Aikawa [et al.] // Autoimmun Rev. – 2014. – № 13 (4-5). – P. 427-430.
9. Assessment of 1,2-propanediol (PrOH) genotoxicity on mouse oocytes by comet assay / A. Berthelot-Ricou, J. Perrin, C. di Giorgio [et al.] // Fertil Steril. – 2011. – Vol. 96. – P. 1002-1007.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Resveratrol during in vitro maturation improves the quality of bovine oocyte and enhances embryonic development in vitro / V. Torres, L. Mucoz, R. Urrego, [et al.] // Reprod Fertil Dev. – 2016. – № 29 (1). – P. 199-203.
15. 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.
16. 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.
17. 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.

РОЗПОДІЛ ОДНОНИТКОВИХ РОЗРИВІВ ДНК ЯДЕР ООЦИТІВ В УМОВАХ ВПЛИВУ АНТИОКСИДАНТА, БЛОКАТОРА ПАРП, СУБСТРАТА NOS, БЛОКАТОРА iNOS

Срібна В. О., Грушка Н. Г., Кондрацька О. А., Блашків Т. В., Янчій Р. І.

Резюме. Мета роботи полягала у дослідженні розподілу одноніткових розривів ДНК ядер ооцитів в умовах впливу антиоксиданта, блокатора ПАРП, субстрата NOS, блокатора iNOS in vitro. Для вивчення розподілу одноніткових розривів ДНК ядер ооцитів використовували метод лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет – «DNA-comet assay»).

Отримані дані про розподіл одноніткових розривів ДНК ооцитів в умовах впливу антиоксиданта (ресвератрола), блокатора ПАРП (4-гідроксиквіназолін), субстрата NOS (L-аргінін), блокатора iNOS (аміногуанідин) дають підстави стверджувати, що NO бере участь в регуляції репарації одноніткових розривів ДНК ооцитів, що може забезпечити в майбутньому обґрунтування новітніх підходів, спрямованих на зменшення пошкодження ДНК, а отже і в терапевтичних цілях – на корекцію передчасної недостатності яєчників у жінок.

Ключові слова: одноніткові розриви ДНК, ооцити, передчасна недостатність яєчників.

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ОДНОНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК ЯДЕР ООЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ АНТИОКСИДАНТА, БЛОКАТОРА ПАРП, СУБСТРАТА NOS, БЛОКАТОРА iNOS

Срибная В. А., Грушка Н. Г., Кондрацкая Е. А., Блашкив Т. В., Янчий Р. И.

Резюме. Цель работы заключалась в исследовании распределения однонитевых разрывов ДНК ядер ооцитов в условиях воздействия антиоксиданта, блокатора ПАРП, субстрата NOS, блокатора iNOS in vitro. Для изучения распределения однонитевых разрывов ДНК ядер ооцитов использовали метод щелочного гель-электрофореза изолированных клеток (метод ДНК-комет – «DNA-comet assay»).

Полученные данные о распределении однонитевых разрывов ДНК ооцитов в условиях воздействия антиоксиданта (ресвератрол), блокатора ПАРП (4-гидроксиквиназолин), субстрата NOS (L-аргинин), блокатора iNOS (аминогуанидин) дают основания утверждать, что NO участвует в регуляции репарации однонитевых разрывов ДНК ооцитов, что может обеспечить в будущем обоснования новых подходов, направленных на уменьшение повреждения ДНК, а значит и в терапевтических целях – на коррекции преждевременной недостаточности яичников у женщин.

Ключевые слова: однонитевые разрывы ДНК, ооциты, преждевременная недостаточность яичников.

OOCYTES SINGLE-STRAND DNA BREAKS WITH THE INFLUENCE OF ANTIOXIDANT, PARP-1 IHIBITOR, NO SYNTHASE SUBSTRATE, iNOS IHIBITOR

Sribna V. O., Grushka N. G., Kondratska O. A., Blashkiv T. V., Yanchiy R. I.

Abstract. Premature ovarian failure (POF) – an ovarian function disorder affecting women under 40 – is actively studied. This disease is fairly widespread due to the delay in maternal age, and today is a medical and social problem. POF is studied on models using rodents and main researches are aimed at correction of ovarian disorder.

Previously, using a model of experimental immune complex-mediated failure, which partially reflects POF, inhibition of oocytes meiotic maturation and increased DNA damage of follicular cells surrounding oocytes, thymic and lymph nodes cells (increase of single-strand breaks of DNA) was established, and it was shown that these investigated parameters are improved with the use of antioxidant, iNOS ihibitor, because of the probable reduction of manifestations of oxidative-nitrosatitative stress.

The purpose of the work was to investigate the distribution of single-strand DNA breaks of oocyte nuclei with the influence of antioxidant, PARP inhibitor, iNO-synthase inhibitor, NOS substrate.

The study was carried out on non-pregnant female BCA mice. For DNA damage assessment DNA-comet assay (alkaline) was used. Comets were separated into 4 classes (0/1; 2; 3; 4) depending on the value of DNA in the “head” and “tail” of comet.

It was established that the PARP inhibitor – 4-Hydroxyquinazoline (4-GQ) and iNOS ihibitor – aminoguanidine (AG), as well as their combination, lead to the redistribution of single-strand DNA breaks of oocytes in the direction of increasing the DNA damage. NOS substrate L-arginine and antioxidant resveratrol did not have a damaging effect on the DNA of oocytes, on the contrary, there was a certain increase in the number of cells with nuclei 0/1 classe.

It was obtained that under the influence of 4-GQ and L-arginine (1.0 mM / 0.04 mM, respectively) there was a decrease in the oocyte DNA damage in relation to the values in the group of 4-GQ: the particles of 3 and 4 classe`s nuclei decrease in, respectively, 1,7 and 2,1 times, and nuclei 0/1 and 2 classes increase in, respectively, 3,1 and 1,9 times; under the influence of 4-GQ and resveratrol (1.0 mM / 2.0μM, respectively), there was obtained a decrease in the oocyte DNA damage, namely, the proportion of cells with 3 and 4 class`s nuclei decrease in, respectively, 1,4 and 1,8 times, and the particles of nuclei 0/1, 2 classes increase in, respectively, 2,6 and 1,7 times as compared to those under the influence of 4-GQ.

Under the influence of AG and resveratrol (0,02 mM / 2,0 μM, respectively), there was a decrease in the oocyte DNA damage, namely, the number of cells with 3 and 4 class nuclei was reduced to 22.78 ± 1.53% ($p < 0.05$, $n = 6$) and 25.19 ± 1.67% ($p < 0.05$, $n = 6$) compared with, respectively, 32.96 ± 1.67% and 35.93 ± 1.67% under the influence of AG, and 0/1 class nuclei increased to 31.85 ± 1.67% ($p < 0.05$, $n = 6$) relative to the value under the influence of AG – 12.22 ± 2.72%.

Conclusions. The results of the study of the integral integrity of the oocyte genome using antioxidant (resveratrol), the PAPP-1 (4-GK) inhibitor, the NOS substrate (L-arginine), the iNOS inhibitor (aminoguanidine) give grounds to defend the NO-dependence of the DNA repair regulation, which is displayed as single-strand DNA breaks.

Keywords: single-strand DNA breaks, oocytes, premature ovarian failure.

Рецензент – проф. Дубінін С. І.

Стаття надійшла 01.11.2017 року