DOI 10.29254/2077-4214-2024-1-172-111-120
UDC 616. 092.18

Sribna V. O., Voznesenska T. Yu., Blashkiv T. V.

GENOME AVAILABILITY: CHANGES IN THE CHROMATIN OF CELLS OF THE FOLLICULAR ENVIRONMENT OF OOCYTES UNDER CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS *IN VITRO*

Bogomolets Institute of Physiology of NAS of Ukraine (Kyiv, Ukraine)
valia-z@ukr.net

In this work, new data on the effect of H2O2 (5 min, 250 mM) on the cells of the follicular environment of oocytes were obtained, which give grounds to assert that such changes in the values of cytological parameters, namely a decrease in the chromatinization index (ChI) as a decrease in genome activity due to a decrease in its accessibility ("openness"), an increase in the nucleolar index (NI) as an increase in the activity of the translational apparatus - the reaction of cells to stress, an increase in the index of morphologically altered nuclei (MNI) as a decrease in the integrity of the karyoplasm - the functioning of the genome is suppressed, together reflect chromatin damage characteristic of oxidative stress. The same changes are observed under the influence of a PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) blocker and an iNOS blocker.

The use of NOS substrate and SIRT-1 activator, under the influence of a PARP blocker, an iNOS blocker and, together, a PARP blocker and an iNOS blocker, led to: an increase in ChI - as an increase in genome activity due to an increase in its accessibility ("openness"), a decrease in NI - as a decrease in the activity of the translational apparatus - a decrease in the cellular response to stress, a decrease in MNI - as an increase in the integrity of the karyoplasm - the functioning of the genome is restored, together reflecting the restoration of chromatin activity.

The data obtained suggest that nitric oxide and SIRT-1 are involved in maintaining the functional state of chromatin availability in the cells of the follicular environment of oocytes.

Key words: *cells of the follicular environment of oocytes, chromatin, oxidative stress, sirtuin_1.*

Connection of the publication with planned research works.

The work was performed at the Department of Immunophysiology of the Bogomolets Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine in 2021-2023 as part of the research work №III-15-20 “Investigation of cellular and molecular mechanisms of immune-induced disorders of the female reproductive system and the corrective effect of metal nanoparticles” / state registration number 0119U103964 (departmental).

Introduction.

Access to the genome (DNA) is a prerequisite for executing basic cellular processes, including transcription, replication, chromosomal segregation, and DNA repair. Over the past decade, whole-genome studies and new imaging approaches have provided a better understanding of how genome access is regulated. How the proteins that regulate these processes function in the context of chromatin and its dynamic architecture is the subject of intense research [1].

Sirtuin-1 (SIRT-1) plays a key role in the adaptive response of mouse oocytes to oxidative stress (OS) and contributes to the signaling cascade leading to the activation of the MnSod gene. In response to OS, specific changes in the intracellular localization of SIRT-1 gene and the increase in the SIRT-1 gene were detected in mouse oocytes. In addition, an increase in intracellular reactive oxygen species was observed when Ex527 inhibited SIRT-1 activity. SIRT-1 may be an excellent pharmacological target for improving oocyte quality and in vitro fertilization outcome in aging or aging-like diseases [2-5].

Further study is required to determine the role of the nuclear protein sirtuin-1 in oxidative stress-induced changes in chromatin activity in the follicular surrounding cells of oocytes, which play a major role in follicle and oocyte differentiation.

The aim of the study.

To investigate changes in the cytological parameters (chromatinization index, nucleolar index and index of morphologically altered nuclei) by changes in the functional state of chromatin of cells of the follicular environment of oocytes under conditions of oxidative stress *in vitro*, as well as under the influence of SIRT-1 activator, PARP (poly(ADP-ribose) polymerase) blocker, NOS substrate and iNOS blocker, which has not been studied before.

Object and methods of the study.

The experiments were conducted using 89 mature female mice of the CBA line (weighing 18-22 g) in compliance with the requirements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Research and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986) and the Law of Ukraine “On the Protection of Animals from Cruelty” (2006).

Isolation of the cells of the follicular environment of oocytes (FEO). Oocyte follicular environment cells were isolated non-enzymatically (mechanically) from mouse ovarian follicles and cultured for 4 h in separate chambers with 400 µL of DME culture medium containing 15 mM HEPES, a Ca^{2+} concentration of 1.71 mM, and a temperature 37°C.

Assessment of cell viability. After FEO cells were isolated from the ovary, they were morphologically assessed by the routine method of dye exclusion – trypan blue (0.2% solution in 0.9A% NaCl). Live and dead cells were counted in a Goryaev chamber. Viable cells remained unstained, while non-viable cells were stained blue. The ratio of viable cells to the total number of counted cells was calculated as the viability percentage for each sample. The average number of 15.6% of non-viable (trypan blue-stained) and 81.6% of viable (non-trypan blue-stained) FEO cells was determined.

Modeling of oxidative stress. Oxidative stress was modeled using H_2O_2. The addition of the calculated

amounts of H_2O_2 (88597, Sigma-Aldrich, USA) to phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.4, was used to obtain the following oxidative stress: "weak"; "medium"; "strong". The ratio of viable cells to the total number of counted cells was calculated as the viability percentage for each sample. The average number of non-living (stained with trypan blue) and living (not stained with trypan blue) FEO cells was evaluated after incubation at 37^{0}C for 60 min, 30 min, 15 min and 5 min. It was found that the number of live (not stained with trypan blue) and non-live (stained with trypan blue) FEO cells decreased with both an increase in the concentration of H_2O_2 and an increase in the duration of incubation of FEO cells at 37^{0}C. For all subsequent experiments, the OS was used – "medium", 5 min at 37^{0}C – the average number of living cells was 56%, not alive – 44%.

Cytological examination of FEO cells (by Follgen). For the cytological study, preparations were made, which, after drying and fixation, were stained by Follgen in our modification [6]. In each preparation, 100 interphase nuclei were studied with the following assessment of their structural characteristics: 1) chromatinization index (ChI) – the ratio of the number of nuclei with a predominance of euchromatin to those with a predominance of heterochromatin (genome activity); 2) nucleolar index (NI) – the proportion of cells with a nucleus (gene transcription); 3) morphologically altered nuclei index (MNI) – the proportion of cells with morphological changes in the karyoplasm and/or karyolemma (karyolemma integrity); N=8 – the number of preparations for each of the 12 different experimental conditions **(table)**.

According to the methodology, FEO cells were used as a positive control and were exposed to H_2O_2 (250 mM, 5 min) after the cultivation period (4 h). Negative control – FEO cells cultured for 4 h in DME medium with 15 mM HEPES.

Substances used: resveratrol (RES, Sigma-Aldrich, USA): 2.0 μM – activator of SIRT-1; 4-hydroxyquinazoline (4-H, Sigma-Aldrich, USA): 1.0 mM – blocker of PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymerase); L-arginine hydrochloride (L-AGH, Sigma-Aldrich, USA): 0.04 mM – NOS substrate; aminoguanidine (AG, Sigma-Aldrich, USA): 0.02 mM – a specific iNOS blocker – in concentrations that were selected according to the literature and in some preliminary experiments.

The results were processed statistically in the Graph Pad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, California, USA). After checking for normal distribution, the analysis of data groups was performed using one-way ANOVA followed by multiple comparisons using the Newman-Keuls post-hoc test. Differences were considered statistically significant at $p<0.05$. The results were expressed as M±m (mean ± standard error). All experiments were performed at n=4 – the number of series of experiments with 4 independent replicates.

Results of the study and their discussion.

The data on the effect of the SIRT-1 activator (RES), PARP blocker (4-H), NOS substrate (L-ARG) and iNOS blocker (AG) on the cytological parameters of ChI, NI and MNI of FEO cells are presented in the **table**.

Chromatin condensation index. Chromatin is composed of DNA (packaged in nucleosomes), associated proteins, and RNA. Its variable composition, structure, and dynamics can regulate genomic processes ranging from the molecular scale, affecting transcription factor binding, to functional outcomes such as DNA repair and replication. In the nucleus, there is a spectrum of DNA accessibility states, from hyper-accessibility, often referred to as "open" chromatin, to more inaccessible or repressive states and referred to as "closed" chromatin [7].

Open states are transcriptionally active chromatin and are often used interchangeably with the term "euchromatin", while closed states are usually referred to as "heterochromatin". The state of chromatin compactification reflects the function of the genome, in particular the first stage of the realization of hereditary information [8-10].

We evaluated ChI – the ratio of the number of FEO cells with euchromatin predominant in their nuclei to the number of cells with heterochromatin predominance – a marker of genome activity. Thus, under exposure to H_2O_2 (5 min, 250 mM), FEO cells showed a 1.52-fold decrease in ChI compared to the control (negative control). Under the conditions of exposure to both 4-H (1.0 mM) and AG (0.02 mM), ChI decreased by 1.37 and 1.33 times, respectively, while L-arg (0.04 mM) and RES (2.0 μM) had no effect on ChI of FEO cells compared to the control (negative control). Also, under the conditions of 4-H+AG exposure, there is a 1.38-fold decrease in ChI value compared to the value of 0.88±0.04 in the control (negative control), while under the conditions of 4-H+L-ARG and 4-H+RES exposure, there is an increase in ChI value, respectively, by 1.27 and 1.26 times compared to the value under 4-H exposure. In the experimental conditions of 4-H+AG+L-ARG and 4-H+AG+RES exposure, the ChI value increased by 1.20 and 1.19 times, respectively, compared to the value in the conditions of 4-H+AG exposure. Under the experimental conditions of 4-H+L-ARG+RES exposure,

Table – Chromatization index, nucleolar index and index of morphologically altered nuclei of cells of the follicular environment of oocytes under different experimental conditions

FEO cell group	Chromatization index, units	Nuclear index, %.	Morphologically altered nuclei, %.
Negative control	0,88±0,04	4,82±0,51	5,22±0,37
Positive control (H_2O_2 – 5min, 250 mM)	0,58±0,03 *	19,14±0,54 *	15,42±0,41 *
4-H (1,0 mM)	0,62±0,04 *	8,83±0,74 *	12,72±0,34 *
AG (0,02 mM)	0,64±0,05 *	7,34±0,57 *	9,42±0,43 *
L-AGH (0,04 mM)	0,83±0,06	5,04±0,53	5,74±0,47
RES (2,0 μM)	0,85±0,07	5,43±0,58	5,93±0,42
4-H+ AG	0,64±0,05 *	12,38±1,48 *	16,57±0,73 * º
4-H+L-АРГ	0,79±0,06 º	6,48±0,58 *	7,23±0,43 * º
4-H+ RES	0,79±0,07 º	5,14±0,34 º	6,42±0,48 º
4-H+ AG + L-AGH	0,77±0,08 #	6,23±0,43 #	6,36±0,34 º #
4-H+ AG + RES	0,76±0,09 #	6,48±0,64 #	5,82±0,46 º #
4-H+ L-AGH + RES	0,78±0,07 #	5,18±0,35 º #	5,53±0,52 º #

Notes: * – $p<0.05$ – significance of differences in the average data groups compared to those in the control (negative control); º – $p<0.05$ – significance of differences in the average data groups compared to those in the 4-H group (1.0 mM); # – $p<0.05$ – significance of differences in the average data groups compared to those in the 4-H+AG group.

the ChI value of FEO cell chromatin increased by 1.22 times compared to the value under 4-H+AG exposure.

Nuclear index. It is known that the activity of the nucleolar apparatus is an indicator of translation as a synthesis of a protein molecule. We evaluated the NI – the proportion of cells with a nucleus. Thus, under the H_2O_2 (5 min, 250 mM) exposure conditions, the NI increased by 3.97 times compared to the control (negative) control value. Under the conditions of exposure to both 4-H (1.0 mM) and AG (0.02 mM), the NI value increased by 1.83 times and 1.52 times, respectively, while L-arg (0.04 mM) and RES (2.0 μM) had no effect on the NI of FEO cells compared to the control (negative control). Also, under the conditions of exposure to 4-H+AG, there is a 2.57-fold increase in the value of NI compared to the control (negative control). Under the conditions of 4-H+L-ARG exposure, there is a 1.43-fold increase in the value of NI compared to the value in the control (negative control). Meanwhile, under the conditions of exposure to 4-H+RES, there is a 1.72-fold decrease in the value of NI compared to the value under the conditions of exposure to 4-HC. Under the experimental conditions of exposure to 4-H+AG+L-ARG and 4-H+AG+RES, the value of NI decreases by 1.98 times and 1.91 times compared to the value under exposure to 4-HC+AG. And under the experimental conditions of 4-G+L-ARG+RES exposure, the value of chromatin NI of FEO cells decreased by 2.40 times compared to the value under the conditions of 4-H+AG exposure.

Index of morphologically altered nuclei. It is known that the function of the genome/genotype (consisting of individual genes (discrete) but functioning as a whole) directly depends on the integrity of the karyolemia, the presence of intranuclear vacuoles, i.e., on morphological changes in the nucleus components. We evaluated MNI – the percentage of FEO cells with morphological changes in the caryoplasm. Thus, under exposure to H_2O_2 (5 min, 250 mM), FEO cells showed a 2.95-fold increase in the MNI index compared to the control value (negative control). Under the conditions of exposure to both 4-H (1.0 mM) and AG (0.02 mM), the MNI value increased by 2.44 times and 1.80 times, respectively, while L-arg (0.04 mM) and RES (2.0 μM) had no effect on the MNI of FEO cells compared to the control (negative control). Also, under the conditions of 4-H+AG exposure, there is a 3.17-fold increase in MNI compared to the control (negative control) and 2.44-fold increase compared to the value under 4-H exposure. And under the influence of 4-H+L-ARG, there is a decrease in the value of MNI by 1.76 times compared to the value under the influence of 4-H and by 2.29 times compared to the value under the influence of 4-H+AG. And in the conditions of 4-H+RES exposure, there is a decrease in the value of MNI by 2.58 times compared to the value in the conditions of 4-H exposure. In the experimental conditions of exposure to 4-H+AG+L-ARG and 4-H+AG+RES, there is a decrease in the value of MNI, 2.0 times and 2.19 times, respectively, compared to the value under 4-H exposure and 2.61 times and 2.85 times compared to the value under 4-H+AG exposure. And under the experimental conditions of 4-H+L-arg+RES exposure, the value of chromatin MNI of FEO cells decreased by 2.30 times compared to the value under 4-H exposure and by 2.99 times compared to the value under 4-H+AG exposure.

Thus, the data obtained on the effect of H_2O_2 (5 min, 250 mM) on FEO cells suggest that such changes in cytological parameters, namely: a decrease in ChI – as a decrease in genome activity due to a decrease in its accessibility ("openness"), an increase in NI – as an increase in the activity of the translational apparatus – the reaction of cells to stress, an increase in MNI – as a decrease in the integrity of the karyolemia – the functioning of the genome is suppressed, together reflect chromatin damage characteristic of oxidative stress.

In our experiments, under the influence of a PARP blocker and an iNOS blocker, a decrease in ChI – as a decrease in genome activity due to a decrease in its accessibility ("openness"), an increase in NI – as an increase in the activity of the translational apparatus – the reaction of cells to stress, an increase in MNI – as a decrease in the integrity of the karyolemma – genome functioning is suppressed, together reflect chromatin damage that can be compared with those under conditions of oxidative stress modeled using H_2O_2.

The use of the NOS substrate and SIRT-1 activator, under the influence of a PARP blocker, an iNOS blocker, and, together, a PARP blocker and an iNOS blocker, caused an increase in ChI – as an increase in genome activity due to an increase in its availability ("openness"), a decrease in NI – as a decrease in the activity of the translational machinery – a decrease in the cellular response to stress, a decrease in MNI – as an increase in the integrity of the karyoplasm – the functioning of the genome is restored, together reflecting the restoration of chromatin activity.

Taken together, the data obtained suggest that nitric oxide and sirtuin-1 are involved in maintaining the functional state of chromatin availability in FEO cells.

In our experiments, to assess the functional state of chromatin in FEO cells, we confirmed the importance of assessing genome activity, as "openness" or "genome accessibility", by the value of ChI, as well as the value of MNI as a marker of karyoplasmic integrity, which is important for DNA repair (single- and double-strand breaks).

Visualization of chromatin accessibility. Using oligopeptide probes and fluorescence microscopy [11, 12], it has been shown that the nuclear localization of accessibility depends on the cell type [13-15]. It is worth noting that despite this technique's advantages in determining the fundamental structures of chromatin, including the accessible regions, the resolution is still insufficient.

DNA repair. Depending on the form of DNA damage, different repair pathways are triggered, so there is likely a wide variation in the role of chromatin availability in the sensitivity to DNA damage. For example, double-strand breaks (DSBs) form a "broken DNA polymer", and such a "broken link" in the DNA chain is determined by proteins such as PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymerase-1) [16].

A different picture is observed in case of single-stranded DNA breaks or damage to DNA bases, DNA adducts (covalent complexes), depurination, or cross-linking, where damage is detected by various DNA scanning enzymes [16-20].

It is known that to initiate repair, neighboring nucleosomes need to be remodeled and removed. This process can be simplified by combining damage sensing with nucleosome remodeling. For example, PARP-1,

a nuclear enzyme activated by DNA damage, synthesizes negatively charged ADP-ribose polymer chains from NAD+ and attaches them to DNA repair proteins (histones), transcription factors, etc. This process can directly modify histones and induce nucleosome unwinding [21].

Studying genome-wide chromatin availability in the context of DNA damage and repair can be even more challenging because repair pathways, unlike transcription, target DNA damage sites that are not usually anchored to transcriptional sites. The anchored sites that do exist within the framework of DNA repair are usually called "hot spots" that correlate with different genomic sequences, secondary structures that are able or unable to interact under conditions of chromatin availability [22, 23].

Thus, chromatin availability may play an essential role in DNA damage repair, depending on the type of damage (single- or double-stranded DNA breaks), and additional research in this area will increase our understanding of how chromatin (nucleosome) remodeling occurs.

Our data are consistent with [2, 24-28]. It has been suggested that SIRT-1 may play a vital role in the terminal differentiation of FEO cells [25], and that the viability of FEO cells depends on the balance between the inhibitory and stimulatory effects on SIRT-1 [25, 27]. Resveratrol attenuates the OS to protect H_2O_2-induced damage and apoptosis of ovarian granular cells in rats [29], that a certain level of SIRT-1 activity can protects oocytes from oxidative damage caused by stress associated with their culture in vitro [2, 26].

Conclusions.

In this work, we have obtained new data on the effect of H_2O_2 (5 min, 250 mM) on the cells of the follicular environment of oocytes, which gives grounds to assert that such changes in the values of cytological parameters (ChI, NI, MNI), namely decrease in chromatinization index (ChI) – as a decrease in genome activity due to a decrease in its accessibility ("openness"), increase in NI – as an increase in the activity of the translational apparatus – the reaction of cells to stress, increase in MNI – as a decrease in the integrity of the karyolemma – the functioning of the genome is suppressed, together reflect chromatin damage characteristic of oxidative stress.

In our experiments, under the influence of a PARP blocker and an iNOS blocker, we observed a decrease in ChI, which is a decrease in genome activity due to a decrease in its accessibility ("openness"), an increase in NI, which is an increase in the activity of the translational machinery (cellular stress response), and an increase in MNI, which is a decrease in the integrity of the karyolemma (genome functioning is suppressed). All of this together reflects chromatin damage that can be compared to that which occurs under oxidative stress conditions, which was modeled using H_2O_2.

The use of NOS substrate and SIRT-1 activator, exposure to PARP blocker, iNOS blocker and, in combination, PARP blocker and iNOS blocker, causes an increase in ChI – as an increase in genome activity due to an increase in its accessibility ("openness"), a decrease in NI – as a decrease in the activity of the translational machinery – a decrease in the cellular response to stress, a decrease in MNI – as an increase in the integrity of the karyoplasm – the functioning of the genome is restored, together reflect the restoration of chromatin activity.

Taken together, the data obtained suggest that nitric oxide and sirtuin-1 are involved in maintaining the functional state of chromatin availability in the cells of the follicular environment of oocytes.

Prospects for further research.

In the future, we plan to join the study of DNA integrity by assessing changes in the distribution of single-stranded DNA breaks in FEO cells under different experimental conditions.

DOI 10.29254/2077-4214-2024-1-172-111-120
УДК 616. 092.18

Срібна В. О., Вознесенська Т. Ю., Блашків Т. В.

ДОСТУПНІСТЬ ГЕНОМУ: ЗМІНИ ХРОМАТИНУ КЛІТИН ФОЛІКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ ООЦИТІВ В УМОВАХ ОКИСНОГО СТРЕСУ *IN VITRO*

Інститут фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України (м. Київ, Україна)
valia-z@ukr.net

У цій роботі отримано нові дані про вплив H2O2 (5хв, 250 mM) на клітини фолікулярного оточення ооцитів, які дають підстави стверджувати, що такі зміни величин цитологічних показників, а саме: зменшення індексу хроматизації (ІХ) – як зниження активності геному, через зменшення його доступності («відкритості»), зростання ядерцевого індексу (ЯІ) – як зростання активності трансляційного апарату – реакція клітин на стрес, зростання індексу морфологічно змінених ядер (МЗЯ) – як зменшення цілісності каріоплазми - функціонування геному пригнічується, разом відображають пошкодження хроматину характерні для окисного стресу. Такі ж самі зміни відмічаються в умовах впливу блокатора ПАРП (полі (АДФ-рибоза) полімерази) і блокатора iNOS.

Застосування субстрату NOS і активатора СІРТ-1, в умовах впливу блокатора ПАРП, блокатора iNOS і, разом блокатора ПАРП і блокатора iNOS, призводило до: збільшення ІХ – як збільшення активності геному, через збільшення його доступності («відкритості»), зменшення ЯІ – як зменшення активності трансляційного апарату – зменшення реакції клітин на стрес, зменшення МЗЯ – як збільшення цілісності каріоплазми - функціонування геному відновлюється, разом відображають відновлення активності хроматину.

Разом, отримані дані дають підстави стверджувати, що і оксид азоту, і CIPT-1 беруть участь у підтриманні функціонального стану доступності хроматину в клітинах фолікулярного оточення ооцитів.

Ключові слова: *клітини фолікулярного оточення ооцитів, хроматин, окисний стрес, сіртуїн_1.*

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Роботу виконано у відділі імунофізіології Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України у 2021-2023 рр. в рамках виконання наукової роботи №III-15-20 «Дослідження клітинно-молекулярних механізмів імуноіндукованих розладів жіночої репродуктивної системи і корегуючого впливу наночастинок металів»/державний реєстраційний номер роботи 0119U103964 (відомча).

Вступ.

Доступ до геному (ДНК) є необхідною умовою для виконання основних клітинних процесів, зокрема транскрипції, реплікації, хромосомної сегрегації та репарації ДНК. За останнє десятиліття повногеномні дослідження та нові підходи до візуалізації дозволили краще зрозуміти, як регулюється доступ до геному. Те, як білки, які регулюють ці процеси, функціонують у контексті хроматину та його динамічної архітектури є предметом інтенсивних досліджень [1].

Відомо, що сіртуїн-1 (CIPT-1) відіграє ключову роль в адаптивній відповіді ооцитів миші на окисний стрес (ОС) і сприяє сигнальному каскаду, що веде до активації гена MnSod. Специфічні зміни у внутрішньоклітинній локалізації CIPT-1 та посилення гена CIPT-1 виявлені в ооцитах миші у відповідь на ОС. Крім того, спостерігалося підвищення внутрішньоклітинних активних форм кисню, коли активність CIPT-1 пригнічувалася Ex527. Вважають, що CIPT-1 може бути чудовою фармакологічною мішенню для покращення якості ооцитів і результату екстракорпорального запліднення при старінні або подібних до старіння захворюваннях [2-5].

Роль ядерного білка сіртуїна-1 у зміні активності хроматину, викликаної окисним стресом, у клітинах фолікулярного оточення ооцитів – клітинах, що відіграють головну роль у диференціюванні фолікулів та ооцитів, потребує подальшого вивчення.

Мета дослідження.

За змінами величин цитологічних показників (індексу хроматизації, ядерцевого індексу та індексу морфологічно змінених ядер) дослідити зміни функціонального стану хроматину клітин фолікулярного оточення ооцитів в умовах окисного стресу *in vitro*, а також в умовах впливу активатора CIPT-1, блокатора ПАРП (полі (АДФ-рибоза) полімерази), субстрата NOS і блокатора iNOS, що раніше не було вивчено.

Об'єкт і методи дослідження.

Досліди проводили з використанням 89 статевозрілих самиць 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).

Виділення клітин фолікулярного оточення ооцитів (ФОО). Клітини фолікулярного оточення ооцитів неферментативно (механічно) виділяли з фолікулів яєчників мишей та культивували протягом 4 год в окремих камерах з 400 мкл культурального середовища DME з 15 mM HEPES, концентрація Ca^{2+} 1,71 mM, температура 37°C.

Оцінка життєздатності клітин. Після виділення клітин ФОО *з яєчника* проводили їх морфологічну оцінку рутинним методом виключення барвника – трипанового синього (0,2% розчин на 0,9% NaCl). Живі та мертві клітини підраховували в камері Горяєва. Життєздатні клітини залишалися не забарвленими, тоді як не життєздатні клітини фарбувалися синім кольором. Вираховували відношення життєздатних клітин до загальної кількості підрахованих клітин як відсоток життєздатності для кожного зразка. Встановлено середню кількість 15,6% не живих (забарвлених трипановим синім) і 81,6% живих (не забарвлених трипановим синім) клітин ФОО.

Моделювання окисного стресу. ОС моделювали з використанням H_2O_2. Додаванням розрахованих кількостей H_2O_2 (88597, Sigma-Aldrich, USA) до фосфатно-буферного сольового розчину (PBS), pH 7,4 отримували ОС: «слабий»; «середній»; «сильний». Вираховували відношення життєздатних клітин до загальної кількості підрахованих клітин як відсоток життєздатності для кожного зразка. Оцінювали середню кількість не живих (забарвлених трипановим синім) і живих (не забарвлених трипановим синім) клітин ФОО за умов їх інкубації при 37^0C протягом 60 хв, 30 хв, 15 хв і 5 хв. Встановлено зменшення кількості живих (не забарвлених трипановим синім) і збільшення не живих (забарвлених трипановим синім) клітин ФОО за умов як збільшення концентрації H_2O_2, так і збільшення тривалості інкубування клітин ФОО при 37^0C. Для всіх подальших дослідів використовувався ОС – «середній», 5 хв при 37^0C – середня кількість живих 56%, не живих – 44%.

Цитологічне дослідження клітин ФОО (за Фьольгеном). Для цитологічного дослідження виготовляли препарати, які після висушування і фіксації забарвлювали за Фьольгеном у власній модифікації [6]. У кожному препараті вивчали по 100 інтерфазних ядер з наступною оцінкою їх структурних характеристик: 1) індекс хроматизації (ІХ) – співвідношення кількості ядер із перевагою еухроматину до таких із перевагою гетерохроматину (активність геному); 2) ядерцевий індекс (ЯІ) – частка клітин із ядерцем (транскрипція генів); 3) індекс морфологічно змінених ядер (МЗЯ) – частка клітин із морфологічними змінами каріоплазми та/або каріолеми (цілісність каріолеми); N=8 – кількість препаратів для кожної з 12 різних експериментальних умов **(таблиця)**.

Згідно методиці за позитивний контроль використовували клітини ФОО, які після терміну культивування (4 год) піддавали впливу H_2O_2 (250mM, 5 хв). Негативний контроль – культивовані протягом 4 год клітини ФОО в середовищі DME з 15 мМ HEPES.

Використані речовини: ресвератрол (РЕС, Sigma-Aldrich, USA): 2,0 мμM – активатор CIPT-1; 4-гідроксиквіназолін (4-Г, Sigma-Aldrich, USA): 1,0 mM – блокатор ПАРП-1 (полі (АДФ-рибоза) полімерази); Л-аргінін гідрохлорид (L-АРГ, Sigma-Aldrich, USA): 0,04mM – субстрат NOS; аміногуанідин (АГ, Sigma-Aldrich, USA):

0,02 mM – специфічний блокатор блокатор iNOS – в концентраціях, які були підібрані за даними літератури і в окремих попередніх дослідах.

Результати обробляли статистично в програмі Graph Pad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, 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). Всі досліди проведено при n=4 – кількість серій дослідів з 4-ма незалежними повторами.

Результати дослідження та їх обговорення.

Дані про вплив активатора CIPT-1 (PEC), блокатора ПАРП (4-Г), субстрата NOS (L-АРГ) і блокатора iNOS (АГ) на цитологічні показники ІХ, ЯІ та МЗЯ клітин ФОО представлено в **таблиці**.

Індекс конденсації хроматину. Хроматин складається з ДНК (упакованої в нуклеосоми), асоційованих білків та РНК. Його змінний склад, структура та динаміка можуть регулювати геномні процеси в діапазоні від молекулярного масштабу, що впливає на зв'язування фактора транскрипції, до функціональних результатів, таких як репарація та реплікація ДНК. У ядрі існує спектр станів доступності ДНК, від гіпердоступності, яку часто називають «відкритим» хроматином, до більш недоступних або репресивних станів і позначається як «закритий» хроматин [7].

Відкриті стани є транскрипційно активним хроматином і часто взаємозамінно використовуються з терміном «еухроматин», тоді як закриті стани зазвичай називають «гетерохроматином». Стан компактизації хроматину відображає функцію геному, зокрема першого етапу реалізації спадкової інформації [8-10].

Ми оцінювали ІХ – відношення кількості клітин ФОО, в ядрах яких переважав еухроматин до кількості клітин, з переважанням гетерохроматину – маркер активності геному. Так, в умовах впливу H_2O_2 (5 хв, 250 mM) на клітини ФОО відбувається зменшення в 1,52 рази ІХ у порівнянні з величиною в контролі (негативний контроль). В умовах впливу, як 4-Г (1,0 mM), так і АГ (0,02 mM) відбувається зменшення величини ІХ, відповідно, в 1,37 рази і 1,33 рази, тоді як L-АРГ (0,04 mM), так і PEC (2,0 μM) не чинять вплив на ІХ клітин ФОО у порівнянні з величиною в контролі (негативний контроль). А також в умовах впливу 4-Г+АГ відбувається зменшення в 1,38 рази величини ІХ у порівнянні з величиною 0,88±0,04 в контролі (негативний контроль), тоді як в умовах впливу 4-Г+L-АРГ і 4-Г+PEC відбувається збільшення величини ІХ, відповідно, в 1,27 рази і 1,26 рази у порівнянні з величиною в умовах впливу 4-Г. В експериментальних умовах впливу 4-Г+АГ+L-АРГ і 4-Г+АГ+PEC відбувається збільшення величини ІХ, відповідно, в 1,20 рази і 1,19 рази до у порівнянні з величиною в умовах впливу 4-Г+АГ. І в експериментальних умовах впливу 4-Г+L-АРГ+PEC відбувається збільшення величини ІХ хроматину клітин ФОО в 1,22 рази у порівнянні з величиною в умовах впливу 4-Г+АГ.

Ядерцевий індекс. Відомо, що показником трансляції, як синтезу білкової молекули є активність ядерцевого апарату. Ми оцінювали ЯІ – частку клітин ФОО із ядерцем. Так, в умовах впливу H_2O_2 (5хв, 250 mM) на клітини ФОО відбувається зростання в 3,97 рази ЯІ у порівнянні з величиною в контролі (негативний) контроль. В умовах впливу, як 4-Г (1,0 mM), так і АГ (0,02 mM) відбувається зростання величини ЯІ, відповідно, в 1,83 рази і 1,52 рази, тоді як L-АРГ (0,04 mM), так і PEC (2,0 μM не чинять вплив на ЯІ клітин ФОО у порівнянні з величиною в контролі (негативний контроль). А також в умовах впливу 4-Г+АГ відбувається збільшення величини ЯІ в 2,57 рази у порівнянні з величиною в контролі (негативний контроль). І в умовах впливу 4-Г+L-АРГ відбувається збільшення величини ЯІ в 1,43 рази у порівнянні з величиною в контролі (негативний контроль). Тоді як в умовах впливу 4-Г+PEC відбувається зменшення величини ЯІ в 1,72 рази у порівнянні з величиною в умовах впливу 4-ГК. В експериментальних умовах впливу 4-Г+АГ+L-АРГ і 4-Г+АГ+PEC відбувається зменшення величини ЯІ, відповідно, в 1,98 рази і 1,91 рази у порівнянні з величиною в умовах впливу 4-ГК+АГ. І в експериментальних умовах впливу 4-Г+L-АРГ+PEC відбувається зменшення величини ЯІ хроматину клітин ФОО, в 2,40 рази у порівнянні з величиною в умовах впливу 4-Г+АГ.

Таблиця – Індекс хроматизації, ядерцевий індекс та індекс морфологічно змінених ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів за різних експериментальних умов

Група клітин ФОО	Індекс хроматизації, ум.од	Ядерцевий індекс, %	Морфологічно змінені ядра, %
Негативний контроль	0,88±0,04	4,82±0,51	5,22±0,37
Позитивний контроль (H_2O_2 – 5хв, 250 mM)	0,58±0,03 *	19,14±0,54 *	15,42±0,41 *
4-Г (1,0 mM)	0,62±0,04 *	8,83±0,74 *	12,72±0,34 *
АГ (0,02 mM)	0,64±0,05 *	7,34±0,57 *	9,42±0,43 *
L-АРГ (0,04 mM)	0,83±0,06	5,04±0,53	5,74±0,47
PEC (2,0 μM)	0,85±0,07	5,43±0,58	5,93±0,42
4-Г+АГ	0,64±0,05 *	12,38±1,48 *	16,57±0,73 * º
4-Г+L-АРГ	0,79±0,06 º	6,48±0,58 *	7,23±0,43 * º
4-Г+PEC	0,79±0,07 º	5,14±0,34 º	6,42±0,48 º
4-Г+АГ+L-АРГ	0,77±0,08 #	6,23±0,43 #	6,36±0,34 º #
4-Г+АГ+PEC	0,76±0,09 #	6,48±0,64 #	5,82±0,46 º #
4-Г+L-АРГ+PEC	0,78±0,07 #	5,18±0,35 º #	5,53±0,52 º #

Примітки: * – p<0,05 – вірогідність відмінностей середніх груп даних у порівнянні з такими в контролі (негативний контроль); º – p<0,05 – вірогідність відмінностей середніх груп даних у порівнянні з такими в групі 4-Г(1,0 mM); # – p<0,05 – вірогідність відмінностей середніх груп даних у порівнянні з такими в групі 4-Г+АГ.

Індекс морфологічно змінених ядер. Відомо, що функція геному/генотипу (складається з окремих генів (дискретний), але функціонує як єдине ціле) безпосередньо залежить і від цілісності каріолеми, наявності внутрішньоядерних вакуолей, тобто від морфологічних змін компонентів ядра. Ми оцінювали МЗЯ – відсоток клітин ФОО із морфологічними змінами каріоплазми. Так, в умовах впливу H_2O_2 (5хв, 250 mM) на клітини ФОО відбувається зростання в 2,95 рази індексу МЗЯ у порівнянні з величиною в контролі (негативний контроль). В умовах впливу, як 4-Г (1,0 mM), так і АГ (0,02 mM) відбувається зростання величини МЗЯ, відповідно, в 2,44 рази і 1,80 рази, тоді як L-АРГ (0,04 mM), так і PEC (2,0 μM) не чинять

вплив на МЗЯ клітин ФОО у порівнянні з величиною в контролі (негативний контроль). А також в умовах впливу 4-Г+АГ відбувається збільшення величини МЗЯ в 3,17 рази у порівнянні з величиною в контролі (негативний контроль) і в 2,44 рази у порівнянні з величиною в умовах впливу 4-Г. І в умовах впливу 4-Г+L-АРГ відбувається зменшення величини МЗЯ в 1,76 рази у порівнянні з величиною в умовах впливу 4-Г і в 2,29 рази у порівнянні з величиною в умовах впливу 4-Г+АГ. І в умовах впливу 4-Г+РЕС відбувається зменшення величини МЗЯ в 2,58 рази у порівнянні з величиною в умовах впливу 4-Г. В експериментальних умовах впливу 4-Г+АГ+L-АРГ і 4-Г+АГ+РЕС відбувається зменшення величини МЗЯ, в 2,0 рази і 2,19 рази відповідно, до у порівнянні з величиною в умовах впливу 4-Г і в 2,61 рази і 2,85 рази у порівнянні з величиною в умовах впливу 4-Г+АГ. І в експериментальних умовах впливу 4-Г+L-АРГ+РЕС відбувається зменшення величини МЗЯ хроматину клітин ФОО, в 2,30 рази у порівнянні з величиною в умовах впливу 4-Г і у 2,99 рази порівнянні з величиною в умовах впливу 4-Г+АГ.

Таким чином, отримані дані про вплив H_2O_2 (5хв, 250 mM) на клітини ФОО дають підстави стверджувати, що такі зміни величин цитологічних показників, а саме: зменшення ІХ – як зниження активності геному, через зменшення його доступності («відкритості»), зростання ЯІ – як зростання активності трансляційного апарату – реакція клітин на стрес, зростання МЗЯ – як зменшення цілісності каріолеми – функціонування геному пригнічується, разом відображають пошкодження хроматину характерні для окисного стресу.

В наших дослідах в умовах впливу блокатора ПАРП і блокатора iNOS спостерігається зменшення ІХ – як зниження активності геному, через зменшення його доступності («відкритості»), зростання ЯІ – як зростання активності трансляційного апарату – реакція клітин на стрес, зростання МЗЯ – як зменшення цілісності каріолеми – функціонування геному пригнічується, разом відображають пошкодження хроматину, які можуть бути порівнювані з такими в умовах окисного стресу, який моделювався з використанням H_2O_2.

Застосування субстрату NOS і активатора CIPT-1, в умовах впливу блокатора ПАРП, блокатора iNOS і, разом блокатора ПАРП і блокатора iNOS, зумовлювало збільшення ІХ – як збільшення активності геному, через збільшення його доступності («відкритості»), зменшення ЯІ – як зменшення активності трансляційного апарату – зменшення реакції клітин на стрес, зменшення МЗЯ – як збільшення цілісності каріоплазми – функціонування геному відновлюється, разом відображають відновлення активності хроматину.

Разом, отримані дані дають підстави стверджувати, що і оксид азоту, і сіртуїн-1 беруть участь у підтриманні функціонального стану доступності хроматину в клітинах ФОО.

В наших дослідах для оцінки функціонального стану хроматину клітин ФОО підтверджено значимість оцінки активності геному, як «відкритості» або «доступності геному», за величиною ІХ, а також величини МЗЯ, як маркера цілісності каріоплазми, що значимо для репарації ДНК (одно- та двох-ниткових розривів).

Візуалізація доступності хроматину. З допомогою методики з використанням олігопейнтих зондів та флюоресцентної мікроскопії [11, 12] встановлено, що ядерна локалізація доступності залежить саме від типу клітин [13-15]. Варто відмітити, що незважаючи на переваги цієї методики визначати базові структури хроматину, включаючи і доступні зони, роздільна здатність все ще залишається недостатньою.

Репарація ДНК. Залежно від того в яких формах відбувається пошкодження ДНК, запускаються різні шляхи репарації, тому, ймовірно існує широка варіабельність ролі доступності хроматину в чутливості до пошкоджень ДНК. Так, двониткові розриви (ДЛР) формують «розірваний ДНК-полімер», і така «розірвана ланка» в ланцюзі ДНК визначається білками, такими як ПАРП-1 (полі(АДФ-рибозо)полімераза-1) [16].

Інакша картина відзначається при однониткових розривах ДНК або пошкодженнях основ ДНК, адуктів (ковалентні комплекси) ДНК, депуринації або зшиванні, де пошкодження виявляються різними ферментами, які сканують ДНК [16-20].

Відомо, що для ініціації репарації необхідно ремоделювати та вилучати сусідні нуклеосоми. Цей процес може бути спрощено за допомогою поєднання зондування пошкоджень із ремоделюванням нуклеосом. Так, ПАРП-1 – ядерний фермент, що активується при ушкодженні ДНК – синтезує негативно заряджені ланцюги полімеру АДФ-рибози із $НАД^+$ та приєднує їх до білків репарації ДНК (гістонів), транскрипційних факторів та ін. Цей процес здатен безпосередньо модифікувати гістони та індукувати розкручування нуклеосом [21].

Дослідження загальногеномної доступності хроматину в рамках ушкодження ДНК та її репарації може бути ще більш складним, бо шляхи репарації на відміну від транскрипції направлені на ділянки ушкодження ДНК, які зазвичай не прив'язані до транскрипційних сайтів. Закріплені сайти, які дійсно існують у рамках репарації ДНК, зазвичай називають «гарячими точками», які корелюють із різними геномними послідовностями, вторинними структурами, які здатні або не здатні взаємодіяти в умовах доступності хроматину [22, 23].

Таким чином, доступність хроматину може відігравати важливу роль у репарації пошкодження ДНК, залежно від типу пошкодження (одно- чи двохланцюгові розриви ДНК), і додаткові дослідження в цьому напрямку збільшуватимуть розуміння те, як відбувається ремоделювання хроматину (нуклеосом).

Отримані нами дані узгоджуються [2, 24-28]. В тому, що CIPT-1 може відігравати ключову роль у термінальній диференціації клітин ФОО [25], а також, що життєздатність клітин ФОО залежить від балансу між пригнічуючим та стимулюючим впливом на CIPT-1 [25, 27]. Ресвератрол послаблює ОС, щоб захистити спричинене H_2O_2 пошкодження і апоптоз гранулярних клітин яєчників у щурів [29], що певний рівень активності CIPT-1 може захищати ооцити від окисного ушкодження, викликаного стресом, пов'язаним з їх культивуванням *in vitro* [2, 26].

Висновки.

У цій роботі нами отримано нові дані про вплив H_2O_2 (5хв, 250 mM) на клітини фолікулярного оточення ооцитів, які дають підстави стверджувати, що такі зміни величин цитологічних показників (ІХ, ЯІ, МЗЯ), а саме: зменшення індексу хроматизації (ІХ) – як зниження активності геному, через зменшення його доступності («відкритості»), зростання ЯІ – як зростання активності трансляційного апарату – реакція клітин на стрес, зростання МЗЯ – як зменшення цілісності каріолеми – функціонування геному пригнічується, разом відображають пошкодження хроматину характерні для окисного стресу.

В наших дослідах в умовах впливу блокатора ПАРП і блокатора iNOS відмічається зменшення ІХ – як зниження активності геному, через зменшення його доступності («відкритості»), зростання ЯІ – як зростання активності трансляційного апарату – реакція клітин на стрес, зростання МЗЯ – як зменшення цілісності каріолеми – функціонування геному пригнічується. Все це разом відображає пошкодження хроматину, яке можуть бути порівнюване з таким, що виникає в умовах окисного стресу, який моделювався з використанням H_2O_2.

Застосування субстрату NOS і активатора CIPT-1, умовах впливу блокатора ПАРП, блокатора iNOS і, сумісно блокатора ПАРП і блокатора iNOS, зумавлює збільшення ІХ – як збільшення активності геному, через збільшення його доступності («відкритості»), зменшення ЯІ – як зменшення активності трансляційного апарату – зменшення реакції клітин на стрес, зменшення МЗЯ – як збільшення цілісності каріоплазми – функціонування геному відновлюється, разом відображають відновлення активності хроматину.

Разом, отримані дані дають підстави стверджувати, що і оксид азоту, і сіртуїн-1 беруть участь у підтриманні функціонального стану доступності хроматину в клітинах фолікулярного оточення ооцитів.

Перспективи подальших досліджень.

В майбутньому ми плануємо долучитися до досліджень цілісності ДНК, через оцінку зміни розподілу одно-ниткових розривів ДНК клітин ФОО в різних експериментальних умовах.

References / Література

1. Mansisidor A, Risca V. Chromatin accessibility: methods, mechanisms, and biological insights. Nucleus. 2022;13(1):236-276. DOI: 10.1080/19491034. 2022.2143106.
2. Di Emidio G, Falone S, Vitti M, D'Alessandro A, Vento M, Di Pietro C, et al. SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. Hum Reprod. 2014;29(9):2006-2017. DOI: 10.1093/humrep/deu160.
3. Zhang T, Zhou Y, Li L, Wang H, Ma X, Qian W, et al. SIRT1, 2, 3 protect mouse oocytes from postovulatory aging. Aging (Albany NY). 2016;8(4):685-696. DOI: 10.18632/aging.100911.
4. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Morte D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. Clin Interv Aging. 2018;13:757-772. DOI: 10.2147/CIA.S158513.
5. Liang J, Huang F, Song Z, Tang R, Zhang P, Chen R. Impact of NAD+metabolism on ovarian aging. Immun Ageing. 2023;20:70. DOI: 10.1186/s12979-023-00398-w.
6. Kovalchuk LY, Kovalchuk NV, Ilik VI, avtory, IFNMU, vlasnyk. Viyavlennya DNK v tsitologichnikh preparatakh. Ratsionalizatorska propozitsiya №30/2319. 1997. 5 s. [in Ukrainian].
7. Klemm S, Shipony Z, Greenleaf W. Chromatin accessibility and the regulatory epigenome. Nat Rev Genet. 2019;20(4):207-220. DOI: 10.1038/s41576-018-0089-8.
8. Newburger P, Subrahmanyam Y, Weissman S. Global analysis of neutrofil gene expression. Cur Opin Haematol. 2000;7(1):16-20. DOI: 10.1097/00062752-200001000-00004.
9. Garratt L. Current Understanding of the Neutrophil Transcriptome in Health and Disease. Cells. 2021;10(9):2406. DOI: 10.3390/cells10092406.
10. Keenan C, Mlodzianoski M, Coughlan H, Bediaga N, Naselli G, Lucas E, et al. Chromosomes distribute randomly to, but not within, human neutrophil nuclear lobes. iScience. 2021;24(3):102161. DOI: 10.1016/j.isci.2021. 102161.
11. Boettiger A, Bintu B, Moffitt J, Wang S, Beliveau B, Fudenberg G, et al. Super-resolution imaging reveals distinct chromatin folding for different epigenetic states. Nature. 2016;529(7586):418-422. DOI: 10.1038/nature 16496.
12. Su J, Zheng P, Kinrot S, Bintu B, Zhuang X. Genome-Scale Imaging of the 3D Organization and Transcriptional Activity of Chromatin. Cell. 2020;182(6):1641-1659.e26. DOI: 10.1016/j.cell.2020.07.032.
13. Boettiger A, Murphy S. Advances in Chromatin Imaging at Kilobase-Scale Resolution. Trends Genet. 2020;36(4):273-287. DOI: 10.1016/j.tig.2019. 12.010.
14. Chen X, Shen Y, Draper W, Buenrostro J, Litzenburger U, Cho S, et al. ATAC-see reveals the accessible genome by transposase-mediated imaging and sequencing. Nat Methods. 2016;13(12):1013-1020. DOI: 10.1038/ nmeth.4031.
15. Xie L, Dong P, Chen X, Hsieh T, Banala S, De Marzio M, et al. 3D ATAC-PALM: Super-resolution Imaging of the Accessible Genome. Nat Methods. 2020;17(4):430-436. DOI: 10.1038/s41592-020-0775-2.
16. Yang Y, Ye X, Dai R, Li Z, Zhang Y, Xue W, et al. Phase separation of Epstein-Barr virus EBNA2 protein reorganizes chromatin topology for epigenetic regulation. Commun Biol. 2021;4(1):967. DOI: 10.1038/s42003-021-02501-7.
17. Andres S, Schellenberg M, Wallace B, Tumbale P, Williams R. Recognition and repair of chemically heterogeneous structures at DNA ends. Environ Mol Mutagen. 2015;56(1):1-21. DOI: 10.1002/em.21892.
18. Mao P, Smerdon M, Roberts S, Wyrick J. Chromosomal landscape of UV damage formation and repair at single-nucleotide resolution. Proc Natl Acad Sci USA. 2016;113(32):9057-9062. DOI: 10.1073/pnas.1606667113.
19. Mao P, Brown A, Malc E, Mieczkowski P, Smerdon M, Roberts S, et al. Genome-wide maps of alkylation damage, repair, and mutagenesis in yeast reveal mechanisms of mutational heterogeneity. Genome Res. 2017;27(10):1674-1684. DOI: 10.1101/gr.225771.117.
20. Meas R, Wyrick JJ, Smerdon MJ. Nucleosomes regulate base excision repair in chromatin. Mutat Res Rev Mutat Res. 2019;780:29-36. DOI: 10.1016/j.mrrev.2017.10.002.
21. Perez B, Wong K, Schwartz E, Herrera R, King D, García-Nieto P, et al. Genome-Wide Profiles of UV Lesion Susceptibility, Repair, and Mutagenic Potential in Melanoma. Mutat Res. 2021;823:111758. DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2021.111758.
22. Chaudhuri A, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. Nat Rev Mol Cell Biol. 2017;18(10):610-621. DOI: 10.1038/nrm.2017.53.
23. Deng S, Yin Y, Petes T, Symington L. Mre11-Sae2 and RPA collaborate to prevent palindromic gene amplification. Mol Cell. 2015;60(3):500-508. DOI: 10.1016/j.molcel.2015.09.027.
24. Nesta A, Tafur D, Beck C. Hotspots of Human Mutation. Trends Genet. 2021;37(8):717-729. DOI: 10.1016/j.tig.2020.10.003.
25. Morita Y, Wada-Hiraike O, Yano T, Shirane A, Hirano M, Hiraike H, et al. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. Reprod Biol Endocrinol. 2012;10:14. DOI: 10.1186/1477-7827-10-14.

26. Sirotkin A, Dekanová P, Harrath A, Alwasel S, Vašíček D. Interrelationships between sirtuin 1 and transcription factors p53 and NF-κB (p50/p65) in the control of ovarian cell apoptosis and proliferation. Cell Tissue Res. 2014;358(2):627-632. DOI: 10.1007/s00441-014-1940-7.
27. Takeo S, Sato D, Kimura K, Monji Y, Kuwayama T, Kawahara-Miki R, et al. Resveratrol improves the mitochondrial function and fertilization outcome of bovine oocytes. J Reprod Dev. 2014;60(2):92-99. DOI: 10.1262/jrd.2013-102.
28. Sapuleni J, Szymanska M, Meidan R. Diverse actions of sirtuin-1 on ovulatory genes and cell death pathways in human granulosa cells. Reprod Biol Endocrinol. 2022;20(1):104. DOI: 10.1186/s12958-022-00970-x.
29. Cai M, Wang J, Sun H, Guo Q, Zhang C, Yao H, et al. Resveratrol Attenuates Hydrogen Peroxide-induced Injury of Rat Ovarian Granulosa-lutein Cells by Resisting Oxidative Stress via the SIRT1/Nrf2/ARE Signaling Pathway. Curr Pharm Des. 2023;29(12):947-956. DOI: 10.2174/1381612829666230403133322.

ДОСТУПНІСТЬ ГЕНОМУ: ЗМІНИ ХРОМАТИНУ КЛІТИН ФОЛІКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ ООЦИТІВ В УМОВАХ ОКИСНОГО СТРЕСУ *IN VITRO*

Срібна В. О., Вознесенська Т. Ю., Блашків Т. В.

Резюме. Доступ до геному (ДНК) є необхідною умовою для виконання основних клітинних процесів, зокрема транскрипції, реплікації, хромосомної сегрегації та репарації ДНК. За останнє десятиліття повногеномні дослідження та нові підходи до візуалізації дозволили краще зрозуміти, як регулюється доступ до геному. Те, як білки, які регулюють ці процеси, функціонують у контексті хроматину та його динамічної архітектури, є предметом інтенсивних досліджень.

Мета дослідження – за змінами величин цитологічних показників (індексу хроматизації (ІХ), ядерцевого індексу (ЯІ) та індексу морфологічно змінених ядер (МЗЯ)) оцінити зміни функціонального стану хроматину клітин фолікулярного оточення ооцитів в різних експериментальних умовах, а саме в умовах окисного стресу in vitro, а також впливу активатора CIPT_1, блокатора ПАРП (полі (АДФ-рибоза) полімерази), субстрата NOS і блокатора iNOS, що раніше не було вивчено.

У цій роботі нами отримано нові дані про вплив H_2O_2 (5 хв, 250 mM) на клітини фолікулярного оточення ооцитів дають підстави стверджувати, що такі зміни величин цитологічних показників (ІХ, ЯІ, МЗЯ), а саме: зменшення індексу хроматизації (ІХ) – як зниження активності геному, через зменшення його доступності («відкритості»), зростання ЯІ – як зростання активності трансляційного апарату – реакція клітин на стрес, зростання МЗЯ – як зменшення цілісності каріоплазми – функціонування геному пригнічується, разом відображають пошкодження хроматину характерні для окисного стресу.

В наших дослідах в умовах впливу блокатора ПАРП і блокатора iNOS відбувається: зменшення індексу хроматизації (ІХ) – як зниження активності геному, через зменшення його доступності («відкритості»), зростання ЯІ – як зростання активності трансляційного апарату – реакція клітин на стрес, зростання МЗЯ – як зменшення цілісності каріоплазми – функціонування геному пригнічується, разом відображають пошкодження хроматину, які можуть бути порівнювані з такими в умовах окисного стресу, який моделювався з використанням H_2O_2.

Застосування субстрату NOS і активатора CIPT_1, умовах впливу блокатора ПАРП, блокатора iNOS і, разом блокатора ПАРП і блокатора iNOS, що призводило: збільшення індексу хроматизації (ІХ) – як збільшення активності геному, через збільшення його доступності («відкритості»), зменшення ЯІ – як зменшення активності трансляційного апарату – зменшення реакції клітин на стрес, зменшення МЗЯ – як збільшення цілісності каріоплазми – функціонування геному відновлюється, разом відображають відновлення активності хроматину.

Разом, отримані дані дають підстави стверджувати, що і оксид азоту, і сиртуїн_1 беруть участь у підтриманні функціонального стану доступності хроматину в клітинах ФОО.

Ключові слова: клітини фолікулярного оточення ооцитів, хроматин, окисний стрес, сіртуїн_1.

GENOME AVAILABILITY: CHANGES IN THE CHROMATIN OF CELLS OF THE FOLLICULAR ENVIRONMENT OF OOCYTES UNDER CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS *IN VITRO*

Sribna V. O., Voznesenska T. Yu., Blashkiv T. V.

Abstract. Access to the genome (DNA) is a prerequisite for basic cellular processes, including transcription, replication, chromosome segregation, and DNA repair. Over the past decade, genome-wide studies and new imaging approaches have provided a better understanding of how access to the genome is regulated. How the proteins that regulate these processes function in the context of chromatin and its dynamic architecture is the subject of intense research.

The purpose of the study is to evaluate changes in the functional state of the chromatin of the cells of the follicular environment of oocytes under different experimental conditions, namely under conditions of oxidative stress, based on changes in the values of cytological indicators (chromatization index (ChI), nuclear index (NI) and morphologically altered nuclei index (MNI)), as well as the influence of the activator of Sirtuin_1, the PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase) blocker, the NOS substrate, and the iNOS blocker, which had not been studied before.

In this work, we have obtained new data about the effect of H_2O_2 (5 min, 250 mM) on the cells of the follicular environment of oocytes, which allowed us to asserting that such changes in the values of cytological indicators (ChI, NI, MNI), namely: a decrease in the chromatization index (ChI) – as decrease in the activity of the genome, due to a decrease in its accessibility (“openness”), the growth of NI – as an increase in the activity of the translational apparatus – the response of cells to stress, the growth of MNI – as a decrease in the integrity of the karyoplasm – the functioning of the genome is suppressed, together they reflect damage to the chromatin characteristic of oxidative stress.

The use of the NOS substrate and the activator of Sirtuin_1, under conditions of exposure to the PARP blocker, the iNOS blocker and, together, the PARP blocker and the iNOS blocker, which led to: an increase in the chromatization index (ChI) – as an increase in the activity of the genome, due to an increase in its accessibility (“openness”), a decrease in NI – as a decrease in the activity of the translational apparatus – a decrease in the reaction of cells

to stress, a decrease in MNI – as an increase in the integrity of the karyoplasm – the functioning of the genome is restored, together they reflect the restoration of chromatin activity.

Together, the obtained data provide grounds for asserting that both nitric oxide and sirtuin_1 are involved in maintaining the functional state of chromatin availability in cells of the follicular environment of oocytes.

Key words: cells of the follicular environment of oocytes, chromatin, oxidative stress, sirtuin_1.

ORCID and contributionship: / ORCID кожного автора та його внесок до статті:
Sribna V. O: https://orcid.org/0000-0003-0673-5131 ABCDF
Voznesenskaya T. Yu.: https://orcid.org/0000-0001-8478-2422 AE
Blashkiv T. V.: https://orcid.org/0000-0003-1196-2929 ABF

Conflict of interest: / Конфлікт інтересів:
The Authors declare no conflict of interest. / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції
Sribna Valentyna Oleksandrivna / Срібна Валентина Олександрівна
Bogomolets Institute of Physiology of NAS of Ukraine / Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України
Ukraine, 01024, 4 Academic Bogomolets str. / Адреса: Україна, 01024, м. Київ, вул. Академіка Богомольця 4
Tel.: +380633552233 / Тел.: +380633552233
E-mail: valia-z@ukr.net

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 15.09.2023 / Стаття надійшла 15.09.2023 року
Accepted 21.02.2024 / Стаття прийнята до друку 21.02.2024 року

DOI 10.29254/2077-4214-2024-1-172-120-125
UDC 616.72 +159.98

Streltsova V. V.

PERCEPTION AND PROCESSING PECULIARITIES OF INFORMATION ADDRESSED TO I AND II SIGNALING SYSTEMS IN THE CONTEXT OF MILD ACQUIRED MYOPIA

Nizhyn Mykola Gogol State University (Nizhyn, Ukraine)
vleipinge@gmail.com

The study focuses on the impact of myopia on the nervous system's reactions to stimuli addressed to different signalling systems. Since modern society is information and cyber-based and people have to process significant amounts of information, there has been a tendency in recent decades to increase the number of people with acquired myopia. Our study aims to determine the peculiarities of neurodynamic functions, perception and processing of stimuli addressed to the I and II signalling systems in people suffering from acquired myopia. The study participants were divided into groups with and without myopia. The Makarenko method was used to study neurodynamic functions. All experiments were conducted following international bioethical standards. Each participant gave written consent to participate in the study. The study considered changes in mental performance at the beginning of the working day and week, carried out on days of high mental performance. To avoid the subjective factor, the state of neurodynamic properties was tested three times. Separate stimuli were selected for each signalling system.

The study of neurodynamic functions revealed that people with myopia have shorter latent periods of choice reaction to stimuli addressed to the I and II signalling systems, and an increase in the functional mobility of nervous processes was observed. The slight differences in the values of SVMR and LPRC1-3 are due to their simplicity. The data obtained in the study confirm that myopia can affect the perception and processing of information, depending on the type of stimuli. Such findings are essential for understanding the relationship between visual function and the central nervous system in people with different degrees of myopia.

Key words: *myopia, latent periods, functional mobility of nervous processes, I and II signal systems.*

Connection of the publication with planned research works.

This study is a part of the research topic "State of functional systems in the conditions of formation of adaptive reactions and effects of biologically active compounds under these conditions" of the Department of Biology of Nizhyn Mykola Gogol State University, state registration number 0123U100614.

Introduction.

Modern society is considered an information and cybernetic society, a characteristic feature of which is an increased flow of information stimuli addressed to the sensory systems of the human body. The leading role in sensory signal perception is the visual system, which processes and perceives 80% of the information flow. Physiological and morphological disorders in the eye ac-