

рів спостерігалось достовірне зменшення кількості окисненого глутатіону щодо контролю в усі терміни дослідження.

Отже, алотрансплантація стегнової м'язової тканини ембріона призводить до збільшення кількості окисненого глутатіону в тканині реципієнта, що є результатом зниження антиоксидантного захисту клітин. Можна припустити, що ці зміни пов'язані з впливом ембріональних клітин на тканину реципієнта. Алотрансплантація

черевної м'язової тканини ембріона приводить до стабілізації рівня окисненого глутатіону в тканині реципієнта.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Утворення активних форм кисню та система антиоксидантного захисту в організмі тварин* / Г. Л. Антоняк, Н. О. Бабич, Л. І. Сологуб, В. В. Снітинський // *Біологія тварин*. – 2000. – Т. 2, № 2. – С. 34–43.
2. *Горячковский А. М. Клиническая биохимия в лабораторной диагностике : справ. пособие* / А. М. Горячковский. – Одесса : Экология, 2005. – 616 с.

3. *Рокитский П. Ф. Биологическая статистика* / П. Ф. Рокитский. – Минск : Высшая школа, 1972. – 318 с.

4. *Салига Н. О. Активність глутатіонової системи антиоксидантного захисту у щурів за дії L-глутамінової кислоти* / Н. О. Салига // *Український біохімічний журнал*. – 2013. – Т. 85, № 4. – С. 40–47.

5. *Birben E. Oxidative stress and antioxidant defense* / E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen // *WAO J.* – 2012. – N 5. – P. 9–19.

Надійшла 16.09.2015

Рецензент канд. мед. наук,  
доц. Г. Ф. Степанов

УДК 594:094.3(262.5)

О. В. Кулібаба, С. А. Петров

#### РІВЕНЬ ОКИСНеноГО ГЛУТАТІОНУ ПРИ АЛОТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЕМБРІОНАЛЬНОЇ М'ЯЗОВОЇ ТКАНИНИ У ЩУРІВ

Глутатіон є одним з найважливіших компонентів системи антиоксидантного захисту у ссавців. У ході роботи було проведено три види операційного втручання: 1 — алотрансплантація ембріональних м'язових тканин; 2 — трансплантація м'язової тканини, взятої у щурів з одного посліду; 3 — хибна операція. Мета нашого дослідження полягала у з'ясуванні зміни рівня окисненого глутатіону при алотрансплантації ембріональної м'язової тканини. Алотрансплантація стегнової м'язової тканини ембріона призводить до збільшення кількості окисненого глутатіону у тканині реципієнта, тимчасом як хибна операція — до його зменшення. Алотрансплантація черевної м'язової тканини ембріона сприяє стабілізації рівня окисненого глутатіону у тканині реципієнта. Можна припустити, що ці зміни пов'язані з впливом ембріональних клітин на тканину реципієнта.

**Ключові слова:** алотрансплантація, окиснений глутатіон, м'язова тканина.

UDC 594:094.3(262.5)

O. V. Kulibaba, S. A. Petrov

#### OXIDIZED GLUTATHIONE AT ALLOTRANSPLANTATION OF EMBRYONIC MUSCLE TISSUE IN RATS

Glutathione is one of the most important components of the antioxidant defense system in mammals. The aim of our study was to investigate the changes in the level of oxidized glutathione at allotransplantation of embryonic muscle tissue.

The work presents 3 types of surgical intervention: 1 — allograft of embryonic muscle tissue; 2 — transplantation of muscle tissue from the rats from the same litter, 3 — false operation.

The muscular tissue allograft embryonic femoral tissue increases the amount of oxidized glutathione in the tissue of the recipient. Allograft of embryonic abdominal muscle leads to stabilization of the level of oxidized glutathione in the tissue of the recipient. We can assume that these changes are related to the influence of embryonic cells in recipient's tissue.

**Key words:** allotransplantation, oxidized glutathione, muscle tissue.

УДК 612.62:616.155.194:615.038

А. П. Литвиненко,

В. О. Срібна,

Н. Г. Грушка, канд. біол. наук,

Т. Ю. Вознесенська, д-р біол. наук,

Т. В. Блашків, д-р біол. наук

## ВПЛИВ ІМУНІЗАЦІЇ БИЧАЧИМ СИРОВАТКОВИМ АЛЬБУМІНОМ НА ООЦИТИ, КЛІТИНИ ЇХ ФОЛКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ, КЛІТИНИ ТИМУСА І ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ У МИШЕЙ

*Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ*

### Вступ

Системні запальні процеси впливають на органи репродуктивної системи, зокрема на ско-

ротливість матки [1; 2], що може призводити до порушення імплантації та передчасних пологів, а також є однією з причин безплідності.

Раніше встановлено, що імунізація самок мишей введенням бичачого сироваткового альбуміну (БСА) призводить до запуску імунізаційної відповіді, яка

характеризується активацією клітинної ланки адаптивного імунітету, а саме антиген-специфічних лімфоцитів. Також відбувається зрушення лейкоцитарної формули вліво, збільшення індексу активації нейтрофілів, посилення функціонально-метаболічної активності клітин неспецифічної резистентності та зростання продукції біологічно активних речовин [3]. Однак можливі за таких умов розлади мейотичного дозрівання ооцитів, а також цитогенетичні порушення в клітинах фолікулярного оточення ооцитів, тимуса та лімфовузлів залишаються вивченими недостатньо.

**Мета** даної роботи — оцінити вплив імунізації БСА на мейотичне дозрівання ооцитів, життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів і ушкодження цілісності геному клітин імунікомпетентних органів у мишей.

#### **Матеріали та методи дослідження**

Дослідження проведене з використання невагітних самок мишей лінії СВА масою 16–18 г. Під час виконання роботи дотримувалися міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних досліджень. Імунізацію мишей здійснювали зростаючими дозами антигену — БСА (150–300 мг/кг маси миші, Sigma, USA) внутрішньовенно 1 раз на тиждень протягом 6 тиж. На сьому добу після останньої імунізації тварин піддавали ефірному наркозу і вилучали яєчники, пахові лімфовузли, тимус. Мишам контрольної групи вводили фізіологічний розчин за цією ж схемою. З яєчників мишей неферментативно (механічно) виділяли ооцити, які від мишей однієї групи збирали та розподіляли в окремі камери. Усі контрольні й

експериментальні ооцити культивували в однакових умовах (стерильний бокс, камери по 400 мкл культурального середовища DME з 15 мМ NERES, концентрація  $\text{Ca}^{2+}$  1,71 мМ, температура 37 °С, тривалість 20 год).

Морфологічні дослідження ооцитів проводили під мікроскопом МБС-10. Визначали стан зародкового пухирця, перивітелінового простору та цитоплазми, а саме щільність, ступінь гранульованості, ознаки фрагментації та дегенерації. Після 2 год культивування підраховували ооцити (відсоток від загальної кількості), що перебували на стадії метафази I (розчинення зародкового пухирця), а після 20 год — на стадії метафази II (формування першого полярного тільця). Шляхи клітинної загибелі вивчали з допомогою методу прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот Хехст 33342 та йодиду пропідіуму. Зв'язані з хроматином барвники дають змогу оцінити морфологічні особливості ядерного матеріалу.

Відсоток живих і ушкоджених клітин тимуса та лімфатичних вузлів установлювали рутинним методом виключення барвника — трипанового синього. Забарвлення флуоресцентними барвниками проводили в забуференому фосфатом фізіологічному розчині (ЗФР) із подальшим двократним відмиванням клітин у ЗФР під час центрифугування (2000 об/хв, 7 хв) і фіксували 5 % формаліном у ЗФР (2 хв). Оцінку проводили не менш як 200 клітин за допомогою люмінесцентного мікроскопа «Люмам И-1» (ЛМО, Росія) з водно-імерсійним об'єктивом  $\times 85$  та відеосистемою передачі зображення на комп'ютер. Для виявлення ушкоджень ДНК в ядрах клітин тимуса і лімфатичних вузлів використовували метод ДНК-комет

(лужний). Аналіз ДНК-комет на електрофореграмах, забарвлених Хехст 33342 (700 мкмоль/л) протягом 15 хв, здійснювали візуально, використовуючи люмінесцентний мікроскоп «Люмам И-1» (Росія) та відеосистему передачі зображення на комп'ютер при застосуванні водно-імерсійного об'єктива ( $\times 30$ ). На кожному мікропрепараті аналізували не менше ніж 400 окремо розташованих ДНК-комет. За співвідношенням ДНК у «голови» та «хвості» комети поділяли на 5 класів (0–4). Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента за допомогою програми GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, США);  $p < 0,05$  вважалося статистично вірогідним.

#### **Результати дослідження та їх обговорення**

Встановлено, що за умов імунізації БСА у мишей зменшується кількість ооцитів, в яких розчиняється зародковий пухирець (метафаза I), що становить  $(72,16 \pm 4,89) \%$  ( $p < 0,05$ ;  $n = 8$ ) порівняно з  $(84,05 \pm 3,50) \%$  у контролі. Відбувається посилення загибелі клітин фолікулярного оточення ооцитів (ФОО) — кількість живих клітин ФОО зменшується до  $(66,13 \pm 0,97) \%$  ( $p < 0,01$ ;  $n = 8$ ) порівняно з  $(83,00 \pm 2,48) \%$  у контролі.

Крім того, спостерігається збільшення кількості клітин ФОО з морфологічними ознаками апоптозу до  $(22,00 \pm 0,91) \%$  порівняно з показником у контролі  $(8,11 \pm 0,59) \%$ , тимчасом як кількість клітин з морфологічними ознаками некрозу вірогідно не змінюється порівняно з контролем і відповідно становить  $(9,88 \pm 0,48) \%$  і  $(8,89 \pm 1,39) \%$ .

За умов уведення БСА спостерігається посилення загибелі клітин в органах імунної системи — у тимусі відбувається зменшення кількості живих клі-

тин до  $(67,6 \pm 1,4) \%$  ( $p < 0,01$ ;  $n=8$ ) порівняно з  $(91,7 \pm 0,8) \%$  у контролі; кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу збільшується і відповідно становить  $(17,43 \pm 0,95) \%$  ( $p < 0,01$ ;  $n=8$ ) і  $(16,13 \pm 0,83) \%$  ( $p < 0,01$ ;  $n=8$ ) порівняно з показниками у контролі — відповідно  $(5,01 \pm 0,53)$  і  $(4,81 \pm 0,54) \%$ .

При дослідженні клітин лімфатичних вузлів спостерігалися подібні зміни — зменшується кількість живих клітин до  $(56,9 \pm 1,2) \%$  ( $p < 0,001$ ;  $n=6$ ) порівняно з  $(87,1 \pm 1,5) \%$  у контролі. Також відмічається ослаблення життєздатності внаслідок підвищення кількості клітин лімфатичних вузлів з морфологічними ознаками як апоптозу, так і некрозу — відповідно  $(18,9 \pm 1,2) \%$  ( $p < 0,01$ ;  $n=8$ ) і  $(22,9 \pm 1,2) \%$  ( $p < 0,01$ ;  $n=8$ ) порівняно з контрольними показниками відповідно  $(8,9 \pm 3,2)$  і  $(5,0 \pm 3,2) \%$ .

Дані про вплив імунізації БСА на розподіл ДНК-комет ядер клітин тимуса представлені на рис. 1.

За умов імунізації БСА відбувається ушкодження ДНК ядер клітин тимуса, а саме кількість клітин тимуса з ядрами 0-х/1-х зменшується в 3,12 разу, тимчасом як кількість клітин з ядрами 4-х збільшується в 2,23 разу порівняно з контролем.

Дані про вплив імунізації БСА на розподіл ДНК-комет ядер клітин лімфатичних вузлів представлені на рис. 2.

За умов імунізації БСА відбувається ушкодження ДНК клітин лімфатичних вузлів: кількість клітин з ядрами 0-х/1-х і 2-х зменшується відповідно у 2,3 і 2,1 разу, а кількість клітин з ядрами 4-х збільшується в 3,6 разу порівняно з такими показниками в контролі.

Відомо, що реакція організму на запалення, незалежно від локалізації запального процесу,

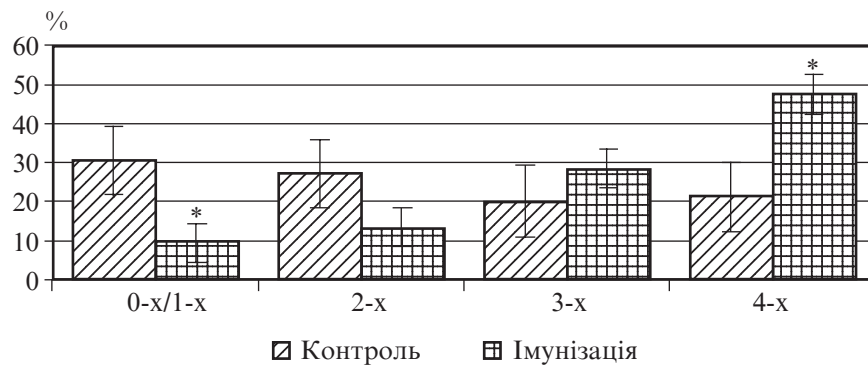


Рис. 1. Розподіл ДНК-комет ядер клітин тимуса за умов імунізації бичачим сироватковим альбуміном: \* —  $p < 0,05$  — вірогідність відмінностей величин середніх груп даних щодо таких показників у контрольних тварин

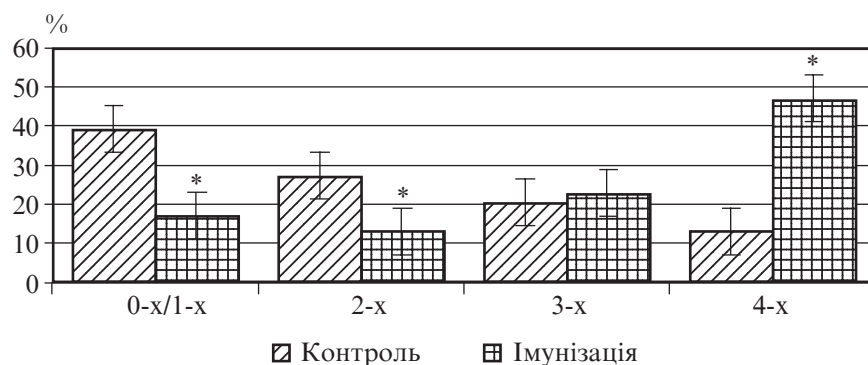


Рис. 2. Розподіл ДНК-комет ядер клітин лімфатичних вузлів за умов імунізації бичачим сироватковим альбуміном: \* —  $p < 0,05$  — вірогідність відмінностей величин середніх груп даних щодо таких величин у контрольних тварин

розвивається відповідно до загальних типових патологічних процесів за участі численних медіаторів запалення. Надмірна продукція цитокінів та інших медіаторів запалення (монооксиду азоту, ейкозаноїдів тощо) викликає порушення регуляторної функції імунної системи, призводить до їх неконтрольованого виділення не лише в осередку запалення, але і в циркулюючій крові, до порушення балансу між прозапальними і протизапальними цитокінами на користь прозапальних [4; 5]. Таким чином, медіатори запалення з чинників, що захищають організм, перетворюються на ушкоджувальні, порушуючи мікроциркуляторну систему органів і тканин за межами первинного осередку запалення. Починає розвиватися синдром системної реакції на запалення,

а далі порушується функція органів і систем.

Нами вперше встановлено, за умов імунізації БСА відбувається ушкодження ооцитів, а саме пригнічення їх мейотичного дозрівання *in vitro* на стадії метафази I, зменшення кількості живих клітин і підвищення кількості клітин з морфологічними ознаками як апоптозу, так і некрозу у тимусі, лімфатичних вузлах і фолікулярному оточенні ооцитів, а також ушкодження ДНК ядер клітин тимуса та лімфатичних вузлів.

Ми вважаємо, що імунізація БСА спричиняє секрецію потужних вазоактивних і прозапальних чинників з подальшим збільшенням загибелі клітин, у сукупності це призводить до посилення запальних процесів на системному рівні, тому відбувається ушкодження функцій ор-

ганів імунної та репродуктивної систем, що узгоджується з даними про пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів і посилення загибелі клітин ФОО, а також клітин тимуса та лімфатичних вузлів за апоптичним і некротичним шляхами за умов імунізації мишей гомогенатом алогенних яєчників [6].

Відомо, що запальний процес супроводжується активацією імунокомпетентних клітин як центральної, так і периферичної ланки імунної системи із посиленою продукцією прозапальних чинників. Підвищується генерація активних форм кисню та експресія індукцибельної NO-синтази, що призводить до відповідного збільшення утворення реактивних форм азоту [7], які, у свою чергу, можуть призвести до ушкодження ДНК клітин тимуса і лімфатичних вузлів.

Спираючись на власні результати, а також на дані літератури, є підстави стверджувати, що імунізація БСА призводить до системного запального процесу з ушкодженням клітин тимуса та лімфатичних вузлів, окрім цього, пригнічує мейотичне дозрівання ооцитів і знижує життєздатність клітин

фолікулярного оточення ооцитів.

Оцінка життєздатності клітин тимуса і лімфатичних вузлів та інтегральної цілісності їх геному дає підстави стверджувати, що імунізація БСА може змінювати активність експресії генів, асоційованих з репарацією, що відображається як одонитковий розрив ДНК.

### Висновки

За умов імунізації БСА пригнічується мейотичне дозрівання ооцитів, а саме частка клітин, у яких розчиняється зародковий міхурець (матафаза I), зменшується на 16 % порівняно з контролем; відбувається скорочення кількості живих клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів; також скорочується кількість клітин з ядрами 0-х/1-х у тимусі та 0-х/1-х і 2-х у лімфатичних вузлах і збільшується кількість клітин з ядрами 4-х у тимусі та лімфатичних вузлах порівняно з такими в контролі.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Вознесенська Т. Ю. Функціонування органів репродуктивної системи в умовах експериментального імунного ушкодження яєчника у мишей / Т. Ю. Вознесенська, О. М. Калейні-

кова, Т. В. Блашків // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. – № 2. – С. 125–128.

2. Моделювання хронічного запалення яєчників / Н. О. Волкова, М. С. Юхта, Т. О. Юрчук [та ін.] // Патологія. – 2014. – № 1. – С. 100–104.

3. Імуноморфологічна характеристика моделі системної патології імунокомплексного генезу у мишей / С. І. Павлович, А. П. Литвиненко, Н. В. Макогон [та ін.] // Вісник морфології. – 2014. – № 2. – С. 496–500.

4. T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection / E. F. McKinney, J. C. Lee, D. R. Jayne [et al.] // Nature. – 2015 Jun 29. doi: 10.1038/nature14468.PMID: 26123020.

5. Balk R. A. Systemic inflammatory response syndrome (SIRS): where did it come from and is it still relevant today? / R. A. Balk // Virulence. – 2014. – Vol. 5 (1). – P. 20–26.

6. Протективна дія молсидоміну при імунній патології яєчників у мишей / Н. В. Макогон, Т. Ю. Вознесенська, Т. М. Бризгіна [et al.] // Фізіологічний журнал. – 2007. – Т. 53, № 5. – С. 29–34.

7. Retinol,  $\beta$ -carotene and oxidative stress in systemic inflammatory response syndrome / C. Nogueira, F. Borges, E. Lameu [et al.] // Rev. Assoc. Med. Bras. – 2015. – Vol. 61 (2). – P. 116–120.

Надійшла 7.09.2015

Рецензент д-р мед. наук,  
проф. В. О. Ульянов

УДК 612.62:616.155.194:615.038

А. П. Литвиненко, В. О. Срібна, Н. Г. Грушка, Т. Ю. Вознесенська, Т. В. Блашків

ВПЛИВ ІМУНІЗАЦІЇ БИЧАЧИМ СИРОВАТКОВИМ АЛЬБУМІНОМ НА ООЦИТИ, КЛІТИНИ ЇХ ФОЛІКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ, КЛІТИНИ ТИМУСА І ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ У МИШЕЙ

Оцінювали вплив імунізації бичачим сироватковим альбуміном (БСА) на мейотичне дозрівання ооцитів, життєздатність клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса та лімфатичних вузлів і ушкодження цілісності геному клітин імунокомпетентних органів у самок мишей.

Встановлено, що при імунізації БСА відбувається ушкодження ооцитів, а саме пригнічення їх мейотичного дозрівання, зменшення кількості живих клітин лімфатичних вузлів і фолікулярного оточення ооцитів, ушкодження ДНК ядер клітин тимуса і лімфатичних вузлів.

Зроблено висновок, що імунізація БСА може змінювати активність експресії генів, асоційованих з репарацією, що відображається як одонитковий розрив ДНК.

**Ключові слова:** імунізація, метод ДНК-комет, тимус, лімфатичні вузли, ушкодження ДНК.

UDC 612.62:616.155.194:615.038

А. П. Lytvynenko, V. O. Sribna, N. G. Grushka, T. Yu. Voznesenska, T. V. Blashkiv

BOVINE SERUM ALBUMIN IMMUNIZATION EFFECTS ON THE OOCYTES AND FOLLICULAR CELLS, THYMIC AND LYMPH NODES CELLS IN MICE

The effect of bovine serum albumin (BSA) immunization on the meiotic maturation of oocytes, viability of the ovarian follicular cells, thymus-derived lymphocytes and lymph nodes cells and damage of the genome's integrity of immune cells in female mice were investigated.

Thus, under the condition of BSA immunization oocytes damage, namely the suppression of meiotic maturation, reduction of the number of living cells of lymph nodes, thymus and follicular cells surrounding oocytes, nuclear DNA damage of the thymus and lymph nodes cells were observed.

We suggest that BSA immunization could modify the activity of gene expression associated with reparation displayed as single-strand DNA break.

**Key words:** immunization, DNA-comet assay method, thymus, lymph nodes, DNA damage.