

© Срібна В. О., Грушка Н. Г., Янчій Р. І.

УДК 616.092-18:616.428:616.438

*Срібна В. О., Грушка Н. Г., Янчій Р. І.*

## ОДНОНИТКОВІ РОЗРИВИ ДНК ЯДЕР КЛІТИН ФОЛІКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ ООЦИТІВ, ТИМУСА І ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУНОКОМПЛЕКСНОГО УШКОДЖЕННЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ АНТИОКСИДАНТА

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

valia-z@ukr.net

Робота виконувалася в 2014-2015 рр. в рамках наукової програми відділу імунофізіології Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України: «Дослідження молекулярно-генетичних і імунопатологічних механізмів функціональних порушень жіночої репродуктивної системи і можливості їх корекції», № державної реєстрації 0112U008233.

**Вступ.** Відомо, що близько  $10^5$  пошкоджень ДНК, які виникають у геномі ссавців є результатом спонтанних мутацій, помилок реплікації і клітинного метаболізму [11]. Серед ряду пошкоджень ДНК, таких як модифіковані азотисті основи, AP-сайти, різноманітні ниткові розриви, внутрішньо- та міжниткові зшивки білкових-ДНК аддуктів, близько  $10^4$  складають модифіковані основи і одностричкові розриви ДНК [8,14]. Останні є одними з найбільш поширених пошкоджень ДНК, що виникають орієнтовно десятками тисяч на клітину в день [9,10,14]. Проте, безперервні одностричкові розриви можуть призвести до поломки реплікаційних вилок під час дублювання хромосом та до формування двохниткових розривів ДНК, а також до блокування транскрипції [14]. За останні роки все більше отримано результатів, які демонструють, що процес репарації ДНК відіграє важливу роль у збереженні життєздатності клітин [11,12,13,15]. Таким чином, постійне підтримання цілісності генома має важливе значення для життєздатності і довголіття здорового організму.

Відомо, що за умов імунного ушкодження збільшується генерація активних форм кисню та азоту за рахунок активації нейтрофілів та зростання експресії iNOS, що призводить до перекисного окислення ліпідів, ушкодження білків і ДНК і спричиняє розвиток оксидативного стресу [1,3,6].

Етилметилгідроксіпіридин сукцинат (ГС, препарат «Мексидол») — речовина з антиоксидантними та мембранопротекторними властивостями, яка здатна покращувати енергетичний обмін клітини, активувати енергосинтезуючу функцію мітохондрій. За останні роки вона набула широкого застосування в різних галузях медицини (неврології, хірургії, стоматології, ін.), проте її вплив на цілісність геному (одностричкові розриви ДНК) соматичних клітин за умов імунокомплексної патології не вивчено.

Мета дослідження – оцінити вплив введення ГС на пошкодження ДНК (одностричкові розриви) ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів (ФОО), тимуса і лімфатичних вузлів (ЛВ) за умов експериментального імунокомплексного ушкодження (ІКУ).

**Об'єкт і методи дослідження.** Дослідження проведено з використанням невагітних самиць мишей лінії СВА, масою 16-20 г. При роботі дотримувалися Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин Ради Європи.

Для моделювання експериментального ІКУ тварин імунізували зростаючою дозою антигену – бичачим сироватковим альбуміном (БСА, 150-300 мг/кг маси миші, Sigma, USA) згідно схеми імунізації [3].

Тварин було розділено на 4 групи по 8 тварин у кожній: I — контроль (вводили фізіологічний розчин за схемою імунізації); II — імунізація БСА – 1 раз на тиждень в/в зростаючою дозою антигену (150, 175, 200, 250, 250, 300 мг/кг) протягом 6 тижнів); III гр. – введення ГС (препарат «Мексидол», «Фармасофт», Російська Федерація) в/о, один раз на тиждень, у дозі 100 мг/кг) згідно схеми імунізації); IV — імунізація БСА за схемою та введення ГС згідно схеми імунізації, в/о, один раз на тиждень, в дозі 100 мг/кг. На 7 добу після останньої імунізації тварин піддавали дії ефірного наркозу і вилучали яєчники, тимус, пахові ЛВ.

Для виявлення одностричкових розривів ДНК ядер клітин ФОО, тимуса і ЛВ використовували метод ДНК-комет (лужний). На кожному мікропрепараті аналізували не менше 400 окремо розташованих ДНК-комет. За співвідношенням ДНК у «голові» та «хвості» комети поділяли на 5 класів (0-4).

Отримані дані перевіряли на нормальність за тестом Колмогорова-Смирнова. Порівняння груп даних здійснювали за дисперсійним аналізом ANOVA, з додатковим аналізом Newman-Keuls post hoc test, користуючись програмою GraphPad Prism version 5.00 for Windows.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Дані про вплив введення ГС на цілісність ДНК ядер клітин ФОО за умов експериментального ІКУ представлено в таблиці.

Таблиця.

**Вплив введення ГС на цілісність ДНК ядер клітин ФОО за умов експериментального ІКУ. Розподіл комет за класами у %**

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

Примітки: \* —  $p < 0.05$ ; \*\* —  $p < 0.01$  — вірогідності відмінностей величин відносно контролю; # —  $p < 0,01$  — вірогідності відмінностей величин відносно таких величин у групі імунізації БСА; n — кількість повторів.

Встановлено, що за умов експериментального ІКУ спостерігається значне пошкодження ДНК за рахунок збільшення кількості ядер клітин ФОО з максимальним ушкодженням ДНК (3-х, 4-х) та зменшення кількості ядер, які характеризуються відсутністю первинних пошкоджень (0/1-х). Введення ГС не справляє пошкоджувального впливу на ДНК ядер клітин ФОО, але відзначається деяке зростання частки ядер 2-го класу. Введення ГС на тлі імунізації БСА призводить до зменшення пошкодження ДНК: зменшується кількість ядер клітин ФОО з максимальним ушкодженням ДНК (3-х, 4-х) та збільшується кількість ядер, які характеризуються відсутністю первинних пошкоджень (0/1-х).

За умов експериментального ІКУ відбувається ушкодження ДНК клітин тимуса: зменшується кількість клітин з ядрами 0-х/1-х до  $6,33 \pm 1,03\%$  ( $p < 0,01$ ,  $n=6$ ) у порівнянні з  $67,00 \pm 5,48\%$  у контролі, а кількість клітин з ядрами 2-х, 3-х і 4-х зростає до, відповідно,  $20,33 \pm 3,56\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ),  $34,17 \pm 2,71\%$  ( $p < 0,01$ ,  $n=6$ ) і  $39,17 \pm 3,06\%$  ( $p < 0,01$ ,  $n=6$ ) у порівнянні з, відповідно,  $10,33 \pm 2,50\%$ ,  $12,33 \pm 4,27\%$  і  $10,33 \pm 2,42\%$  в контролі.

При введенні ГС частка клітин тимуса з ядрами 0/1-го, 3-го і 4-го класів залишається у межах контрольних величин і складає, відповідно,  $63,00 \pm 2,92\%$ ,  $15,40 \pm 1,67\%$  і  $4,00 \pm 1,87\%$ . Однак спостерігається збільшення ядер 2-го класу до  $17,60 \pm 1,52\%$  ( $p < 0.05$ ,  $n=6$ ) при  $10,33 \pm 2,50\%$  у контролі.

За умов експериментального ІКУ введення ГС призводить до зменшення кількості ядер клітин тимуса 3 і 4 класу до, відповідно,  $17,60 \pm 2,19\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) і  $15,20 \pm 1,92\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) при, відповідно,  $34,17 \pm 2,71\%$  і  $39,17 \pm 3,06\%$  ядер клітин цього ж класу в групі імунізація БСА; частка клітин з ядрами 2-го класу залишається без вірогідних змін по відношенню до відповідної величини у групі імунізація БСА і склав  $21,40 \pm 3,05\%$ ; відсоток клітин 0/1-го класу збільшується і становить  $45,80 \pm 2,05\%$  ( $p < 0.01$ ,  $n=6$ ) при  $6,33 \pm 1,03\%$  у групі імунізація БСА.

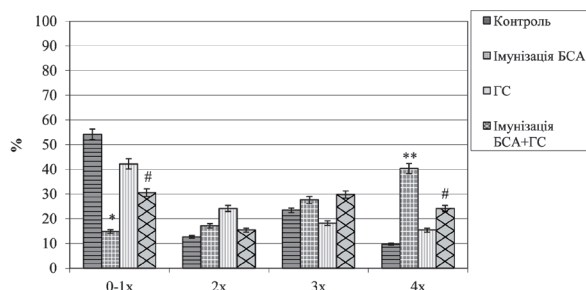
Дані про вплив введення ГС на цілісність ДНК ядер клітин ЛВ за умов експериментального ІКУ представлено на **рисунку**.

За умов експериментального ІКУ спостерігається значне пошкодження ДНК за рахунок збільшення кількості ядер клітин ЛВ з максимальним ушкодженням ДНК (4-х) та зменшення кількості ядер, які характеризуються відсутністю первинних пошкоджень (0/1-х). Введення ГС не впливає на кількість одониткових розривів ДНК ядер клітин ЛВ. Проте, за умов експериментального ІКУ введення ГС призводить до зменшення пошкодження ДНК: зменшується кількість ядер з максимальним ушкодженням ДНК (4-х) та збільшується кількість

ядер для яких характерна відсутність первинних пошкоджень ДНК (0/1-х).

Відомо, що геноми всіх живих організмів постійно змінюються за участю реактивних молекул, що виробляються ендогенно, в основному через мітохондріальне дихання, або за рахунок дії екзогенних факторів (фізичних, хімічних і біологічних) таких як ультрафіолетове випромінювання, радіоактивне випромінювання, важкі метали, атмосферні забруднення, хіміотерапевтичні препарати і імунозапальні відповіді [14]. Стійке пошкодження ДНК може призводити до мутагенезу та грубих хромосомних перебудов. Така нестабільність геному є суттєвим кроком до розвитку раку і ймовірно сприяє старінню й розвитку вікових захворювань. Окрім цього, пошкодження ДНК може запускати клітинну відповідь, яка ймовірно лежить в основі імунопатологій, що включають, мабуть, і системне запалення.

Нещодавно встановлено, що за умов імунокомплексемії введення ГС зумовило різнонаправлені ефекти: в оваріальному відділі матки спостерігалось зниження величин амплітуди і індексу скоротливості, у цервікальному – навпаки їх зростання. В цілому, ГС сприяв нормалізації окремих параметрів скоротливості, змінених за умов імунізації БСА [5].



**Рис. Вплив введення ГС на цілісність ДНК ядер клітин ЛВ за умов експериментального ІКУ. Розподіл комет за класами у %.**

Примітки: \* —  $p < 0.05$ ; \*\* —  $p < 0.01$  — вірогідності відмінностей величин відносно контролю; # —  $p < 0,01$  — вірогідності відмінностей величин відносно таких величин у групі імунізації БСА.

В цій роботі нами вперше показано, що введення ГС не впливає на кількість одониткових розривів ДНК ядер ЛВ та не справляє пошкоджувального впливу на ДНК ядер клітин ФОО і тимуса, але відмічається зростання частки ядер 2-го класу останніх, відповідно, в 2,0 і 1,7 рази. Введення ГС за умов експериментального ІКУ призводить до зменшення пошкодження ДНК, а саме, частка ядер 4-го класу клітин ФОО, тимуса і ЛВ з максимальним ушкодженням ДНК зменшується, відповідно, в 3,6, 2,6 і 1,7 рази, натомість частка ядер 0/1-го класу, які характеризуються відсутністю первинних пошкоджень зростає, відповідно, в 2,0, 7,0 і 2,2 разів. Наші результати доповнюють і розширюють відомості про ефект ГС на тканини.

Слід відмітити, що механізми дії ГС продовжують активно вивчатися. Так, один з шляхів дії ГС може бути пов'язаний з NO, який регулює  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортувальні системи плазматичної мембрани, саркоплазматичного ретикулу та мітохондрій міомерію. NO спричинює зростання проникності сарколеми для  $\text{Ca}^{2+}$ , стимулює пасивний транспорт катіона у міоцити крізь дигідропіридинчутливі канали, стимулює  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФ-азу [2], змінює функціонування мітохондріальних переносників [4]. В

дослідах *in vitro* показано, що ГС знижує активність iNOS [7].

**Висновки.** За умов експериментального ІКУ відбувається значне пошкодження ДНК: збільшується частка ядер клітин ФОО, тимуса і ЛВ з максимальним ушкодженням ДНК та зменшується частка ядер, які характеризуються відсутністю первинних пошкоджень.

Введення ГС не справляє пошкоджувального впливу на ДНК ядер клітин ФОО і клітини тимуса, але відмічається зростання частки ядер 2-го класу. Введення ГС не впливає на одониткові розриви ДНК ядер ЛВ.

Введення ГС за умов експериментального ІКУ призводить до зменшення пошкодження ДНК ядер клітин ФОО, тимуса і ЛВ з максимальним ушкодженням ДНК та збільшення кількості ядер, які характеризуються відсутністю первинних пошкоджень.

**Перспективи подальших досліджень.** Подальші наші дослідження з використанням блокаторів ПАРП та аргінази II зможуть дати відповідь щодо окремих механізмів патологічних змін функціональної активності соматичних клітин з метою пошуку адекватних протективних засобів при імунотоксичній патології.

### Література

1. Вознесенська Т.Ю. Функціонування органів репродуктивної системи в умовах експериментального імунного ушкодження яєчника у мишей / Т.Ю. Вознесенська, О.М. Калейнікова, Т.В. Блашків // Вісник проблем біології і медицини. – 2013. — № 2. — С. 125-128.
2. Данилович Ю.В. Оксид азоту як регулятор внутрішньоклітинного кальцієвого гомеостазу в міоцитах матки / Ю.В. Данилович // Укр. біохім. журнал. – 2012. — № 84 (3). — С. 5-25.
3. Імуноморфологічна характеристика моделі системної патології імунотоксичного генезу у мишей / С.І. Павлович, А.П. Литвиненко, Н.В. Макогон, Т.В. Мартинова [та ін.] // Вісник морфології. – 2014. — № 2. — С. 496-500.
4. Калейнікова О.М. Скоротлива активність міомерію миші в умовах зміни функціонального стану мітохондрій / О.М. Калейнікова, Т.В. Блашків, О.Р. Янчій, Т.Ю. Вознесенська // Укр. мед. альманах. – 2013(16). — № 1. — С. 186-188.
5. Литвиненко А.П. Вплив препарату «Мексидол» на скоротливість міомерію цервікального відділу матки у мишей / А.П. Литвиненко, О.А. Шепель, О.М. Калейнікова // Досягнення біології та медицини. – 2014. — № 1 (23). — С. 21-24.
6. Моделювання хронічного запалення яєчників / Н.О. Волкова, М.С. Юхта, Т.О. Юрчук, Л.В. Степанюк [та ін.] // Патологія. – 2014. — № 1. — С. 100-104.
7. Шулькин А.В. Влияние мексидола на развитие феномена эксайтотоксичности нейронов *in vitro* / А.В. Шулькин // Журнал неврологии и психиатрии. – 2012. — № 2. — С. 35-39.
8. Çağlayan M. Oxidant and environmental toxicant-induced effects compromise DNA ligation during base excision DNA repair / M. Çağlayan, S. Wilson // DNA Repair (Amst). — 2015. — 35. — P. 85-89.
9. Caldecott K. Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin / K. Caldecott // DNA Repair (Amst). — 2007. — 6 (4). — P. 443-453.
10. Caldecott K. Protein ADP-ribosylation and the cellular response to DNA strand breaks / K. Caldecott // DNA Repair (Amst). — 2014. — 19. — P. 108-113.
11. Hoeijmakers J.H. DNA damage, aging, and cancer / J.H. Hoeijmakers // N. Engl. J. Med. — 361 (2009). — P. 1475-1485.
12. Howard S. DNA damage response factors from diverse pathways, including DNA crosslink repair, mediate alternative end joining / S. Howard, D. Yanez, J. Stark // PLoS Genet. — 2015. — Jan 28. — 11 (1).
13. Jeppesen D.K. DNA repair deficiency in neurodegeneration / D.K. Jeppesen, V.A. Bohr, T. Stevensner // Prog. Neurobiol. — 94 (2011). — P. 166-200.
14. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA / T. Lindahl // Nature. — 362 (1993). — P. 709-715.
15. McKinnon P.J. DNA repair deficiency and neurological disease / P.J. McKinnon // Nat. Rev. Neurosci. — 10 (2009). — P. 100-112.

УДК 616.092-18:616.428:616.438

### ОДНОНИТКОВІ РОЗРИВИ ДНК ЯДЕР КЛІТИН ФОЛІКУЛЯРНОГО ОТОЧЕННЯ ООЦИТІВ, ТИМУСА І ЛІМФАТИЧНИХ ВУЗЛІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ІМУНОКОМПЛЕКСНОГО УШКОДЖЕННЯ ТА ЗАСТОСУВАННЯ АНТИОКСИДАНТА

Срібна В. О., Грушка Н. Г., Янчій Р. І.

**Резюме.** Оцінювали одониткові розриви ДНК за умов експериментального ІКУ і введення ГС. Встановлено, що введення ГС не впливає на кількість одониткових розривів ДНК ядер клітин ЛВ та не справляє

пошкоджувального впливу на ДНК ядер клітин ФОО і тимуса, але відмічається зростання частки ядер 2-го класу останніх, відповідно, в 2,0 і 1,7 рази. Введення ГС за умов експериментального ІКУ призводить до зменшення пошкодження ДНК, а саме, частка ядер 4-го класу клітин ФОО, тимуса і ЛВ з максимальним ушкодженням ДНК зменшується, відповідно, в 3,6, 2,6 і 1,7 рази, а частка ядер 0/1-го класу, які характеризуються відсутністю первинних пошкоджень збільшується в, відповідно, 2,0, 7,0 і 2,2 разів.

**Ключові слова:** однострункові розриви ДНК, імунокомплексна патологія, тимус, лімфатичні вузли, антиоксидант.

УДК 616.092-18:616.428:616.438

### **ОДНОНИТЕВЫЕ РАЗРЫВЫ ДНК ЯДЕР КЛЕТОК ФОЛИКУЛЯРНОГО ОКРУЖЕНИЯ ООЦИТОВ, ТИМУСА И ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИММУНОКОМПЛЕКСНОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ АНТИОКСИДАНТА**

**Срибная В. А., Грушка Н. Г., Янчий Р. И.**

**Резюме.** Оценивали однострунковые разрывы ДНК в условиях экспериментального иммунокомплексного повреждения и введения этилметилгидроксипиридин сукцината (ГС). Установлено, что введение ГС не влияет на количество однострунковых разрывов ДНК ядер клеток лимфатических узлов и не вызывает поврежденный ДНК ядер клеток фолликулярного окружения ооцитов и тимуса, но отмечается увеличение количества ядер 2-го класса последних, соответственно, в 2,0 и 1,7 раза. Введение ГС в условиях экспериментального иммунокомплексного повреждения приводит к уменьшению повреждения ДНК, а именно, доля ядер 4-го класса клеток фолликулярного окружения ооцитов, тимуса и лимфатических узлов с максимальным повреждением ДНК уменьшилась, соответственно, в 3,6, 2,6 и 1,7 раза, а доля ядер 0/1-го класса, характеризующихся отсутствием первичных повреждений увеличилась, соответственно, в 2,0, 7,0 и 2,2 раза.

**Ключевые слова:** однострунковые разрывы ДНК, иммунокомплексная патология, тимус, лимфатические узлы, антиоксидант.

UDC 616.092-18:616.428:616.438

### **DNA SINGLE-STRAND BREAKS OF FOLLICULAR CELLS SURROUNDING THE OOCYTE, THYMIC AND LYMPH NODES CELLS UNDER THE CONDITIONS OF EXPERIMENTAL IMMUNE COMPLEX-MEDIATED INFLAMMATION AND ANTI-OXIDANT TREATMENT**

**Sribna V., Grushka N., Yanchiy R.**

**Abstract.** Persistent DNA damage can induce mutagenesis, such as base substitutions and small insertions/deletions, as well as gross chromosomal rearrangements. Such genome instability is an essential step in the development of cancer, and likely contributes to aging and age-related disease. In addition, DNA damage can promote cell death responses that presumably underlie pathologies of immune system that include systemic inflammation.

Immune system damage, which was achieved by bovine serum albumin (BSA) immunization, leads to the launch of immunoinflammatory response, characterized by activation of cellular component of immune system, namely antigen-specific lymphocytes, also there are a left shift of leucogramme, increase of the activated neutrophils index, functional-metabolic activity of nonspecific resistance cells, production of biologically active substances. However, possible cytogenetic disorders in somatic cells (follicular cells surrounding the oocyte, thymic and lymph nodes cells) under such conditions are not studied enough.

That's why the aim of our study was to investigate the impact of the treatment of ethylmethylhydroxypyridyn succinate (GS) on DNA single-strand breaks of follicular cells surrounding the oocyte, thymic and lymph nodes cells under the conditions of experimental immune failure.

The study was carried out on non-pregnant female BCA mice, 16-18 g, divided into four groups: I — control (N=8), II-BSA immunization (N=8), III — administration of GS (N=8), IV — BSA immunization and administration of GS (N=8). Immunization of mice was performed with increasing doses of antigen-bovine serum albumin (BSA, 150-300 mg/kg of mouse, Sigma, USA) intravenously once a week for 6 weeks. GS was administered intraperitoneally at a dose of 100 mg/kg once a week according the immunization. Control mice were injected with saline. On the seventh day after the last immunization animals were anesthetized and ovaries, inguinal lymph nodes and thymus were removed. 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.

The obtained results demonstrated that the administration of GS had no effect on DNA strand breaks of lymph nodes cells as well as produces no damaging effects on DNA of follicular cells surrounding the oocytes and of the thymic cells, but there is some increase in the part of nuclei of the 2nd class, respectively, in 2,0 and 1.7 times. Treatment of GS under the condition of BSA immunization leads to a decrease in DNA damage, namely, the part of 4th class nuclei of follicular cells surrounding the oocytes, thymic and lymph nodes cells with a maximum DNA damage decreased in, respectively, 3.6, 2.6 and 1.7 times and the part of 0/1 class nuclei, that are characterized by the absence of primary lesions, increased in, respectively, 2,0, 7,0 and 2.2 times.

Conclusions. BSA immunization leads to a significant DNA damage by increasing the number of follicular cells surrounding the oocytes, thymic and lymph nodes nuclei with maximum DNA damage and reducing the number of nuclei, characterized by the absence of primary lesions. The treatment of GS does not produce damaging effects on DNA follicular cells surrounding the oocytes and thymic cells, but there is some increase in the portion of 2nd class nuclei. The treatment of GS does not affect DNA stand breaks of lymph nodes cells.

The treatment of GS under conditions of BSA immunization leads to a decrease in DNA damage of follicular cells surrounding the oocytes, thymic and lymph nodes cells with maximum DNA damage and increase in the number of nuclei, characterized by the absence of primary lesions.

**Keywords:** DNA single-strand breaks, immune complex-mediated inflammation, thymus, lymph node, antioxidant.

*Рецензент – проф. Дубінін С. І.*  
Стаття надійшла 27.04.2016 року