

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

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ГРУШКА НАТАЛІЯ ГЕОРГІЇВНА

УДК 612.017.1 : 612.621 : 612.42-092.4

ДИСЕРТАЦІЯ

**МЕХАНІЗМИ ФУНКЦІОНУВАННЯ ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ
ТА ОВАРІАЛЬНИХ КЛІТИН ПРИ АКТИВАЦІЇ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ**

03.00.13 – фізіологія людини і тварин

Подається на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук

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

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

Київ – 2026

АНОТАЦІЯ

Грушка Н.Г. Механізми функціонування імунокомпетентних та оваріальних клітин при активації імунної відповіді. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.13 «фізіологія людини і тварин». – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця Національної академії наук України, Київ, 2026.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню молекулярно-клітинних механізмів порушення функціонування імунокомпетентних та оваріальних клітин, що виникають за умов надмірної активації імунної відповіді. Актуальність такого дослідження зумовлена зростанням поширеності імуноопосередкованих та хронічних запальних розладів у жінок репродуктивного віку, що потребує поглибленого розуміння фізіологічних та клітинно-молекулярних змін, які виникають при імунній активації. Надмірна імунна активація супроводжується надлишковою продукцією прозапальних цитокінів, формуванням активних форм кисню та азоту, дисрегуляцією транскрипційних факторів і надмірною активацією механізмів клітинної відповіді на ушкодження ДНК. Ці зміни призводять до розвитку оксидативного та генотоксичного стресу, ушкодження ДНК та клітинної загибелі. Особливо чутливими до цих процесів є клітини тимуса, лімфатичних вузлів, а також гранулярні клітини та ооцити, що визначають стан фолікулогенезу і оваріального резерву. Оскільки такі ушкодження є ключовими факторами, що зумовлюють зниження репродуктивного потенціалу та імунної резистентності, їх вивчення має важливе фундаментальне і прикладне значення.

У роботі використано широкий спектр сучасних експериментальних та аналітичних методів, зокрема культивування ооцитів *in vitro*, виділення імунокомпетентних та гранулярних клітин, цитоморфологічні дослідження, метод лужного гель-електрофорезу поодиноких клітин (ДНК-комет) для оцінки інтегральної цілісності ДНК, прижиттєве флуоресцентне забарвлення нуклеїнових кислот для аналізу життєздатності клітин, апоптозу та некрозу, імуноцитохімічне визначення полі(АДФ-рибози) для оцінки активації PARP-1, аналіз маркерів оксидативного стресу (вміст МДА), кисневозалежного метаболізму нейтрофілів за НСТ-тестом та кисневонезалежних механізмів за вмістом катіонних білків, а також оцінку біохімічних показників ушкодження печінки (АЛТ), дослідження експресії генів HAS2, COX2 та GREM1 методом полімеразної ланцюгової реакції, імуноблотинг та імуноцитохімічний аналіз для оцінки активації NF-κB, а також статистичні методи для обробки, інтерпретації та підтвердження достовірності отриманих результатів.

Перший розділ експериментальної частини роботи присвячено оцінці адекватності застосованих експериментальних підходів для моделювання надмірної активації імунної відповіді, що охоплює гуморальну, клітинну та вроджену ланки імунітету: модель імунокомплексного ушкодження, індукованого БСА, модель КонА-індукованого Т-клітинного гепатиту, модель системної ендотоксемії, індукованої ЛПС. Це дозволило комплексно оцінити інтегральну цілісність ДНК, шляхи клітинної загибелі, інтенсивність оксидативного стресу, активацію ключових молекулярних медіаторів і сигнальних шляхів, а також вплив системного запалення на оваріальні клітини самиць мишей.

У моделі імунокомплексної патології, індукованої БСА, показано посилення клітинних і гуморальних реакцій імунної системи мишей. Імунофлуоресцентні дослідження підтвердили фіксацію імунних комплексів у тканині печінки, селезінки та аорти й їх накопичення в судинному руслі.

Гістологічний аналіз цих органів виявив переважне ураження судинної системи та, меншою мірою, паренхіми. Встановлено підвищення функціонально-метаболічної активності клітин вродженого імунітету за умов дії БСА. Показано, що генералізований імунокомплексний процес призводить до ушкодження ДНК й загибелі імунокомпетентних клітин центральних і периферичних органів імунної системи, а також оваріальних клітин, що супроводжується збільшенням відсотка клітин із важкими формами фрагментації ДНК. Крім того, встановлено порушення мейотичного дозрівання та дисрегуляцію експресії генів HAS2, COX2 і GREM1, що відображає погіршення функціонального стану гранульозних клітин.

У моделі КонА-індукованого гепатиту, що відтворює Т-клітинно-опосередковане імунне ушкодження печінки, було підтверджено активацію клітинних механізмів запальної відповіді. За цих умов спостерігалось підвищення вмісту катіонних білків, зростання показників НСТ-тесту, збільшення рівня МДА, а також підвищення відсотка клітин із різним ступенем фрагментації ДНК. Гістологічні дослідження виявили дистрофічні зміни гепатоцитів, порушення структури тимуса та лімфатичних вузлів і формування масивних вогнищ некрозу. Отримані результати свідчать, що у моделі реалізуються як апоптотичні, так і некротичні шляхи клітинної загибелі, причому некроз має тенденцію до переважання та може бути пов'язаний з активацією ПАРП-1 і NF-κB.

У моделі ЛПС-індукованої ендотоксемії зареєстровано виражену активацію та дисфункцію клітин вродженого імунітету, посилення генерації активних форм кисню та збільшення частки клітин, що зазнають некротичної загибелі. Спостерігалось значне ушкодження ДНК і розвиток вираженого генотоксичного стресу, що супроводжувалося активацією некротичних механізмів клітинної загибелі із вивільненням DAMP-молекул, зокрема HMGB1 (амфотерину).

Другий розділ експериментальної частини роботи присвячено аналізу ролі ПАРП-1 - ключового ферменту відповіді на пошкодження ДНК, який, залежно від рівня генотоксичного стресу, здатний підтримувати геномну стабільність або зумовлювати розвиток некротичної клітинної загибелі. Показано, що за умов імунокомплексного ушкодження відбувається гіперактивація ПАРП-1, що супроводжується розвитком некрозу. У досліджуваних моделях застосування інгібіторів ПАРП-1 (3-амінобензаміду та 4-гідроксиквіназоліну) достовірно знижувало ступінь фрагментації ДНК та зменшувало відсоток клітин із некротичною загибеллю. Отримані дані свідчать, що фармакологічне пригнічення ПАРП-1 чинить виражений цитопротективний ефект у моделях імуноопосередкованого ушкодження, сприяючи збереженню життєздатності клітин тимусу та лімфатичних вузлів і обмежуючи розвиток некротичних процесів, характерних для надмірної активації ПАРП-1. В яєчнику встановлено також активацію ПАРП-1, зниження життєздатності гранулярних клітин, посилення апоптозу та некрозу, а також дисрегуляцію експресії генів, пов'язаних із мейотичним дозріванням, що супроводжувалося суттєвим зниженням якості ооцитів. Продемонстровано підвищену чутливість гранулярних клітин до системного запалення, що свідчить про значну роль оксидативного стресу в їх ушкодженні.

Третій розділ експериментальної частини роботи присвячено дослідженню ролі амфотерину. Показано його участь як DAMP-молекули, що вивільняється з клітин під час некрозу та посилює запалення через рецептори TLR і RAGE. Виявлено підвищення рівня амфотерину при ендотоксемії та його внесок у формування генотоксичного стресу і порушення цілісності ДНК імунокомпетентних клітин. Інгібітор амфотерину – гліциризинат амонію – зменшував інтегральне ушкодження ДНК та знижував частку некротичних клітин у моделі ЛПС, підтверджуючи ключову роль амфотерину у підтриманні запальної відповіді та генотоксичного стресу.

Четвертий розділ експериментальної частини роботи присвячено аналізу ролі NF-κB у розвитку імуноопосередкованих ушкоджень. Підтверджено значущу роль NF-κB у регуляції експресії генів прозапальних медіаторів і підтриманні запальної відповіді. У моделі КонА-індукованого гепатиту зафіксовано виражену транслокацію NF-κB до ядра гепатоцитів та імунних клітин, що свідчить про його залучення до Т-клітинно-опосередкованого ушкодження. Показано, що інгібітор ПАРП-1 4-ГК значно пригнічує активацію NF-κB за умов КонА-індукованого імуноопосередкованого процесу. Це супроводжувалося зменшенням ядерної локалізації p65 в клітинах печінки та імунокомпетентних органах.. Андрографолід і куркумін продемонстрували виражений протизапальний ефект у моделі КонА-індукованого гепатиту, знижуючи некротичну загибель клітин. Крім того, за даними імуноблотингу встановлено, що андрографолід знижує активацію NF-κB.

П'ятий розділ експериментальної частини роботи присвячено комплексній оцінці широкого спектра фармакологічних засобів, здатних коригувати патологічні зміни, зокрема кверцетину, етилметилгідроксипіридин сукцинату (ГС), цитрату германію та наноструктурованих частинок срібла. Кверцетин зменшував ступінь ушкодження ДНК імунокомпетентних клітин при ЛПС-індукованому ушкодженні, що узгоджується з його антиоксидантними властивостями. Етилметилгідроксипіридин сукцинат покращував функціональний стан клітин імунної системи за умов імунокомплексного ушкодження, знижував інтенсивність оксидативного стресу та підтримував життєздатність гранулярних клітин і якість ооцитів. Цитрат германію та наночастинки срібла проявляли виражені антиоксидантні й мембранопротекторні властивості, знижували генотоксичний стрес, обмежували некроз і покращували структурно-функціональний стан імунних та оваріальних клітин. Отже, застосування антиоксидантів і наноматеріалів

сприяло зниженню генотоксичного стресу, обмеженню некротичної загибелі клітин і покращенню функціонального стану імунних та оваріальних клітин.

У дисертаційній роботі вперше комплексно охарактеризовано роль ПАРП-1, амфотерину та NF-κB у механізмах розвитку імуноопосередкованих ушкоджень. Встановлено взаємозв'язок між ступенем ушкодження ДНК, рівнем оксидативного стресу та типом клітинної загибелі. Показано, що надмірна активація ПАРП-1 є ключовим чинником некротичної загибелі клітин, порушення клітинного гомеостазу та втрати функціональної активності. Виявлено нові аспекти впливу системного запалення на фолікулогенез, життєздатність гранулярних клітин та якість ооцитів. Обґрунтовано доцільність застосування інгібіторів ПАРП-1, та модуляторів амфотерину і NF-κB, а також антиоксидантів і наноструктурованих матеріалів для фармакологічної корекції імуноопосередкованих ушкоджень.

За результатами виконання роботи сформульовано наукову концепцію, що обґрунтовує ключову роль порушення інтегральної цілісності ДНК, надмірної активації ПАРП-1, дисрегуляції NF-κB та вивільнення амфотерину у розвитку імуноопосередкованих ушкоджень. Концепція визначає взаємозв'язок між генотоксичним стресом, характером клітинної загибелі та функціональним станом імунних та оваріальних клітин, а також передбачає, що цілеспрямована модуляція сигнальної осі ПАРП-1/амфотерин/NF-κB із застосуванням інгібіторів, антиоксидантів та наноструктурованих сполук є ефективною стратегією збереження геномної стабільності, обмеження некротичної загибелі та підтримання репродуктивної функції в умовах надмірної імунної активації.

У дисертації запропоновано підходи до фармакологічної корекції ушкоджень із використанням синтетичних інгібіторів ПАРП-1 та природних біологічно активних сполук. Експериментальні результати показали, що застосування цих засобів сприяло зниженню фрагментації ДНК,

оксидативного стресу, а 4-ГК і андрографолід зменшували активацію NF-κB. Доведено, що така фармакологічна корекція супроводжується зменшенням некротичної загибелі клітин та відносним збільшенням рівня апоптотичної загибелі, що зменшує інтенсивність запальної відповіді й сприяє збереженню їх функціональної активності.

Уперше обґрунтовано доцільність модуляції сигнального шляху ПАРП-1/HMGB1 як перспективного напрямку фармакологічної корекції імуноопосередкованих ушкоджень репродуктивної системи. Запропоновано концепцію використання ступеня фрагментації ДНК, рівня активації ПАРП за вмістом полі(АДФ-рибози) та показників оксидативного стресу як маркерів клітинної дисфункції, що створює наукове підґрунтя для розроблення нових діагностичних підходів.

Сформовано нові уявлення про механізми порушення репродуктивної функції при імуноопосередкованих розладах, що відкриває можливості для розробки індивідуальних профілактичних і терапевтичних підходів. Отримані дані поглиблюють сучасні знання щодо взаємодії імунної та репродуктивної систем, підкреслюючи необхідність комплексного підходу до збереження жіночого здоров'я за умов надмірної імунної активації. Генотоксичний стрес імунокомпетентних клітин та посилення їх загибелі некротичним шляхом можуть відігравати значну роль у розвитку імуноопосередкованих захворювань. Показники ушкодження ДНК у лімфоцитах периферичної крові можуть розглядатися як перспективні інтегральні біомаркери для оцінки тяжкості імуноопосередкованих захворювань та ефективності їх лікування.

Отримані результати мають високе прикладне значення для клінічної імунології та репродуктивної медицини. Крім того, вони мають важливе фундаментальне значення для клінічної фізіології, репродуктивної біології й імунології, оскільки відкривають можливості для розробки нових стратегій профілактики і лікування, а також формування терапевтичних підходів до

збереження оваріального резерву та якості ооцитів, зокрема із застосуванням інгібіторів ПАРП-1, модуляторів HMGB1 і NF-κB та антиоксидантних наноматеріалів для обмеження хронічного запалення.

Ключові слова: імуноопосередковане ушкодження, імунокомпетентні клітини, оваріальні клітини, інтегральна цілісність ДНК, ПАРП-1, амфотерин (HMGB1), NF-κB, оксидативний стрес, генотоксичний стрес, клітинна загибель, мейотичне дозрівання, антиоксиданти, наноматеріали.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЙНОЇ РОБОТИ

Статті у виданнях, включених до наукометричної бази Scopus

1. Shepel E, **Grushka N**, Makogon N, Sribna V, Pavlovych S, Yanchii R. Changes in DNA integrity and gene expression in ovarian follicular cells of lipopolysaccharide-treated female mice. Pharmacol Rep. 2018 Dec;70(6):1146–1149. doi: 10.1016/j.pharep.2018.06.005. Epub 2018 Jun 20. PMID: 30317130. **Scopus (Q2).** *(Особистий внесок здобувача: участь у плануванні та виконанні експериментальних досліджень, узагальненні отриманих результатів).*
2. Makogon N, Voznesenskaya T, Bryzgina T, Sukhina V, **Grushka N**, Alexeyeva I. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, 3-aminobenzamide, protects against experimental immune ovarian failure in mice. Reprod Biol. 2010 Nov;10(3):215–26. doi: 10.1016/s1642-431x(12)60041-2. PMID: 21113202. **Scopus (Q2).** *(Особистий внесок здобувача: виконано частину експериментальних досліджень; участь в аналізі та статистичній обробці отриманих результатів).*
3. Kondratska O, **Grushka N**, Pavlovych S, Krasutska N, Tsyhankov S, Yanchii R. Effects of Poly (ADP-ribose) Polymerase Inhibition on DNA Integrity

and Gene Expression in Ovarian Follicular Cells in Mice with Endotoxemia. Iran Biomed J. 2022 Jan 1;26(1):44–52. doi: 10.52547/ibj.26.1.44. PMID: 34826885; PMCID: PMC8784896. **Scopus (Q3)**. *(Особистий внесок здобувача: участь у виконанні експериментальних досліджень, проведенні аналізу та узагальненні результатів)*.

4. Voznesenskaya T., Makogon N., Bryzgina T., Sukhina V., **Grushka N.**, Alexeyeva I. Melatonin protects against experimental immune ovarian failure in mice. Reproductive Biology. – 2007. – Vol. 7, No. 3. – P. 207–220. – PMID: 18059973. **Scopus (Q3)**. *(Особистий внесок здобувача: участь у виконанні частини експериментальних досліджень; участь у статистичній обробці отриманих результатів)*.

5. Blashkiv T.V., Stupchuk M.S., Sribna V.A., Kaleynykova O.M., **Grushka N.G.**, Voznesenska T.Yu. Resumption of meiotic maturation of oocytes, pre- and post-implantational embryonic mortality under conditions of experimental glomerulonephritis and treatment of silver nanoparticles. Nano Biomedicine and Engineering. – 2018. – Vol. 10, No. 4. – P. 355–361. – doi:10.5101/nbe.v10i4.p355-361. **Scopus (Q3)**. *(Особистий внесок здобувача: участь у виконанні частини експериментальних досліджень; участь у статистичній обробці отриманих результатів)*.

6. Макогон НВ, Павлович СІ, Бризгіна ТМ, Алексюк ЛІ, Сухіна ВС, **Грушка НГ**, Алексєєва ІМ. Проліферація та загибель мононуклеарних клітин печінки мишей за умов її імунного ураження, викликаного введенням конканаваліну А або протипечінкових антитіл. Фізіологічний журнал. 2008;54(6):49-57. **Scopus**. *(Особистий внесок здобувача: виконано частину експериментальних досліджень; проведено аналіз та статистичну обробку отриманих результатів)*.

7. **Грушка НГ**, Павлович СІ, Бризгіна ТМ, Сухіна ВС, Макогон НВ, Янчій РІ. Генотоксичний стрес і шляхи загибелі клітин тимуса та лімфовузлів мишей за умов системної імунокомплексної патології. Фізіол журн. 2015;61(1):28–34. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz61.01.028>. **Scopus (Q4)**.

(Особистий внесок здобувача: формування ідеї дослідження, виконання експериментальної частини, аналіз та опрацювання отриманих результатів, їх узагальнення і підготовка матеріалів до публікації).

8. Павлович СІ, Макогон НВ, **Грушка НГ**, Бризгіна ТМ, Янчій РІ. Морфологічні зміни у печінці мишей за умов конканавалін А-індукованого гепатиту. Фізіол журн. 2016;62(1):83-91.

DOI: <https://doi.org/10.15407/fz62.01.083>. **Scopus (Q4)**. *(Особистий внесок здобувача: участь у формуванні ідеї дослідження та виконанні експериментальних досліджень; участь у проведенні аналізу та узагальненні результатів; участь у підготовці рукопису статті).*

9. **Грушка НГ**, Павлович СІ, Кондрацька ОА, Пількевич НО, Янчій РІ. Протективна дія цитрату германію на функціональний стан імунокомпетентних клітин та активність нейтрофілів при запаленні, індукованому ліпополісахаридом. Фізіол журн. 2019;65(6):43-50. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz65.06.043>. **Scopus (Q4)**. *(Особистий внесок здобувача: сформовано ідею дослідження; виконано частину експериментальних досліджень; участь у проведенні аналізу, статистичної обробки та узагальненні отриманих результатів; підготовлено рукопис статті).*

10. Кондрацька ОА, **Грушка НГ**, Павлович СІ, Янчій РІ. Корируючий вплив цитрату германію на репродуктивну функцію самок старих мишей. Фізіол журн. 2023;69(2):37-43. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz69.02.037>. **Scopus (Q4)**. *(Особистий внесок здобувача: участь у плануванні та виконанні експериментальних досліджень).*

11. Кондрацька ОА, **Грушка НГ**, Мешко ВВ, Павлович СІ, Янчій РІ. Функціональна активність ядерного протеїну амфотерину та його роль у розвитку ендотоксемії. Фізіол журн. 2023;69(6):120-132. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz69.06.120>. **Scopus (Q4)**. *(Особистий внесок*

здобувача: участь в аналізі та узагальненні літературних даних, підготовці рукопису статті).

12. Павлович СІ, **Грушка НГ**, Кондрацька ОА, Красуцька НО, Антонюк ВМ, Мешко ВВ, Янчій РІ. Гістоструктурні зміни в імунокомпетентних органах, печінці та легенях за умов експериментальної ендотоксемії, індукованої ліпополісахаридом. Фізіол журн. 2024;70(5):66-71. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz70.05.066>. **Scopus (Q4)**. (Особистий внесок

здобувача: участь у плануванні та виконанні експериментальних досліджень, проведенні аналізу та узагальненні результатів, підготовці рукопису статті).

13. Kondratska OA, **Grushka NG**, Pavlovych SI, Yanchii RI. Germanium citrate improves ovarian granulosa cells viability and antioxidant defense system in aging female mice during endotoxemia. Fiziol Zh. 2024;70(3):59–64. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz70.03.059>. **Scopus (Q4)**. (Особистий внесок

здобувача: участь у плануванні та виконанні експериментальних досліджень).

14. **Грушка НГ**. Вплив 4-гідроксиквіназоліну та 3-амінобензаміду на ступінь ушкодження ДНК в імунокомпетентних клітинах за умов гепатиту, індукованого конканаваліном А. Фізіол журн. 2025;71(5):56-64. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz71.05.056>. **Scopus (Q4)**. (Особистий внесок

здобувача: робота виконана автором самотійно).

15. **Грушка НГ**, Павлович СІ, Кондрацька ОА, Андрійчук ІІ, Янчій РІ. Вплив кверцетину на інтегральну цілісність ДНК та життєздатність імунокомпетентних клітин за умов ендотоксемії у мишей. Фізіол журн. 2026; 72(3):18-25. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz72.03.018>. **Scopus (Q4)**. (Особистий внесок здобувача: участь у формуванні ідеї дослідження та виконанні експериментальних досліджень; участь у проведенні аналізу, статистичній обробці та узагальненні отриманих результатів; підготовлено рукопис статті).

**Статті, опубліковані у наукових фахових виданнях, включених до
Переліку МОН України, що відображають основні результати дисертації**

1. Вознесенська Т.Ю., Макогон Н.В., Бризгіна Т.М., Сухіна В.С., **Грушка Н.Г.**, Алексєєва І.М. Шляхи загибелі фолікулярних клітин яєчника у мишей при порушенні оогенезу імунного походження. Фізіологічний журнал. 2006;52(3):52–56. ISSN 0201-8489. *(Особистий внесок здобувача: виконано частину експериментальних досліджень, участь в обговоренні отриманих результатів).*
2. Бризгіна ТМ, Сухіна ВС, **Грушка НГ**, Макогон НВ. Морфологічні прояви апоптотичної загибелі клітин лімфовузлів і тимуса мишей при застосуванні конканаваліну А. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2007;(2):44-47. doi:10.11603/1811-2471.2007.v0.i2.347. *(Особистий внесок здобувача: участь у плануванні та виконанні експериментальних досліджень; проведено аналіз, статистичну обробку та узагальнення результатів).*
3. Павлович СІ, Литвиненко АП, Макогон НВ, Мартинова ТВ, Бризгіна ТМ, Янчій РІ, Сухіна ВС, **Грушка НГ**, Шепель ОА, Вознесенська ТЮ, Блашків ТВ, Гетьманець ОВ. Імуноморфологічна характеристика моделі системної патології імунокомплексного генезу у мишей. Вісник морфології. 2014;20(2):496-500. *(Особистий внесок здобувача: участь у плануванні та виконанні експериментальних досліджень; проведено аналіз та узагальнення результатів).*
4. Шепель ОА, Блашків ТВ, Вознесенська ТЮ, **Грушка НГ**, Янчій РІ. Гени, пов'язані з передчасним виснаженням яєчників. Вісник проблем біології і медицини. 2015;2(1):58-62. *(Особистий внесок здобувача: участь у аналізі та узагальненні літературних джерел, підготовці окремих розділів статті).*
5. Ступчук МС, **Грушка НГ**, Шепель ОА, Блашків ТВ, Вознесенська ТЮ. Мейотичне дозрівання ооцитів і життєздатність клітин їх фолікулярного

оточення, тимуса і лімфатичних вузлів в умовах експериментального імунного гломерулонефриту. Вісник проблем біології і медицини. 2015;4(2):229-231. *(Особистий внесок здобувача: виконання частини експериментальних досліджень; участь у проведенні аналізу, статистичній обробці та узагальненні отриманих результатів).*

6. Литвиненко АП, Срібна ВО, **Грушка НГ**, Вознесенська ТЮ, Блашків ТВ. Мейотичне дозрівання ооцитів і життєздатність клітин їх фолікулярного оточення, тимуса і лімфатичних вузлів за умов моделювання системного імунокомплексного ушкодження. Одеський медичний журнал. 2016;(1):13-17. *(Особистий внесок здобувача: участь у формуванні ідеї дослідження; виконано частину експериментальних досліджень; проведено аналіз, статистичну обробку та узагальнення результатів).*

7. Срібна О, **Грушка НГ**, Янчій РІ. Однониткові розриви ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів за умов експериментального імунокомплексного ушкодження та застосування антиоксиданта. Вісник проблем біології та медицини. 2016;2(3):195-199. *(Особистий внесок здобувача: участь у формуванні ідеї дослідження; виконано частину експериментальних досліджень; проведено аналіз, статистичну обробку та узагальнення результатів; участь у підготовці рукопису статті).*

8. Литвиненко АП, Срібна ВО, **Грушка НГ**, Вознесенська ТЮ, Блашків ТВ. Вплив імунізації бичачим сироватковим альбуміном на ооцити, клітини їх фолікулярного оточення, клітини тимуса і лімфатичних вузлів у мишей. Досягнення біології та медицини. 2015;(2):10–13. *(Особистий внесок здобувача: участь у формуванні ідеї дослідження; виконано частину експериментальних досліджень; проведено аналіз, статистичну обробку та узагальнення результатів).*

9. **Грушка НГ.** Вплив інгібітора полі(АДФ-рибозо)полімерази 4-гідроксиквіназоліну на загибель імунокомпетентних клітин за умов імунокомплексної патології у мишей. Фізіол журн. 2017;63(1):43-50. DOI: <https://doi.org/10.15407/fz63.01.043>. *(Особистий внесок здобувача: робота виконана автором самостійно).*
10. Срібна ВО, **Грушка НГ**, Шепель ОА, Блашків ТВ, Янчій РІ. Розподіл одониткових розривів ДНК ядер ооцитів в умовах впливу антиоксиданта, блокатора ПАРП, субстрата NOS, блокатора iNOS. Вісник проблем біології і медицини. 2017;4(3):231-234. DOI 10.29254/2077-4214-2017-4-3-141-231-234. *(Особистий внесок здобувача: виконано частину експериментальних досліджень; проведено аналіз, статистичну обробку та узагальнення отриманих результатів).*
11. Вознесенська ТЮ, Ступчук МС, **Грушка НГ**, Кондрацька ОА, Блашків ТВ. Вплив внутрішньовенного введення наночастинок срібла на ДНК ядер клітин тимуса, лімфатичних вузлів і фолікулярного оточення ооцита в умовах експериментального системного аутоімунного ушкодження. Вісник проблем біології і медицини. 2018;1(2):327-331. DOI: 10.29254/2077-4214-2018-1-2-143-327-331. *(Особистий внесок здобувача: участь у плануванні експерименту та виконанні експериментальних досліджень; участь в аналізі, статистичній обробці та узагальненні отриманих результатів).*
12. Кондрацька ОА, **Грушка НГ**, Павлович СІ, Стовбун ЮР, Плинка ОІ, Янчій РІ. Гліциризинат амонію чинить протективний вплив на оогенез та послаблює генотоксичний стрес і загибель імунних клітин в умовах ендотоксемії, індукованої ліпополісахаридом. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2020;3/4(91):5–11. *(Особистий внесок здобувача: участь у постановці завдань дослідження, плануванні та виконанні експериментальних досліджень; участь у проведенні аналізу, узагальненні результатів, підготовці рукопису статті).*

**Статті у зарубіжних наукових виданнях, що відображають результати
дисертаційного дослідження та не індексуються у міжнародних
наукометричних базах даних**

1. **Grushka N**, Makogon N, Pavlovych S, Bryzgina T, Martynova T, Sukhina V, Yanchii R. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-hydroxyquinazoline exerts a protective effect against concanavalin A-induced hepatitis in mice. J Health Sci. 2013;3(11):463-468. *(Особистий внесок здобувача: сформовано ідею дослідження; участь у виконанні експериментальних досліджень; проведено аналіз, статистичну обробку; підготовлено рукопис статті).*
2. **Grushka N**, Pavlovych S, Kondratska O, Pilkevich N, Yanchii R. Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition on morpho-functional state of immunocytes under conditions of experimental endotoxemia in mice. World J Pharm Pharm Sci. 2019;8(8):161-173. *(Особистий внесок здобувача: сформовано ідею дослідження; участь у виконанні експериментальних досліджень; проведено аналіз, підготовлено рукопис статті).*
3. Shepel E, **Grushka N**, Makogon N, Voznesenskaya T, Yanchii R. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) protects against experimental immune complex-induced ovarian failure in mice. Int J Health Sci Res. 2016;6(11):103-108. *(Особистий внесок здобувача: участь у формуванні ідеї дослідження, виконанні експериментальних досліджень, проведенні аналізу та узагальненні отриманих результатів).*
4. Lytvynenko AP, Rieznichenko LS, Sribna VA, Stupchuk MI, **Grushka NG**. et al. Functional status of reproductive system under treatment of silver nanoparticles in female mice. Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol. 2017;6(5):1713–1720. doi:10.18203/2320-1770.ijrcog20171930. *(Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень та статистичній обробці отриманих результатів).*

5. Sribna VO, Kaleynykova ON, **Grushka NG**, Blashkiv TV, Voznesenska TYu, Yanchiy RI. Resumption of meiotic maturation of oocytes, pre- and postimplantation mortality of embryos under ten-time intravenous treatment of silver nanoparticles in mice. International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology. 2018. Vol. 7, No. 11. P. 4360–4365. doi: 10.18203/2320-1770.ijrcog20184478. *(Особистий внесок здобувача: участь у проведенні експериментальних досліджень та статистичній обробці отриманих результатів).*

Патенти України на корисну модель

1. Макогон НВ, Вознесенська ТЮ, Павлович СІ, **Грушка НГ** та ін. Спосіб моделювання імунокомплексного ушкодження у мишей. Патент України на корисну модель №93351; 2014. *(Особистий внесок здобувача: участь у плануванні та виконанні частини експериментальних досліджень, аналізі, статистичній обробці та узагальненні отриманих результатів).*

2. Ступчук МС, Вознесенська ТЮ, **Грушка НГ**, Шепель ОА, Джуран БВ, Блашків ТВ. Спосіб моделювання системного аутоімунного ушкодження у мишей. Патент України на корисну модель №120418; 2017. *(Особистий внесок здобувача: участь у плануванні та виконанні частини експериментальних досліджень, аналізі, статистичній обробці та узагальненні отриманих результатів).*

3. **Грушка НГ**, Кондрацька ОА, Павлович СІ, Джуран БВ, Янчій РІ. Спосіб моделювання системної ендотоксемії у мишей лінії Альбіно. Патент України на корисну модель №139296; 2019. *(Особистий внесок здобувача: участь у плануванні та виконанні частини експериментальних досліджень, аналізі, статистичній обробці та узагальненні отриманих результатів, а також їх інтерпретації).*

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

1. Павлович С.І., Сухіна В.С., Грушка Н.Г. Вплив інгібітора активації ядерного фактора NF-κB куркуміну на гістоструктуру печінки в нормі та при експериментальному імунному гепатиті різного генезу // Матеріали XVIII з'їзду Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (Одеса, 20–22 травня 2010 р.) // Фізіол. журн. – 2010. – Т. 56, № 2. – С. 123–124.
2. Pavlovych S.I., Martynova T.V., Makogon N.V., Grushka N.G., Sukhina V.S., Bryzgina T.M., Yanchiy R.I. The role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) in concanavalin A (Con A)-induced microcirculation disturbances in mouse liver // «Physiology and Pathology of Respiration: Advances in Basic Research and Clinical Applications», Фізіол. журн. – 2013. – Т. 59, № 4. – С. 24.
3. Мартинова Т.В., Макогон Н.В., Бризгіна Т.М., Павлович С.І., Сухіна В.С., Грушка Н.Г. Вплив 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК) – інгібітора полі(АДФ-рибозо)полімерази (ПАРП) на прооксидантно-антиоксидантний стан печінки мишей при експериментальному імунному гепатиті // Матеріали XIX з'їзду Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (Львів, 26–29 травня 2014 р.) // Фізіол. журн. – 2014. – Т. 60, № 3. – С. 212.
4. Грушка Н.Г., Шепель О.А., Макогон Н.В., Вознесенська Т.Ю., Янчій Р.І. Вплив інгібітора полі(АДФ-рибозо)полімерази 4-гідроксиквіназоліну на шляхи загибелі імунокомпетентних та гранулярних клітин за умов імунокомплексної патології у мишей // Тези доповідей 5-го з'їзду Українського товариства клітинної біології з міжнародною участю (Одеса, 2–6 жовтня 2016 р.). – С. 8.
5. Срібна В.О., Литвиненко А.П., Грушка Н.Г., Янчій Р.І. Однотиткові розриви ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів за умов експериментального імунного ушкодження // Тези доповідей VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю (Харків, 5–7 жовтня 2016 р.). – С. 218.

6. Янчій Р.І., Срібна В.О., Павлович С.І., Грушка Н.Г., Макогон Н.В. Механізми участі полі(АДФ-рибозо)полімерази (ПАРП) у патогенезі імуноопосередкованих захворювань // Тези доповідей VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю (Харків, 5–7 жовтня 2016 р.). – С. 279.
7. Вознесенська Т.Ю., Ступчук М.С., Шепель О.А., Грушка Н.Г., Блашків Т.В. Цілісність ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцита, тимуса та лімфатичних вузлів в умовах експериментального імунного ушкодження нирок та введення наночастинок срібла // Збірник тез VIII Міжнародної наукової конференції «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (Київ, 2017). – С. 30.
8. Kondratskaya E.A., Grushka N.G., Voznesenskaya T.Yu., Yanchiy R.I. The effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-hydroxyquinazoline on oogenesis and cell death pathways under experimental immune complex-mediated injury in mice // Proceedings of the International Medical Congress “Euromedica – Hannover” (Hannover, Germany, 2017). – P. 128–129.
9. Грушка Н.Г., Шепель О.А., Павлович С.І., Срібна В.А., Макогон Н.В. Генотоксичний стрес та загибель клітин тимуса та лімфовузлів за умов експериментальної ендотоксемії // Бюлетень XVI читань ім. В.В. Підвисоцького (Одеса, 18–19 травня 2017 р.). – С. 104.
10. Грушка Н.Г., Кондрацька О.А., Павлович С.І., Пількевич Н.О., Янчій Р.І. Вплив цитрату германію на генотоксичний стрес імуноцитів мишей, спричинений введенням ліпополісахариду // Матеріали III Національного конгресу з імунології, алергології та імунореабілітації (Дніпро, 17–19 квітня 2018 р.). – С. 15.
11. Янчій Р.І., Грушка Н.Г., Кондрацька О.А., Портніченко В.І., Каплуненко В.Г., Павлович С.І. Механізми ендотоксин-індукованих патологічних змін у ссавців та засоби їх корекції // Матеріали Міжнародної науково-практичної

конференції «Актуальні проблеми фізіології тварин», присвяченої 120-річчю Національного університету біоресурсів і природокористування України» (Чернігів, 2018). - С. 96-97.

12. Kondratska O., Grushka N., Pavlovych S., Yanchii R. Effect of PARP inhibition on HAS2, COX-2 and GREM1 gene expression in ovarian cumulus cells under experimental immune complex injury in mice // Proceedings of the 3rd International Conference “Smart Bio” (Kaunas, Lithuania, May 2–4, 2019). – P. 273.

13. Shepel E.A., Blashkiv T.V., Voznesenskaya T.Yu., Bryzgina T.M., Makogon N.V., Grushka N.G., Sukhina V.S., Yanchiy R.I. Possible markers for oocyte quality upon immune ovarian failure // Proceedings of the XIII International Medical Congress “Euromedica – Hannover” (Hannover, Germany, 2013 Jun 4–5). – P. 203–204.

14. Yanchiy R., Makogon N., Bryzgina T., Sukhina V., Voznesenskaya T., Shepel O., Lukjanchuk A., Blashkiv T., Pavlovich S., Martynova T., Grushka N., Kolesnikova O. Pharmacological inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase modulates cell death pathways in the mouse model of immune ovarian failure // Proceedings of the XXII International Symposium “Molecular and physiological aspects of regulatory processes of the organism” (Kraków, Poland, 2013). – P. 96.

15. Грушка Н.Г., Кондрацька О.А., Павлович С.І., Пількевич Н.О., Янчій Р.І. Вплив інгібування полі(АДФ-рибозо)полімерази на ушкодження ДНК та шляхи загибелі імуніцитів мишей за умов ендотоксемії, індукованої ліпополісахаридом // Матеріали XX з'їзду Українського фізіологічного товариства (Київ, 27–30 травня 2019 р.). – Фізіол. журн. – 2019. – Т. 65, № 3 (додаток). – С. 182.

16. Грушка Н.Г., Кондрацька О.А., Павлович С.І., Пількевич Н.О., Янчій Р.І. Дослідження про- та антиоксидантного стану печінки мишей за умов дії блокатора 4-гідроксиквіназоліну при ЛПС-індукованому запаленні //

Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю «Галицькі читання» (Івано-Франківськ, 2019). – С. 10–11.

17. Грушка Н.Г., Кондрацька О.А., Павлович С.І., Пількевич Н.О., Янчій Р.І. Вплив гліцирризинату амонію на індукований ліпополісахаридом генотоксичний стрес клітин лімфатичних вузлів мишей // Матеріали XII Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм. Галицькі читання II» (Тернопіль, 2020 р.). – С. 34.

18. Kondratska O.A., Grushka N.G. Changes in cumulus cell gene expression under the condition of experimental immune-mediated inflammation // Biological Markers in Fundamental and Clinical Medicine. – 2020. – Vol. 4, No. 1. – P. 11–12.

19. Kondratska O., Grushka N., Pavlovych S., Krasutska N., Yanchii R. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the pathogenesis of immune complex-induced ovarian injury in mice // Proceedings of the XXVIII Congress of the Polish Physiological Society (Gdańsk, Poland, September 15–17, 2021).

20. Грушка Н.Г., Кондрацька О.А., Павлович С.І., Янчій Р.І. Вплив інгібування полі(АДФ-рибозо)полімерази на цілісність ДНК ядер клітин тимуса і лімфатичних вузлів мишей за умов імунокомплексної патології // Матеріали XLII Наукових читань імені О.О. Богомольця (Київ, 24 травня 2021 р.). – С. 33.

21. Павлович С.І., Грушка Н.Г., Кондрацька О.А., Красуцька Н.О., Пількевич Н.О., Янчій Р.І. Протективний ефект гліцирризинату амонію на функціональну активність нейтрофілів за умов ендотоксемії, індукованої ліпополісахаридом // Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції «Актуальні питання патологічної фізіології» (Україна, 2021).- С. 91-92.

22. Грушка Н.Г., Кондрацька О.А., Павлович С.І., Янчій Р.І. Пригнічення амфотерину сприяє зменшенню оксидативного стресу в печінці мишей за умов

експериментальної ендотоксемії // Матеріали Пленуму Українського наукового товариства патофізіологів «Особливості науково-педагогічного процесу в період пандемії COVID-19» (Тернопіль, 2022 р.). – С. 27.

23. Мешко В.В., Кондрацька О.А., Грушка Н.Г. Вплив цитрату германію на життєздатність, загибель та інтегральну цілісність геному гранулярних клітин яєчників старих мишей // Матеріали IV науково-практичної конференції студентів та молодих учених з міжнародною участю (Харків, 19 травня 2022 р.). – С. 239.

24. Meshko V.V., Kondratska O.A., Grushka N.G., Pavlovych S.I., Yanchii R.I. Lipopolysaccharide-induced genotoxic stress in cells of the immune and reproductive systems in mice // Proceedings of the IV International Scientific Conference “Microbiology and Immunology – The Development Outlook in the 21st Century” (Kyiv, Ukraine, September 22–23, 2022). – P. 46.

25. Kondratska O.A., Grushka N.G., Pavlovych S.I., Sribna V.O., Yanchii R.I. PARP inhibition protects against ovarian injury in mice with an experimental model of immune complex disease // Proceedings of the All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with International Participation (June 15–17, 2022). – P. 106.

26. Pavlovych S.I., Grushka N.G., Kondratska O.A., Meshko V.V., Yanchii R.I. Analysis of morphological changes in the internal organs of mice during LPS-induced endotoxemia // Modern aspects of microbiology, virology, and biotechnology in wartime and post-war period: Proceedings of the International Scientific and Practical Conference (Kyiv, November 15–16, 2023). – P. 187.

27. Грушка Н.Г., Кондрацька О.А., Павлович С.І., Янчій Р.І. Вплив інгібіторів полі(АДФ-рибозо)полімерази на ступінь ушкодження ДНК та загибель імунокомпетентних клітин при експериментальному імунному гепатиті // Матеріали XIV науково-практичної конференції «Актуальні

питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (Тернопіль, 23–25 жовтня 2024 р.). – С. 22–23.

28. Грушка Н.Г., Павлович С.І., Кондрацька О.А., Андрійчук І.І., Янчій Р.І. Вплив блокаторів ПАРП-1 на інтенсивність функціонально-метаболічної активності клітин-ефекторів запалення за умов дії конканаваліну А // Матеріали міжнародної конференції з нейронаук та наукових читань, присвячених вісцеральній фізіології та патофізіології. – Фізіол. журн. – 2024. – Т. 70, № 5 (додаток). – С. 25–26.

29. Грушка Н.Г., Кондрацька О.А., Павлович С.І., Янчій Р.І. Кореляційний аналіз ушкодження ДНК та загибелі імунокомпетентних клітин в умовах експериментального запалення різного генезу // Матеріали ІХ міжнародної конференції «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (Київ, 21–24 жовтня 2025 р.). – С. 58.

30. Грушка Н.Г., Кондрацька О.А., Павлович С.І., Андрійчук І.І., Янчій Р.І. Вплив кверцетину на інтегральну цілісність ДНК клітин тимуса та лімфатичних вузлів за умов системної ендотоксемії // Матеріали науково-практичної конференції «XXIV Читання імені В.В. Підвисоцького», присвяченої 125-річчю Одеського національного медичного університету (Одеса, 15–16 травня 2025 р.). – С. 73–76.

ABSTRACT

Grushka N.G. Mechanisms of functioning of immunocompetent and ovarian cells under immune response activation. – Qualifying scientific work submitted as a manuscript.

Dissertation for the degree of Doctor of Biological Sciences in the specialty 03.00.13 “Human and Animal Physiology”. – O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2026.

The dissertation is devoted to the study of molecular and cellular mechanisms underlying impaired functioning of immunocompetent and ovarian cells under conditions of excessive immune response activation. Considering the increasing prevalence of immune-mediated and chronic inflammatory disorders in women of reproductive age, the relevance of this research is determined by the need for a deeper understanding of the physiological, cellular and molecular changes occurring during immune activation. Excessive immune activation is accompanied by overproduction of pro-inflammatory cytokines, generation of reactive oxygen and nitrogen species, dysregulation of transcription factors, and excessive activation of cellular DNA damage response mechanisms. These changes lead to the development of oxidative and genotoxic stress, DNA damage, and cell death. Cells of the thymus and lymph nodes, as well as granulosa cells and oocytes that determine the state of folliculogenesis and the ovarian reserve, are particularly sensitive to these processes. Since such damage represents a key factor contributing to decreased reproductive potential and decreased immune resistance, its investigation has important fundamental and applied significance.

A wide range of modern experimental and analytical methods was employed in this study, including the in vitro culture of oocytes, isolation of immunocompetent and granulosa cells, cytomorphological analysis, alkaline single-cell gel electrophoresis (DNA comet assay) to assess DNA integrity, vital fluorescent

staining of nucleic acids to evaluate cell viability, apoptosis and necrosis, immunocytochemical detection of poly(ADP-ribose) to assess PARP-1 activation, analysis of oxidative stress markers (malondialdehyde content), assessment of the oxygen-dependent component of neutrophil functional activity using the NBT test and the oxygen-independent component based on cationic protein content, as well as evaluation of biochemical indicators of liver injury (ALT activity), analysis of HAS2, COX2 and Grem1 gene expression using polymerase chain reaction, immunoblotting and immunocytochemistry to assess NF- κ B activation, as well as statistical methods for processing, interpretation, and validation of the obtained results.

The first section of the experimental part of the study is devoted to the evaluation of the adequacy of the experimental approaches used to model excessive immune response activation, involving the humoral, cellular, and innate components of immunity: a model of immune complex injury induced by BSA, a ConA-induced T-cell hepatitis model, and a model of systemic endotoxemia induced by LPS. This approach allowed a comprehensive assessment of DNA integrity, pathways of cell death, the intensity of oxidative stress, activation of key molecular mediators and signaling pathways, as well as the effect of systemic inflammation on ovarian cells in female mice. In the immune complex pathology model, immunofluorescence studies confirmed the deposition of immune complexes in the tissues of the liver, spleen, and aorta, indicating their accumulation within the vascular system. Histological analysis of these organs revealed damage to the vascular system and, to a lesser extent, to the parenchyma. Increased functional and metabolic activity of innate immune cells was observed under BSA exposure. It was shown that the generalized immune complex process leads to DNA damage and death of immunocompetent cells in both central and peripheral immune organs, as well as ovarian cells, accompanied by an increased percentage of cells with severe DNA fragmentation. Disturbances in meiotic maturation and dysregulation of the

expression of the HAS2, COX2, and Grem1 genes were also detected, reflecting impaired functional status of granulosa cells. In the ConA-induced hepatitis model, activation of T-cell-mediated injury mechanisms was confirmed, accompanied by increased cationic protein content, elevated NBT-test indices, increased MDA levels, and a higher percentage of cells with different degrees of DNA fragmentation. Histological examination revealed dystrophic changes in hepatocytes, structural alterations in the thymus and lymph nodes, and the formation of extensive necrotic foci. The obtained results indicate that both apoptotic and necrotic pathways of cell death are involved in this model, with necrosis tending to predominate and potentially being associated with activation of PARP-1 and NF- κ B.

In the LPS-induced endotoxemia model, marked activation and dysfunction of innate immune cells, enhanced generation of reactive oxygen species, and an increased proportion of cells undergoing necrotic death were observed. Significant DNA damage and the development of marked genotoxic stress were detected, accompanied by activation of necrotic cell death mechanisms and the release of DAMP molecules, particularly HMGB1 (amphoterin).

The second section of the experimental part of the study is devoted to the analysis of the role of PARP-1, a key enzyme of the cellular response to DNA damage, which, depending on the level of genotoxic stress, may either maintain genomic stability or promote necrotic cell death. It was shown that under conditions of immune complex injury, PARP-1 undergoes hyperactivation accompanied by the development of necrosis. In the studied models, the use of PARP-1 inhibitors (3-aminobenzamide and 4-hydroxyquinazoline) significantly reduced the degree of DNA fragmentation and decreased the percentage of cells undergoing necrotic death.

The obtained results indicate that pharmacological inhibition of PARP-1 exerts a pronounced cytoprotective effect in models of immune-mediated injury by preserving the viability of thymic and lymph node cells and limiting the

development of necrotic processes associated with excessive PARP-1 activation. In the ovary, PARP-1 activation was detected together with decreased viability of granulosa cells, increased apoptosis and necrosis, and dysregulation of the expression of genes involved in meiotic maturation, which was accompanied by a significant reduction in oocyte quality. Increased sensitivity of granulosa cells to systemic inflammation was also demonstrated, indicating an important role of oxidative stress in their damage.

The third section of the experimental part of the study is devoted to investigating the role of amphoterin (HMGB1). Its involvement as a DAMP molecule released from cells during necrosis and enhancing inflammation via TLR and RAGE receptors was demonstrated. Increased amphoterin levels were detected under endotoxemia and were shown to contribute to the development of genotoxic stress and disruption of DNA integrity in immunocompetent cells. The amphoterin inhibitor ammonium glycyrrhizinate reduced overall DNA damage and decreased the proportion of necrotic cells in the LPS-induced model, confirming the key role of amphoterin in maintaining the inflammatory response and genotoxic stress.

The fourth section of the experimental part of the study is devoted to the analysis of the role of NF- κ B in the development of immune-mediated injury. A significant role of NF- κ B in regulating the expression of pro-inflammatory mediator genes and maintaining the inflammatory response was confirmed. In the ConA-induced hepatitis model, pronounced translocation of NF- κ B to the nuclei of hepatocytes and immune cells was observed, indicating its involvement in T-cell-mediated injury. It was shown that the PARP-1 inhibitor 4-hydroxyquinazoline (4-HQ) significantly suppressed NF- κ B activation under conditions of the ConA-induced immune-mediated process. This was accompanied by decreased nuclear localization of p65 in liver cells and immunocompetent organs. Moreover, andrographolide and curcumin demonstrated pronounced anti-inflammatory effects

in the ConA-induced hepatitis model by reducing necrotic cell death. In addition, andrographolide also reduced NF- κ B activation.

The fifth section of the experimental part of the study is devoted to a comprehensive evaluation of a wide range of pharmacological agents capable of correcting pathological alterations, including quercetin, ethylmethylhydroxypyridine succinate (EMHPS), germanium citrate, and nanostructured silver particles. Quercetin reduced the degree of DNA damage in immunocompetent cells under LPS-induced injury, which is consistent with its antioxidant properties. Ethylmethylhydroxypyridine succinate improved the functional state of immune system cells under conditions of immune complex injury, decreased the intensity of oxidative stress, and maintained the viability of granulosa cells and the quality of oocytes. Germanium citrate and silver nanoparticles exhibited pronounced antioxidant and membrane-protective properties, reduced genotoxic stress, limited necrosis, and improved the structural and functional state of immune and ovarian cells. Thus, the use of antioxidants and nanomaterials contributed to the reduction of genotoxic stress, limitation of necrotic cell death, and improvement of the functional state of immune and ovarian cells.

In this dissertation, the roles of PARP-1, amphoterin, and NF- κ B in the mechanisms underlying the development of immune-mediated injury were comprehensively characterized for the first time. A relationship between the degree of DNA damage, the level of oxidative stress, and the type of cell death was established. It was demonstrated that excessive activation of PARP-1 is a key factor driving necrotic cell death, disruption of cellular homeostasis, and loss of functional activity. New aspects of the effects of systemic inflammation on folliculogenesis, granulosa cell viability, and oocyte quality were revealed. The feasibility of using PARP-1 inhibitors and modulators of amphoterin and NF- κ B, as well as antioxidants and nanostructured materials, for the pharmacological correction of immune-mediated injury was substantiated.

Based on the results of this study, a scientific concept has been formulated that substantiates the key role of disruption of DNA integrity, excessive PARP-1 activation, NF- κ B dysregulation, and amphotericin release in the development of immune-mediated injury. The concept establishes a relationship between genotoxic stress, the pattern of cell death, and the functional state of immune and ovarian cells, and proposes that targeted modulation of the PARP-1/amphotericin/NF- κ B signaling pathways using inhibitors, antioxidants, and nanostructured compounds represents an effective strategy for preserving genomic stability, limiting necrotic cell death, and maintaining reproductive function under conditions of excessive immune activation.

The dissertation proposes approaches to the pharmacological correction of cellular injury using synthetic PARP-1 inhibitors and natural biologically active compounds. Experimental results demonstrated that their application reduced DNA fragmentation, decreased oxidative stress, and that 4-HQ and andrographolide decreased NF- κ B activation. These pharmacological interventions were accompanied by a reduction in necrotic cell death and a relative increase in apoptotic cell death, which contributes to the attenuation of the inflammatory response and the maintenance of cellular functional activity.

For the first time, the feasibility of modulating the PARP-1/HMGB1 signaling pathway as a promising approach for the pharmacological correction of immune-mediated injury of the reproductive system has been substantiated. A concept is proposed for the use of the degree of DNA fragmentation, the level of PARP activation assessed by poly(ADP-ribose) content, and oxidative stress indicators as markers of cellular dysfunction providing a scientific basis for the development of new diagnostic approaches.

New insights into the mechanisms underlying reproductive dysfunction in immune-mediated disorders have been obtained, opening new prospects for the development of individualized preventive and therapeutic approaches. The obtained

data deepen the current understanding of the interaction between the immune and reproductive systems and highlight the need for a comprehensive approach to preserving women's health under conditions of excessive immune activation.

Genotoxic stress in immunocompetent cells and increased necrotic cell death may play a significant role in the development of immune-mediated diseases. Indicators of DNA damage in peripheral blood lymphocytes may be considered promising integral biomarkers for assessing the severity of immune-mediated diseases and the effectiveness of their treatment. The obtained results have high applied significance for clinical immunology and reproductive medicine. In addition, they have important fundamental significance for clinical physiology, reproductive biology, and immunology, as they open opportunities for the development of new strategies for prevention and treatment, the formation of therapeutic approaches aimed at preserving the ovarian reserve and oocyte quality, and the use of PARP-1 inhibitors, modulators of HMGB1 and NF- κ B, as well as antioxidant nanomaterials, to limit chronic inflammation.

Key words: immune-mediated injury, immunocompetent cells, ovarian cells, DNA integrity, PARP-1, amphoterin (HMGB1), NF- κ B, oxidative stress, genotoxic stress, cell death, meiotic maturation, antioxidants, nanomaterials.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	39
ВСТУП.....	41
РОЗДІЛ 1	60
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	60
1.1. Імунокомпетентні та оваріальні клітини: структура та функції	60
1.1.1 Основні популяції імунокомпетентних клітин та активація імунної відповіді	60
1.1.2. Основні типи клітин яєчника та їх роль у забезпеченні репродуктивної функції.....	67
1.1.3. Функціональна взаємодія клітин імунної та репродуктивної систем за фізіологічних умов	73
1.2. Порухення функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов надмірної імунної активації	77
1.2.1. Інтегральна цілісність ДНК у нормі та при дії ушкоджуючих факторів.....	77
1.2.2. Типи ушкоджень ДНК: одноланцюгові, дволанцюгові розриви і механізми репарації	80
1.2.3. Механізми ушкодження ДНК за умов оксидативного та генотоксичного стресу	83
1.2.4. Типи клітинної загибелі імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов надмірної імунної активації.....	87
1.3. Молекулярні механізми імуноопосередкованого ушкодження клітин. 93	
1.3.1. Молекулярні механізми ушкодження імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов імунної активації	93
1.3.2. Полі(АДФ-рибозо)полімераза-1: роль у відповіді на ушкодження ДНК та регуляції імунної активації	95

1.3.3. HMGB1 як медіатор запальної відповіді при некротичній загибелі клітин.....	98
1.3.4. NF-κB: роль у регуляції імунної відповіді та клітинної активації.	102
1.3.5. TNF-α, IL-6 та IFN-γ як ключові медіатори імунної активації та клітинного ушкодження.....	106
1.4. Експериментальні моделі імуноопосередкованого ушкодження	108
1.4.1. Імунокомплексні механізми ушкодження за умов імунної відповіді на білкові антигени	108
1.4.2. Т-клітинно-опосередковані механізми імунного ушкодження печінки	112
1.4.3. Механізми активації вродженого імунітету, індуковані ліпополісахаридом	115
1.5. Фармакологічні модулятори функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов надмірної імунної активації	118
1.5.1. Інгібітори PARP-1: механізми дії та перспективи застосування ..	118
1.5.2. Роль інгібування HMGB1 за умов імуноопосередкованого ушкодження.....	122
1.5.3. Механізми дії та протективні ефекти інгібіторів NF-κB за умов імуноопосередкованого ушкодження	124
1.5.4. Антиоксидантні та наноструктуровані сполуки у регуляції функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин	126
РОЗДІЛ 2	133
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	133
2.1. Загальна характеристика об'єкта дослідження.....	133
2.2. Експериментальні моделі імуноопосередкованого ушкодження	133
2.2.1. Модель імунокомплексного ушкодження, індукованого бичачим сироватковим альбуміном (БСА)	134

2.2.2. Модель Т-клітинного ушкодження печінки, індукованого конканаваліном А (Кон А)	135
2.2.3. Модель системної ендотоксемії, індукованої ліпополісахаридом (ЛПС).....	135
2.2.4. Модель оксидативного стресу <i>in vitro</i> , індукованого перекисом водню (H ₂ O ₂) та гіпохлоритом (OCl ⁻)	135
2.3. Клітинні культури та гістологічні дослідження	136
2.3.1. Виділення клітин природного та адаптивного імунітету	136
2.3.2. Виділення гранулярних клітин яєчників	137
2.3.3. Культивування ооцитів <i>in vitro</i>	138
2.3.4. Гістологічні та цитологічні дослідження	140
2.4. Методи визначення маркерів запального процесу, активації клітин вродженого імунітету та оксидативного стресу	141
2.5. Оцінка функціонального стану імуніцитів методом реакції гальмування адгезії лімфоцитів (РГАЛ)	146
2.6. Імунофлуоресцентне виявлення фіксації імуноглобулінів у тканинах	147
2.7. Імуноцитохімічне виявлення полі(АДФ-рибози) (ПАР)	147
2.8. Імуноцитохімічне визначення експресії Fas-рецептора (CD95) в імунокомпетентних клітинах	149
2.9. Оцінка ушкодження та життєздатності клітин	149
2.9.1. Тест з трипановим синім для оцінки життєздатності клітин	149
2.9.2. Метод ДНК-комет (лужний варіант)	150
2.9.3. Метод прижиттєвого подвійного флуоресцентного забарвлення клітин барвниками нуклеїнових кислот	154
2.10. Визначення рівня експресії мРНК генів HAS2, COX2 та GREM1 у кумулюсних клітинах методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) ..	156
2.11. Дослідження активації NF-κB методом імуноблотингу	159
2.12. Оцінка транслокації NF-κB в ядра клітин методом імуноцитохімії..	161

2.13. Використані речовини	162
2.14. Загальна схема експерименту	167
2.15. Методи статистичної обробки результатів дослідження.....	170
РОЗДІЛ 3	172
ВІДТВОРЕННЯ МОДЕЛЕЙ ІМУНООПОСЕРЕДКОВАНОГО УШКОДЖЕННЯ	172
3.1. Розробка та характеристика моделі імунокомплексного ушкодження у мишей, індукованого БСА	172
3.1.1. Оцінка утворення та фіксації імунних комплексів і гістоструктурні зміни тканин	172
3.1.2. Функціональна активність клітин вродженого імунітету та інтенсивність перекисного окиснення ліпідів	175
3.1.3. Оцінка інтегральної цілісності геному імунокомпетентних клітин	178
3.1.4. Дослідження шляхів загибелі клітин імунокомпетентних органів	181
3.1.5. Вплив БСА-індукованого ушкодження на функціональний стан оваріальних клітин.....	183
3.1.6. Генотоксичний стрес в оваріальних клітинах за умов БСА- індукованого ушкодження	187
3.1.7. Визначення шляхів загибелі оваріальних клітин за умов імунокомплексного ушкодження, індукованого БСА	188
3.2. Відтворення моделі Т-клітинного ушкодження печінки у мишей	190
3.2.1. Показники ушкодження печінки, активації клітин вродженого імунітету та оксидативного стресу за умов КонА-індукованого гепатиту	190
3.2.2. Оцінка інтегральної цілісності геному імунокомпетентних клітин за умов введення Кон А	193

3.2.3. Оцінка життєздатності та шляхів загибелі імунокомпетентних клітин при введенні КонА.....	196
3.2.4. Гістоструктурні зміни печінки при КонА-індукованому ушкодженні	198
3.3. Відтворення моделі ендотоксемії, індукованої ліпополісахаридом....	204
3.3.1. Активація клітин вродженого імунітету та інтенсивність перекисного окиснення ліпідів за умов дії ЛПС	204
3.3.2. Оцінка інтегральної цілісності геному імунокомпетентних клітин за умов дії ЛПС.....	207
3.3.3. Оцінка життєздатності та шляхів загибелі імунокомпетентних клітин за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії.....	210
3.3.4. Гістоструктурні зміни органів імунної системи та печінки за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії.....	212
РОЗДІЛ 4	218
РОЛЬ ПОЛІ(АДФ-РИБОЗО)ПОЛІМЕРАЗИ-1 (ПАРП-1) У РОЗВИТКУ ІМУНООПОСЕРЕДКОВАНОГО УШКОДЖЕННЯ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ПОРУШЕНЬ ІМУННОЇ ТА РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМ САМИЦЬ МИШЕЙ	218
4.1. Дослідження ролі ПАРП-1 в ушкодженні ДНК та загибелі лімфоцитів за умов оксидативного стресу in vitro.....	218
4.1.1. Оцінка інтегральної цілісності геному клітин	218
4.1.2. Життєздатність клітин і шляхи їх загибелі	223
4.2. Дослідження ролі ПАРП-1 в розвитку імуноопосередкованого ушкодження (моделі БСА, КонА, ЛПС).....	225
4.2.1. Оцінка дозозалежних ефектів інгібітора ПАРП-1 4-ГК у моделі КонА-індукованого гепатиту.....	226
4.2.2. Вплив інгібування ПАРП-1 на інтегральну цілісність геному імунокомпетентних клітин.....	233

4.2.3. Вплив інгібування ПАРП-1 на життєздатність і шляхи загибелі імунокомпетентних клітин.....	239
4.2.4. Вплив інгібування ПАРП-1 на активацію клітин природного імунітету	244
4.2.5. Вплив інгібування ПАРП-1 на інтенсивність перекисного окиснення ліпідів	248
4.2.6. Вплив інгібітора полі(АДФ-рибозо)полімерази-1 4-ГК на утворення та відкладання імунних комплексів у тканинах	249
4.2.7. Дослідження активації полі(АДФ-рибозо)полімерази-1 при ушкодженні імунокомплексного генезу	251
4.3. Молекулярно-генетичні механізми дисфункції репродуктивної системи самиць мишей у моделі БСА-індукованого імунокомплексного ушкодження	255
4.3.1. Імуноцитохімічне дослідження активності ПАРП-1 в клітинах яєчника	255
4.3.2. Вплив інгібування ПАРП-1 на інтегральну цілісність геному клітин фолікулярного оточення, їх життєздатність та шляхи загибелі.....	256
4.3.3. Вплив інгібування ПАРП-1 на мейотичне дозрівання ооцитів та експресію генів маркерів мейотичного дозрівання (HAS2, COX2, GREM1)	260
РОЗДІЛ 5	264
ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ АЛАРМІНУ HMGB1 У РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ІМУНООПОСЕРЕДКОВАНИХ РОЗЛАДІВ ІМУННОЇ СИСТЕМИ.....	264
5.1. Дослідження впливу гліциризинату амонію як інгібітора HMGB1 на інтегральну цілісність геному імунокомпетентних клітин	264
5.2. Дослідження впливу гліциризинату амонію як інгібітора HMGB1 на життєздатність та шляхи загибелі імунокомпетентних клітин	268

РОЗДІЛ 6	270
ВИВЧЕННЯ NF-κB-ОПОСЕРЕДКОВАНИХ МЕХАНІЗМІВ УШКОДЖЕННЯ ПЕЧІНКИ Т-КЛІТИННОГО ГЕНЕЗУ В МОДЕЛІ КОНА-ІНДУКОВАНОГО ГЕПАТИТУ	270
6.1. Оцінка активації NF-κB у клітинах печінки та імунокомпетентних органів при КонА-індукованому гепатиті за даними імуноблотингу та імуноцитохімічних досліджень	270
6.2. Дослідження NF-κB-опосередкованих механізмів участі ПАРП-1 в патогенезі КонА-індукованого гепатиту	274
6.3. Вплив куркуміну на життєздатність та шляхи загибелі імунокомпетентних клітин за умов КонА-індукованого гепатиту	278
6.4. Активація NF-κB у печінці мишей за умов КонА-індукованого гепатиту при застосуванні андрографоліду	280
6.5. Життєздатність та шляхи загибелі імунокомпетентних клітин за умов дії андрографоліду в моделі КонА-індукованого імунного гепатиту	282
РОЗДІЛ 7	287
ВПЛИВ ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ - АНТИОКСИДАНТНИХ РЕЧОВИН ТА НАНОСТРУКТУРОВАНИХ СПОЛУК МЕТАЛІВ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН ТА ОВАРІАЛЬНИХ КЛІТИН ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ІМУНООПОСЕРЕДКОВАНОГО УШКОДЖЕННЯ	287
7.1. Вплив кверцетину на інтегральну цілісність геному, життєздатність та шляхи клітинної загибелі імунокомпетентних клітин за умов ЛПС-індукованого ушкодження	288
7.2. Протективний вплив етилметилгідроксипіридину сукцинату на інтегральну цілісність ДНК та функціональний стан клітин імунної й репродуктивної систем за умов імунокомплексного ушкодження	292

7.2.1. Інтегральна цілісність геному, життєздатність та шляхи загибелі імункомпетентних клітин при застосуванні ГС за умов імункомплексного ушкодження	293
7.2.2. Інтегральна цілісність геному кумулюючих клітин, їх життєздатність та шляхи загибелі при застосуванні ГС за умов імункомплексного ушкодження.....	295
7.2.3. Вплив ГС на мейотичне дозрівання ооцитів та експресію генів у кумулюючих клітинах за умов імункомплексного ушкодження.....	298
7.3. Вплив цитрату германію на розвиток генотоксичного стресу, життєздатність та шляхи загибелі імункомпетентних клітин за умов ендотоксемії.....	300
7.4. Вплив наночастинок срібла на інтегральну цілісність ДНК та функціональний стан клітин імунної й репродуктивної систем за умов імункомплексного ушкодження	304
7.4.1. Ступінь ушкодження ДНК, життєздатність та шляхи загибелі імункомпетентних клітин за умов дії НЧС при імункомплексному ушкодженні.....	304
7.4.2. Життєздатність та шляхи загибелі кумулюючих клітин за умов дії НЧС при імункомплексному ушкодженні	310
7.4.3. Вплив НЧС на мейотичне дозрівання ооцитів та експресію генів у кумулюючих клітинах мишей	312
РОЗДІЛ 8	316
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	316
ЗАКЛЮЧЕННЯ	358
ВИСНОВКИ.....	361
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	367

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

3-АБА – 3-амінобензамід
4-ГК – 4-гідроксиквіназолін
АЛТ – аланінамінотрансфераза
АНД – андрографолід
АСТ – аспартатамінотрансфераза
АТФ – аденозинтрифосфат
АФК – активні форми кисню
БСА – бичачий сироватковий альбумін
ГА – гліциризинат амонію
ГС – етилметилгідроксипіридину сукцинат
ДК – дендритні клітини
ДР – дволанцюгові розриви ДНК
ЗП – зародковий пухирець
ІДК – індекс ДНК-комет
ІКК – імунокомпетентні клітини
ІК – імунні комплекси
ІЛ – інтерлейкін
ІФН – інтерферон
ІФН- γ – інтерферон гамма
КК – кумулюсні клітини
КОК – кумулюсно-ооцитарний комплекс
КонаА – конканавалін А
ЛПС – ліпополісахарид
МДА – малоновий діальдегід
МПО – мієлопероксидаза
НК – натуральні кілери

НКТ- природні кілерні Т-лімфоцити
НЧС – наночастинки срібла
ОР – одноланцюгові розриви ДНК
ПАРП-1 – полі(АДФ-рибозо)полімераза-1
ПАР – полі(АДФ-рибоза)
ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів
СЦК – середній цитохімічний коефіцієнт
СОД – супероксиддисмутаза
ЦГ – цитрат германію
ФНП- α – фактор некрозу пухлин альфа
цГМФ – циклічний гуанозинмонофосфат
АР-1 – активаторний протеїн-1 (Activator Protein-1)
DAMP – молекулярні патерни, асоційовані з ушкодженням (damage-associated molecular patterns)
iNOS – індуцибельна NO-синтаза
HMGB1 – білок високомобільної групи В1 (High Mobility Group Box 1), амфотерин
NF- κ B – ядерний фактор κ B (nuclear factor kappa B)
PI3K – фосфатидилінозитол-3-кіназа
Th1 – Т-хелпери 1 типу
TLR – Toll-подібні рецептори
RAGE – рецептор кінцевих продуктів посиленого глікування (receptor for advanced glycation end products)

ВСТУП

Імунна система відіграє ключову роль у регуляції клітинного гомеостазу та контролі запальних процесів. За фізіологічних умов імунна відповідь є тонко регульованим процесом, який забезпечує стабільність клітинного середовища, сприяє елімінації ушкоджених клітин та запобігає аутоагресії шляхом підтримання імунної толерантності та контрольованого апоптозу. Проте під дією ендогенних та екзогенних чинників, зокрема хронічного стресу, токсичних агентів, порушень мікробіоти або генетичної схильності, відбувається надмірна активація імунної системи, що лежить в основі розвитку імунозапальних та імуноопосередкованих захворювань (McInnes & Gravallese, 2021; Monteleone et al., 2023; Sadeghpour, 2024; Balcerowska & Kwaśnik, 2025; Kumar et al., 2025). До клітин, залучених до імуноопосередкованого ушкодження, належать імунокомпетентні клітини, зокрема Т-лімфоцити, макрофаги та дендритні клітини (Liu et al., 2021; Monteleone et al., 2023). Крім того, наявні дані про залучення клітин репродуктивної системи, таких як гранульозні клітин, клітин теки та ооцитів, до імуноопосередкованих патологічних процесів (Bazzano et al., 2024; Cacciottola et al., 2025). Порушення імунного гомеостазу в оваріальному мікрооточенні асоціюється зі змінами функціонального стану та життєздатності цих клітин.

Надмірна активація клітин вродженого імунітету супроводжується вивільненням прозапальних цитокінів, активацією каспаз, продукцією вільних радикалів та активацією комплементу, що сприяє розвитку оксидативного і генотоксичного стресу, ушкодженню ДНК, порушенню функцій клітин та активації процесів клітинної загибелі. Ці зміни призводять до порушення рівноваги між проліферацією та загибеллю клітин, сприяють системному запаленню, яке є основою патогенезу імуноопосередкованих захворювань. За даними літератури, ці захворювання вражають від 5 до 10% населення,

причому переважна більшість випадків (приблизно 75%) припадає на жінок репродуктивного віку. Останніми роками спостерігається чітка тенденція до зростання їхньої поширеності (Fairweather et al., 2008; Miller, 2023; Monteleone et al., 2023; Liang et al., 2025). Особливо критичним є вплив імунітопосередкованих механізмів на оваріальні клітини, де підвищення рівнів прозапальних цитокінів (IL-6, TNF- α), розвиток оксидативного та генотоксичного стресу призводять до дисфункції гранульозних клітин, зниження оваріального резерву, порушення стероїдогенезу, погіршення якості ооцитів і підвищення ризику розвитку безпліддя (Liu et al., 2023; Orisaka et al., 2023; Bazzano et al., 2024). За фізіологічних умов імунітокомпетентні клітини, зокрема макрофаги, Т-лімфоцити та дендритні клітини, залучені до регуляції фолікулогенезу та формування оваріального мікрооточення і забезпечують локальну продукцію цитокінів і факторів росту, модифікуючи мікросередовище фолікула, що, у свою чергу, впливає на процеси проліферації, апоптозу й ангіогенезу (Bazzano et al., 2024; Banerjee et al., 2025). З віком, особливо на тлі імунітозапальних розладів і хронічного стресу, спостерігається патологічна інфільтрація тканини яєчника імунними клітинами, активація запальних сигнальних шляхів, зокрема NLRP3-інфламасоми, а також зростання рівня оксидативного стресу, що веде до фолікулярного виснаження (Orisaka et al., 2023; Liu et al., 2023). Зниження оваріального резерву є незворотним, оскільки популяція ооцитів формується ще в ембріональному періоді та не відновлюється протягом життя. Після народження кількість фолікулів зменшується з приблизно 1–2 млн до близько 400 тис. до початку менархе. У подальшому оваріальний резерв продовжує знижуватися і становить близько 12% до 30 років та приблизно 3 % до 40 років (Wallace & Kelsey, 2010).

Ще одним впливовим чинником зниження оваріального резерву є хронічний стрес, який може відігравати ключову роль у формуванні системної

імунної активації. За цих умов відбувається тривале підвищення рівнів прозапальних цитокінів, зокрема інтерлейкіну-6 і ФНП- α , та активація механізмів вродженого імунітету, у тому числі NLRP3-інфламасоми, залучених до розвитку запальних змін у яєчнику. Активація цих запальних механізмів сприяє тривалій продукції прозапальних медіаторів, розвитку хронічного запалення та оксидативного стресу й дисфункції гранульозних та інших оваріальних клітин, що зумовлює передчасне виснаження оваріального резерву і прогресування репродуктивної дисфункції у жінок з імуноопосередкованими порушеннями (Orisaka et al., 2023; Liu et al., 2023). Таким чином, хронічне запалення, оксидативний і генотоксичний стрес сприяють незворотній втраті оваріального резерву і стійкому зниженню фертильності жінок, особливо за умов імуноопосередкованих ушкоджень.

За таких умов важливим є визначення ступеня ушкодження ДНК як в імунокомпетентних клітинах, так і в оваріальних клітинах, оскільки даний показник є інформативним маркером генотоксичного стресу, інтенсивності апоптотичних і некротичних процесів, а також відображає функціональну спроможність клітинних систем репарації ДНК (Collins, 2004; Gunasekarana et al., 2015; Liu et al., 2023). Збереження інтегральної цілісності геному є критичним для підтримання життєздатності клітин і нормального функціонування організму. Функціональна активність імунокомпетентних клітин має важливе значення не лише для підтримання імунного гомеостазу, а й для регуляції репродуктивних процесів, зокрема через їх взаємодію з клітинами яєчника та формування відповідного тканинного мікрооточення. Порушення цілісності ДНК та надмірна клітинна загибель у даних клітинних системах можуть призводити до зниження репродуктивного потенціалу, посилення запальних процесів і передчасного клітинного старіння та сприяти прогресуванню імунозапальних порушень, що в комплексі негативно відбивається на соматичному здоров'ї (Panier et al., 2024; Isola et al., 2024;

Cacciottola et al., 2025). Це підкреслює актуальність подальшого вивчення молекулярних механізмів дисфункції імункомпетентних і оваріальних клітин та необхідність розробки ефективних фармакологічних стратегій їх корекції, зокрема із застосуванням антиоксидантних та протизапальних засобів.

Одним із перспективних напрямів фармакологічної корекції імунопосередкованих ушкоджень є застосування інгібіторів ядерного ферменту полі(АДФ-рибозо)полімерази-1 (ПАРП-1), який відіграє ключову роль у регуляції клітинної відповіді на ушкодження ДНК та клітинної загибелі. Останніми роками активно вивчається терапевтичний потенціал інгібіторів ПАРП-1, здатних обмежувати клітинне ушкодження та загибель клітин, а також позитивно впливати на збереження клітинного гомеостазу (Martin-Guerrero, 2017; Макогон та Алексєєва, 2012). ПАРП-1 бере участь у синтезі полі(АДФ-рибозних) ланцюгів та регулює функціонування білків репарації ДНК, гістонів, транскрипційних факторів, забезпечуючи підтримання геномної стабільності та епігенетичну регуляцію (Макогон та Алексєєва, 2012; Veith & Mangerich, 2015). Водночас, за масивного генотоксичного стресу, надмірна активація ПАРП-1 набуває патологічного значення. Посилене утворення розривів ДНК призводить до гіперактивації ПАРП-1, що супроводжується виснаженням внутрішньоклітинних запасів NAD^+ та АТФ і може призводити до загибелі клітин. Некротична загибель супроводжується виходом DAMP-молекул, які сприяють підтриманню запальної відповіді (Rock et al., 2010; Martin-Guerrero et al., 2017). Такий процес сприяє формуванню «замкненого кола» імунозапального ушкодження з подальшим наростанням окислювального стресу та клітинної дисфункції. Попри активні дослідження ПАРП-1 з огляду різних захворювань, його роль у патогенезі ушкоджень органів жіночої репродуктивної системи залишається мало дослідженою. Наявні лише поодинокі та переважно опосередковані дослідження активації ПАРП-1 в клітинах яєчника та імункомпетентних органів як в

експериментальних моделях, так і у жінок із розладами репродуктивної функції (Ahmed et al., 2024). Достеменно також не вивчений ефект даного ферменту на збереження цілісності ДНК клітин тимусу, лімфатичних вузлів та оваріальних клітин за умов імуноопосередкованих запальних процесів, що обмежує з'ясування потенційних терапевтичних підходів у даному напрямі. Крім того, особливу увагу привертає подвійна роль ПАРП-1: з одного боку, він підтримує геномну стабільність за умов помірного ушкодження ДНК, а з іншого - є ключовим медіатором некрозу при посиленому ушкодженні. Дані експериментальних досліджень свідчать, що інгібування ПАРП-1 може зменшувати некротичну загибель клітин та модулювати клітинні шляхи загибелі в умовах оксидативного стресу, а також знижувати активність NF-κB-опосередкованої транскрипції прозапальних генів, що корелює з обмеженням імунозапальних реакцій (Erener et al., 2012; Hareendran et al., 2016; Nehme et al., 2024). Це відкриває перспективи для подальшого вивчення інгібіторів ПАРП-1 як можливих засобів корекції запальних та репродуктивних порушень з метою збереження цілісності ДНК, функціональної активності імунних і оваріальних клітин та підтримання репродуктивного потенціалу жіночого організму.

Важливим молекулярним механізмом імуноопосередкованого ушкодження є функціональний взаємозв'язок ПАРП-1 із двома ключовими ланками активації імунної відповіді, зокрема з активацією NF-κB та вивільненням HMGB1 (High Mobility Group Box 1, амфотерину) із ядра до позаклітинного простору. NF-κB регулює прозапальну відповідь та є центральним регулятором у розвитку хронічних і аутоімунних захворювань, включаючи Т-клітинний гепатит (Zhang et al., 2021). HMGB1 за фізіологічних умов приймає участь у підтриманні структурної стабільності ДНК та регуляції транскрипції, однак під час некротичної загибелі або клітинного стресу активно вивільняється у позаклітинний простір, виконуючи роль потужного

прозапального сигналу (Yang et al., 2014). Вивільнений HMGB1 активує Toll-подібні рецептори (TLR) та рецептор кінцевих продуктів глікації (RAGE), що призводить до посилення секреції прозапальних цитокінів, стимулює міграцію імунних клітин та підтримує розвиток хронічного запалення. У механізмах розвитку імуноопосередкованих захворювань ПАРП-1 та HMGB1 діють у тісному взаємозв'язку: підвищена активність ПАРП-1 сприяє накопиченню HMGB1 у позаклітинному просторі, що посилює активацію макрофагів, стимулює проліферацію Т-клітин і посилює аутоімунні реакції (Qin et al., 2023). Порушення регуляції сигнального шляху ПАРП-1/HMGB1 є ключовим механізмом хронічного запалення, встановленим при ревматоїдному артриті, системному червоному вовчаку, хронічних запальних захворюваннях кишечника та інших патологіях (Vitali et al., 2023; Yang et al., 2014). Взаємодія між цими молекулами підсилює запальні реакції та модулює шляхи клітинної загибелі, зокрема некротичні механізми. Важливим терапевтичним підходом є те, що фармакологічне інгібування ПАРП-1 або генетичне блокування цього ферменту супроводжується зменшенням експресії NF-κB-залежних генів прозапальних медіаторів (IL-1, IL-6, TNF-α, IFN-γ), зниженням продукції хемокінів, молекул адгезії, а також індукцибельних ферментів iNOS і COX-2, що зумовлює обмеження імунозапальних реакцій (Hareendran et al., 2016; Hu et al., 2025). Інгібітори ПАРП проявляють протективний ефект на моделях серцево-судинних, запальних та аутоімунних захворювань. Разом із тим, їхній потенціал у захисті соматичних і оваріальних клітин, запобіганні генотоксичному стресу і підтриманні репродуктивного здоров'я залишається практично невивченим щодо імуноопосередкованих ушкоджень, що обґрунтовує необхідність подальших досліджень у цьому напрямку.

Враховуючи фізіологічну роль ПАРП-1 у підтриманні геномної стабільності, досягнення контрольованого або часткового інгібування активності цього ферменту розглядається як більш безпечний і ефективний

терапевтичний підхід для корекції запальних процесів (Kirkland, 2010). ПАРП-інгібуючі властивості мають не лише синтетичні препарати, а й сполуки ендогенного та природного походження. До них відносять різноманітні біологічно активні молекули, такі як флавоноїди, активні метаболіти вітаміну Д, кофеїнові похідні, поліфенольні компоненти червоного вина, тиреоїдні гормони, поліаміни та пуринові сполуки (Kirkland, 2010; Banasik et al., 2012; Arunray et al., 2023). Особливу увагу привертають антиоксиданти, оскільки ці сполуки здатні нейтралізувати оксидативний і нітрозативний стрес, знижувати рівень генотоксичного ушкодження ДНК, підтримувати клітинну життєздатність та зменшувати активацію ПАРП-1. Ці сполуки активно застосовуються не лише як лікарські засоби, а й як дієтичні добавки з профілактичною метою для зниження ризику розвитку хронічних, запальних і дегенеративних захворювань, а також для підтримання клітинного гомеостазу та збереження функціональної активності тканин (Banasik et al., 2012; Maluchenko et al., 2021; Chandimali & Bak, 2025). На теперішній час нанотехнології широко застосовуються у науково-практичній діяльності людини і набувають все більшого застосування в лікуванні та діагностиці захворювань різної етіології. Біоміметичні наноматеріали, завдяки ферментоподібним властивостям, здатні каталітично нейтралізувати активні форми кисню та азоту, захищаючи клітини від окислювального ушкодження ДНК. Особливо перспективними є наночастинки оксидів церію, фулеренів, заліза та золота, що імітують активність ферментів супероксиддисмутази (СОД), каталази та пероксидази (Casals et al., 2020; Liu et al., 2023; Huang et al., 2019). Завдяки високій біосумісності, низькій токсичності та здатності до регенерації антиоксидантної активності, ці наноматеріали розглядаються як перспективні нанобіоматеріали для лікування патологій, пов'язаних з хронічним оксидативним стресом і запаленням (Saifi et al., 2021; Liu et al., 2023). Експериментальні дослідження підтверджують їхні цитопротективні,

протизапальні, нейропротективні та радіопротективні властивості, які пов'язані зі зниженням ушкоджень ДНК, попередженням клітинної загибелі та збереженням клітинного гомеостазу (Tavoosi et al., 2020). Отже, використання натуральних модуляторів активності ПАРП-1 та антиоксидантних наноматеріалів може становити перспективний і безпечний напрям у довготривалій корекції хронічних запальних станів і збереженні клітинної життєздатності.

Таким чином, актуальність дослідження визначається необхідністю поглибленого вивчення молекулярних механізмів порушення функціонування імунокомпетентних і оваріальних клітин за умов надмірної активації імунної відповіді, а також розробки ефективних підходів до їх захисту та корекції. Дослідження порушень інтегральної цілісності ДНК, розвитку генотоксичного стресу та механізмів некротичної загибелі клітин імунної та репродуктивної систем в умовах системного (ендотоксемія, гіперімунокомплексемія) та органоспецифічного імуноопосередкованого ушкодження печінки (КонА-індукований гепатит) є надзвичайно актуальним. Це обумовлено тим, що клітинна загибель, залежно від домінуючого механізму її реалізації, може як обмежувати імунну відповідь і запалення, так і сприяти посиленню імунозапальних процесів, їх хронізації та прогресуванню ушкоджень. Особливе значення має з'ясування ролі ключових сигнальних шляхів за участю ПАРП-1 у регуляції запальних та імуноопосередкованих процесів, що відкриває нові можливості для визначення терапевтичних мішеней, спільних для механізмів ушкодження імунокомпетентних та оваріальних клітин. Модуляція цих шляхів, зокрема за допомогою інгібіторів ПАРП-1, модуляторів NF- κ B, HMGB1, а також антиоксидантів та наноматеріалів з ферментоподібною активністю, розглядається як перспективна стратегія для збереження інтегральної цілісності ДНК та життєздатності клітин за умов імуноопосередкованого ушкодження. Отримані результати створюють

передумови для формування науково обґрунтованих підходів до профілактики та корекції репродуктивних порушень, асоційованих з імуноопосередкованими процесами, шляхом збереження оваріального резерву та підтримання цілісності ДНК. У сукупності ці результати формують наукову основу для розробки нових стратегій регуляції імуноопосередкованих процесів, що є критично важливим для збереження репродуктивного здоров'я жіночого організму в умовах зростання поширеності частоти хронічних запальних та імуноопосередкованих захворювань. Запропоновані підходи мають потенціал для клінічного впровадження з метою покращення профілактики та лікування як імунозапальних, так і репродуктивних розладів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Роботу виконано в межах НДР відділу імунофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України:

1. «Вивчення механізмів імуноіндукованих запальних процесів в печінці і органах жіночої репродуктивної системи та шляхів їх корекції» (державний реєстраційний номер теми 0108U003914);
2. «Дослідження молекулярно-генетичних та імунопатологічних механізмів функціональних порушень жіночої репродуктивної системи та можливості їх корекції» (державний реєстраційний номер теми 0112U008233);
3. «Дослідження клітинно-молекулярних механізмів імуноіндукованих розладів жіночої репродуктивної системи та коригуючого впливу наночастинок металів» (державний реєстраційний номер теми роботи 0116U004471);

4. «Роль аларміну амфотерину, сиртуїнів та наночастинок металів за умов імуноіндукованих розладів жіночої репродуктивної системи» (державний реєстраційний номер роботи 0119U103964);
5. «Механізми та шляхи корекції регульованої загибелі клітин імунної (тимуса і лімфатичних вузлів) та репродуктивної (яєчників і сім'яників) систем» (державний реєстраційний номер роботи 0124U001370).

Мета роботи. Метою роботи було дослідження механізмів порушення функціонування імунокомпетентних та оваріальних клітин при надмірній активації імунної відповіді та визначення ефективних засобів їх корекції.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити наступні завдання.

Завдання дослідження:

1. Відтворити експериментальні моделі імуноопосередкованого ушкодження у мишей із залученням вродженої, клітинної та гуморальної ланок імунної відповіді для комплексного аналізу механізмів його розвитку, включаючи порушення інтегральної цілісності ДНК, функціональної активності клітин імунної та репродуктивної систем, а також морфологічні зміни імунокомпетентних органів.
2. З'ясувати вплив фармакологічного інгібування полі(АДФ-рибозо)полімерази-1 на ступінь ушкодження ДНК, життєздатність імунокомпетентних клітин та клітин кумулюсного оточення ооцитів, а також охарактеризувати гістоструктурні зміни тканини печінки за умов імуноопосередкованого ушкодження при застосуванні інгібіторів ПАРП-1.
3. За умов оксидативного стресу *in vitro* дослідити вплив інгібіторів ферменту ПАРП-1 на ступінь ушкодження ДНК, а також на рівень некротичної та апоптотичної загибелі імунокомпетентних клітин.

4. Дослідити функціонально-метаболічний стан клітин вродженого імунітету та рівень малонового діальдегіду (МДА) як показника оксидативного стресу за умов імуноопосередкованого ушкодження та за дії інгібітора ПАРП-1.
5. З'ясувати участь амфотерину (HMGB1) як маркера некротичної загибелі клітин у розвитку генотоксичного стресу та порушенні цілісності ДНК клітин імунної системи.
6. Дослідити активацію ядерного транскрипційного фактора NF-κB за умов імуноопосередкованого ушкодження.
7. Вивчити вплив речовин з антиоксидантними властивостями та наноструктурованих сполук на функціональний стан імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов імуноопосередкованого ушкодження.

Об'єкт дослідження - функціональний стан клітин імунної та репродуктивної систем мишей, зокрема порушення інтегральної цілісності ДНК та життєздатності клітин при надмірній активації імунної відповіді, спричиненої експериментальними впливами, а також можливості корекції виявлених порушень.

Предмет дослідження - клітинно-молекулярні механізми порушення функціонування імунокомпетентних та оваріальних клітин при експериментальній активації імунної відповіді різного генезу, що включають розвиток генотоксичного стресу, порушення інтегральної цілісності ДНК та активацію шляхів клітинної загибелі (апоптозу та некрозу), а також можливості фармакологічної корекції цих порушень із використанням інгібіторів ПАРП-1, модуляторів NF-κB- та HMGB1-залежних сигнальних шляхів, антиоксидантів і наноструктурованих матеріалів.

Методи дослідження: методи виділення та культивування імунокомпетентних та оваріальних клітин; методи культивування *in vitro*;

цитологічні та гістологічні методи; біохімічні методи для оцінки функціонального стану печінки та інтенсивності запальних процесів; імуофлуоресцентні методи; метод ДНК-комет (лужний варіант) для визначення ступеня ушкодження ДНК; метод подвійного прижиттєвого забарвлення з метою оцінки шляхів клітинної загибелі (апоптоз, некроз) клітин тимусу, лімфатичних вузлів та оваріальних клітин; метод культивування ооцитів *in vitro* для аналізу мейотичного дозрівання ооцитів (розчинення зародкового пухирця - метафаза I, формування першого полярного тільца - метафаза II); метод оцінки фіксації імуноглобулінів на відбитках тканин органів; імуоцитохімічний метод для визначення експресії Fas-рецептора (CD95) та рівня полі(АДФ-рибози); метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для аналізу рівня експресії мРНК досліджуваних генів Has2, Cox-2 та Grem1; метод імуоблотингу (Western blot) для оцінки активації NF-κB; статистичні методи аналізу та оцінки вірогідності змін отриманих показників.

Наукова новизна отриманих результатів

Отримано нові дані, які свідчать, що імуноопосередковане ушкодження з використанням бичачого сироваткового альбуміну (БСА), конканаваліну А (КонА) та ліпополісахариду (ЛПС) призводить до вираженого порушення інтегральної цілісності ДНК в імунокомпетентних клітинах, що проявляється достовірним зниженням відсотка клітин із мінімальними ушкодженнями ДНК (0-1 клас) та підвищенням їх відсотка із тяжкими ушкодженнями (3-4 клас) у тимусі та лімфатичних вузлах. Водночас КонА спричиняв ушкодження іншого характеру, що проявлялося більш різноспрямованими змінами ступеня ДНК-пошкоджень. При його дії відмічено не лише зростання відсотка клітин із тяжкими ушкодженнями, але й збільшення їх кількості із мінімальними (1

клас) та незначними (2 клас) ушкодженнями ДНК, що свідчить про більш складний та багаторівневий механізм дії КонА порівняно з БСА та ЛПС.

В результаті проведених експериментальних досліджень уперше комплексно досліджено взаємозв'язок між імунозапальним ушкодженням та дисфункцією клітин репродуктивної системи при імуноопосередкованому ушкодженні, індукованому введенням БСА. Експериментально доведено, що надмірна імунна активація супроводжується вираженим ушкодженням ДНК як в імунокомпетентних клітинах тимуса та лімфатичних вузлів, так і в оваріальних клітинах. Це призводить до порушення мейотичного дозрівання ооцитів і посилення некротичних та апоптотичних процесів у клітинах яєчника.

Вперше показано, що при імунокомплексному ушкодженні відбувається активація ПАРП-1 як в імунокомпетентних, так і в оваріальних клітинах яєчників. Встановлено, що підвищена активність ПАРП-1 є одним із центральних патогенетичних механізмів генотоксичного ушкодження при дії БСА та асоціюється з порушенням цілісності ДНК в імунокомпетентних і оваріальних клітинах, а також із пригніченням мейотичного дозрівання ооцитів.

Вперше показано, що фармакологічне інгібування ПАРП-1 призводить до суттєвого зниження ступеня ушкодження ДНК в імунокомпетентних та оваріальних клітинах при імунокомплексному ушкодженні, що супроводжується нормалізацією мейотичного дозрівання ооцитів (метафаза I і II) та пригніченням фіксації імунних комплексів у тканинах. Отримані результати підтверджують перспективність ПАРП-1 як потенційної мішені для фармакологічної корекції при імунозапальних ушкодженнях.

На клітинах тимуса та лімфатичних вузлів в експериментах *in vivo* та *in vitro* доведено, що фармакологічне блокування ПАРП-1 чинить виражену цитопротективну дію, зменшуючи ушкодження ДНК і загибель клітин тимусу

та лімфовузлів за прозапальним та імуногенним некротичним шляхом. Важливим механізмом протективного ефекту 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК) при імуноопосередкованому ушкодженні є нормалізація активності клітин-ефекторів запалення, зокрема зменшення генерації активних форм кисню (АФК). Показано також, що інгібування ПАРП-1 супроводжується зниженням вивільнення амфотерину (HMGB1) та пригніченням активації NF-κB, що свідчить про участь сигнального каскаду ПАРП-1/HMGB1/NF-κB у розвитку імуноопосередкованих ушкоджень. Отримано нові дані щодо впливу різних модулюючих агентів на процес мейотичного дозрівання ооцитів та функціональний стан імунокомпетентних і оваріальних клітин, що відкриває перспективи фармакологічного захисту клітин репродуктивної та імунної систем при імунній активації.

Вперше показано, що застосування антиоксидантів (кверцетину при ЛПС-індукованому запаленні та етилметилгідроксипіридину сукцинату при імунокомплексному ушкодженні БСА) суттєво знижує ушкодження ДНК в імунокомпетентних та оваріальних клітинах, сприяють нормалізації мейотичного дозрівання ооцитів, знижують розвиток апоптозу і некрозу, сприяючи збереженню геномної стабільності та репродуктивного потенціалу.

Вперше продемонстровано, що наночастинки срібла (НЧС) за умов імунокомплексного ушкодження, індукованого БСА, достовірно знижують рівень ушкодження ДНК, апоптоз і некроз у кумулюючих клітинах та клітинах імунної системи, сприяють покращенню оваріальної функції і мейотичного дозрівання ооцитів, що підтверджує їх позитивний потенціал для фармакологічної корекції імуноопосередкованих розладів.

Також нами вперше продемонстровано, що цитрат германію достовірно знижує генотоксичний стрес і апоптоз в імунокомпетентних клітинах тимуса та лімфатичних вузлів при ЛПС-індукованій системній імунній активації,

підтверджуючи його цитопротективний ефект для запобігання системним запальним ушкодженням.

Отримані результати дають підстави стверджувати, що ушкодження ДНК та некротична загибель клітин є важливими факторами виснаження оваріального резерву та порушення репродуктивного потенціалу за умов імуноопосередкованих розладів. Це обґрунтовує доцільність цілеспрямованої фармакологічної корекції із використанням модуляторів клітинної загибелі для запобігання ушкодженню ДНК і некротичній загибелі клітин з метою збереження оваріального резерву та підтримки репродуктивного здоров'я жінок в умовах зростання поширеності хронічних імуноопосередкованих розладів. Отримані дані створюють експериментальне підґрунтя для подальшого вивчення молекулярних механізмів і розробки терапевтичних стратегій, спрямованих на збереження репродуктивного здоров'я жінок за умов імуноопосередкованих ушкоджень.

Теоретичне та практичне значення роботи

Дослідження має значне фундаментальне теоретичне та практичне значення для розуміння механізмів ушкодження імунокомпетентних і оваріальних клітин за умов надмірної активації імунної відповіді, зокрема вродженого імунітету, при імуноопосередкованих розладах. На теоретичному рівні виконана робота поглиблює сучасні уявлення про роль генотоксичного стресу, некротичної загибелі клітин та залучення ключових молекулярних регуляторів (ПАРП-1, амфотерину (HMGB1), NF-κB) у розвитку ушкоджень при системних (ендотоксемія, гіперімунокомплексемія) та органоспецифічних (КонА-індукований гепатит) моделях активації імунної системи.

Отримані експериментальні дані на трьох використаних моделях імуноопосередкованих ушкоджень можуть слугувати основою для

подальшого дослідження модулаторів клітинної загибелі, антиоксидантів і наноматеріалів щодо цільового захисту імунної та репродуктивної систем. Беручи до уваги те, що нами були встановлені односпрямовані зміни ступеня ушкодження ДНК та життєздатності клітин імунної та репродуктивної систем, особливе значення має розроблена система оцінки ушкоджень імунокомпетентних клітин, яка може бути використана як перспективний маркер імунозапальних змін з можливістю раннього виявлення розвитку їх дисфункції без прямого втручання в оваріальні тканини. Такий підхід є менш травматичним та етично прийнятним для експериментальних моделей порівняно з безпосереднім впливом на ооцити або оваріальні фолікули. Це відкриває можливості для створення неінвазивних методів визначення ступеня імунозапального процесу у випадках безпліддя, асоційованого з імуноопосередкованими порушеннями, а також для пошуку молекулярних механізмів фармакологічної корекції на ранніх етапах розвитку патологічного процесу.

Практична цінність отриманих результатів полягає у можливості використання розроблених експериментальних моделей для доклінічного тестування лікарських засобів, зокрема препаратів, спрямованих на фармакологічну корекцію оваріальної дисфункції та імуноопосередкованих запальних ушкоджень. Встановлена ефективність інгібіторів ПАРП-1, антиоксидантів та наноматеріалів обґрунтовує перспективність розробки нових підходів до профілактики і лікування імуноопосередкованих і репродуктивних порушень. Отримані результати можуть бути використані науковцями в галузі фізіології, патофізіології та репродуктології, викладачами у навчальних програмах з імунології, репродуктології та патофізіології, студентами та аспірантами закладів вищої освіти біологічного та медичного профілю, а також фахівцями у галузі ветеринарної медицини.

Особистий вклад здобувача

Дисертаційна робота є завершеним науковим дослідженням, виконаним безпосередньо автором. Здобувачем самостійно сформульовано основні ідеї, мету та завдання дослідження, обрано експериментальні моделі, здійснено пошук та аналіз сучасної наукової літератури з обраної проблематики. Автор особисто організувала та виконала переважну частину експериментальних досліджень, включно з вибором моделей, збором фактичного матеріалу і статистичною обробкою даних та інтерпретацією отриманих результатів. Теоретичне узагальнення, аналіз результатів, формулювання наукових положень і висновків, а також підготовку основного тексту дисертаційної роботи виконано здобувачем особисто. Науковий консультант приймав участь у формуванні наукової концепції роботи, обговоренні отриманих результатів та редагуванні формулювань висновків. Деякі етапи експериментальних досліджень виконано у співпраці зі співавторами опублікованих робіт та колегами Інституту фізіології імені О.О. Богомольця НАН України, кандидатами біологічних наук Н.В. Макогон, С.І. Павлович, О.А. Кондрацькою (Шепель) та В.О. Срібною.

Апробація результатів дослідження

Основні положення дисертаційної роботи були представлені для обговорення на семінарах Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, а також відповідних наукових форумах - симпозіумах, конгресах та з'їздах: конгрес Українського фізіологічного товариства з міжнародною участю (2010, 2016); читання ім. В.В. Підвисоцького (2012, 2016); XIII international Medical Congress "Euromedica – Hannover" (Hanover, Germany, 4-5 June 2013); The XXII International Symposium "Molecular and Physiological

Aspects of Regulatory Processes of the Organism” (Krakow, Poland, 2014); з’їздах Українського товариства клітинної біології з міжнародною участю (2014р, 2016); пленум наукового товариства патфізіологів України та науково-практичної конференції за участю міжнародних спеціалістів (2014); конгресах та пленумах Українського наукового товариства патофізіологів з міжнародною участю (2016, 2022, 2024); 3 rd International Conference «Smart Bio» (Kaunas, Lithuania, 2–4 May 2019); Галицьких читаннях (2019, 2020); Ukrainian conference with International Participation «Chemistry, physics and Technology of Surface» and Workshop «Nanostructures and nanomaterials in medicine: challenges, tasks and perspectives» (2021); XXVIII Congress of the Polish Physiological Society (Gdansk, September 2021); Наукові читання імені О.О. Богомольця: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченій 140-річчю з дня народження академіка О.О. Богомольця (2022); Всеукраїнській науково-практичній конференції «Актуальні питання патологічної фізіології» (2022); IV науково-практична конференція студентів та молодих вчених з міжнародною участю (19 травня 2022); XIII науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (2022); IV International Scientific Conference «Microbiology and Immunology - the Development Outlook in the 21st Century» (2022); All-Ukrainian Conference on Molecular and Cell Biology with international participation (2022); III міжнародній науково-практичній Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (2023); IV міжнародній науково-практичній Інтернет-конференції «Проблеми та досягнення сучасної біотехнології» (2024); XIV науково-практичній конференції «Актуальні питання патології за умов дії надзвичайних факторів на організм» (2024); Міжнародній конференції з нейронаук та наукових читаннях, присвячених вісцеральній фізіології та патофізіології (2024); науково-практичній конференції «XXIV-і читання ім. В.В. Підвисоцького»

(2025); IX Міжнародній науковій конференції «Психофізіологічні та вісцеральні функції в нормі і патології» (2025).

Отримано деклараційні патенти

1. «Спосіб моделювання імунокомплексного ушкодження у мишей»
Патент на корисну модель (Патент № 93351 від 25.09.2014);
2. «Спосіб моделювання системної ендотоксемії у мишей лінії Альбіно»
(Патент №139296 від 26.12.2019);
3. «Спосіб моделювання системного аутоімунного ушкодження у мишей.
Патент України на корисну модель» (Патент №120418 від 25.10.2017).

За темою дисертації Грушки Н.Г. опубліковано близько 60 наукових праць: 15 статей у виданнях, що індексуються міжнародними наукометричними базами даних Scopus і Web of Science, з них - 2 статті у виданнях, віднесених до другого квартилю (Q2), 3 - віднесених до третього квартилю (Q3), 9 - віднесених до четвертого квартилю (Q4) відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank або Journal Citation Reports, 1 стаття у виданні без визначеного квартиля. 12 статей у фахових наукових виданнях, затверджених МОН України категорії Б, 5 статей у зарубіжних виданнях, не індексованих у Scopus і Web of Science; доповіді на наукових конгресах, з'їздах, конференціях - 30. Крім цього, Грушка Н.Г. є співавтором 3 патентів на корисну модель за темою дисертації.

Структура і обсяг дисертації

Дисертація складається з анотації, змісту, переліку умовних скорочень, вступу, основної частини: огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, результатів досліджень, аналізу даних та їх обговорення, заключення, висновків, списку використаних джерел. Дисертаційна робота представлена на 421 сторінці друкованого тексту та проілюстрована 74 рисунками та 13 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Імунокомпетентні та оваріальні клітини: структура та функції

1.1.1 Основні популяції імунокомпетентних клітин та активація імунної відповіді

Основна функціональна роль імунної системи полягає в захисті організму від потенційно небезпечних патогенів, включаючи бактерії, віруси, грибки та паразитів. В процесі еволюційного розвитку вона сформувалася як злагоджена система клітинних та гуморальних механізмів, здатна реалізовувати як швидкі неспецифічні реакції, так і відтерміновану антиген-специфічну імунну відповідь. Завдяки злагодженій дії імунна система не лише забезпечує захист від інфекційних агентів, а й підтримує гомеостаз організму, контролює толерантність до власних антигенів та бере участь у процесах регенерації тканин (Miles et al., 2021). Головну роль у реалізації захисних і регуляторних функцій імунної системи виконують імунокомпетентні клітини, що забезпечують як первинне розпізнавання патогенів, так і запуск адаптивної відповіді. Вони поділяються на клітини вродженого та адаптивного імунітету, функціонування яких відбувається у тісній взаємодії. Клітини вродженого імунітету (макрофаги, нейтрофіли, дендритні клітини, природні кілери) забезпечують першу лінію захисту, тоді як адаптивні клітини (Т- та В-лімфоцити з їх численними субпопуляціями) відповідають за високо специфічну реакцію та формування імунологічної пам'яті. У фізіологічних умовах ці клітини взаємодіють між собою через цитокіни, хемокіни та паракринові сигнали, забезпечуючи інтеграцію як вродженого, так і адаптивного імунітету та збалансовану реакцію на патогени, контроль за

аутоімунною толерантністю та регенерацію тканин. Ця взаємодія відбувається в центральних (тимус) та периферичних (лімфовузли) органах імунної системи, де клітини дозрівають, активуються та координують відповідь. (Borgoni et al., 2021). Важливо зазначити, що значна частина імунологічної активності розгортається не в кровотоці, а в лімфоїдних органах, таких як селезінка та лімфатичні вузли, або безпосередньо в тканинах, зокрема слизовій оболонці кишківника та легенях (Miles et al., 2021).

Фізіологічні механізми активації вродженого імунітету починаються з розпізнавання патоген-асоційованих молекулярних патернів (PAMPs), які є характерними компонентами мікроорганізмів. Одним з таких є ліпополісахарид (ЛПС) – складова зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій. ЛПС розпізнається спеціальними рецепторами клітин вродженого імунітету - рецепторами розпізнавання патернів (PRR), серед яких ключову роль відіграє Toll-подібний рецептор 4 (TLR4). Зв'язування ЛПС з TLR4 запускає внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, зокрема шлях ядерного фактора κ B (NF- κ B) та шлях мітоген-активованих протеїнкіназ (MAPK). При цьому активується транскрипція генів прозапальних цитокінів, зокрема фактора некрозу пухлин α (TNF- α), інтерлейкіну- 1β (IL- 1β) та інтерлейкіну-6 (IL-6), а також хемокінів, зокрема CXCL8 (інтерлейкін-8), що забезпечує розвиток запальної відповіді. У відповідь формується швидка неспецифічна реакція, яка включає фагоцитоз макрофагами та нейтрофілами, активацію системи комплементу та секрецію антимікробних пептидів. Контроль над цією реакцією здійснюється через механізми негативної регуляції, зокрема за участю SOCS-протеїнів, які обмежують надмірний розвиток запальної відповіді (Huang et al., 2020; Luo et al., 2025).

Серед клітин вродженого імунітету провідне місце займають макрофаги, які не лише здійснюють фагоцитоз, але й виступають антигенпрезентуючими клітинами та координують запальну відповідь через продукцію цитокінів

(TNF- α , IL-1, IL-6). Під час активації імунної відповіді вони мігрують до місць інфекції чи запалення через судинну мережу, де взаємодіють з іншими клітинами, стимулюючи запальні каскади. У тимусі вони не є основними клітинами, що здійснюють позитивну та негативну селекцію Т-лімфоцитів, проте здійснюють кліренс апоптотичних тимоцитів, що забезпечує підтримку мікрооточення та запобігає розвитку аутоімунних реакцій; у периферичних лімфатичних вузлах макрофаги також беруть участь у кліренсі загиблих клітин і формуванні імунного мікрооточення (Cosway et al., 2017). Активація адаптивного імунітету відбувається після фази вродженої відповіді та залежить від антиген-специфічного розпізнавання. У Т-лімфоцитів активація починається з взаємодії Т-клітинного рецептора (TCR) з комплексом МНС-антиген на антиген-презентуючих клітинах. Для повної активації потрібна ко-стимуляція (наприклад, CD28 на Т-клітині з CD80/86 на APC), яка запускає внутрішньоклітинні сигнальні шляхи PI3K–Akt та NFAT. Після розпізнавання антигену активовані Т-лімфоцити продукують цитокіни, такі як IFN- γ та IL-2, що регулюють запалення та клітинну цитотоксичність. Це стимулює проліферацію Т-клітин та їх диференціацію в ефекторні субпопуляції (Chen & Flies, 2013). В-лімфоцити активуються через В-клітинний рецептор, який безпосередньо зв'язує антиген. Повноцінна активація В-клітин відбувається за участю Т-хелперів через взаємодію CD40 (на В-клітині) з CD40L (на Т-клітині), що забезпечує їх проліферацію та функціональне дозрівання. В результаті формується гуморальна відповідь: відбувається соматична гіпермутація, клас-світчинг і диференціація В-клітин у плазматичні клітини та клітини пам'яті (Mesin et al., 2016).

Т-лімфоцити (CD3⁺) є основними ефекторами клітинної адаптивної відповіді, які у тимусі проходять позитивну та негативну селекцію, внаслідок чого формується толерантність до власних антигенів. У периферичних лімфоїдних органах Т-клітини активуються дендритними клітинами, після

чого набувають ефекторних властивостей і формують популяції клітин пам'яті (Smith-Garvin et al., 2009). Виділяють дві головні субпопуляції: $CD4^+$ Т-хелпери, які координують імунні реакції, активуючи В-клітини та макрофаги. $CD4^+$ клітини залежно від цитокінового мікрооточення диференціюються у Th1, Th2, Th17 та Treg, кожна з яких виконує специфічну регуляторну або ефекторну функцію. $CD8^+$ Т-лімфоцити розпізнають і знищують клітини, що експресують чужорідні антигени, зокрема вірус-інфіковані та пухлинні (Zhu et al., 2010; Zhu & Zhu, 2020).

Взаємодія Т- та В-лімфоцитів забезпечує узгодженість адаптивної імунної відповіді. $CD8^+$ клітини реалізують цитотоксичні функції, а $CD4^+$ субпопуляції координують імунну відповідь, тоді як В-лімфоцити формують гуморальну ланку, продукуючи антитіла та забезпечуючи імунну пам'ять (Crotty, 2019).

Як зазначено вище, В-лімфоцити активуються через В-клітинний рецептор, який розпізнає антиген (наприклад, БСА, що використовується в експериментальних моделях). Для повної активації потрібна допомога від Т-хелперних клітин, що реалізується через взаємодію CD40 (на В-клітині) з CD40L (на Т-клітині). Такий сигнал запускає соматичну гіпермутацію та переключення класів імуноглобулінів, унаслідок чого В-клітини диференціюються у плазматичні клітини, які продукують антитіла, або в клітини пам'яті з підвищеною специфічністю до антигену (Elgueta et al., 2009). Таким чином, В-лімфоцити формують гуморальну ланку адаптивного імунітету, забезпечуючи продукцію антитіл та імунну пам'ять. Вони також можуть виступати як антигенпрезентуючі клітини і регулювати імунну відповідь через секрецію IL-10 та TGF β , що сприяє підтриманню локальної толерантності та запобіганню автоімунним реакціям (Mauri & Bosma, 2012). У тимусі роль В-лімфоцитів є мінімальною і вони становлять незначну частину клітинного складу й локалізуються переважно в медулярних ділянках, де

можуть виконувати функцію антигенпрезентуючих клітин та брати участь у формуванні центральної толерантності Т-лімфоцитів (Wedemeyer & Griffith, 2025).

Таким чином, В-лімфоцити разом із Т-лімфоцитами складають ключові популяції адаптивного імунітету, що забезпечують специфічність імунної відповіді. Водночас ефективність їх активації значною мірою залежить від активності клітин, які інтегрують вроджений та адаптивний імунітет. До таких належать дендритні клітини та природні кілери, які беруть участь у регуляції та координації розвитку як клітинної, так і гуморальної відповіді.

Дендритні клітини є найпотужнішими антигенпрезентуючими клітинами, що забезпечують зв'язок між вродженим та адаптивним імунітетом. У незрілому стані вони локалізуються в периферійних тканинах, де здійснюють розпізнавання, захоплення та процесинг антигенів. Після активації через рецептори небезпеки дендритні клітини проходять стадію дозрівання, що супроводжується підвищенням експресії МНС II та коstimуючих молекул, набувають дендритної морфології, з формуванням характерних дендритних відростків та мігрують до регіональних лімфатичних вузлів. У лімфовузлах вони презентують антиген і активують наївні Т-лімфоцити, ініціюючи їх активацію, проліферацію та подальшу диференціацію (Liu et al., 2021; Meloun et al., 2025).

У тимусі дендритні клітини також виконують важливу функцію, вони беруть участь у процесах негативної селекції Т-лімфоцитів, сприяючи формуванню центральної імунологічної толерантності. У периферичних лімфовузлах вони формують імунні синапси, продукуючи цитокіни, зокрема IL-12 та IFN- α що стимулюють активацію як Т-лімфоцитів, так і клітин натуральних кілерів. Серед основних підтипів дендритних клітин виділяють мієлоїдні клітини, що здійснюють презентацію антигену, та плазмоцитоїдні - основні продуценти інтерферонів у відповідь на вірусну інфекцію. Важливо,

що дендритні клітини також здатні індукувати диференціацію регуляторних Treg-клітин, що відіграє суттєву роль у підтриманні периферичної толерантності та запобіганні розвитку автоімунних реакцій (Mildner & Jung, 2014; Borgoni et al., 2021).

Натуральні кілери (НК-клітини) належать до лімфоїдних клітин вродженого імунітету й відіграють ключову роль у швидкому розпізнаванні та знищенні вірус-інфікованих або трансформованих (пухлинних) клітин без необхідності попередньої антигенної стимуляції. Основний механізм їхньої цитотоксичної дії полягає у вивільненні перфोरину та гранзимів, що призводить до індукції апоптозу в ураженій клітині. Крім того, НК-клітини активно секретують низку прозапальних цитокінів, зокрема інтерферон- γ (IFN- γ) та фактор некрозу пухлин- α (TNF- α), які не лише безпосередньо впливають на патологічні клітини, а й модулюють функції інших клітин імунної відповіді, зокрема посилюючи активність адаптивного імунітету. НК-клітини активуються безпосередньо в периферичних тканинах, включаючи лімфатичні вузли, де тісно взаємодіють з дендритними клітинами, макрофагами та Т-лімфоцитами. Така взаємодія забезпечує баланс між їхньою цитотоксичною активністю, яка спрямована на елімінацію патогенних або трансформованих клітин, та імуномодуючими властивостями, що обмежують надмірну запальну реакцію та забезпечують адекватну координацію імунної відповіді (Mace, 2023; Chen et al., 2024).

Імунна відповіді розвивається послідовно, починаючи від розпізнавання антигену клітинами вродженого імунітету, активацією та проліферацією та диференціацією адаптивних лімфоцитів, а згодом, до завершення реакції шляхом формування механізмів імунологічної толерантності. Вирішальну роль у цьому процесі відіграють цитокіни та хемокіни, які регулюють міграцію та функціональну взаємодію імунних клітин. Тимус, виступає основним центральним органом імунної системи, де відбувається генерація та

дозрівання Т-лімфоцитів, тоді як регіонарні лімфатичні вузли є периферійними структурами, де антигенпрезентуючі клітини (зокрема дендритні) взаємодіють з наївними та ефекторними лімфоцитами. Усі ці клітинні популяції та органи діють як єдина система, де міжклітинна взаємодія та сигнальна координація процесів забезпечують ефективність і специфічність імунного захисту.

Водночас імунні механізми тісно пов'язані з функціональним станом інших систем організму, зокрема репродуктивної. У фолікулярному мікросередовищі (фолікулярній рідині та навколишніх клітинах) імунні клітини становлять суттєву частину клітинної популяції. За даними окремих досліджень, їх відсоток може наближатися до 50% і більше, що є співставним із відсотком гранульозних клітин (Zhou et al., 2024; Banerjee et al., 2025). Серед них переважають макрофаги, Т-лімфоцити, дендритні клітини та НК-клітини, які відіграють важливу роль у підтриманні фізіологічних процесів репродукції: очищенні фолікулів від апоптотичних клітин, регуляції локального запалення, секреції цитокінів і хемокінів для координації фолікулогенезу, дозрівання ооцита, овуляції та формування жовтого тіла (Dai et al., 2023; Banerjee et al., 2025). Порушення балансу цих клітин (наприклад, зміна поляризації макрофагів чи підвищення прозапальних Т-субпопуляцій) може суттєво впливати на якість гамет та репродуктивний потенціал (Zhou et al., 2024; Tang et al., 2023). З огляду на це доцільним є детальний розгляд фізіологічного стану ключових оваріальних клітин, таких як гранульозні клітини, тека-клітини та ооцити, з урахуванням їх взаємодії з імунним компонентом фолікулярного середовища, що й буде представлено в наступному підрозділі.

1.1.2. Основні типи клітин яєчника та їх роль у забезпеченні репродуктивної функції

Фізіологічний розвиток і функціонування гранульозних клітин, тека-клітин та ооцитів є основою всіх ключових процесів у яєчнику: від формування фолікула до дозрівання гамети та підготовки до запліднення. Саме ці клітини формують структурно-функціональну й ендокринну основу яєчника, забезпечуючи його репродуктивну й гормональну активність у нормі. Фолікул є базовою функціональною одиницею яєчника. Він складається з ооцита, оточеного шарами клітин гранульози, які відмежовані від стромы базальною мембраною і не мають прямого кровопостачання. Розвиток фолікула проходить кілька етапів: рекрутинг примордіальних фолікулів, проліферацію або атрезію гранульозних і тека-клітин, стероїдогенез, експресію рецепторів до гонадотропінів, дозрівання ооцита, овуляцію, лютеїнізацію та утворення жовтого тіла. Залежно від стадії розвитку, розрізняють примордіальні, преантральні, антральні та преовуляторні фолікули (Hsueh et al., 2015; Cox & Takov, 2025). Одним із важливих компонентів мікрооточення яєчника є строма, що містить стромальні клітини, судини та нервові закінчення й імунні клітини, які беруть участь у формуванні локального регуляторного мікросередовища і впливають на активацію, ріст і атрезію фолікулів.

Преовуляторний фолікул виконує дві взаємопов'язані функції. Перша - забезпечує остаточне дозрівання ооцита та вивільнення кумулюсно-ооцитарного комплексу (КОК), який утворений ооцитом та кумулюсними клітинами гранульози. Ці клітини безпосередньо оточують ооцит, формуючи спеціалізоване мікросередовище, критично важливе для запліднення та подальшого розвитку жовтого тіла. Друга функція - ендокринна. Преовуляторний фолікул активно синтезує естрадіол, який забезпечує

формування передовуляторного піку лютеїнізуючого гормону, запускає механізм овуляції й готує ендометрій до можливого імплантаційного процесу (Hsueh et al., 2015; Li et al., 2021; Richani et al., 2021; Cox & Takov, 2025).

У більшості фолікулів ооцити перебувають на стадії диктіотени - тривалої паузи в мейозі, коли зберігається зародковий пухирець і диплоїдний набір хромосом. Під час овуляції ооцит виходить зі стану мейотичної зупинки, відновлює мейоз, відбувається розчинення зародкового пухирця, утворюється перше полярне тільце, а хромосомний набір зменшується до гаплоїдного (Wang & Pepling, 2021). Ооцит і гранулярні клітини постійно взаємодіють через щілинні контакти (gap junctions). Ці контакти проходять крізь блискучу оболонку (zona pellucida) завдяки спеціальним білкам (Cx37, Cx43) (Winterhager & Kidder, 2015; Xie et al., 2023). Саме через них відбувається обмін іонами та метаболітами та й іншими сигнальними молекулами, необхідними для нормального розвитку ооцита (Wang & Pepling, 2021).

Крім того, сам ооцит виділяє ключові сигнальні фактори з сімейства TGF- β , зокрема, GDF-9 та BMP-15. Вони впливають на сусідні соматичні клітини фолікула, регулюючи їх проліферацію та диференціацію. Завдяки цьому формуються різні субпопуляції: кумулюсні клітини (безпосередньо навколо ооцита), гранульозні клітини (внутрішні шари фолікула) та тека-клітини (зовнішній шар) (Sanfins et al., 2018).

Клітини кумулюсу - соматичні клітини, що безпосередньо оточують ооцит у складі КОК. Найщільніший шар цих клітин формує променистий вінець (corona radiata), який безпосередньо контактує з ооцитом. Під впливом ооцит-секретованих факторів, зокрема GDF-9, BMP-15, а також EGF-подібних факторів амфірегуліну, бетацелюліну та епірегуліну, клітини кумулюсу експресують гіалуронансинтазу-2 (HAS2), пентраксин-3 (PTX3), TNFAIP6 і PTGS2, що забезпечує синтез позаклітинного матриксу, розширення КОК та його структурну стабільність перед овуляцією (Шепель та ін., 2015; Richani et

al., 2021; Turathum et al., 2021). Кумулюсні клітини продукують циклічний гуанозинмонофосфат (цГМФ), який через щілинні контакти (коннексини Cx43, Cx37) дифундує в ооцит та інгібує фосфодіестеразу 3 (PDE3A). Це запобігає розпаду цАМФ, підтримує його високий рівень та активність протеїнкінази А (РКА), що забезпечує мейотичну зупинку (Vaccari & Horner, 2008; Norris, 2009).

Після дії лютеїнізуючого гормону на преовуляторний фолікул у кумулюсних клітинах активується MAPK/ERK-каскад, що супроводжується пригніченням активності рецептора натрійуретичного пептиду 2 (NPR2) і зниженням синтезу цГМФ. Внаслідок цього зменшується його надходження до ооцита через щілинні контакти, що призводить до активації фосфодіестерази 3A (PDE3A), посилюється гідроліз цАМФ та знижується його внутрішньоклітинна концентрація. Падіння рівня цАМФ призводить до інактивації РКА-залежного механізму підтримання профазної блокади та ініціює відновлення мейозу. Першою морфологічною ознакою цього процесу є розпад зародкового пухирця (GVBD), після чого ооцит проходить послідовні стадії мейозу I, досягає метафази I, а потім екструдує перше полярне тільце. Після цього ооцит швидко переходить до метафази II, на якій і зупиняється до моменту запліднення (Vaccari & Horner, 2008; Conti et al., 2012).

Клітини гранульози - соматичні епітеліальні клітини, які оточують ооцит уже на стадії примордіального фолікула та супроводжують його протягом усього періоду фолікулогенезу. Вони формують структурне мікрооточення ооцита, активно проліферують і диференціюються на кумулюсні та муральні субпопуляції, забезпечуючи структурну та функціональну диференціацію фолікула в процесі його росту (Turathum et al., 2021). Під час росту фолікула гранульозні клітини змінюють свою морфологію, щільність міжклітинних контактів і спектр експресованих рецепторів, що відображає їх функціональну спеціалізацію. Високий

проліферативний потенціал і експресія низки характерних клітинних маркерів (CD90, CD44, CD166, CD117, CD105, CD29) та транскрипційного фактора OCT4 свідчать про їхню клітинну пластичність і дозволяють розглядати ці клітини як такі, що характеризуються широким диференціаційним потенціалом. У експериментальних умовах ці клітини здатні диференціюватися в інші лінії, що підтверджує їх регенераторний потенціал (Kossowska-Tomaszczuk et al., 2009; Dompe et al., 2021).

Гранульозні клітини є ключовою ланкою ендокринної регуляції фолікула. Вони експресують рецептори до фолікулостимулюючого гормону (ФСГ), а на пізніших стадіях і до лютеїнізуючого гормону (ЛГ), що забезпечує їх чутливість до циклічних змін гонадотропної стимуляції. Під впливом ФСГ активується стероїдогенез, проліферація та синтез естрадіолу, який через позитивний зворотний зв'язок сприяє передовуляторному піку ЛГ. Крім того, гранульозні клітини продукують інгібін, який модулює секрецію ФСГ гіпофізом, забезпечуючи тонке гормональне налаштування фолікулогенезу (Kossowska-Tomaszczuk et al., 2009; Liu et al., 2021; Hsueh et al., 2015). Таким чином, ці клітини не лише підтримують, а й координують локальні оваріальні процеси з центральною нейроендокринною регуляцією. Активний стероїдогенез у клітинах гранульози та теки супроводжується утворенням АФК як побічного продукту мітохондріального метаболізму та роботи ферментів цитохрому P450, що за фізіологічних умов відіграє регуляторну роль, але за надмірного накопичення може створювати умови для розвитку оксидативного стресу в оваріальному мікрооточенні (Immediata et al., 2022).

Тека-клітини (ТК) відіграють ключову роль у розвитку фолікулів та синтезі жіночих стероїдних гормонів, хоча вони вивчалися менш детально, ніж гранульозні клітини. Це соматичні клітини мезенхімного походження, які формують периферичний шар фолікула, прилягаючи до його базальної мембрани. У процесі фолікулогенезу вони диференціюються з

фібробластоподібних клітин оваріальної строми, рекрутуються під впливом ооцит- та гранульозо-секретованих факторів, зокрема через сигнальний шлях Kit/KL, і набувають стероїдогенної активності за участі GDF-9 (Asiabi et al., 2020; Orisaka et al., 2009).

Залежно від розташування та функції, тека-клітини у зрілому фолікулі поділяються на два шари: тека interna (гормонально активний внутрішній шар), розташований безпосередньо під базальною мембраною поруч із гранульозою та тека externa (зовнішній шар), який забезпечує переважно структурно-механічну підтримку фолікула (Liu & Hsueh, 1986; Orisaka et al., 2009).

Клітини внутрішньої теки синтезують андрогени, насамперед андростендіон і тестостерон у межах класичного стероїдогенного шляху за участі ферментів цитохрому P450 (CYP11A1, CYP17A1). Ці андрогени дифундують до клітин гранульози, де під дією ароматази (CYP19A1) перетворюються на естрогени. Така взаємодія теки й гранульози лежить в основі двоклітинної моделі стероїдогенезу та забезпечує синтез 17β -естрадіолу, необхідного для росту домінантного фолікула (Chauvin et al., 2022; Ueno et al., 2025).

Окрім стероїдогенної функції, тека-клітини забезпечують міжклітинну комунікацію з гранульозними клітинами й ооцитом, беручи участь у регуляції проліферації, диференціювання та виживання фолікулярних клітин. У разі атрезії фолікула саме тека-клітини зазвичай залишаються останньою популяцією, що зазнає апоптозу. Натомість в овулюючих фолікулах вони диференціюються у лютеїнізовані клітини та беруть участь у формуванні жовтого тіла (Vlieghe et al., 2023). Таким чином, тека-клітини виконують не лише ендокринну, а й структурно-регуляторну функцію, створюючи гормональні та регуляторні умови, необхідні для проліферації клітин

гранульози, підтримання життєздатності фолікула та запобігання передчасній атрезії.

Старіння яєчників супроводжується поступовим зниженням функціональної активності гранульозних клітин, тека-клітин та ооцитів, що призводить до виснаження оваріального резерву. Цей процес регулюється генетичними механізмами, зокрема шляхами відповіді на пошкодження ДНК (DNA damage response, DDR), які визначають вік природної менопаузи (Ruth et al., 2021). Дослідження Ruth et al. (2021) виявило 290 генетичних локусів, асоційованих з віком природної менопаузи, більшість з яких пов'язані з процесами DDR та впливають на встановлення й виснаження оваріального резерву протягом життя. Вікові зміни в гранульозних клітинах та фолікулярній рідині (зокрема, зниження якості ооцитів, накопичення окислювального стресу та метаболічні порушення) також підтверджуються в моделях на коровах, де спостерігається поступове погіршення функції цих клітин з віком (Iwata, 2017).

Таким чином, ооцит та соматичні клітини фолікула: гранульозні, кумулюсні та тека-клітини утворюють єдину функціональну систему, де тісні міжклітинні взаємодії забезпечують ріст, дозрівання і здатність до овуляції. Гармонійна взаємодія їхньої активності є необхідною умовою підтримання репродуктивного потенціалу протягом фертильного періоду. З віком накопичення пошкоджень ДНК та інші генетичні фактори призводять до порушення цього балансу, що змінює чутливість клітин до регуляторних сигналів мікрооточення, в тому числі імунних клітин, які відіграють важливу роль у фізіології яєчника (від підтримки фолікулогенезу до регуляції запалення та атрезії).

1.1.3. Функціональна взаємодія клітин імунної та репродуктивної систем за фізіологічних умов

Імунні клітини є постійними клітинними компонентами яєчника та відіграють важливу роль у регуляції росту, дозрівання й овуляції фолікулів. Вони локалізуються переважно у стромі яєчника, у ділянці теки, а також у жовтому тілі, взаємодіючи з соматичними клітинами фолікула та компонентами його мікрооточення (Chen et al., 2024; Li et al., 2022; Ameho & Klutstein, 2025).

Основними популяціями імунних клітин яєчника є макрофаги (найчисленніші), дендритні клітини, природні кілери, Т- та В-лімфоцити, а також менш представлені нейтрофіли, мастоцити й еозинофіли. Кількість і функціональна активність цих клітин змінюються залежно від фази оваріального циклу та гормонального фону (естрогенів, прогестерону, ЛГ), що сприяє підтриманню фізіологічної регуляції репродуктивних процесів (Bazzano et al., 2024; Li et al., 2022). Макрофаги відіграють важливу роль у ангиогенезі фолікулів і жовтого тіла та регуляції тканинного гомеостазу, що критично важливо для нормального фолікулогенезу та функціонування жовтого тіла (Zhang et al., 2021; Bazzano et al., 2024; Li et al., 2022). Фізіологічний стан яєчників залежить не лише від соматичних клітин (гранулярних, текальних, стромальних), що підтримують ріст і дозрівання ооцита та забезпечують стероїдогенез, але й від клітин імунної системи (переважно резидентних макрофагів, дендритних клітин, природних кілерів, Т- та В-лімфоцитів) й сигнальних молекул, які вони продукують (цитокіни, хемокіни, фактори росту). У стромі яєчника також присутні НК-клітини, які беруть участь у регуляції росту фолікулів та перебудови тканин яєчника. Вони секретують цитокіни і фактори росту, що впливають на ангиогенез,

функціонування клітин фолікула та підтримання імунного гомеостазу в яєчнику (Bazzano et al., 2024).

За фізіологічних умов імунокомпетентні клітини, зокрема макрофаги та Т-лімфоцити, підтримують тканинний гомеостаз і імунну толерантність у яєчнику. Макрофаги регулюють атрезію фолікулів і сприяють овуляції, тоді як Т-регуляторні клітини (FoxP3⁺) забезпечують імунну толерантність до ооцитів та оваріальних антигенів. Порушення цього балансу при імунній активації може призвести до дисфункції оваріальних структур (Кнарік et al., 2022).

Імунні клітини строми яєчників, зокрема макрофаги, еозинофіли, моноцити, В-лімфоцити, Т-лімфоцити та природні кілери (НК-клітини), разом із цитокінами й хемокінами беруть участь у регуляції фолікулогенезу, овуляції, формуванні та регресії жовтого тіла. Їх основні функції включають фагоцитоз, презентацію антигенів, секрецію сигнальних молекул і ремоделювання тканин за рахунок протеаз та лізосомальних ензимів (Bazzano et al., 2024).

У яєчниках присутня популяція імунних клітин, більшість з яких належить до компонентів вродженого імунітету. Вони локалізуються переважно у стромі та поблизу примордіальних фолікулів, де їхня кількість є відносно невеликою і функціональна активність обмеженою. У період овуляції чисельність цих клітин зростає, особливо в ділянці теки фолікула, після чого вони мігрують у жовте тіло, що формується з клітин гранульози. У цей період імунні клітини разом із гранульозними клітинами продукують широкий спектр сигнальних молекул, що беруть участь у регуляції фолікулогенезу, зокрема CSF-1, GM-CSF, інтерлейкіни (IL-1, IL-6, IL-8), моноцитарний хемоатрактантний білок-1 (MCP-1), а також фактор некрозу пухлин- α (TNF- α), які забезпечують ремоделювання тканини та процеси лютеїнізації (Bukulmez & Arici, 2000).

Макрофаги виконують регуляторні функції у яєчнику, беручи участь у ремоделюванні тканин, ангіогенезі та підтриманні локального імунного гомеостазу. Залежно від мікрооточення та гормонального статусу вони набувають фенотипу M1 (прозапального) або M2 (репаративного), що забезпечує баланс між руйнуванням і відновленням тканини. У передовуляторний період макрофаги стимулюють розрив фолікула через продукцію металопротеїназ і прозапальних медіаторів, тоді як у лютеїновій фазі вони сприяють формуванню та підтриманню жовтого тіла завдяки секреції ангіогенних факторів (VEGF, bFGF). Дефіцит або дисфункція макрофагів призводять до порушення овуляції, аномалій розвитку жовтого тіла та зниження рівня прогестерону (Li et al., 2022; Zhang et al., 2021; Bazzano et al., 2024).

Т-лімфоцити формують меншу, але функціонально значущу популяцію імунних клітин у яєчнику. У примордіальних і незрілих фолікулах їхня кількість обмежена, проте після дії ЛГ відбувається активне залучення цих клітин у тканину. У складі оваріальних Т-клітин часто переважають CD8⁺ цитотоксичні (близько 45% у деяких дослідженнях) та CD4⁺ хелперні (близько 25%) субпопуляції. Важливим механізмом регуляції є поява Т-регуляторних клітин (FoxP3⁺ CD4⁺), які підтримують імунну толерантність до ооцита та клітин гранульози. У період регресії жовтого тіла зростає частка CD8αα⁺ та γδ⁺CD8αα⁺ Т-лімфоцитів, тоді як частка FoxP3⁺ регуляторних Т-клітин зменшується, що свідчить про зміну функціонального фенотипу резидентних Т-лімфоцитів залежно від стану жовтого тіла (Poole & Pate, 2012). Подібні механізми толерантності спостерігають і в мікрооточенні матки. Дослідження одиночноклітинного РНК-секвенування показали, що НК-клітини та макрофаги підтримують імунний баланс, тоді як дисбаланс субпопуляцій асоціюється з патологічними станами (Guo et al., 2021). Це вказує на подібність імунорегуляторних механізмів у жіночій репродуктивній системі, які в

яєчнику забезпечують баланс між толерантністю та активацією (Knapik et al., 2022).

Таким чином, імунні клітини яєчника формують регуляторне мікрооточення, яке забезпечує баланс між підтриманням тканинного гомеостазу та реалізацією репродуктивної функції. Макрофаги, дендритні клітини, НК-клітини та Т-лімфоцити сприймають сигнали від соматичних клітин і координують ключові процеси, від росту фолікулів до формування та регресії жовтого тіла. Підтримання імунної толерантності у фізіологічних умовах є важливим для захисту оваріальної тканини від аутоімунного ушкодження. Водночас навіть незначний зсув цього балансу у бік активації імунної системи може призвести до структурних та функціональних порушень, що створює передумови для розвитку репродуктивних патологій. За таких умов надмірне накопичення реактивних форм кисню та прозапальних цитокінів призводить до оксидативного стресу, пошкодження ДНК у гранульозних клітинах і ооцитах та активації програм клітинної загибелі. Це супроводжується порушенням фолікулярного розвитку, прискореною атрезією фолікулів та прогресуючим виснаженням оваріального резерву, що може сприяти розвитку передчасної оваріальної недостатності та інших репродуктивних патологій. Саме тому в наступному розділі буде розглянуто порушення функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов надмірної імунної активації.

1.2. порушення функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов надмірної імунної активації

1.2.1. Інтегральна цілісність ДНК у нормі та при дії ушкоджуючих факторів

Щодня в клітинах людини виникають тисячі ушкоджень ДНК, спричинених як ендогенними фізіологічними процесами (реплікація, метаболізм, оксидативний стрес), так і екзогенними факторами, зокрема токсинами довкілля і харчових продуктів, ультрафіолетовим (УФ) та іонізуючим випромінюванням, а також хімічними канцерогенами (Tubbs & Nussenzweig, 2017; Milano et al., 2024). Найпоширеніші типи ушкоджень включають одноланцюгові (ОР) та дволанцюгові розриви (ДР), міжниткові зшивання, утворення ковалентних аддуктів із хімічними сполуками, а також спонтанні хімічні модифікації, такі як дезамінування та депуринізація. Якщо ці ушкодження залишаються нерепарованими або репаруються з помилками, це може призводити до накопичення мутацій, порушення регуляції клітинного циклу та геномної нестабільності, що асоціюється з прискореним старінням і розвитком онкологічних захворювань (Caldecott, 2024; Hoeijmakers, 2009; Milano et al., 2024; Kang et al., 2025).

В імунокомпетентних клітинах, таких як Т-лімфоцити, ушкодження ДНК можуть порушувати формування адекватної імунної відповіді, тоді як в оваріальних клітинах, зокрема ооцитах, вони знижують репродуктивний потенціал, оскільки ці клітини характеризуються високою чутливістю до генотоксичного стресу, особливо в умовах надмірної імунної активації (Bednarski & Sleckman, 2019; Carroll & Marangos, 2013; Huang et al., 2025). Збереження цілісності геному забезпечується системою відповіді на ушкодження ДНК, яка виявляє, сигналізує та відновлює ці пошкодження. Ця

система координує посттрансляційні модифікації, такі як фосфорилування, убіквітинування та SUMO-їлація, для залучення і активації репараційних білків, їхньої взаємодії та завершення процесу репарації. SUMO-їлація відіграє важливу роль в організації та стабілізації репараційних комплексів у зонах ушкодження (Bhachoo & Garvin, 2024).

Нерепаровані ушкодження ДНК можуть самі по собі ініціювати імунну відповідь. Коли фрагменти ДНК накопичуються в цитоплазмі, клітина сприймає їх як сигнал небезпеки та активує внутрішньоклітинні сенсори (зокрема шлях cGAS-STING), що призводить до синтезу інтерферонів і прозапальних цитокінів. Під час ушкодження або загибелі клітин також вивільняються молекули небезпеки (HMGB1, АТР та ін.), які додатково стимулюють дендритні клітини й Т-лімфоцити. Крім того, накопичення мутацій може сприяти появі нових антигенів і посиленню імунної реакції. У гострих умовах це допомагає елімінувати ушкоджені клітини, однак при тривалій активації може підтримувати хронічне запалення, імуносупресію або навіть аутоімунні процеси (Deligianni et al., 2025).

Ключові білки, такі як ATM, ATR і DNA-PK, активують сигнальні каскади, що регулюють репарацію та зупиняють клітинний цикл, запобігаючи передачі пошкодженої ДНК дочірнім клітинам (Blackford & Jackson, 2017; Xu et al., 2024). Ці механізми особливо важливі для імунокомпетентних клітин, таких як Т-лімфоцити, а також для оваріальних клітин, зокрема ооцитів, оскільки їх функціональна активність безпосередньо залежить від збереження інтегральної цілісності геному (Xu et al., 2024). Сигнальні каскади відповіді на ушкодження ДНК забезпечують послідовне рекрутування репараційних білків, регуляцію їхньої активності та точність відновлення ушкоджених ділянок ДНК. Після завершення репарації сигналізація повинна бути своєчасно припинена, що дозволяє відновити нормальний перебіг клітинного

циклу та запобігти надмірній активації стресових шляхів (Bhachoo & Garvin, 2024).

ДНК тривалий час розглядалася як відносно стабільна структура, однак Томас Ліндаль довів, що її нуклеотидні основи зазнають спонтанних змін через звичайні хімічні реакції (такі як гідроліз). Зокрема, цитозин може перетворюватися на урацил (дезамінування), а пуринові основи (аденін і гуанін) можуть відщеплюватися від дезоксирибози (депуринація), утворюючи апуринові ділянки. Саме ці відкриття стали основою для розуміння механізмів базової ексцизійної репарації - вирізання пошкоджених ділянок (Lindahl, 1993). Азіз Санкар розкрив механізми нуклеотидної ексцизійної репарації (NER), яка усуває УФ-індуковані ушкодження, такі як піримідинові димери (Sancar 2016). Пол Модріч описав репарацію невідповідностей (MMR), що виправляє помилки реплікації (Modrich, 2016). Ці дослідження, відзначені Нобелівською премією з хімії 2015 року, показали, що підтримання інтегральної цілісності ДНК забезпечується не одним універсальним механізмом, а кількома взаємопов'язаними шляхами репарації, які діють скоординовано, розпізнаючи певний тип ушкодження і забезпечуючи підтримання геномної стабільності та запобігання накопиченню мутацій.

Основні шляхи репарації, такі як гомологічна рекомбінація і негомологічне з'єднання кінців для ДР, а також базова ексцизійна репарація (BER) і нуклеотидна ексцизійна репарація (NER) для хімічних і УФ-індукованих ушкоджень, функціонують узгоджено, мінімізуючи геномні порушення. Порушення цих механізмів, зокрема мутації в генах BRCA1/2, асоціюються з дефектами HR і накопиченням генетичних змін, що має особливе значення для клітин яєчника в контексті онкогенної трансформації (Shah et al., 2025).

Таким чином, ефективна репарація ДНК є ключовою умовою для підтримання геномної стабільності та функціональної активності

імунокомпетентних і оваріальних клітин, особливо в умовах надмірної імунної активації, коли кількість ушкоджень ДНК зростає і вони можуть ініціювати прозапальні сигнали та посилювати локальне запалення, що створює передумови для патологічних змін у тканині яєчника (Deligianni et al., 2025).

1.2.2. Типи ушкоджень ДНК: одноланцюгові, дволанцюгові розриви і механізми репарації

Серед різних типів ушкоджень геному особливу увагу привертають одноланцюгові та дволанцюгові розриви ДНК, оскільки вони можуть інтенсивно утворюватися у клітинах за умов оксидативного стресу та надмірної імунної активації. Хоча дволанцюгові розриви ДНК (ДР) вважаються одними з найнебезпечніших ушкоджень геному через ризик хромосомних перебудов і клітинної загибелі, значно частіше у клітинах виникають саме одноланцюгові розриви ДНК (ОР), кількість яких може сягати десятків тисяч на клітину щодня (Caldecott, 2022; Caldecott, 2024). Вони утворюються внаслідок дії ендогенних факторів, таких як АФК, що утворюються під час мітохондріального дихання, базової ексцизійної репарації основ (BER) або активності топоізомераз, а також під впливом екзогенних генотоксичних факторів. Якщо ОР своєчасно не виявляються та не усуваються, вони можуть порушувати транскрипцію, спричиняти зупинку реплікаційної вилки та активувати сенсорні білки, що розпізнають ушкодження ДНК, а також перетворюватися на дволанцюгові розриви під час реплікації ДНК.

Для збереження інтегральної цілісності геному клітини мають систему відповіді на ушкодження ДНК (DNA damage response, DDR), яка забезпечує розпізнавання пошкоджень, активацію механізмів їх репарації та координацію клітинного циклу. Репарація ОР ДНК є швидким і високоефективним

процесом, що включає розпізнавання розриву сенсорним білком ПАРП-1, обробку пошкоджених 3'- і 5'-кінців ферментами APE1, PNKP, TDP1, APTX та подальше відновлення безперервності ДНК за участю ДНК-лігаз (переважно LIG1 або LIG3 у комплексі з XRCC1). ПАРП-1 координує процес шляхом синтезу полі(АДФ-рибози), залучаючи фактори BER до місця ушкодження та змінюючи структуру хроматину (Caldecott, 2022; Caldecott, 2024).

Надмірна активація ПАРП-1 при накопиченні ОР ДНК може призводити до виснаження клітинного резерву NAD^+ , надмірного полі(АДФ-рибозилування) білків, енергетичного дефіциту та активації ПАРП-1-залежних шляхів клітинної загибелі. Водночас нерепаровані ОР ДНК під час реплікації можуть перетворюватися на дволанцюгові розриви. Це особливо критично для імунокомпетентних клітин (лімфоцити, макрофаги), де посилене утворення АФК під час імунної активації підвищує рівень ушкоджень ДНК і впливає на їхню проліферацію та функціональну активність, а також для оваріальних клітин (ооцити, гранульозні клітини), де накопичення пошкоджень ДНК асоційоване зі зниженням якості ооцитів, прискореним старінням яєчників і передчасною оваріальною недостатністю (Bednarski & Sleckman, 2019; Liang et al., 2023; Ahmed et al., 2024).

Дволанцюгові розриви ДНК (ДР) належать до найбільш небезпечних ушкоджень геному, оскільки вони можуть призводити до втрати генетичної інформації, хромосомних перебудов та клітинної загибелі (Qin et al., 2023; Li et al., 2023). Такі розриви можуть виникати внаслідок ендогенних факторів (АФК, що генеруються під час клітинного метаболізму, колапсу реплікаційних вилок та помилок репарації) або екзогенних чинників (іонізуюче випромінювання або хіміотерапевтичні препарати). Основними механізмами репарації ДР ДНК є гомологічна рекомбінація (HR) та негомологічне з'єднання кінців (NHEJ). Гомологічна рекомбінація є високоточною системою відновлення ДНК, що використовує непошкоджену сестринську хроматиду як

матрицю для точного відновлення генетичної послідовності та переважно функціонує у S- і G2-фазах клітинного циклу. Натомість негомологічне з'єднання кінців є швидшим, але менш точним механізмом, який безпосередньо з'єднує розірвані кінці ДНК і може працювати в різних фазах клітинного циклу, включаючи непроліферуючі клітини (Blackford & Jackson, 2017; Nastasi et al., 2020; Hou et al., 2024). Цей механізм переважно активний у фазі G1 клітинного циклу та може супроводжуватися невеликими делеціями або вставками нуклеотидів у місці репарації. Отже, система відповіді на ушкодження ДНК забезпечує розпізнавання пошкоджень, активацію механізмів репарації та підтримання геномної стабільності клітини (Blackford & Jackson, 2017; Stixová et al., 2024).

Порушення цих механізмів репарації ДНК асоціюється з розвитком різних патологічних станів, включаючи неврологічні та імунні порушення, підвищену чутливість до радіації, передчасне старіння та онкологічні захворювання (Bednarski & Sleckman, 2019; Ropert et al., 2024; Qin et al., 2023; Li et al., 2025). У разі неможливості ефективної репарації ушкоджень ДНК активуються програми клітинної загибелі або клітинної сенесценції, які запобігають накопиченню геномної нестабільності (Carusillo & Mussolino, 2020; Qin et al., 2023).

Важливе значення має ефективність механізмів репарації ДНК для клітин імунної та репродуктивної систем, оскільки їхня функціональна активність пов'язана з посиленням утворення АФК та чутливістю до порушення редокс-балансу. Активація імунних клітин супроводжується підвищеною генерацією реактивних форм кисню та азоту, які можуть ушкоджувати геном як самих імунокомпетентних клітин, так і клітин тканин-мішеней. У яєчнику накопичення ушкоджень ДНК у гранульозних клітинах і ооцитах асоціюється зі зниженням якості ооцитів, порушенням мейотичного дозрівання та прискореним виснаженням оваріального резерву. Саме тому

ефективність систем репарації ДНК розглядається як один із ключових факторів підтримання репродуктивного потенціалу та функціональної активності імунної системи (Caldecott, 2024; Xu et al., 2024).

Таким чином, типи ушкоджень ДНК та ефективність механізмів їх репарації мають важливе значення для підтримання функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин. Особливе значення за умов імуноопосередкованого ушкодження має оксидативний стрес, який супроводжується надмірною генерацією АФК під час активації імунної відповіді та здатний індукувати як одноланцюгові, так і дволанцюгові розриви ДНК. У наступному підрозділі буде розглянуто оксидативний та генотоксичний стрес як головні чинники ушкодження ДНК.

1.2.3. Механізми ушкодження ДНК за умов оксидативного та генотоксичного стресу

Оксидативний і генотоксичний стрес є важливими чинниками ушкодження ДНК в імунокомпетентних та оваріальних клітинах. Вони активують механізми відповіді на пошкодження ДНК, які включають репарацію та програмовані форми клітинної загибелі. У результаті порушується функціональний стан клітин, змінюється імунна відповідь і знижується репродуктивний потенціал.

Підвищене утворення АФК в імунокомпетентних клітинах, особливо макрофагах та інших фагоцитах, є фізіологічним компонентом протимікробного захисту, однак за умов надмірної або тривалої активації воно посилює запальну реакцію і сприяє ушкодженню ДНК. В оваріальних клітинах (гранульозних, тека-клітинах, ооцитах) надлишок АФК асоційований з порушенням проліферації, індукцією апоптозу та зниженням фертильності (Agarwal et al., 2012; Begum, 2025; Voros et al., 2025). У фізіологічних умовах

АФК виконують регуляторну функцію як вторинні месенджери, проте їх надмірна продукція під впливом екзогенних або ендогенних чинників призводить до розвитку генотоксичного стресу (Hong et al., 2024; Christmann & Kaina, 2013; Li et al., 2025).

АФК, а саме супероксид-аніон ($O_2^{\bullet-}$), гідроген пероксид (H_2O_2) та гідроксильний радикал ($\bullet OH$) є ключовими медіаторами розвитку оксидативного стресу. Вони безпосередньо ушкоджують ДНК, спричиняючи переважно одноланцюгові розриви (ОР), рідше дволанцюгові розриви (ДР). Під час імунної відповіді АФК продукуються ферментами, такими як НАДФН-оксидази, ксантиноксидаза та циклооксигенази, які присутні у макрофагах, нейтрофілах та інших імунокомпетентних клітинах. АФК, як високо реактивні молекули, мають високу реакційну здатність і пошкоджують не тільки ДНК, але й білки, ліпіди та інші молекули клітини (Forrester et al., 2018; Li et al., 2016).

АФК ініціюють ПОЛ, відщеплюючи атом водню від ненасичених жирних кислот у складі мембранних фосфоліпідів. Це призводить до утворення ліпідних радикалів і пероксирадикалів, які запускають ланцюгову реакцію, руйнують структуру клітинних мембран і знижують їхню селективну проникність. Продукти ПОЛ, зокрема малондіальдегід (MDA) і 4-гідрокси-2-ноненал (4-HNE), а також гідропероксили ліпідів мають високу реакційну здатність. Вони безпосередньо ушкоджують ДНК, (викликаючи модифікації основ, мутації) та білки (індукують окисну модифікацію, зшивки та агрегацію). Водорозчинні альдегіди (MDA, 4-HNE) дифундують у цитозоль, посилюючи пошкодження клітинних структур і сприяючи апоптозу (Ayala et al., 2014; Chandimali et al., 2025; Zhao et al., 2025).

Окрім утворення розривів ДНК, АФК можуть спричиняти окисні модифікації азотистих основ і дезоксирибозного остова. Одним із найпоширеніших продуктів такого ушкодження є 8-оксо-2'-деоксигуанозин

(8-oxo-dG), що утворюється внаслідок окиснення гуаніну гідроксильним радикалом. Ця модифікація порушує правильне спарювання основ під час реплікації ДНК і може призводити до мутацій типу G→T. Крім того, АФК індують утворення апуринових/апиримідинових (AP) сайтів та окисні модифікації тиміну і цитозину, що порушує стабільність подвійної спіралі ДНК і може блокувати процеси транскрипції та реплікації (Li et al., 2023; Caldecott, 2024; Ayna et al., 2025). Важливу роль у розвитку генотоксичного стресу відіграють також реактивні форми нітрогену (АФН), зокрема оксид азоту (NO) та пероксинітрит (ONOO⁻), який утворюється при взаємодії NO із супероксид-аніоном. Пероксинітрит є високореактивною сполукою, здатною нітрувати азотисті основи ДНК, індукувати розриви її ланцюгів і модифікувати білки, що беруть участь у процесах репарації. У клітинах імунної системи значні кількості NO синтезуються індукцйбельною NO-синтазою (iNOS) під час запальної відповіді, що додатково посилює генотоксичний вплив оксидативного стресу. Поєднана дія АФК і АФН призводить до формування складних ушкоджень ДНК, які важче піддаються репарації та можуть активувати клітинну загибель або клітинну сенесценцію (Forrester et al., 2018; Ayna et al., 2025; Krych et al., 2026).

Оксидативний стрес, викликаний накопиченням АФК в яєчниках, є ключовим чинником ушкодження клітин і тканин, що негативно впливає на фертильність жінок. Підвищений синтез АФК під час запальних процесів, зокрема при активації макрофагів ліпополісахаридами, супроводжується інтенсифікацією ПОЛ, що відображається зростанням рівня малондіальдегіду. Це підтримує запалення, сприяє фібротичним змінам строми та загибелі клітин гранульози, що може супроводжуватися зниженням репродуктивного потенціалу (Agarwal et al., 2012; Liang et al., 2023; Zhao et al., 2025; Su et al., 2024).

Генотоксичний стрес, що виникає з різних джерел навколишнього середовища та ендогенних клітинних процесів, становить постійну загрозу для геномної стабільності. Клітини виробили складні механізми для виявлення та відновлення пошкоджень ДНК, активуючи відповідь на генотоксичний стрес для захисту цілісності геному. Генотоксичний стрес, індукований АФК та реактивними формами нітрогену (АФН), є одним із механізмів ушкодження ДНК, що виникає внаслідок окисного стресу. АФК, такі як супероксид-аніон, пероксид водню та гідроксильний радикал, а також АФН (зокрема пероксинітрит) безпосередньо взаємодіють з нуклеотидами ДНК, викликаючи окиснення основ, зокрема утворення 8-оксо-2'-деоксигуанозину (8-охо-dG), який може призводити до мутацій під час реплікації ДНК. Крім того, надмірна продукція АФК та АФН спричиняє одно- та дволанцюгові розриви ДНК, а також формування апуринових/апиримідинових сайтів. Ці ушкодження активують систему відповіді на пошкодження ДНК, включаючи кінази ATM/ATR, які стабілізують p53, і запускають зупинку клітинного циклу, репарацію або апоптоз для запобігання мутагенезу. За умов хронічного запалення або онкогенезу регуляція відповіді на пошкодження ДНК часто порушується, що сприяє накопиченню мутацій і геномній нестабільності (Bednarski & Sleckman, 2019; Li et al., 2025; Zhao et al., 2025).

В імунокомпетентних клітинах генотоксичний стрес супроводжується зниженням проліферативної активності та ефекторних функцій. Під дією АФК відбувається активація сигнальних кіназ ATM/ATR, що стабілізує білок p53 і призводить до зупинки клітинного циклу або активації апоптозу (Bednarski & Sleckman, 2019). Водночас у макрофагах і дендритних клітинах генотоксичний стрес змінює профіль секреції цитокінів, посилює прозапальні сигнали, підтримує хронічне запалення, але знижує здатність до ефективної антигенної презентації. Це створює порочне коло, де пошкодження ДНК послаблює імунну відповідь, сприяючи хронічному запаленню в тканинах, включаючи

яєчники, і потенційно підвищуючи ризик аутоімунних розладів або онкогенезу (Christmann & Kaina, 2013; Blackford & Jackson, 2017). Генотоксичний стрес, зумовлений ушкодженням ДНК, безпосередньо впливає на ооцити та гранульозні клітини. Він індукує апоптоз через мітохондріальний і рецептор-опосередкований шляхи: активація Вах призводить до втрати мембранного потенціалу мітохондрій, вивільнення цитохрому с та активації каспаз-9 і -3; рецепторний шлях за участю Fas і TNFR1 через FADD активує каспазу-8, яка запускає ефекторні каспази-3 і -7 та ДНК-азу CAD. Пошкоджена ДНК активує шляхи відповіді на пошкодження (DDR), порушує активність MPF та взаємодію ооцитів з клітинами кумулюсу, затримуючи дозрівання ооцитів. Надлишок АФК погіршує якість ооцитів, зменшує кількість фолікулів і знижує ймовірність настання вагітності. Дослідження підтверджують роль оксидативного та генотоксичного стресу в зниженні фертильності за хронічного запалення, підкреслюючи потребу в пошуку антиоксидантних стратегій (Carroll & Marangos, 2013; Xu et al., 2024; Zhao et al., 2025; Ameho & Klutstein, 2025).

Таким чином, оксидативний і генотоксичний стрес, спричинений АФК, є головними факторами ушкодження ДНК, що порушують функціональність імунокомпетентних та оваріальних клітин і сприяють розвитку імуноопосередкованих уражень та репродуктивних розладів.

1.2.4. Типи клітинної загибелі імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов надмірної імунної активації

Клітинна загибель – це універсальний біологічний процес, що виконує подвійну роль: з одного боку, забезпечує фізіологічні механізми підтримання гомеостазу, селекцію лімфоцитів та регуляцію імунної відповіді, а з іншого – бере участь у патогенезі імуноопосередкованих захворювань, дегенерації та

хронічного запалення. Загибель клітин може мати ознаки регульованої або нерегульованої клітинної смерті, які принципово відрізняються за молекулярними механізмами та наслідками для тканин. У імунній системі регульовані форми клітинної загибелі беруть участь у формуванні антиген-специфічної відповіді, що супроводжується проліферацією Т- і В-лімфоцитів, а також забезпечують елімінацію надлишкових або неспецифічно активованих клітин. Така селективна загибель є ключовим механізмом підтримання імунологічної толерантності, оскільки сприяє видаленню аутореактивних лімфоцитів, здатних ініціювати аутоімунну відповідь. Крім того, контрольована клітинна загибель обмежує надмірну активацію імунної системи, запобігаючи хронічному запаленню та тканинному ушкодженню (Lee et al., 2023; Newton et al., 2024; Patton et al., 2025).

У яєчниках також клітинна загибель відіграє ключову роль у регуляції фізіологічної атрезії фолікулів і підтриманні оваріального резерву. Програмоване видалення більшості примордіальних і зростаючих фолікулів забезпечує селекцію ооцитів із найвищим функціональним потенціалом для подальшого дозрівання та овуляції. Водночас надмірна або патологічна активація механізмів клітинної загибелі призводить до втрати ооцитів, дисфункції гранульозних клітин, фіброзних змін у стромі яєчника та, як наслідок, до зниження фертильності (Stringer et al., 2023). Особливого значення ці процеси набувають за умов надмірної імунної активації та оксидативного стресу, коли посилення сигнальних шляхів клітинної загибелі в ооцитах і клітинах їх мікрооточення порушує оваріальний цикл та сприяє розвитку патологічних станів, зокрема синдрому полікістозних яєчників.

До регульованих форм клітинної загибелі належать апоптоз, піроптоз, фероптоз та некроптоз, кожна з яких характеризується специфічними молекулярними механізмами, що визначають функціональний стан імунокомпетентних і оваріальних клітин. Водночас некроз, який традиційно

розглядався як нерегульована форма клітинної загибелі, у сучасній концепції доповнюється регульованими формами некротичної клітинної загибелі, зокрема некроптозом, що має важливе значення за умов імунної активації та тканинного ушкодження (Galluzzi et al., 2018; Dhuriya & Sharma, 2018; Zhang et al., 2022). Аутофагія, хоча переважно розглядається як механізм клітинного виживання та адаптації до стресу, за певних умов може асоціюватися з розвитком залежної від аутофагії клітинної загибелі (Bialik et al., 2018).

Різноманітні форми клітинної загибелі не є ізольованими процесами, а тісно взаємодіють між собою, утворюючи складну, узгоджену систему сигнальних шляхів, які визначають долю клітини за умов стресу. У нормі ці механізми забезпечують фізіологічне оновлення клітинного складу і підтримання тканинного гомеостазу, але при надмірній імунній активації чи вираженому оксидативному стресі їх баланс може зміщуватися до переважання запальних форм клітинної загибелі. Зокрема, некроптоз і піроптоз характеризуються порушенням цілісності клітинної мембрани та вивільненням молекул небезпеки (DAMPs), а піроптоз, крім того, також прозапальних цитокінів, що посилюють імунну відповідь. і можуть сприяти поширенню тканинного ушкодження (Chai et al., 2023; Lin et al., 2025). Така взаємодія між різними формами запрограмованої клітинної загибелі відіграє ключову роль у клітинах імунної та репродуктивної систем, оскільки визначає баланс між ефективною імунною відповіддю та збереженням структурної і функціональної цілісності тканин (Shen et al., 2023; Wu et al., 2025).

Однак, оскільки у нашому дослідженні основна увага приділялася апоптозу та некрозу (як запальній формі клітинної загибелі) як провідним механізмам у імунній та репродуктивній системах, у подальшому ми детальніше розглянемо саме ці дві форми. Некроз характеризується набряком клітин та порушенням цілісності клітинної мембрани з подальшим вивільненням внутрішньоклітинного вмісту, що призводить до активації

запальної відповіді. На відміну від нього, апоптоз є контрольованим енергозалежним процесом, який завершується утворенням апоптотичних тілець та їх фагоцитозом без індукції запалення (Newton et al., 2024; Eskander et al., 2025).

Видалення апоптотичних клітин (ефероцитоз) відбувається у тісному зв'язку з антизапальною відповіддю, адже на ранніх стадіях апоптозу клітини швидко елімінуються фагоцитами, що запобігає виходу внутрішньоклітинних антигенів і вторинному некрозу. Порушення цього механізму здатне провокувати аутоімунні процеси, оскільки імунокомпетентні клітини взаємодіють із власними внутрішньоклітинними антигенами, вивільненими під час недостатнього кліренсу апоптотичних клітин, на які за відсутності толерантності формується патологічна імунна відповідь (Li et al., 2025; Xing et al., 2024). Крім того, ефективний ефероцитоз супроводжується вивільненням протизапальних медіаторів, зокрема IL-10 та TGF- β (трансформуючий фактор росту- β), що сприяє підтриманню імунного гомеостазу та обмеженню запальної відповіді.

Особливо важливою є роль апоптозу у регуляції селекції Т- і В-лімфоцитів. Вилучення аутореактивних або функціонально неповноцінних Т-лімфоцитів відбувається шляхом активаційно-індукованої клітинної загибелі (АІКЗ), важливою молекулярною ланкою якої є експресія рецептора CD95 (Fas) та взаємодія Fas/FasL. АІКЗ Т-лімфоцитів є важливим механізмом регуляції периферичної імунної системи, а їхня доля визначається численними сигналами від антигенів, цитокінів та хемокінів. У здорових людей надмірно активовані або аутореактивні Т-клітини усуваються через Fas/FasL-опосередкований апоптоз. Контроль експресії Fas та FasL є критичним для ефективності АІКЗ. Порушення цього процесу сприяє розвитку аутоімунних захворювань через накопичення аутореактивних клітин (Patton et al., 2025; Arakaki et al., 2014).

Центральне місце у реалізації апоптозу посідають каспази - цистеїн-протеази, які існують у клітині у вигляді неактивних проензимів і після активації поділяються на ініціювальні (8, 9, 10) та ефекторні (3, 6, 7). Важливим результатом їхньої активації є фрагментація ДНК за участю CAD (caspase-activated DNase), що спричинює міжнуклеосомні розриви ДНК і формування характерних фрагментів. Окрім каспазозалежного, описаний і каспазонеалежний шлях апоптозу, який реалізується через вивільнення апоптоз-індукуючого фактора (AIF) із мітохондрій (Prabhu et al., 2013; Dho et al., 2025).

У фізіології імунної та оваріальної систем апоптоз і некроз можуть співіснувати, а перехід від одного механізму клітинної загибелі до іншого часто зумовлений енергетичним дефіцитом або дією певних медіаторів. Наприклад, окис азоту (NO) може інгібувати каспази (зокрема, каспази-3, 8 та 9) шляхом S-нітрозилювання їх цистеїнових залишків, що призводить до пригнічення їхньої протеолітичної активності та гальмування каспазозалежного апоптозу. Цей ефект є оборотним, оскільки система клітинного редокс-контролю, зокрема тіоредоксин, здатна здійснювати денітрозилювання та відновлювати активність каспаз (Chakraborty et al., 2023).

У яєчниках апоптоз гранульозних клітин є основним механізмом фізіологічної атрезії фолікулів та регуляції оваріального резерву. Цей процес бере участь у селекції домінантного фолікула та регуляції активації примордіальних фолікулів. Некроз, на відміну від апоптозу, виникає переважно за умов патологічного впливу токсичних, ішемічних або інфекційних чинників, що ушкоджують тканину яєчника, і супроводжується розвитком локального запалення, яке може знижувати фертильність (Xi et al., 2025; Stringer et al., 2023; Newton et al., 2024).

Таким чином, баланс між апоптозом і некрозом є дуже важливим для підтримання нормального функціонування організму. У імунній системі він

визначає ефективність селекції лімфоцитів і запобігає розвитку автоімунних реакцій, тоді як у репродуктивній системі порушення цього балансу може призводити до ушкодження клітин фолікулярного оточення та зниження оваріального резерву. На відміну від апоптозу, який відбувається без розвитку запальної реакції, некроз супроводжується вивільненням внутрішньоклітинних компонентів (DAMPs) та активацією запальних процесів (Galluzzi et al., 2018). Тому саме пошук способів зменшення некротичної загибелі клітин, з одночасним збереженням фізіологічного апоптозу, має важливе значення для запобігання хронічному запаленню, автоімунним процесам і порушенням репродуктивної функції.

Порушення функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов імунної активації зумовлене складною взаємодією генотоксичного та оксидативного стресу, що супроводжується ушкодженням ДНК і активацією різних типів клітинної загибелі, зокрема апоптозу, некрозу, піроптозу, фероптозу та аутофагії (Galluzzi et al., 2018). Одно- та дволанцюгові розриви ДНК, спричинені зовнішніми чи внутрішніми ушкоджуючими чинниками, порушують цілісність геному, що призводить до зниження функціональної активності клітин. Оксидативний стрес посилює ці процеси, індукуючи запальні реакції та некротичну загибель, що має особливе значення для оваріальної тканини, де втрата гранульозних клітин чи ооцитів може призвести до зменшення оваріального резерву. У той же час, імунокомпетентні клітини, такі як лімфоцити, зазнають змін у селекції та активації, що може сприяти розвитку автоімунних реакцій або хронічного запалення. Отже, баланс між фізіологічним апоптозом і патологічною некротичною загибеллю є ключовим для підтримання гомеостазу імунної системи та яєчника і визначається складними молекулярними механізмами регуляції клітинної смерті.

1.3. Молекулярні механізми імуноопосередкованого ушкодження клітин

1.3.1. Молекулярні механізми ушкодження імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов імунної активації

В основі імуноопосередкованих захворювань лежить порушення гомеостатичних механізмів регуляції імунної системи. Одним із ключових механізмів є підтримання збалансованого співвідношення між проліферацією, диференціюванням і загибеллю імунокомпетентних клітин. На різних етапах захисної реакції організму відбувається інтенсивна проліферація клітин, що забезпечують як неспецифічний, так і антиген-специфічний імунний захист. Одночасно активуються механізми елімінації аутореактивних або функціонально неповноцінних клітин. Завершення імунної відповіді супроводжується посиленою елімінацією надлишкових активованих клітин-ефекторів запалення, що призводить до переважання клітинної загибелі над проліферацією. У разі порушення регуляторних механізмів життєздатності та загибелі імунокомпетентних клітин можуть виникати аутоімунні стани (Hu et al., 2024; Arneth, 2025).

Активация імунної відповіді є фізіологічним процесом, що забезпечує підтримання гомеостазу організму, зокрема через регуляцію функціонального стану імунокомпетентних клітин і тканин яєчника. Імунні клітини, включаючи макрофаги, дендритні клітини та Т-лімфоцити, беруть активну участь у регуляції фолікулярного розвитку, гормональної регуляції та процесів овуляції. Їхня присутність у мікрооточенні яєчника визначає чутливість оваріальних клітин до дії цитокінів та факторів росту, що необхідні для проліферації, диференціювання й виживання гранульозних клітин та ооцитів (Bazzano et al., 2024; Zhou et al., 2024). У яєчниках клітинна загибель є ключовим елементом фізіологічної атрезії фолікулів, що підтримує

оваріальний резерв і забезпечує природний відбір ооцитів хорошої якості. Надмірна активація шляхів клітинної загибелі може призводити до втрати ооцитів, дисфункції гранульозних клітин і зниження фертильності (Stringer et al., 2023).

Надмірна або тривала імунна активація, викликана дією бактеріальних компонентів (наприклад, ліпополісахариду, ЛПС), полівалентних антигенів або хронічного стресу, здатна ініціювати каскад молекулярних змін, що призводять до ушкодження клітин. Зокрема, ЛПС активує TLR4-залежні сигнальні шляхи, що супроводжується індукцією секреції прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-6, IL-1 β), підвищенням рівнів активних форм кисню (АФК), ушкодженням ДНК та активацією програм клітинної загибелі, таких як апоптоз і некроз. У сукупності ці процеси негативно впливають на життєздатність і функцію як імунокомпетентних, так і оваріальних клітин, зокрема гранульозних клітин, тека-клітин та ооцитів (Qin et al., 2024; Seo et al., 2022; Shepel et al., 2018).

Центральну роль у цих процесах відіграють молекулярні регулятори, такі як ПАРП-1, HMGB1 та NF- κ B. ПАРП-1 активується у відповідь на ушкодження ДНК і бере участь у регуляції процесів репарації ДНК та енергетичного метаболізму клітини, тоді як HMGB1, вивільняючись із некротично ушкоджених клітин, виконує функцію молекули небезпеки (DAMP), посилюючи запальні сигнали через рецептори, такі як TLR4. Транскрипційний фактор NF- κ B регулює транскрипцію прозапальних генів, що впливають на проліферацію та виживання клітин (Pazzaglia & Pioli, 2019; Chen et al., 2022; Lawrence, 2009). У результаті порушується гомеостатична регуляція імунної відповіді, що сприяє дисфункції імунокомпетентних клітин та може супроводжуватися зменшенням оваріального резерву внаслідок апоптозу або некрозу клітин фолікулярного оточення.

Таким чином, тривала або надмірна активація імунної відповіді супроводжується залученням внутрішньоклітинних сенсорних систем і сигнальних каскадів, що визначають вибір шляхів клітинної загибелі. Центральне значення у цих процесах мають оксидативний стрес та ушкодження ДНК, які ініціюють каскад молекулярних змін у клітинах. Це призводить до зміщення рівноваги між апоптозом, некрозом та іншими формами клітинної загибелі, що зрештою спричиняє ушкодження як імунокомпетентних, так і оваріальних клітин. У наступних підрозділах буде детальніше розглянуто роль основних молекулярних регуляторів, таких як ПАРП-1, HMGB1, NF-κB та прозапальних цитокінів у реалізації цих процесів.

1.3.2. Полі(АДФ-рибозо)полімераза-1: роль у відповіді на ушкодження ДНК та регуляції імунної активації

ПАРП-1 є найбільш поширеною і добре охарактеризованою ізоформою родини ПАРП ферментів, які каталізують полі(АДФ-рибозилування) білків, використовуючи NAD⁺ як субстрат. ПАРП-1 локалізується переважно у ядрі клітини, де виконує функції сенсора ушкоджень ДНК, ініціюючи сигнальні каскади, що підтримують стабільність геному та беруть участь у епігенетичній регуляції. Її активація відбувається у відповідь на одно- та дволанцюгові розриви ДНК, що запускає полімеризацію АДФ-рибози та модифікацію ядерних білків, зокрема гістонів і транскрипційних факторів. Це призводить до деконденсації хроматину та забезпечує доступ репараційних комплексів до ушкоджених ділянок ДНК (Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017).

Особливо важлива роль ПАРП-1 проявляється у механізмах базової ексцизійної репарації (BER) та репарації одноланцюгових розривів ДНК, що забезпечує усунення одноланцюгових розривів ДНК і пошкоджених азотистих основ. Розпізнавання ушкоджень відбувається за участю ДНК-зв'язувальних

доменів типу «цинкових пальців», після чого активована ПАРП-1 каталізує полі(АДФ-рибозилування) ядерних білків та формує платформи для рекрутування репараційних факторів. У результаті до ділянки ушкодження залучаються ключові компоненти BER-системи, зокрема XRCC1, DNA polymerase β та ДНК-лігаза III, що забезпечує ефективне відновлення структури ДНК. Крім того, ПАРП-1 здатна до автомодифікації шляхом полі(АДФ-рибозилування), що супроводжується утворенням негативно заряджених полі(АДФ-рибозних) ланцюгів. Це сприяє від'єднанню ферменту від ушкодженої ділянки ДНК та забезпечує своєчасне завершення репараційного процесу, запобігаючи надмірному споживанню клітинного NAD^+ (Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017; Spiegel et al., 2021).

Крім участі у репарації ДНК, ПАРП-1 також відіграє важливу роль у регуляції структури хроматину та транскрипції генів. Полі(АДФ-рибозилування) гістонів і інших білків, асоційованих з хроматином, призводить до послаблення міжнуклеосомних взаємодій і сприяє ремоделюванню хроматину, що полегшує доступ транскрипційних факторів до ДНК. Завдяки цьому ПАРП-1 бере участь у регуляції експресії генів, пов'язаних із клітинним циклом, реакцією на стрес та запальними процесами. Фермент безпосередньо взаємодіє з низкою ключових транскрипційних регуляторів, зокрема NF- κB , AP-1 та p53, модулюючи їхню активність і координуючи клітинну відповідь на генотоксичні та запальні сигнали (Zong et al., 2022; Lu et al., 2024).

За умов надмірної імунної активації, зокрема при оксидативному чи нітрозативному стресі, ПАРП-1 може переходити від цитопротективної ролі до цитотоксичної. Надмірна активація ферменту призводить до масового споживання NAD^+ і виснаження внутрішньоклітинних запасів АТФ, що порушує енергетичний гомеостаз клітини та зміщує баланс клітинної загибелі у бік некротичних або каспаз-незалежних форм. Однією зі специфічних

ПАРП-1-залежних форм клітинної загибелі є партанатоз, який реалізується через сигнальний шлях ПАРП-1–AIF (apoptosis-inducing factor) та належить до каспаз-незалежних форм загибелі клітин. Його розвиток пов'язаний із гіперактивацією ПАРП-1 та подальшою транслокацією AIF із мітохондрій у ядро, що супроводжується фрагментацією ДНК (Wang et al., 2011; Huang et al., 2022). Такий механізм може мати особливе значення для імунокомпетентних (Т-лімфоцитів, макрофагів) та оваріальних клітин (гранульозних клітин, ооцитів), оскільки їх життєздатність значною мірою залежить від збереження енергетичного балансу клітини та геномної стабільності.

Крім того, ПАРП-1 бере участь у регуляції запальних процесів, впливаючи на транскрипцію генів через коактивацію транскрипційного фактора NF- κ B, що посилює експресію прозапальних медіаторів (TNF- α , IL-6, ICAM-1, iNOS) (Ray Chaudhuri & Nussenzweig, 2017; Rosado et al., 2013). ПАРП-1 не лише коактивує NF- κ B, а й виступає як хроматин-ремоделюючий фактор, що визначає доступність промоторних ділянок для транскрипції NF- κ B-залежних генів. Встановлено, що ПАРП-1 безпосередньо взаємодіє з p65 (RelA)-субодиницею NF- κ B і функціонує як транскрипційний коактиватор, сприяючи ацетилюванню гістонів та ремоделюванню хроматину, що забезпечує доступ транскрипційного комплексу до промоторів запальних генів. У результаті посилюється експресія прозапальних цитокінів і хемокінів, зокрема IL-1 β , які визначають інтенсивність клітинної інфільтрації у вогнище ушкодження. В умовах оваріального мікрооточення це має особливе значення, оскільки дисбаланс цитокінів, може бути асоційований з накопиченням ушкоджень ДНК та зниженням функціональної компетентності ооцитів, і, як наслідок, може порушувати стероїдогенез у гранульозних клітинах, індукувати апоптоз ооцитів та сприяти прогресуючому виснаженню оваріального резерву (Qin et al., 2024; Liang et al., 2023). Крім того, у ПАРП-1-нокаутних моделях спостерігається зниження запальних ускладнень, зокрема

через зменшення транскрипції NF-κB-залежних генів, таких як iNOS, що підтверджує ключову роль ПАРП-1 у підтриманні хронічного запалення (Rosado et al., 2013).

Отже, ПАРП-1 виступає центральною молекулярною ланкою регуляції клітинної відповіді на ушкодження ДНК та запальні сигнали. За фізіологічних умов цей фермент забезпечує підтримання стабільності геному, ефективність репараційних механізмів і транскрипційну регуляцію. Водночас при надмірній імунній активації, зокрема під впливом оксидативного та нітрозативного стресу, ПАРП-1 сприяє виснаженню клітинних запасів NAD⁺ та АТФ, що призводить до порушення енергетичного гомеостазу, зміщення балансу клітинної загибелі у бік некротичних і каспаз-незалежних форм та посилення запальної відповіді. Некротична загибель, індукована ПАРП-1, супроводжується вивільненням молекул небезпеки (DAMPs), серед яких важливу роль відіграє ядерний білок HMGB1 (Ditsworth et al., 2007). Його вивільнення у позаклітинний простір не лише виступає сигналом пошкодження, а й посилює імунну активацію через взаємодію з TLR4 та RAGE, стимулюючи подальший розвиток запальної відповіді. Таким чином, ПАРП-1-опосередковані механізми клітинної загибелі тісно пов'язані з активацією запальних сигнальних шляхів і формуванням порочного кола ушкодження. У зв'язку з цим у наступному підрозділі буде розглянуто роль HMGB1 у некроз-опосередкованому запаленні.

1.3.3. HMGB1 як медіатор запальної відповіді при некротичній загибелі клітин

Запалення та імунну відповідь викликають не тільки антигени та молекулярні патерни мікроорганізмів (PAMPs), а й продукти загибелі власних клітин (DAMPs), такі як амфотерин (HMGB1), білки теплового шоку,

калгрануліни, РНК та інші, які діють як аларміни, сигналізуючи про небезпеку. Одним із ключових алармінів є хроматин-асоційований білок HMGB1 (high mobility group box-1, амфотерин), висококонсервативний ДНК-зв'язуючий білок, який може вивільнятися у позаклітинний простір різними типами клітин та виступати важливим медіатором запалення (Andersson et al., 2018; Yang et al., 2020; Vladimirova et al., 2025).

У ядрі клітини HMGB1 виконує низку життєво важливих функцій. Він локалізується переважно в ядрі, де взаємодіє з нуклеосомами, транскрипційними факторами та гістонами, сприяючи ремоделюванню хроматину, репарації та рекомбінації ДНК, а також регуляції транскрипції генів (Kang et al., 2014). За умов посттрансляційних модифікацій, зокрема ацетилювання, фосфорилювання або метилювання, HMGB1 переміщується з ядра в цитозоль, а надалі може вивільнятися у позаклітинний простір, що є ключовим етапом розвитку запальної відповіді (Chen et al., 2022; Vladimirova et al., 2025).

У фізіологічних умовах HMGB1 регулює адаптивний і вроджений імунітет, сприяючи визріванню дендритних клітин і утворенню високоафінних антитіл. Залежно від редокс-стану (відновлений або дисульфідний), HMGB1 діє як мітоген і хемоатрактант, індукуючи секрецію прозапальних цитокінів (ФНО- α , ІЛ-6) макрофагами або сприяючи регенерації тканин (Bianchi et al., 2017, Andersson et al., 2018). Функціональна активність HMGB1 значною мірою залежить від його посттрансляційних модифікацій та окисно-відновного стану. HMGB1 може виступати пізнім медіатором запалення, оскільки його вивільнення відбувається пізніше, ніж секреція ранніх прозапальних цитокінів, таких як TNF- α та IL-1 β (Yang et al., 2020).

HMGB1 взаємодіє з рецепторами TLR2, TLR4, TLR9 та RAGE на фагоцитах і ендотеліальних клітинах, що призводить до активації NF- κ B і підвищеної експресії прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8),

хемокинів та молекул адгезії (Kang et al., 2014; Yang et al., 2020). Ефекти HMGB1 значною мірою залежать від редокс-стану білка. Надлишок активних форм кисню (АФК), що виникає при оксидативному стресі, може стимулювати вивільнення HMGB1 із клітин та модулювати його біологічну активність, посилюючи прозапальну сигналізацію (Kang et al., 2014). Описано три основні редокс-форми HMGB1, що зумовлюють його функціональні властивості. Повністю відновлений HMGB1 проявляє хемотаксичну активність і сприяє міграції імунних клітин, зокрема через утворення комплексу з хемокином CXCL12 та активацію рецептора CXCR4. Дисульфідна форма HMGB1 має прозапальну дію та індукує NF- κ B-залежну експресію прозапальних цитокінів через TLR4. Повністю окиснений HMGB1 є біологічно інертним, не проявляє цитокінової активності. Таким чином, редокс-стан HMGB1 визначає характер його біологічної активності та участь у регуляції імунної відповіді (Kang et al., 2014; Chen et al., 2022).

HMGB1 функціонує не лише як мітоген і хемоатрактант, а й як потужний імунний ад'ювант. Комплекси амфотерину з одонитковою ДНК, бактеріальним ЛПС чи нуклеосомами стимулюють макрофаги до секреції TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, MIP-1 α та MIP-1 β . Крім того, що він сприяє визріванню дендритних клітин і формуванню високоафінних антитіл, що підкреслює його ключову роль у формуванні адаптивної імунної відповіді (Bianchi et al., 2017). Механізми вивільнення HMGB1 залежать від типу клітинної загибелі. При некрозі або некроптозі він пасивно вивільняється з ушкоджених клітин, після чого у позаклітинному просторі взаємодіє з рецепторами TLR2, TLR4, TLR9 і RAGE, активуючи моноцити, макрофаги та ендотеліальні клітини й запускаючи механізм запальних реакцій. Разом з тим активовані клітини вродженого імунітету (макрофаги, моноцити, дендритні клітини) можуть активно секретувати HMGB1 через секреторні лізосоми або екзосоми після посттрансляційних модифікацій білка (Chen et al., 2022).

HMGB1 виступає не лише DAMP-медіатором, але й активує NF- κ B-залежні сигнальні шляхи через взаємодію з рецепторами TLR4 та RAGE на поверхні імунних клітин. Це призводить до підвищеної продукції прозапальних цитокінів TNF- α , IL-1 β та IL-6, а також до індукції експресії молекул адгезії та ферментів iNOS і COX-2 (Kang et al., 2014). Тому HMGB1 вважають не лише аларміном, але й ключовим підсилювачем тривалого запалення, особливо у хронічних патологіях, де його рівень залишається підвищеним.

Амфотерин задіяний в патогенезі багатьох хронічних запальних та аутоімунних захворювань, зокрема сепсису, ревматоїдного артриту, атеросклерозу, хронічних захворювань нирок, системного червоного вовчака, коліту, аутоімунного тиреоїдиту, гострого респіраторного дистрес-синдрому, нейродегенеративних хвороб та синдрому полікістозних яєчників (Kang et al., 2014; Bangert et al., 2016; Andersson et al., 2018). Показано, що при багатьох із цих патологій концентрація HMGB1 у крові підвищується, а його взаємодія з рецептором RAGE є одним із важливих сигнальних механізмів, що підтримують розвиток і прогресування запалення.

З точки зору терапії, HMGB1 вважається перспективною мішенню. Інгібітори його секреції або взаємодії з рецепторами зменшують запальну відповідь і мають протективний ефект у моделях сепсису, ішемії та імуноопосередкованих уражень. Проте потенційне втручання у функції HMGB1 вимагає обережності, оскільки цей білок бере участь не лише у розвитку запалення, але й у процесах репарації та регенерації тканин. Баланс між його прозапальною та відновлювальною активністю значною мірою визначається окисно-відновним статусом клітин і тканин (Andersson et al., 2018; Yang et al., 2020). Таким чином, HMGB1 виступає універсальним медіатором, що поєднує механізми некротичної клітинної загибелі з активацією запальних сигнальних шляхів і формуванням хронічного

запалення. Його функціональна активність визначається посттрансляційними модифікаціями та редокс-станом клітини, що зумовлює подвійний характер його дії від участі у регенерації тканин до індукції імунopatологічних процесів.

Взаємодія HMGB1 та NF-κB формує самопідтримуване «порочне коло» запалення: активація NF-κB стимулює секрецію HMGB1, який, у свою чергу, посилює NF-κB-залежну транскрипцію прозапальних генів. Надмірна активація цього шляху лежить в основі розвитку хронічного запалення та імунітопосередкованого ушкодження тканин.

1.3.4. NF-κB: роль у регуляції імунної відповіді та клітинної активації

Ядерний фактор каппа κB (NF-κB) - це сімейство транскрипційних факторів (RelA/p65, RelB, c-Rel, p50/NFκB1, p52/NFκB2), яке інтегрує сигнали від рецепторів вродженого та адаптивного імунітету й координує експресію генів, відповідальних за запалення, виживання клітин, міграцію та диференціювання імунних клітин (Т- і В-лімфоцитів, макрофагів, дендритних клітин). У фізіологічних умовах NF-κB підтримує імунний гомеостаз, регулюючи прозапальні та антиапоптотичні програми в імунних клітинах. Окрім участі у запаленні, сигнальний шлях NF-κB також залучений до формування центральної й периферичної імунної толерантності, включаючи процеси Т- і В-клітинної селекції, функціонування регуляторних Т-клітин (Treg) та AIRE-залежні механізми (Barnabei et al., 2021)

NF-κB є ключовим регуляторним фактором клітинної відповіді на різноманітні стресові та патогенні сигнали. Його активацію можуть індукувати бактерії, віруси та інші патогени, сигнали PAMP і DAMP (зокрема ліпополісахарид), а також фізичні та метаболічні чинники, такі як ультрафіолетове або іонізуюче випромінювання, температурний стрес,

оксидативний стрес та кристалічні відкладення (холестерин, сечова кислота) (Mussbacher et al., 2023; Barnabei et al., 2021). Завдяки цьому NF-κB бере участь у регуляції запалення, протівірусних реакцій, процесів апоптозу та антиапоптозу, а також у розвитку автоімунних та онкологічних захворювань.

Сімейство NF-κB складається з п'яти білків (p50, p52, RelA/p65, RelB, c-Rel), які утворюють різні димерні комплекси, що активують транскрипцію цільових генів. У неактивному стані ці димери утримуються в цитоплазмі інгібіторними білками IκB. Активація NF-κB відбувається через два основні сигнальні шляхи - канонічний і неканонічний. Канонічний шлях активується цитокінами (TNF-α, IL-1β), сигналами TLR або ліпополісахаридом і включає фосфорилування IκBα комплексом IKK, його убіквітинацію та протеасомну деградацію, що супроводжується транслокацією димерів p65/p50 у ядро і активацією транскрипції прозапальних генів, таких як TNF-α, IL-6, IL-1β, iNOS та ICAM-1. Неканонічний шлях активується рецепторами надродини TNFR (BAFF-R, CD40), опосередковується кіназою NIK, яка забезпечує процесинг p100 до p52 і формування димерів p52/RelB, що регулюють розвиток імунних клітин і підтримують тривалу імунну активацію. Убіквітин-залежні модифікації (зокрема K63- та K48-ланцюги) визначають силу й тривалість NF-κB-залежної відповіді, що має важливе значення для регуляції запальних реакцій у макрофагах і Т-лімфоцитах (Trares et al., 2022; Guldenpfennig et al., 2023).

Активація NF-κB призводить до підвищення експресії прозапальних цитокінів, таких як TNF-α, IL-1β, IL-6, хемокінів - CCL2, CXCL8, молекул клітинної адгезії - ICAM-1, VCAM-1, ферментів-ефекторів - iNOS, COX-2, а також антиапоптичних білків - BCL-2, BCL-XL, c-IAPs. Це визначає подвійну роль NF-κB, з одного боку він підтримує запалення та проліферацію імунних клітин, а з іншого - сприяє цитопротекції та підтриманню виживання клітин.

Дисбаланс цих програм може призводити до хронізації запальної відповіді (Lawrence, 2009; Mussbacher et al., 2023).

Важливим модулятором NF-κB є ПАРП-1, який функціонує як транскрипційний коактиватор. ПАРП-1 безпосередньо взаємодіє з субодиницями NF-κB p50 та p65, рекрутує коактиватори, зокрема p300 та шляхом полі(АДФ-рибозилування) подовжує ядерну локалізацію RelA, підтримуючи експресію прозапальних генів TNF-α, IL-6 та iNOS. Крім того, ПАРП-1 також модифікує HMGB1 шляхом полі(АДФ-рибозилування), що сприяє його транслокації з ядра в цитоплазму та посиленню DAMP-сигналів, які активують NF-κB-опосередковані прозапальні сигнальні шляхи (Fehr et al., 2020; Chen et al., 2022).

Усі члени сімейства NF-κB експресуються в макрофагах і моноцитах, з переважанням комплексів RelA/p50. У цих клітинах NF-κB регулює поляризацію макрофагів (M1 ↔ M2), праймування інфламасоми NLRP3, секрецію прозапальних цитокінів IL-1β та IL-18, а також метаболічні перебудови, що визначають характер і інтенсивність запальної відповіді (Mussbacher et al., 2023). У Т-лімфоцитах NF-κB контролює активацію через сигнальні комплекси TCR/CD28, диференціювання Th-субпопуляцій і формування імунологічної пам'яті. У В-лімфоцитах він регулює виживання клітин, класове переключення імуноглобулінів та організацію гермінативних центрів (Guldenpfennig et al., 2023). У регуляторних Т-клітинах (Treg) NF-κB, зокрема субодиниця c-Rel, підтримує експресію транскрипційного фактора FOXP3 і формування їх супресивного фенотипу (Hövelmeyer et al., 2022). Окрім індукції запалення, NF-κB також бере участь у формуванні імунної толерантності. Порушення NF-κB-залежних механізмів регуляції (зокрема Treg та AIRE-залежних процесів) може сприяти розвитку автоімунних захворювань (Barnabei et al., 2021).

Роль NF-κB у печінці також є багатогранною. У фізіологічних умовах він сприяє виживанню гепатоцитів через транскрипцію антиапоптотичних генів (BCL-2, BCL-XL), але в умовах імунної активації, зокрема в моделі КонА-індукованого гепатиту, активує прозапальні гени в клітинах Купфера та макрофагах, посилюючи запальну відповідь (AboElnazar et al., 2020).

В результаті участі NF-κB у регуляції запальних реакцій цей сигнальний шлях розглядається як важлива терапевтична мішень при запальних та автоімунних захворюваннях. Фармакологічна модуляція активності NF-κB може знижувати інтенсивність патологічного запалення однак потребує збереження функціонування імунної системи в нормі, що робить його перспективною терапевтичною мішенню при хронічних запальних і автоімунних захворюваннях (Zinatizadeh et al., 2020; Yu et al., 2020).

Таким чином, NF-κB виступає центральним регулятором, що інтегрує сигнали від рецепторів вродженого та адаптивного імунітету і координує експресію широкого спектра генів, визначаючи баланс між активацією та толерантністю імунної системи. Його здатність координувати як гостру запальну відповідь, так і хронічні імунопатологічні процеси підкреслює фундаментальну роль цього фактору у формуванні мікрооточення імунокомпетентних та тканинно-специфічних клітин. Активація NF-κB тісно пов'язана з механізмами клітинної загибелі та сигналами небезпеки (DAMPs), формуючи самопідтримувані запальні каскади, що лежать в основі імуноопосередкованого ушкодження тканин. Ефекти NF-κB значною мірою реалізуються через регуляцію продукції ключових прозапальних цитокінів, зокрема TNF-α, IL-6 та IFN-γ, роль яких буде розглянуто у наступному розділі.

1.3.5. TNF- α , IL-6 та IFN- γ як ключові медіатори імунної активації та клітинного ушкодження

Прозапальні цитокіни відіграють центральну роль у регуляції імунної відповіді через активацію сигнальних шляхів, таких як NF- κ B, MAPK та JAK/STAT (Kany et al., 2019; Guo et al., 2024; Ageeva et al., 2024). Серед них найбільш важливим є фактор некрозу пухлин α (TNF- α), інтерлейкін-6 (IL-6) та інтерферон- γ (IFN- γ), які відіграють провідну роль у підтриманні імунних реакцій. В нормі ці молекули беруть участь у регуляції гострої запальної реакції, активації фагоцитів і лімфоцитів, контролі проліферації та апоптозу клітин, а також у формуванні імунологічної пам'яті. Але їхня надмірна або тривала експресія може сприяти розвитку хронічних запальних процесів, аутоімунних захворювань і порушень тканинного гомеостазу (Turner et al., 2014; Kany et al., 2019; Guo et al., 2024). Особливе значення TNF- α , IL-6 та IFN- γ мають у мікрооточенні жіночої репродуктивної системи, де вони впливають на функції макрофагів, гранульозних клітин і ооцитів, визначаючи баланс між фізіологічною імунною активацією та патологічним запаленням, зокрема при ендометріозі або синдромі полікістозних яєчників (Orisaka et al., 2023; Bazzano et al., 2024).

TNF- α активує експресію прозапальних генів через сигнальні шляхи NF- κ B та MAPK, посилює міграцію та накопичення лейкоцитів у зоні запалення, продукцію хемокінів і молекул адгезії. Також він може індукувати апоптоз через активацію каспазного шляху або некроптоз за відповідних умов (Kany et al., 2019; Guo et al., 2024). Ці властивості зумовлюють ключову роль TNF- α у координації гострих запальних процесів та розвитку хронічних патологій, включаючи ревматоїдний артрит, запальні захворювання кишечника та ендометріоз. Взаємодія TNF- α з рецепторами TNFR1 і TNFR2 запускає різні сигнальні шляхи клітинної відповіді, що підкреслює необхідність точної

регуляції активності цього цитокіну (Pesce et al., 2022). У репродуктивній системі TNF- α впливає на процеси фолікулогенезу та овуляції, модулюючи функцію гранульозних клітин (Sedger & McDermott, 2014; Bazzano et al., 2024). IL-6 є плейотропним цитокіном, який бере участь як у регуляції гострої фази запалення, так і в контролі адаптивного імунітету. Він стимулює продукцію білків гострої фази в гепатоцитах, через сигнальний шлях JAK/STAT, сприяє диференціюванню В-клітин у плазмочити та впливає на поляризацію CD4⁺ Т-клітин у напрямку Th17 або Tfh. Надмірна продукція IL-6 асоціюється з розвитком хронічних запальних і автоімунних процесів, зокрема ревматоїдного артриту та системного червоного вовчака, а також із розвитком цитокінового шторму. У жіночій репродуктивній системі IL-6 регулює функцію гранульозних клітин і впливає на якість ооцитів, що робить його важливим у дослідженні запальних уражень яєчників (Tanaka et al., 2014).

Інтерферон- γ (IFN- γ), синтезований Т-хелперами 1 (Th1) та NK-клітинами, є ключовим фактором захисту від вірусів і внутрішньоклітинних патогенів. Він активує макрофаги, підвищує експресію молекул МНС I та II, сприяючи презентації антигенів, і модулює Th1-поляризацію через сигнальний шлях STAT1 (Zhu & Zhu, 2020). TNF- α , IL-6 і IFN- γ утворюють взаємопов'язану систему цитокінових сигналів, де TNF- α індукує синтез IL-6, тоді як IFN- γ може модулювати ефекти IL-6 через регуляцію JAK/STAT-шляхів. Порушення рівноваги між цими цитокінами може посилювати запальні процеси в репродуктивній системі. Сучасні методи, такі як мультиплексний аналіз цитокінів та одноклітинне РНК-секвенування, дозволяють детально вивчати їхню роль. Терапевтичні стратегії, включаючи інгібітори TNF- α (адаліумаб) або IL-6 (тоцилізумаб), демонструють ефективність у лікуванні запальних та автоімунних патологій (Tanaka & Kishimoto, 2014). Підвищення рівнів TNF α , IL-6 та IFN- γ є характерною ознакою експериментальних моделей імуноопосередкованого ушкодження,

зокрема при введенні ЛПС або КонА (Seo et al., 2022; Wardi et al., 2018). Це супроводжується активацією NF-κB-залежних сигнальних шляхів та розвитком запального ушкодження тканин (Kostallari et al., 2025; Wardi et al., 2018). Подібні механізми лежать в основі імуноопосередкованих порушень в оваріальній тканині.

Отже, молекулярні механізми функціонування імунокомпетентних та оваріальних клітин при надмірній активації імунної відповіді базуються на взаємопов'язаній активації процесів ушкодження клітин, репарації ДНК за участю ПАРП-1, некроз-опосередкованого запалення через HMGB1, NF-κB-залежної регуляції імунозапальних реакцій та координації імунної відповіді прозапальними цитокінами TNF-α, IL-6 і IFN-γ. Взаємодія цих механізмів формує скоординовану систему імунної регуляції, яка забезпечує баланс між фізіологічною імунною активацією та захистом оваріальних клітин. Разом з тим, порушення цього балансу може призводити до розвитку патологічних станів, зокрема запальних уражень яєчників, ендометріозу чи аутоімунних розладів. Розуміння цих процесів на молекулярному рівні є основою для подальшого дослідження в експериментальних моделях та розробки цілеспрямованих терапевтичних підходів, що буде розглянуто в наступних розділах літературного огляду.

1.4. Експериментальні моделі імуноопосередкованого ушкодження

1.4.1. Імунокомплексні механізми ушкодження за умов імунної відповіді на білкові антигени

Імуноопосередковане ушкодження відіграє суттєву патогенетичну роль у розвитку значної кількості захворювань. Останнім часом відзначається значна поширеність патологічних процесів, що супроводжуються наявністю

імунокомплексного компонента (III тип реакцій гіперчутливості за класифікацією Кумбса і Джелла) при автоімунних, алергічних, запальних та інфекційних захворюваннях (системний червоний вовчак, гломерулонефрити, ревматоїдний артрит, системні васкуліти тощо). Для дослідження патогенетичної ролі імунних комплексів (ІК) розроблено низку експериментальних підходів, зокрема імунізацію тварин алогенними або ксеногенними антигенами, введення готових антитіл або комплексів антиген–антитіло (Чоп'як та ін., 2007; Чоп'як, 2014; Borza et al., 2013).

Формування імунних комплексів є центральним механізмом реакцій гіперчутливості III типу, коли у відповідь на надходження антигену імунна система продукує специфічні антитіла, що взаємодіють з антигенами з утворенням антиген-антитільних комплексів. У нормі ІК швидко елімінуються клітинами системи мононуклеарних фагоцитів. Однак, за умов їх надмірного утворення або порушення кліренсу, такі комплекси можуть тривалий час циркулювати в крові та відкладатися у тканинах або в стінках судин. Це супроводжується активацією клітин вродженого імунітету, зокрема нейтрофілів і макрофагів, активацією системи комплементу та розвитком локальної запальної реакції, що призводить до ушкодження тканин (Mayadas et al., 2009; Sunderkötter, 2023). Відомо, що частота імунокомплексних патологій має певні статеві відмінності. Жінки мають вищу схильність до розвитку імунокомплексних ушкоджень, що пов'язано з генетичними факторами (наявністю імунорегуляторних генів на Х-хромосомі) та впливом естрогенів, які можуть підвищувати активність Т-хелперів і посилювати продукцію цитокінів (Libert et al., 2010).

Для експериментального моделювання імунокомплексного ушкодження широко застосовується модель імунізації лабораторних тварин бичачим сироватковим альбуміном (БСА), що призводить до утворення циркулюючих імунних комплексів (ЦІК). Імунізація БСА індукує гуморальну імунну

відповідь із формуванням специфічних антитіл та утворенням антиген-антитільних комплексів, що дозволяє відтворювати імунокомплексні механізми ушкодження тканин. Спосіб моделювання імунокомплексного ушкодження у мишей описаний у попередніх роботах авторів і запатентований (Макогон та ін., 2014).

Утворені імунні комплекси активують клітини вродженого імунітету, зокрема нейтрофіли, макрофаги і дендритні клітини (Павлович та ін., 2014; Срібна та ін., 2016; Wang et al., 2024), а також систему комплементу, що сприяє розвитку запальної реакції. Активація фагоцитів супроводжується посиленням генерації АФК - цитотоксичних і бактерицидних факторів, які, з одного боку, забезпечують ефективність імунної відповіді, а, з іншого боку, можуть сприяти розвитку оксидативного стресу та хронічного запалення (Павлович та ін., 2014). У сукупності ці процеси можуть призводити до ушкодження різних тканин, включаючи органи імунної та репродуктивної систем. Перевагами БСА-індукованої моделі є її відтворюваність і можливість дослідження системного хронічного імунокомплексного ушкодження, що робить її зручною для дослідження молекулярних механізмів імуноопосередкованого ушкодження (Макогон та ін., 2014; Грушка та ін., 2015).

БСА модель широко застосовується в експериментальній імунопатології для вивчення механізмів імунного запалення в різних органах, зокрема в печінці, нирках, судинах і яєчниках. Утворення ЦІК активує Fcγ-рецептори та класичний шлях комплементу, стимулюючи інфільтрацію нейтрофілів, макрофагів та лімфоцитів, а також підвищуючи продукцію цитокінів (TNF-α, IL-1β, IL-6) і розвиток оксидативного стресу (Павлович та ін., 2014). Клінічна актуальність імунокомплексного ушкодження підтверджується численними дослідженнями репродуктивної системи. При системному червоному вовчаку описано зниження оваріального резерву (за маркерами АМН та AFC), підвищення частоти фолікулярної атрезії та ризику передчасної недостатності

яєчників, що пов'язують із хронічним аутоімунним запаленням та дією прозапальних цитокінів, які можуть спричиняти ушкодження оваріальної тканини (Luo et al., 2020; Han et al., 2024; Xu M et al., 2024).

Експериментальні дослідження також свідчать про порушення функціонального стану оваріальних клітин за умов імунного запалення, що проявляється зниженням рівня антимюлерового гормону (АМН), підвищенням апоптозу гранульозних клітин і розвитком морфологічних ознак оваріального запалення. Підвищення рівнів прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-6) та реактивних форм кисню асоціюється зі змінами гормонального профілю та порушенням овуляції (Luo et al., 2020).

Використання БСА моделі імунокомплексного ушкодження дозволяє також оцінювати можливості фармакологічної корекції імуноопосередкованих процесів. Показано, що застосування антиоксидантних та інших протизапальних агентів може послаблювати прояви імунного запалення та пов'язані з ним порушення функції яєчників (Voznesenskaya et al., 2007). Ці ефекти, ймовірно, реалізуються через зменшення утворення імунних комплексів, пригнічення активації NF- κ B-залежних сигнальних шляхів і зменшення оксидативного стресу, що сприяє зниженню ушкодження тканин. Отже, БСА-індукована модель імунокомплексного ушкодження є ефективним і відтворюваним експериментальним підходом для дослідження системних і органоспецифічних проявів імунного запалення, зокрема його шкідливого впливу на функціональний стан клітин імунної та репродуктивної систем.

1.4.2. Т-клітинно-опосередковані механізми імунного ушкодження печінки

Імуноопосередковане ушкодження печінки – це стан, при якому патологічна імунна відповідь, спричинена вірусами, алкоголем, лікарськими препаратами, хімічними речовинами або імунною дисрегуляцією, призводить до ушкодження печінкової тканини, і за тяжкого перебігу може спричиняти печінкову недостатність внаслідок надмірної активації клітин вродженого і адаптивного імунітету. Серед цих станів аутоімунні ураження печінки, зокрема аутоімунний гепатит (АІГ), первинний біліарний та склерозуючий холангіти, що виникають через порушення імунної толерантності до власних антигенів печінки та активації Т-клітинної імунної відповіді, є найбільш дослідженими (Neumann & Tacke, 2016; Bozward et al., 2025).

АІГ поширений у різних регіонах світу, діагностується частіше у жінок і за відсутності лікування може призводити до розвитку цирозу та печінкової недостатності. Захворюваність і поширеність АІГ демонструють тенденцію до зростання, що пояснюється як покращенням діагностики, так і збільшенням частоти факторів ризику (Reau et al., 2024). Особливо високі показники захворюваності спостерігаються у жінок середнього віку, однак описані випадки розвитку АІГ і серед чоловіків та дітей, що підтверджує мультифакторіальний характер цього захворювання. Порушення імунної толерантності до гепатоцитів пов'язують із взаємодією генетичних чинників, факторів навколишнього середовища та дисрегуляцією клітинної імунної відповіді, однак патогенез залишається недостатньо вивченим (Wang et al., 2012).

Попри наявність різних тваринних моделей, однією з найбільш поширених і добре охарактеризованих є модель ураження печінки, індукована конканаваліном А (Кон А) у мишей, яка відтворює імунопатологічні

механізми Т-клітинного ушкодження печінки, що мають спільні риси з аутоімунним гепатитом людини. Кон А - рослинний лектин, виділений із *Canavalia ensiformis* (квасолі), який здатний поліклонально активувати Т-лімфоцити через зв'язування з манозовмісними глікопротеїнами на їхній поверхні. Це призводить до швидкої активації CD4⁺-Т-клітин та NKT-клітин (натуральних кілерних Т-клітин) і супроводжується масивним вивільненням прозапальних цитокінів, зокрема фактора некрозу пухлини- α (TNF- α), інтерферону- γ (IFN- γ), гранулоцитарно-макрофагального колонієстимулюючого фактора (GM-CSF), інтерлейкіну-2 (IL-2). Унаслідок цього формується потужна запальна відповідь, що характеризується інфільтрацією печінкової тканини імунними клітинами, розвитком цитокін-індукованого запалення, генерацією реактивних форм кисню (АФК) та посиленням оксидативного стресу (Liu et al., 2022; AboElnazar et al., 2020; Nao et al., 2022). Крім того, надмірна продукція цитокінів призводить до розвитку цитокінового шторму, що є ключовим фактором швидкого ушкодження печінкової тканини. Ці процеси супроводжуються ушкодженням гепатоцитів і реалізуються через механізми апоптотичної та некротичної клітинної загибелі, що поєднується з пригніченням антиоксидантних систем клітини та посиленням запальної відповіді.

Модель Кон А була розроблена Тігсом у 1992 році й з того часу широко використовується для вивчення імунозапальних механізмів, включаючи дослідження цитокінових каскадів та молекулярних сигналів ушкодження (Tiegs et al., 1992; Neumann et al., 2015). Важливою перевагою моделі є простота відтворення, а також схожість гістологічних змін, таких як лімфоцитарна інфільтрація, апоптоз і некроз гепатоцитів, і біохімічних маркерів ушкодження печінки, зокрема підвищення активності трансаміназ, що значною мірою відтворює патологічні процеси, які спостерігаються у пацієнтів з аутоімунним гепатитом. Печінка є мішенню для активації Т-

лімфоцитів завдяки специфічній імунологічній мікроструктурі, яка містить велику кількість імунних та інших клітин, залучених до регуляції імунної відповіді, таких як Т-лімфоцити, клітини Купфера, синусоїдальні ендотеліальні клітини та зірчасті клітини, що сприяє реалізації запального процесу. У синусоїдах печінки також міститься значна популяція природних кілерних Т-клітин, дендритних клітин та В-лімфоцитів, які беруть участь у регуляції імунної відповіді та формуванні запального мікрооточення (Wang et al., 2012).

Крім того, Кон А-індукована модель дозволяє детально досліджувати взаємодію клітин вродженого і адаптивного імунітету у розвитку імуноопосередкованого ушкодження печінки. У відповідь на введення Кон А відбувається швидка активація CD4⁺ Т-лімфоцитів, NKT-клітин і клітин Купфера, що супроводжується масивною продукцією прозапальних цитокінів (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) та хемокінів, інфільтрацією печінкової тканини імунними клітинами та розвитком оксидативного стресу. Ці реакції призводять до активації внутрішньоклітинних сигнальних шляхів (зокрема NF- κ B та MAPK), що підсилює запальну відповідь та ушкодження гепатоцитів. У подальшому це супроводжується розвитком запальної відповіді, характерної для Т-клітинно-опосередкованого гепатиту (Neumann & Hamesch, 2015; Liu et al., 2022).

Таким чином, модель Кон А є цінним інструментом для дослідження як патогенетичних механізмів ушкодження печінки, так і можливостей корекції імунозапальної відповіді. Переважна локалізація лімфоцитарної інфільтрації в портальних зонах та інтенсивна активація Т-клітин відображають ключові особливості аутоімунного ураження печінки людини, що обґрунтовує доцільність використання цієї моделі в експериментальних дослідженнях імунопатології печінки. Хоча основною мішенню Кон А є печінка, системна активація Т-клітин та вивільнення прозапальних цитокінів можуть впливати і

на інші органи та тканини, що робить цю модель придатною для дослідження системних ефектів імунної активації. Беручи до уваги обмеження сучасної терапії (глюкокортикостероїди, імуносупресанти), яка супроводжується серйозними побічними ефектами, актуальним є пошук нових цитопротективних та імуномодуючих засобів із більшою безпечністю застосування, для дослідження яких модель Кон А слугує ефективною експериментальною системою.

1.4.3. Механізми активації вродженого імунітету, індуковані ліпополісахаридом

Системне запалення є важливим патогенетичним компонентом багатьох гострих і хронічних захворювань, зокрема сепсису, травматичних ушкоджень, цукрового діабету 2 типу, атеросклерозу та нейродегенеративних хвороб, що асоціюються зі значною захворюваністю та смертністю (Andreasen et al., 2008). Для дослідження механізмів системної запальної відповіді широко використовується експериментальна модель ендотоксемії, у якій ліпополісахарид (ЛПС) грамнегативних бактерій вводять *in vivo* з метою індукції контрольованої активації вродженого імунітету (van Lier et al., 2019; Patel et al., 2015). У людини така модель реалізується шляхом внутрішньовенного введення або інфузії низьких доз очищеного ендотоксину (ЛПС) здоровим добровольцям, що викликає короточасну контрольовану системну запальну реакцію, яка відтворює окремі компоненти запальної відповіді, характерної для сепсису, і дозволяє досліджувати системні імунні, метаболічні та геномні аспекти запальної відповіді організму (Kiers et al., 2017; Patel et al., 2015). Ендотоксемія характеризується гострою системною запальною відповіддю організму на бактеріальний ліпополісахарид, який є основним компонентом зовнішньої мембрани грамнегативних бактерій,

зокрема *Escherichia coli*. Ця модель застосовується для вивчення патогенезу сепсису, ендотоксемічного шоку та ряду хронічних запальних станів, зокрема метаболічного синдрому.

ЛПС взаємодіє з клітинами вродженого імунітету (моноцитами, макрофагами, дендритними клітинами та нейтрофілами) через рецепторний комплекс, що включає ліпополісахарид-зв'язуючий білок (LBP), CD14, MD-2 і толл-подібний рецептор 4 (TLR4). Зв'язування ЛПС із комплексом TLR4/MD-2 спричиняє димеризацію рецептора та активацію двох основних сигнальних шляхів - MyD88-залежного та TRIF-залежного. MyD88-залежний шлях забезпечує швидку активацію транскрипційних факторів NF- κ B і AP-1 та індукцію синтезу прозапальних цитокінів, зокрема TNF- α , IL-6 і IL-1 β та інших медіаторів. TRIF-залежний шлях, навпаки, активує фактор IRF3 і сприяє продукції інтерферонів I типу (IFN- α/β) та хемокінів, зокрема CXCL10, що забезпечує рекрутування додаткових імунних клітин до вогнища запалення (Luo et al., 2025). Крім того, у мишей ЛПС здатний активувати неканонічний інфламасомний шлях через каспазу-11, що призводить до розвитку піроптозу - запальної форми регульованої клітинної загибелі, яка супроводжується активацією газдерміну D, вивільненням прозапальних цитокінів і алармінів та посиленням системної запальної реакції (Chai et al., 2023). Внаслідок цього клітини вродженого імунітету продукують широкий спектр прозапальних медіаторів, включаючи TNF- α , IL-1 β , IL-6, хемокіни, оксид азоту (NO), простагландини та АФК, що спричиняє розвиток системної запальної відповіді, оксидативного стресу та цитокінового шторму. Гіперактивація цих сигнальних шляхів також асоціюється з ушкодженням клітинних структур, зокрема ДНК, що може призводити до порушення клітинної життєздатності. Надмірна продукція цих медіаторів порушує ендотеліальну функцію (збільшення проникності судин, адгезія лейкоцитів), активує коагуляційний каскад (через експресію тканинного фактора) та призводить до

мікроциркуляторних розладів (тромбоз, ішемія тканин), що є ключовими ознаками тяжкого перебігу ендотоксемії та сепсису (Chai et al., 2023; Luo et al., 2025; Roszak et al., 2025).

Модель відтворює як гостре, так і за тривалого або повторного впливу ЛПС тривале запалення та зміни імунної реактивності, пов'язані з імунною активацією. Гостра фаза характеризується швидкою активацією моноцитів і макрофагів із масивною продукцією прозапальних цитокінів у перші години після введення ЛПС, тоді як тривалий або повторний вплив ЛПС може призводити до тривалого запалення та формування, залежно від умов стимуляції, так званого феномену «trained immunity» або ендотоксинової толерантності, що пов'язані з метаболічною та епігенетичною перебудовою клітин вродженого імунітету (López-Collazo & Del Fresno, 2024). Такі зміни зумовлюють тривалу модифікацію функціональної активності клітин, що може визначати характер та інтенсивність запальної відповіді залежно від умов стимуляції. Інтенсивність відповіді значною мірою залежить від дози та типу ЛПС (наприклад, O111:B4 чи O55:B5), виду та генотипу тварин, а також шляху введення (внутрішньовенно або внутрішньочеревно), що визначає як інтенсивність гострої запальної реакції, так і ймовірність розвитку тривалого запалення (Zhang et al., 2024; Luo et al., 2025). Зокрема, введення високих доз ЛПС спричиняє потужну цитокінову відповідь із піком продукції медіаторів через 2-4 години, тоді як низькі дози за певних умов можуть сприяти тривалішим змінам функціональної активності макрофагів.

Дані, отримані із використанням моделі ЛПС, слугують важливим експериментальним підґрунтям для тестування нових імуномодулюючих підходів, у тому числі при сепсисі, ендотоксемії та хронічних метаболічних порушеннях. Модель ЛПС також широко використовується для дослідження патогенезу сепсису, який залишається серйозною медичною проблемою з високою летальністю у клінічній практиці (Xie et al., 2020). Експериментальні

моделі ендотоксемії дозволяють досліджувати як механізми системного запалення, так і оцінювати нові фармакологічні втручання у тварин та людей *in vivo*.

Таким чином, використання різних експериментальних моделей надмірної активації імунної відповіді, таких як ушкодження циркулюючими імунними комплексами, Т-клітинно-опосередковане ушкодження та ЛПС-індукована ендотоксемія, дозволяє відтворити ключові ланки імуноопосередкованого ушкодження клітин і тканин. Кожна з цих моделей відображає різні механізми імунної активації - гуморальні, клітинні або вроджені, що забезпечує комплексне вивчення патогенетичних процесів, пов'язаних із запаленням, оксидативним та генотоксичним стресом. Це дозволяє здійснювати інтегрований аналіз взаємозв'язків між ушкодженням ДНК, клітинною загибеллю та імунною активацією. Застосування моделей гіперактивації імунної відповіді є основою для дослідження механізмів ушкодження імунокомпетентних та оваріальних клітин і обґрунтування нових підходів до фармакологічної корекції імуноопосередкованих порушень.

1.5. Фармакологічні модулятори функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов надмірної імунної активації

1.5.1. Інгібітори ПАРП-1: механізми дії та перспективи застосування

Останнім часом активно вивчається терапевтичний потенціал інгібіторів полі(АДФ-рибозо)полімерази (ПАРП), які здатні модулювати клітинну відповідь на ушкодження ДНК та зменшувати розвиток некротичних і запальних процесів. Показано, що фармакологічне пригнічення активності ПАРП може проявляти цитопротективні властивості в різних

експериментальних моделях патології, зокрема запальних, аутоімунних і нейродегенеративних захворювань, таких як ревматоїдний артрит, хронічний коліт, некротизуючий панкреатит, аутоімунний нефрит та нейродегенеративні патології (Berger et al., 2018; Ke et al., 2019; García et al., 2015).

Інгібітори PARP -1, такі як олапаріб, рукпаріб і нірапаріб, широко застосовуються у в онкологічній клінічній практиці та розглядаються як перспективні модифікатори клітинної відповіді на генотоксичний та оксидативний стрес (Pazzaglia & Pioli, 2019; Ordaz et al., 2025). Фармакологічне інгібування PARP-1 може зменшувати некроз і запальну відповідь, пригнічуючи секрецію прозапальних цитокінів (TNF- α та IL-6), модулюючи активність макрофагів і Т-клітин, а також обмежуючи гіперактивацію транскрипційного фактора NF- κ B (Zhu et al., 2021; Sobczak et al., 2020). Крім того, інгібітори PARP-1 знижують активацію прозапальних сигнальних шляхів, що сприяє обмеженню тканинного ушкодження.

Інгібітори PARP поділяють на кілька поколінь залежно від їхньої селективності та ключових фармакологічних особливостей. До інгібіторів першого покоління належать класичні сполуки, зокрема 3-амінобензамід (3-АБА), нікотинамід та різні бензамідні похідні, які структурно імітують NAD⁺, конкурують за активний центр ферменту та забезпечують помірне інгібування. Пізніше з'явилися потужніші препарати другого, а згодом і третього поколінь - олапаріб, рукпаріб, нірапаріб, талазопаріб, які мають значно вищу потужність інгібування PARP-1, а також вирізняються вираженим ефектом "PARP trapping" (утримання ферменту на пошкодженій ДНК) (Murai et al., 2012). Саме ці препарати стали основою сучасної протипухлинної терапії, особливо при BRCA-мутаціях (Yusoh et al., 2020).

Разом із тим цитотоксичність таких інгібіторів, що забезпечує їх ефективність щодо пухлин із дефектами репарації ДНК, може призводити до побічних ефектів у здорових тканинах через індукцію геномної

нестабільності, що є небажаним для нормальних клітин. Особливо обговорюють потенційний вплив на імунні клітини та репродуктивну систему (наприклад, зниження оваріального резерву, порушення сперматогенезу чи імунної регуляції). У зв'язку з цим в експериментальних дослідженнях використовуються класичні інгібітори ПАРП, які є менш цитотоксичні і в низьких дозах можуть проявляти цитопротективні властивості, захищаючи клітини від оксидативного чи генотоксичного стресу. Серед таких сполук особливу увагу привертають 3-амінобензамід (3-АБА) та деякі похідні хіназоліну, наприклад 4-гідроксиквіназолін (4-ГК), які розглядаються як потенційні модулятори активності ПАРП-1 у дослідженнях, спрямованих на зменшення оксидативного та генотоксичного ушкодження клітин, зокрема за умов запалення, ішемії або токсичного стресу (Murai et al., 2012; Curtin & Szabo, 2020; Rudolph et al., 2022). Дані експериментальних досліджень свідчать, що інгібітори ПАРП -1 знижують інфільтрацію тканин імунними клітинами, зменшують оксидативний стрес та рівень HMGB1 у позаклітинному середовищі, що запобігає активації механізмів неінфекційного запалення (Vitali et al., 2023; Yu et al., 2015). Зокрема, у моделях ішемії-реперфузії інгібітори ПАРП -1 обмежували пошкодження тканин, підтримуючи функціональний стан мітохондрій та зменшуючи енергетичне виснаження клітин (Song et al., 2008; Gallyas et al., 2020).

Перспективним напрямом досліджень є вивчення впливу інгібіторів ПАРП на репродуктивну систему. У репродуктивній системі ці інгібітори можуть захищати гранульозні клітини та ооцити від оксидативного стресу, що розглядається як потенційний підхід до терапії ендометріозу та порушень оваріального гомеостазу (Shepel et al., 2016; Wang Y et al., 2023; Li J et al., 2023). Відомо, що надмірна активація ПАРП-1 за умов оксидативного та генотоксичного стресу може призводити до енергетичного виснаження клітин, посилення некротичних процесів і порушення функціональної активності

фолікулярного оточення ооцитів (Wang Y et al., 2023). У цьому контексті фармакологічне пригнічення ПАРП-1 здатне підтримувати клітинний енергетичний баланс, знижувати рівень ушкодження ДНК та обмежувати розвиток запальної відповіді в тканинах яєчника (Li J et al., 2023). Нещодавні роботи показали, що ці препарати здатні захищати оваріальні клітини від апоптозу, індукованого оксидативним стресом та запаленням, а також нормалізувати рівні ключових цитокінів у фолікулярному мікрооточенні. Зокрема, інгібітори ПАРП-1 можуть знижувати вираженість клітинного ушкодження, сприяючи збереженню життєздатності гранульозних клітин та функціонального стану оваріальних клітин (Shepel et al., 2016; Li J et al., 2023). Це відкриває можливості для подальшого вивчення їх застосування при синдромі полікістозних яєчників, ендометріозі та віковому зниженні оваріального резерву. Водночас існують дані про негативні ефекти інгібіторів ПАРП для оваріальної функції. Зокрема, показано, що інгібітор ПАРП олапариб може знижувати продукцію естрадіолу та експресію маркерів гранульозних клітин у культурі, що свідчить про можливу токсичність для яєчників і зменшення оваріального резерву (Nakamura et al., 2020).

Отже, підсумовуючи вищесказане, ПАРП-1 є важливим регулятором клітинної відповіді на генотоксичний та оксидативний стрес, поєднуючи процеси репарації ДНК, регуляції клітинної загибелі та запальної відповіді. Водночас вплив блокаторів ПАРП-1 на репродуктивну систему залишається недостатньо з'ясованим і поряд із цитопротективними ефектами описані і можливі негативні наслідки, що обґрунтовує необхідність подальших експериментальних досліджень їх впливу на клітини імунної та репродуктивної систем.

1.5.2. Роль інгібування HMGB1 за умов імуноопосередкованого ушкодження

HMGB1 є одним із ключових медіаторів запальної відповіді, що вивільняється з ушкоджених або некротичних клітин і діє як молекула небезпеки (DAMP). Позаклітинний HMGB1 активує рецептори вродженого імунітету, зокрема TLR4 та RAGE, що призводить до активації сигнальних шляхів NF-κB і посилення продукції прозапальних цитокінів. Крім того, HMGB1 може підтримувати тривалу активацію імунних клітин, сприяючи хронізації запального процесу. У зв'язку з важливою роллю HMGB1 у підтриманні запальної відповіді цей білок розглядається як перспективна терапевтична мішень, а його інгібітори як потенційні засоби для корекції запальних порушень (Yang H et al., 2020; Andersson et al., 2018).

Останнім часом спостерігається зростання інтересу до використання природних біоактивних сполук, зокрема антиоксидантів, які можуть застосовуватися не лише в харчовій промисловості, але й у медицині завдяки їхній здатності модулювати запальні процеси. Одним із найбільш перспективних природних інгібіторів HMGB1 є гліциризин - тритерпеновий глікозид, що виділяється з кореня солодки (*Glycyrrhiza glabra*). За даними сучасних досліджень, він чинить антиоксидантну, протизапальну та імуномодулюючу дію і демонструє терапевтичний потенціал при низці метаболічних і запальних захворювань (Yu J et al., 2026; Li Y et al., 2024).

У ряді експериментальних досліджень показано, що гліциризин реалізує свою терапевтичну дію шляхом інгібування HMGB1. Так, при моделі експериментального автоімунного енцефаломієліту - експериментальній моделі розсіяного склерозу у мишей, застосування гліциризину на етапі початку хвороби достовірно знижувало її тяжкість, зменшувало клітинну інфільтрацію, демієлінізацію, супроводжувалося зниженням рівнів

прозапальних цитокінів (TNF- α , IFN- γ , IL-17A, IL-6, TGF- β 1) та підвищенням рівнів IL-4. Важливо, що також знижувалося вивільнення HMGB1, що асоціювалося зі зменшенням ушкодження нейронів та активації астроцитів і мікроглії (Sun Y et al., 2018; Li J et al., 2018).

Подібні ефекти описані в моделі цитотоксичного Т-лімфоцит-індукованого ураження печінки HBV-трансгенних мишей: лікування гліциризином значно знижувало тяжкість уражень, що підтверджує важливу патогенетичну роль HMGB1 у прогресуванні гепатитів (Sitia G et al., 2007). Важливі результати отримано також у моделях ішемічного ушкодження мозку. Показано, що гліцирин знижує інтенсивність запалення, оксидативного стресу та апоптозу, а також пригнічує вивільнення HMGB1, що сприяє збереженню життєздатності нейронів і покращує відновлення тканин після ішемічного ушкодження (Li Y et al., 2024). Більш того, біофізичні дослідження підтвердили прямий молекулярний механізм взаємодії гліциризину з HMGB1. Показано, що гліцирин безпосередньо зв'язується з HMG-box доменами цього білка та пригнічує його цитокінову активність, обмежуючи HMGB1-залежну активацію запальних сигнальних шляхів. Це свідчить про те, що гліцирин може діяти не лише як антиоксидант, але й як прямий модулятор HMGB1-залежних сигнальних шляхів (Mollica L et al., 2007).

Таким чином, хоча клінічні дані щодо застосування гліциризину як інгібітора HMGB1 залишаються обмеженими, наявні експериментальні дані свідчать про його виражену протективну дію у моделях автоімунних, інфекційних і ішемічних уражень. Отримані результати підкреслюють важливу роль HMGB1 як медіатора, що зв'язує тканинне ушкодження з активацією запальної відповіді. Цей ефект реалізується, зокрема, через пригнічення HMGB1-залежної активації рецепторів TLR4 і RAGE та NF- κ B-залежних сигнальних шляхів, що призводить до зменшення продукції

прозапальних цитокінів і обмеження подальшого ушкодження тканин. Такі дані створюють наукове підґрунтя для проведення подальших доклінічних та клінічних досліджень з метою впровадження препаратів на основі гліциризину у терапію запальних захворювань.

1.5.3. Механізми дії та протективні ефекти інгібіторів NF-κB за умов імуноопосередкованого ушкодження

На сьогодні встановлена ключова роль ядерного транскрипційного фактора NF-κB у патогенезі багатьох запальних, аутоімунних та онкологічних захворювань. Активація NF-κB призводить до індукції прозапальних цитокінів, молекул адгезії, ферментів (iNOS, COX-2), антиапоптотичних білків та факторів росту, що створює умови для хронічного запалення, імунної дисрегуляції та пухлинного мікрооточення (Taniguchi & Karin M; 2018). Тому пригнічення активації NF-κB розглядають як перспективну терапевтичну стратегію. Надмірна або тривала активація цього транскрипційного фактора підтримує розвиток імуноопосередкованого ушкодження тканин, оскільки постійна експресія прозапальних цитокінів, ферментів оксидативного стресу та молекул адгезії порушує клітинний гомеостаз і сприяє прогресуванню патологічних процесів. У цих умовах фармакологічна модуляція активності NF-κB може обмежувати інтенсивність патологічної імунної відповіді та запобігати хронізації запального процесу (Yu H et al., 2020; Liu T et al., 2017; Roberti A et al., 2022). У зв'язку з цим модуляція запальної відповіді розглядається як важливий терапевтичний напрям при аутоімунних захворюваннях (Xiang et al., 2023).

Особливу увагу привертають природні сполуки з імуномодуючими та протизапальними властивостями, серед яких виділяють куркумін і андрографолід. Куркумін, поліфенольна сполука, виділена з кореня куркуми

довгої (*Curcuma longa*), блокує активацію NF-κB через інгібування IκB-кінази (IKK), що запобігає фосфорилуванню та деградації IκBα і транслокації p65/p50 у ядро. Це знижує експресію TNF-α, IL-1β, IL-6, COX-2 та iNOS, пригнічуючи розвиток гострої та хронічної запальної відповіді. Крім того, куркумін чинить антиоксидантну дію через активацію Nrf2 та індукцію антиоксидантних ферментів. У клінічних та експериментальних дослідженнях продемонстровано його ефективність при ревматоїдному артриті, виразковому коліті, метаболічному синдромі та порушеннях оваріальної функції, пов'язаних з імунним запаленням (Gupta et al., 2013; Hewlings & Kalman, 2017; Zafar et al., 2025; Voznesenska et al., 2010).

Подібні до куркуміну протизапальні механізми притаманні й іншим природним біологічно активним сполукам, серед яких значний інтерес становить андрографолід (Анд). Андрографолід - основний біоактивний дитерпеноїд, виділений із лікарської рослини андрографіс волотистий (*Andrographis paniculata*), який проявляє різноманітну фармакологічну активність, включаючи протизапальну, протиракову, протидіабетну та інші ефекти. Також для нього характерні виражені протизапальні та імуномодуючі властивості (Dai Y et al., 2019; Gonde D et al., 2024). Він безпосередньо взаємодіє із цистеїновим залишком у субодиниці p50 NF-κB, що блокує ДНК-зв'язувальну активність димерів. Крім того, андрографолід інгібує IκB-кіназний комплекс, який відіграє ключову роль у активації NF-κB, зменшує продукцію TNF-α, IL-6, IL-17 та пригнічує Th17-асоційовану відповідь, одночасно сприяючи підвищенню активності регуляторних Т-клітин (Treg). Це робить його перспективним засобом як потенційного терапевтичного агента при аутоімунних і хронічних імунозапальних захворюваннях, зокрема ревматоїдному артриті, астмі та коліті (Li X et al., 2022).

Отже, куркумін і андрографолід є перспективними природними сполуками, що пригнічують активацію NF-κB із багатофакторним механізмом дії, що поєднує протизапальні, антиоксидантні та імуномодуючі ефекти. Молекулярні механізми імуноопосередкованого ушкодження пов'язані з взаємодією сигнальних шляхів ПАРП-1, NF-κB та HMGB1, які беруть участь у регуляції відповіді на ушкодження ДНК, оксидативний стрес і запальну активацію. Показано, що активація ПАРП-1 посилює транскрипційну активність NF-κB і підвищує експресію прозапальних цитокінів, тоді як некротична загибель клітин супроводжується вивільненням HMGB1, який додатково активує запальні сигнальні шляхи через рецептори TLR4 та RAGE, що обґрунтовує доцільність фармакологічної модуляції цих ланок для обмеження ушкодження (Curtin & Szabo, 2020; Yang et al., 2020; Chen et al., 2022).

1.5.4. Антиоксидантні та наноструктуровані сполуки у регуляції функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин

У процесі нормального клітинного метаболізму утворюються реактивні форми кисню (АФК) і азоту, які є природними побічними продуктами окисно-відновних реакцій. У фізіологічних концентраціях ці молекули виконують важливі сигнальні функції, беручи участь у регуляції експресії генів, клітинної проліферації, апоптозу та імунної відповіді. Однак надмірне утворення реактивних форм кисню та азоту або недостатня ефективність ендогенних антиоксидантних систем призводять до порушення окисно-відновної рівноваги клітин і розвитку оксидативного та нітрозативного стресу. Це призводить до клітинної дисфункції та сприяє розвитку різних патологічних процесів. Підвищена продукція АФК може відігравати важливу роль в розвитку генотоксичного стресу, оскільки ці молекули здатні безпосередньо

ушкоджувати ДНК, при цьому спричиняючи утворення одно- та дволанцюгових розривів ДНК та порушення механізмів її репарації (Ayna et al., 2025). Встановлено, що окисно-відновний дисбаланс, поєднаний із мітохондріальною дисфункцією та хронічним запаленням, є характерною рисою багатьох захворювань, включаючи серцево-судинні, метаболічні та нейродегенеративні порушення та інші (Manful et al., 2025).

Організм людини володіє арсеналом антиоксидантних систем, які працюють узгоджено для забезпечення окисно-відновного балансу клітин (García-Sánchez A et al., 2020). Вони беруть участь у нейтралізації реактивних форм кисню, зменшуючи оксидативний стрес в імунокомпетентних і оваріальних клітинах. До основних ферментативних антиоксидантів належать супероксиддисмутаза, яка каталізує перетворення супероксид-аніону на перекис водню, каталаза, що розщеплює H_2O_2 до води та кисню, а також пероксиредоксини, які беруть участь у детоксикації перекисних сполук (Liu T et al., 2025). Важливу роль у підтриманні антиоксидантного захисту відіграють і низькомолекулярні антиоксиданти, зокрема глутатіон (Adeoye O et al., 2018). Узгоджена дія цих систем є критичною для запобігання ушкодженню клітинних мембран і ДНК, особливо в умовах імунної активації, коли продукція реактивних форм кисню значно зростає.

З огляду на важливу роль оксидативного стресу в ушкодженні як клітин імунної, так і репродуктивної системи, значна увага науковців приділяється пошуку антиоксидантних речовин, здатних ефективно модулювати окисно-відновний баланс та зменшувати інтенсивність вільнорадикальних процесів. Серед таких агентів особливий інтерес становлять природні поліфеноли, синтетичні антиоксиданти та наноструктуровані матеріали. Серед природних антиоксидантів значну увагу привертає кверцетин - флавоноїд, що міститься у фруктах і овочах та інших рослинних продуктах. Завдяки наявності фенольних гідроксильних груп він здатний ефективно нейтралізувати реактивні форми

кисню та пригнічувати процеси перекисного окиснення ліпідів. Крім прямої антиоксидантної дії, кверцетин модулює активність ключових сигнальних шляхів клітинної відповіді на стрес, зокрема NF- κ B та MAPK, що супроводжується зниженням експресії прозапальних цитокінів, таких як TNF- α та IL-6. Так, у моделі ЛПС-індукованого системного запалення, відтвореної на мишах, показано, що внутрішньочеревне введення кверцетину зменшує прояви запальної відповіді та знижує продукцію прозапальних медіаторів. Також відзначено зменшення інтенсивності оксидативного стресу та ушкодження тканин, що доводить протизапальний і цитопротективний вплив цього антиоксиданта (Liao Y & Lin J, 2015). Крім того, показано, що кверцетин здатний модулювати функціональну активність імунних клітин, зокрема впливати на проліферацію T- та B-лімфоцитів і продукцію цитокінів, що свідчить про його потенційну роль у регуляції імунної відповіді та підтриманні функціонального стану імунних органів, таких як тимус і селезінка (Li Y et al., 2016; Alharbi H et al., 2025). Також показано, що кверцетин здатний стабілізувати функціональний стан мітохондрій, зменшувати інтенсивність оксидативного ушкодження клітин і захищати клітини від апоптозу. У дослідженнях показано, що кверцетин знижує рівень ROS і апоптоз гранульозних клітин та активує Nrf2-залежні антиоксидантні механізми (Khamineh et al., 2025; Zhang et al., 2025; Liao & Lin, 2015)

Особливе місце серед антиоксидантних підходів займає етилметилгідроксипіридину сукцинат (ЕГ) - синтетичний похідний 3-гідроксипіридину з вираженими мембраностабілізуючими властивостями. Його антиоксидантна дія реалізується через інгібування вільнорадикальних процесів, зменшення інтенсивності перекисного окиснення ліпідів і стабілізацію клітинних мембран. Крім того, ЕГ підвищує активність антиоксидантних ферментів (SOD, каталаза, глутатіонпероксидаза), модулює функціональний стан мітохондрій та оптимізує енергетичний метаболізм

клітин завдяки включенню сукцинату до циклу трикарбонових кислот (циклу Кребса). У експериментальних моделях ЕГ знижує рівень прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-1 β , IL-6) та сприяє нормалізації балансу між апоптозом і клітинним виживанням, що робить його перспективним засобом для корекції оксидативного стресу за різних патологічних станів (Gupta et al., 2022; Chernii et al., 2024).

В останнє десятиліття значно посилився інтерес до застосування наноматеріалів як потенційних антиоксидантних засобів. Поряд із ними значний інтерес становлять органічні сполуки германію. Завдяки здатності модулювати клітинну відповідь на оксидативний стрес, германій поєднує антиоксидантну, протизапальну та імуномодулювальну дію. У систематичному огляді показано, що сполуки германію можуть знижувати рівень прозапальних цитокінів, активувати протизапальні сигнальні шляхи та захищати клітини від окисного пошкодження, виступаючи багатофункціональним модифікатором клітинної відповіді (Luo X et al., 2023). Подібні результати наведені й в інших оглядах, де описано вплив як органічного, так і неорганічного германію на імунну систему, зокрема збільшення маси тимуса і селезінки, активацію фагоцитозу та стимуляцію гуморальної імунної відповіді (Li L et al., 2017). Проте ефект германію залежить від хімічної форми сполуки та її дози. Органічні форми зазвичай проявляють імуностимулюючу дію, тоді як неорганічні можуть бути токсичними при високих концентраціях.

Додатково встановлено, що органічний германій (Ge-132) здатний активувати макрофаги, посилювати фагоцитарну активність, сприяти кліренсу сенесцентних клітин та підтримувати ефективність імунної відповіді (Takeda T et al., 2023). В експериментальних дослідженнях також показано, що органічний германій здатний регулювати експресію генів, пов'язаних із запаленням і клітинною відповіддю на стрес, зокрема IL-6 та CXCL2 (Takeda

et al., 2019). Отже, показано, що органічні форми германію переважно проявляють імуностимулюючу дію, тоді як неорганічні його сполуки можуть бути токсичними при високих концентраціях.

Наночастинки срібла (НЧС) є одними з найпоширеніших металевих наноматеріалів, що активно використовуються у біологічних та медичних дослідженнях. У водному середовищі поверхня НЧС може частково окиснюватися з утворенням іонів срібла (Ag^+), що визначає їх біологічну активність (Liao C et al., 2019; McShan D et al., 2014, Gherasim O et al., 2020). Завдяки вираженій антимікробній активності НЧС широко застосовують у медицині, фармакології, косметології та харчовій промисловості (Burduşel A et al., 2018). Порівняно з макророзмірними формами срібла вони характеризуються вищою біологічною активністю, яка може супроводжуватися цитотоксичністю, пов'язаною з індукцією оксидативного стресу, порушенням функцій мітохондрій і підвищенням проникності клітинних мембран (McShan et al., 2014).

Окрім антимікробної дії, наносрібло проявляє протівірусні, протизапальні та імуномодулюючі властивості, що пов'язують із пригніченням синтезу прозапальних цитокінів ($\text{TNF-}\alpha$, IL-12 , IL-2) та зниженням активності металопротеїназ матриксу (MMP-9) (Burduşel et al., 2018; Liao et al., 2019). Показано також, що за контрольованих концентрацій НЧС можуть зменшувати продукцію прозапальних цитокінів і прискорювати загоєння ран, що свідчить про їх потенціал як терапевтичних агентів у регенерації тканин (Kaya et al., 2025; Singh et al., 2022).

Наночастинки срібла можуть чинити не лише антимікробну, а й імуномодулювальну дію. Зокрема, у моделі ревматоїдного артрити показано, що AgNPs зменшують запалення шляхом індукції апоптозу прозапальних макрофагів M1 та стимуляції поляризації макрофагів M2 , що супроводжується зниженням рівня активних форм кисню та пригніченням запальної відповіді

(Yang Y et al., 2021). Ці ефекти пов'язують із внутрішньоклітинним вивільненням іонів срібла (Ag^+), які відіграють ключову роль у регуляції функціонального стану макрофагів.

Разом із тим дані щодо впливу НЧС на різні системи організму, зокрема репродуктивну, залишаються суперечливими. У низці досліджень показано, що тривале надходження НЧС може призводити до їх накопичення у тканинах, тоді як інші роботи не виявляють значних токсичних ефектів при певних концентраціях (Liao et al., 2019). У деяких експериментальних моделях їх введення не призводить до суттєвих змін фертильності, розвитку потомства або загального стану тварин, що свідчить про відносну безпечність певних доз та форм наночастинок (Ema M et al., 2017).

Водночас існують дані, що високі концентрації наночастинок срібла можуть впливати на ранні стадії ембріонального розвитку, зокрема пригнічувати розвиток преімплантаційних ембріонів *in vitro*, тоді як іони срібла (Ag^+) також можуть проявляти більш виражену ембріотоксичну дію (Wang et al., 2023). Таким чином, НЧС можна розглядати як наноматеріал, який має подвійну дію. З одного боку, він є потенційним протимікробним та імуномодуючим агентом, а з іншого, може призводити до ушкодження оваріальних клітин, що потребує подальших досліджень для безпечного застосування.

Отже, численні дослідження свідчать, що активація імунної відповіді супроводжується розвитком оксидативного та генотоксичного стресу, порушенням функціонування імунокомпетентних і оваріальних клітин та активацією механізмів клітинної загибелі. Надмірна продукція реактивних форм кисню, активація сигнальних шляхів запалення (зокрема NF- κ B) і дисбаланс систем репарації ДНК сприяють ушкодженню клітин та порушенню репродуктивної функції. Водночас сучасні дослідження демонструють перспективність застосування сполук із антиоксидантними та

імуномодулювальними властивостями, зокрема інгібіторів ПАРП-1, модуляторів NF-κB, природних антиоксидантів і наноматеріалів, які здатні зменшувати оксидативне ушкодження, нормалізувати цитокінову відповідь і підтримувати життєздатність клітин. Особливого значення має дослідження впливу антиоксидантних і наноструктурованих сполук на збереження інтегральної цілісності геному та регуляцію механізмів клітинної загибелі в умовах надмірної імунної активації. Однак взаємозв'язок між ушкодженням ДНК, активацією програм клітинної загибелі та функціональним станом імунних і оваріальних клітин за умов імунної активації залишається недостатньо з'ясованим, що визначає актуальність і доцільність подальших експериментальних досліджень у цьому напрямку. Таким чином, природні антиоксиданти, синтетичні мембраностабілізуючі сполуки та наноструктуровані матеріали можуть розглядатися як перспективні засоби регуляції функціонального стану імунокомпетентних і оваріальних клітин, зокрема з метою обмеження ушкодження ДНК та оптимізації клітинної відповіді за умов імунної активації. Отже, наведені літературні дані обґрунтовують доцільність проведення експериментального дослідження, спрямованого на вивчення взаємозв'язку між ушкодженням ДНК, клітинною загибеллю та функціональним станом імунокомпетентних і оваріальних клітин.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Загальна характеристика об'єкта дослідження

Експериментальні дослідження проводили на статевозрілих мишах віком 6-8 тижнів, масою 18-24 г, яких утримували у віварії Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України. Усі роботи з експериментальними тваринами проводили відповідно до основних положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), та Директиви Європейського Парламенту та Ради 2010/63/EU про захист тварин, які використовуються в наукових цілях, від 22 вересня 2010 р. Експериментальні протоколи були схвалені Комітетом з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

2.2. Експериментальні моделі імуноопосередкованого ушкодження

У роботі використовували три експериментальні моделі імуноопосередкованого ушкодження: імунокомплексну (БСА), модель Т-клітинно-опосередкованого ушкодження печінки (Кон А) та системної ендотоксемії (ЛПС). Застосування цих моделей дозволило оцінити особливості імуноопосередкованої відповіді за умов різних механізмів імунної активації. Імунокомплексна модель відтворює ушкодження, пов'язане з утворенням та депонуванням циркулюючих імунних комплексів, модель КонА - Т-клітинно-опосередковане ушкодження печінки, тоді як модель ЛПС індукує запальну відповідь, характерну для ендотоксемії. Використані

експериментальні моделі відображають різні ланки імунної відповіді - гуморальну, клітинну та вроджену, забезпечуючи комплексну оцінку внеску різних типів імунітету у розвиток імуноопосередкованого ушкодження тканин.

2.2.1. Модель імунокомплексного ушкодження, індукованого бичачим сироватковим альбуміном (БСА)

Імунокомплексне ушкодження моделювали шляхом введення зростаючих доз антигену у хвостову вену тварин упродовж 6 тижнів. Як антиген використовували бичачий сироватковий альбумін (БСА). Розчин альбуміну стерилізували фільтруванням через фільтри з діаметром пор фільтру 0,22 мкм та запаювали у скляні ампули. Патологічний процес моделювали за такою схемою: 1-й тиждень - 150 мг БСА/кг; 2-й - 200 мг/кг; 3-й - 250 мг/кг; 4-й - 250 мг/кг; 5-й - 300 мг/кг; 6-й - 300 мг/кг маси миші (Патент України №93351; Макогон Н.В.) У якості контролю використовували миші, яким вводили стерильний фізіологічний розчин відповідно до схеми імунізації БСА. На 7-му добу після останньої імунізації тварин піддавали ефірному наркозу та вилучали тканинний матеріал для подальших гістологічних (аорта, печінка селезінка), цитологічних та біохімічних досліджень, а також кров для отримання сироватки. Також вилучали тимус і пахові лімфатичні вузли для подальшого дослідження. Отриманий матеріал використовували для гістологічних, цитологічних, біохімічних та молекулярно-біологічних досліджень. Модель імунокомплексного ушкодження відтворювали відповідно до описаного раніше способу (Патент України №93351; Макогон Н.В, Павлович та ін., 2014).

2.2.2. Модель Т-клітинного ушкодження печінки, індукованого конканаваліном А (Кон А)

Експериментальне ушкодження печінки викликали введенням поліклонального активатора Т-клітин конканаваліну А (КонА), що є визнаною моделлю Т-клітинно-опосередкованого імунного ушкодження печінки. При дослідженні використовували КонА (“Sigma”, USA) в дозі 25 мг/кг, який вводили одноразово в хвостову вену. Через 2, 6, 12, 20 і 48 годин у тварин під легким ефірним наркозом брали матеріал для імуноблотингу, гістологічних, цитологічних та біохімічних досліджень, а також кров для отримання сироваток. Контрольними були тварини, яким вводили відповідні об'єми фізіологічного розчину (Макогон та ін., 2015).

2.2.3. Модель системної ендотоксемії, індукованої ліпополісахаридом (ЛПС)

Патологічний процес моделювали за допомогою внутрішньоочеревинного введення ЛПС (E. coli O111:B4, Sigma, St. Louis, MO, USA) в дозі 3 мг/кг маси миші. Через 20 год тварин піддавали ефірному наркозу, після чого здійснювали вилучення біологічного матеріалу для подальших досліджень. Контрольними були тварини, яким вводили відповідні об'єми фізіологічного розчину (Грушка та ін., 2019).

2.2.4. Модель оксидативного стресу in vitro, індукованого перекисом водню (H₂O₂) та гіпохлоритом (OCl⁻)

Клітини тимуса та лімфовузлів виділяли, за загальноприйнятою методикою механічної дисоціації шляхом м'якого диспергування з наступним

відмиванням клітин у фізіологічному розчині. Клітини (1×10^5 в 100 мкл) інкубували при 37°C в середовищі RPMI 1640 (Sigma, USA) в присутності блокаторів ПРАП-1 3-амінобензаміду (3-АБА, Sigma-Aldrich, USA) в кінцевій концентрації 2 ммоль/л та 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК) (Sigma-Aldrich, USA) в кінцевій концентрації 100 мкмоль/л протягом 15 хв. Далі проводили інкубування із додаванням ушкоджуючих чинників - перекису водню (H_2O_2 , 0,5 ммоль/л) та гіпохлорит-аніону (розчин NaOCl, 100 мкг/мл) протягом 1 год. Клітини відмивали центрифугуванням в забуференому фосфатами фізіологічному розчині (ЗФР) (5 хв, 200g) та проводили подальше дослідження їх життєздатності, загибелі та ушкодження ДНК. Контрольними були клітини, інкубовані без ушкоджуючих чинників та блокаторів (Грушка та ін., 2017).

2.3. Клітинні культури та гістологічні дослідження

2.3.1. Виділення клітин природного та адаптивного імунітету

З метою отримання клітин тимуса і пахових лімфовузлів органи подрібнювали в середовищі виділення ЗФР за допомогою пінцетів і м'якого піпетування. Клітини виділяли за загальноприйнятою методикою механічної дисоціації шляхом м'якого диспергування з наступним відмиванням клітин і гіпотонічним лізисом еритроцитів. Клітини диспергували в 1 мл холодного ЗФР, фільтрували через капронові фільтри з додаванням 2-3 мл ЗФР, центрифугували (5 хв, 200g). Осади клітин тимуса і лімфовузлів ресуспендували в 200 мкл ЗФР або культурального середовища. Суспензію клітин селезінки звільняли від еритроцитів: до осаду спленоцитів додавали 1 мл дистильованої води на 30 с, потім відновлювали осмолярність середовища додаванням 1 мл розчину ЗФР двократної концентрації. Проби центрифугували (5 хв, 200 g), осад ресуспендували в 200 мкл культурального

середовища. Близько 90 % клітин суспензіях які були отримані складали лімфоцити, що було виявлено при забарвленні препаратів за Папенгеймом. Загальну кількість клітин та їх життєздатність оцінювали відповідно до методик, наведених у розділі 2.9.

2.3.2. Виділення гранулярних клітин яєчників

Виділення яєчників. Яєчники вилучали шляхом відсікання від жирової тканини та маткових труб. Після очищення яєчників від залишків прилеглої жирової тканини їх поміщали у фізіологічний розчин, охолоджений до 4 °С, для запобігання деградації клітин і збереження їх життєздатності.

Виділення ооцитів та клітин гранульози.

Фолікули відокремлювали від сполучної тканини механічним способом під бінокулярним мікроскопом МБС-9 у культуральному середовищі DMEM (з додаванням HEPES для стабілізації pH). Для отримання клітинного матеріалу використовували метод механічної пункції фолікулів. Великі антральні (преовуляторні) фолікули проколювали тонкою стерильною препарувальною голкою та виділяли з них вільні гранулярні клітини й кумулюсно-ооцитарні клітинні комплекси (КОК). Загальна кількість КОК, які виділяли з обох яєчників однієї миші, становила 25–30. Ооцити відділяли від оточуючих кумулюсних клітин шляхом механічного піпетування, не вдаючись до ферментів. Ооцити ідентифікували за морфологічними ознаками та збирали за допомогою мікропіпетки. Виділені ооцити знаходилися на стадії "зародкового пухирця" (ЗП+), яку встановлювали за наявністю чітко сформованої ядерної оболонки. Суспензію клітин гранульози, що залишилася після вилучення ооцитів, переносили у стерильні пробірки та центрифугували (3000 об/хв протягом 5 хвилин). Отриманий осад ресуспендували у

відповідному буфері для подальшого аналізу. Життєздатність клітин оцінювали за допомогою тесту з трипановим синім.

2.3.3. Культивування ооцитів *in vitro*

Ооцити з яєчників мишей виділяли механічним способом без використання ферментів, як у вигляді ізольованих клітин, так і у складі кумулюсно-ооцитарних комплексів. Ооцити від мишей однієї групи збирали та розподіляли в окремі камери, по 10-20 ооцитів у кожній. Морфологічні дослідження ооцитів проводили під мікроскопом МБС-10. Аналізували стан зародкового пухирця, перивітелінового простору та цитоплазми, зокрема її щільність, ступінь гранульованості, а також наявність ознак фрагментації і дегенерації. Усі контрольні і експериментальні ооцити культивували в однакових умовах (стерильний бокс, камери по 0,4 мл культурального середовища DME, що містило 15 ммоль/л HEPES; концентрація кальцію 1,71 ммоль/л, температура 37 °C, тривалість культивування була 20 год). Через 2 год культивування визначали відсоток ооцитів, що перебували на стадії метафази I (розчинення зародкового пухирця), а через 20 год — на стадії метафази II (формування першого полярного тільца). Також реєстрували ооцити з атиповою морфологією, зокрема з нерівномірною гранульованістю цитоплазми та ознаками її фрагментації (рис. 2.1) (Срібна та ін., 2018).

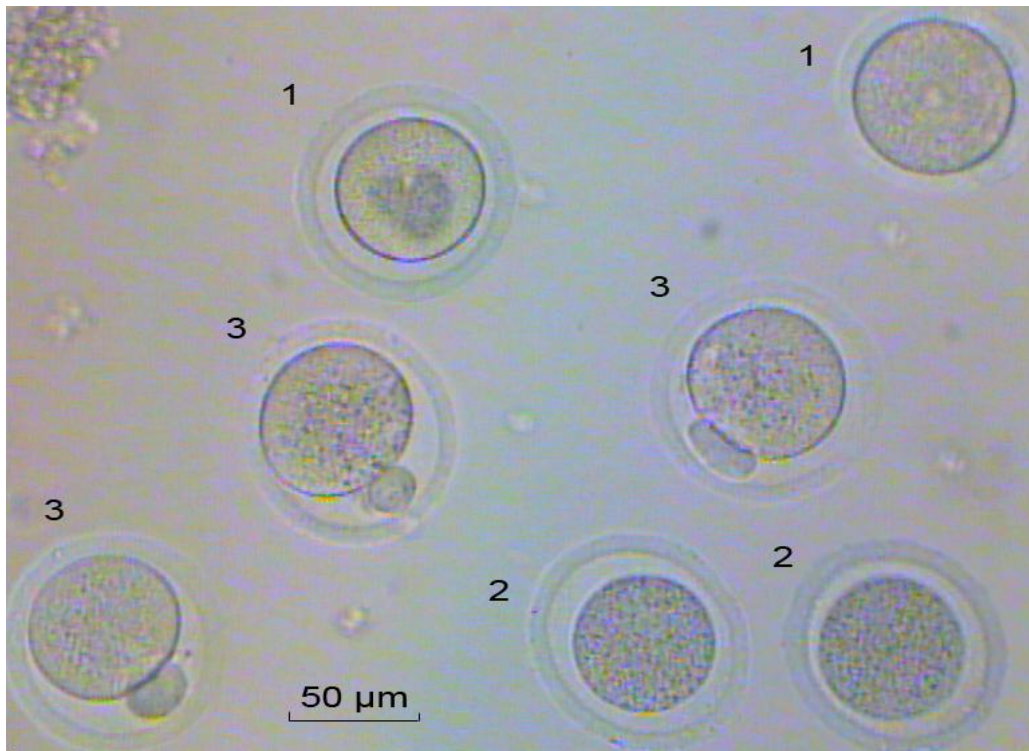


Рисунок 2.1. Мікрофотографія ооцитів, виконана за допомогою світлового мікроскопа. 1 – ооцити з зародковим пухирцем; 2 – ооцити з розчиненим зародковим пухирцем (метафаза I); 3 – ооцити з першим полярним тільцем (метафаза II)

2.3.4. Гістологічні та цитологічні дослідження

Вилучені органи (тимус, лімфатичні вузли та печінку) фіксували у 10% нейтральному формаліні, після чого проводили стандартну гістологічну обробку з подальшим заливанням у парафін. Після фіксації тканини промивали, зневоднювали у висхідній батареї спиртів, просвітлювали у ксилолі та заливали у парафінові блоки. З отриманих блоків на мікромомі виготовляли серійні гістологічні зрізи, які фарбували гематоксилін-еозином і піддавали світлооптичному дослідженню (Павлович та ін., 2014). Морфологічний аналіз проводили з використанням світлового мікроскопа при різних збільшеннях.

Морфологічну оцінку змін гістоструктури печінки проводили за розробленим нами комплексом показників, найбільш важливих для характеристики розвитку імунного запалення у печінці: 1) порушення часточкової структури, 2) дистрофія гепатоцитів, 3) загибель гепатоцитів, 4) активація зірчастих ретикулоендотеліоцитів. Патологічні зміни мікроциркуляторного русла характеризували за такими показниками: 1) розширення судин, 2) повнокрів'я судин, 3) порушення цілісності судинної стінки, 4) периваскулярні набряки, 5) тромбоутворення.

Оцінку морфологічних змін проводили за результатами напівкількісного аналізу з використанням 5-бальної шкали: 0 – відсутність змін, 1- незначні зміни, 2 – зміни середньої вираженості, 3 – суттєві зміни, 4- значно виражені ушкодження. Підраховували окремо суму балів стану паренхіми та судин за вищезгаданою шкалою, а також загальну суму балів морфологічних змін у тканині печінки. При аналізі запальної інфільтрації тканини печінки визначали кількість клітин в інфільтратах. За цим показником характеризували осередки інфільтрації як дрібно- (3–9 клітин), середньо- (10–19 клітин), великовогнищеві (більше ніж 20 клітин). Підраховували кількість

інфільтратів вказаних типів у 10 полях зору (об'єktiv $\times 20$). Клітинний склад (лімфоцити, нейтрофілі та еозинофілі гранулоцити, плазмоцити, макрофаги і моноцити) підраховували в 5 випадково вибраних інфільтратах (об'єktiv $\times 40$) та визначали відсоток кожного типу клітин. Залежно від клітинного складу диференціювали наступні типи інфільтратів: лімфоцитарні, лімфоцитарно-макрофагальні, лімфоцитарно-нейтрофілі, нейтрофілі та змішаного типу. Визначали відсоток кожного типу інфільтратів (Павлович та ін., 2016). Отримані морфологічні показники використовували для комплексної оцінки ступеня імуноопосередкованого ушкодження печінки в експериментальних моделях.

2.4. Методи визначення маркерів запального процесу, активації клітин вродженого імунітету та оксидативного стресу

Визначення лейкоцитарної формули крові

Для оцінки системної запальної відповіді визначали лейкоцитарну формулу периферичної крові. Диференційований підрахунок лейкоцитів проводили на мазках, приготованих з периферичної крові, отриманої з хвостової вени мишей у пробірці з антикоагулянтом ЕДТА К₂ (1,5–2,0 мг/мл). Мазки виготовляли стандартним методом на знежирених предметних скельцях, висушували на повітрі. Фіксацію клітин проводили метанолом, що забезпечувало збереження морфологічної структури клітин. Після фіксації мазки фарбували за методом Романовського–Гімзи з використанням робочого розчину барвника (рН 6,8) протягом 15–20 хв, що дозволяє чітко диференціювати клітинні елементи крові. Підрахунок здійснювали при збільшенні $\times 85$ (імерсійна система), визначаючи відсотковий вміст нейтрофілів (паличко- та сегментоядерних), еозинофілів, базофілів, моноцитів і лімфоцитів на підставі аналізу не менше ніж 100 клітин у кожному препараті.

Отримані показники використовували для оцінки характеру запальної реакції та активації клітин вродженого імунітету.

Визначення активності АЛТ

Функціональний стан печінки оцінювали за активністю аланінамінотрансферази (АЛТ) у сироватці крові мишей. АЛТ є одним із найбільш чутливих біохімічних маркерів ушкодження гепатоцитів, оскільки локалізується переважно у цитоплазмі клітин печінки, і підвищення її активності у крові свідчить про порушення цілісності клітинних мембран та вихід ферменту у системний кровообіг. Активність АЛТ визначали колориметричним методом за Райтманом-Френкелем, який ґрунтується на реакції утворення пірувату внаслідок трансамінування L-аланіну з α -кетоглутаратом під дією ферменту. Утворений піруват взаємодіє з 2,4-динітрофенілгідразином з утворенням забарвленого гідразону, інтенсивність забарвлення якого визначали спектрофотометрично. Активність ферменту розраховували за калібрувальною шкалою та виражали у ммоль/(л·год) (Reitman & Frankel., 1957).

НСТ-тест (оцінка киснезалежного метаболізму нейтрофілів)

Активацію нейтрофілів оцінювали за показниками киснезалежного метаболізму нейтрофільних гранулоцитів, який вивчали за допомогою нітросинього тетразолу (НСТ-тест). Даний показник відображає здатність нейтрофілів до генерації АФК у процесі респіраторного вибуху, що є одним із ключових механізмів їх антимікробної дії. Тест ґрунтується на здатності безкольорового індикатора нітросинього тетразолу відновлюватися до нерозчинного темносинього формазау під впливом АФК, продукованих активованими клітинами. Інтенсивність утворення формазау корелює зі ступенем функціональної активації нейтрофілів. Під світловим мікроскопом з

використанням імерсійного об'єктива 100 (окуляр $\times 12,5$) підраховували не менше ніж 100 нейтрофілів у препаратах крові мишей із розрахунком відсотка формазан-позитивних клітин та цитохімічного показника (ЦХП) за формулою: $\text{ЦХП} = (A \cdot 0 + B \cdot 1 + C \cdot 2 + D \cdot 3) / 100$, де А, В, С і Д – кількість нейтрофілів: А – без формазану; В – площа відкладень формазану не перевищує 1/3 площі ядра клітини; С – відкладення займають від 1/3 до усієї площі ядра клітини; Д – площа включень формазану більша за площу ядра (Blasi-Brugué et al., 2023; Грушка та ін., 2019).

Лізосомально-катіонний тест (ЛКТ)

Для додаткової оцінки функціонального стану нейтрофілів периферичної крові застосовували напівкількісний лізосомально-катіонний тест (ЛКТ), який дозволяє оцінити активність катіонних білків гранул нейтрофілів, що беруть участь у реалізації кисневонезалежних механізмів антимікробного захисту. Результати аналізу виражали шляхом розрахунку середнього цитохімічного коефіцієнта (СЦК), що відображає інтенсивність цитохімічної реакції у популяції клітин. (Nagalienska et al., 2018; Грушка та ін., 2019).

Визначення продуктів ПОЛ

Інтенсивність процесів пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) оцінювали за вмістом у печінці кінцевих продуктів ПОЛ – малонового діальдегіду або ТБК-реактивних продуктів залежно від експериментальної моделі. Ці сполуки утворюються внаслідок окисної деградації поліненасичених жирних кислот клітинних мембран. Відомо, що накопичення цих сполук є одним із найбільш інформативних біохімічних маркерів розвитку оксидативного стресу та ушкодження клітинних структур. Визначення продуктів ПОЛ ґрунтується на їхній здатності взаємодіяти з 2-тіобарбітуровою

кислотою (ТБК) з утворенням стабільного забарвленого комплексу. Інтенсивність забарвлення пропорційна концентрації продуктів ліпопероксидації у досліджуваному зразку, що дозволяє кількісно оцінити рівень оксидативного ушкодження тканини (Макогон та ін., 2015). Гомогенат печінки отримували шляхом механічної гомогенізації тканини. Для цього 500 мг печінкової тканини розтирали у порцеляновій ступці на льоду в 5 мл холодного фосфатно-сольового буфера, що забезпечувало стабільність біохімічних компонентів та мінімізувало подальший розвиток окиснювальних реакцій під час підготовки зразків. Після цього гомогенати центрифугували при 4°C протягом 7 хв при 12000 g, що забезпечувало відділення клітинного детриту та інших нерозчинних компонентів. Для подальшого аналізу використовували супернатант, який містив розчинні продукти ліпопероксидації. У отриманих супернатантах вміст ТБК-реактивних продуктів (ТБКРП) визначали спектрофотометрично за утворенням забарвленого комплексу з 2-тіобарбітуровою кислотою при довжині хвилі 532 нм. Оптичну густину зразків вимірювали на спектрофотометрі з подальшим розрахунком концентрації продуктів (Макогон та ін., 2015). У моделі КонА-індукованого гепатиту вміст МДА виражали у нмоль/мг білка (за Лоурі). У моделі імунокомплексного ушкодження, індукованого БСА, вміст МДА виражали у нмоль/мг тканини. У моделі ЛПС-індукованої ендотоксемії концентрацію ТБКРП розраховували за коефіцієнтом молярного поглинання $1,56 \times 10^5 \text{ моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ та виражали у нмоль/г тканини (Devasagayam et al., 2003; Кондрацька та ін., 2023). Отримані показники використовували для оцінки інтенсивності процесів ліпопероксидації та ступеня розвитку оксидативного стресу в тканині печінки за умов імуноопосередкованого ушкодження.

Визначення активності каталази

Активність каталази в гомогенатах печінки визначали за методом, заснованим на здатності перекису водню утворювати з молібдатом амонію стабільний забарвлений комплекс (Góth, 1991). Метод ґрунтується на визначенні кількості не розкладеного каталазою перекису водню, що дозволяє оцінити активність ферменту за інтенсивністю забарвлення реакційної суміші. Оптичну густину зразків вимірювали спектрофотометрично з подальшим розрахунком активності каталази.

Визначення активності СОД

Для визначення активності СОД був застосований метод, запропонований Сиротою Т.В. з використанням супероксидгенеруючої реакції аутоокиснення адреналіну. Реєстрували утворення адренохрому при $\lambda = 347$ нм. При роботі з супернатантами гомогенатів печінки в даному дослідженні використовували 0,1-% розчин адреналіну та 0,1М бікарбонатний буфер, рН 10,65. Гомогенат печінки та супернатант отримували за описаною вище методикою. Активність ферменту виражали в умовних одиницях ($У.О. = \Delta E \cdot 100/6$, де ΔE - різниця екстинцій, визначених при окисненні адреналіну в присутності 120 мкг білка гомогенату печінки на протязі 6 хв) (Остапченко та Компанець, 2017).

Визначення рівня циркулюючих імунних комплексів (ЦІК)

Дослідження рівня циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в сироватці крові проводили загальноприйнятим методом преципітації в розчині поліетиленгліколю-6000 в мікромодифікації. Метод ґрунтується на здатності поліетиленгліколю викликати селективну преципітацію імунних комплексів різного розміру з подальшим фотометричним визначенням їх кількості у досліджуваних зразках. Оптичну густину проб визначали за допомогою

мікропланшетного фотометра EIA Multi-well Reader II (“Sigma Diagnostics”, USA) при довжині хвилі 405 нм з використанням референс-фільтра 630 нм, що дозволяло підвищити точність вимірювань та компенсувати фонове поглинання. Результати виражали в умовних одиницях (У.О.), які розраховували як добуток оптичної густини проби на коефіцієнт 1000 (У.О. оптична густина $\times$ 1000) (Павлович С. та ін., 2014).

2.5. Оцінка функціонального стану імуніцитів методом реакції гальмування адгезії лімфоцитів (РГАЛ)

Реакція гальмування адгезії лімфоцитів (РГАЛ) базується на пригніченні прилипання клітин сенсibiliзованих тварин до скляних або пластикових поверхонь в присутності специфічного антигену. Метод використовується для оцінки функціональної активності лімфоцитів та ступеня їх сенсibiliзації до відповідного антигену, що відображає рівень клітинної імунної відповіді. Відомо, що при контакті сенсibiliзованих лімфоцитів зі специфічним антигеном відбувається активація клітин, яка супроводжується змінами їх адгезивних властивостей і зменшенням здатності клітин прикріплюватися до поверхні субстрату. Дослідження РГАЛ проводили на суспензії клітин, виділених з пахових лімфатичних вузлів мишей. Кількість адгезованих лімфоцитів визначали у клітинних суспензіях, інкубованих як у присутності специфічного антигену (БСА), так і у контрольних умовах без додавання антигену. Після інкубації підраховували відсоток клітин, що прикріпилися до поверхні субстрату, та визначали показник пригнічення адгезії лімфоцитів як відсоткове зниження кількості адгезованих клітин у присутності БСА порівняно з контролем (Павлович та ін., 2014). Отриманий показник відображає ступінь зниження адгезивних властивостей лімфоцитів у відповідь на антигенну стимуляцію та

використовується для оцінки рівня сенсibilізації клітин і функціональної активності клітинної імунної відповіді.

2.6. Імунофлуоресцентне виявлення фіксації імуноглобулінів у тканинах

Імунофлуоресцентне виявлення фіксації імуноглобулінів проводили на відбитках аорти, селезінки, печінки, тимуса та лімфатичних вузлів. Препарати фіксували 1% спирт-пікриновою сумішшю та обробляли міченими ФІТЦ-антитілами до мишачих імуноглобулінів (Sigma, USA) та аналізували напівкількісним методом з визначенням інтенсивності світіння за наступною шкалою: 0 - відсутнє; 1 - слабе світіння, 2 помірне; 3 - виражене; 4 - сильне світіння. На відбитках органів оцінювали в комплексі як інтенсивність флуоресценції клітин та їх тканинного оточення, так і відносну кількість клітин, що світяться (Павлович та ін., 2014).

2.7. Імуноцитохімічне виявлення полі(АДФ-рибози) (ПАР)

Оцінку ПАРП-активності в клітинах тимусу, лімфовузлів та яєчників проводили за імуноцитохімічним виявленням полі(АДФ-рибози) (ПАР), що утворюється ферментом ПАРП (Tóth-Zsámboki et al., 2006) з деякими модифікаціями. Відомо, що накопичення полі(АДФ-рибозних) ланцюгів у клітині відображає рівень активації ПАРП та інтенсивність процесів відповіді клітини на ушкодження ДНК. Метод імуноцитохімічного забарвлення проводили пероксидазним методом з використанням хромогенного субстрату діамінобензидину. Мазки клітин, виділених з тимусу, лімфатичних вузлів, а також фолікулярних клітин яєчника, фіксували 2 хв в суміші метанол-ацетон (1:1) при кімнатній температурі з наступним промиванням в ЗФР. Далі здійснювали демаскування антигенних детермінант

в 10 ммоль/л цитратному буфері, рН 6, 30 хв при 92-95 ° С на киплячій водяній бані. Після відмивання мазків блокували ендогенну пероксидазу протягом 30 хвилин (0,3% H₂O₂ у 60% метанолі), а потім промивали в ЗФР. Неспецифічне зв'язування блокували протягом 1 год в 1,5% розчині БСА на ЗФР, що містив 0,3% Тритон Х-100, а потім інкубували з поліклональними кролячими антитілами, специфічними до ПАР (BD Pharmingen) протягом ночі (1:100, 4°C). Після відмивання в ЗФР (3×10 хв) зразки інкубували з антитілами до імуноглобулінів кроля, кон'югованими з пероксидазою (Sigma, USA) протягом 1 год (1:100, при кімнатній температурі) з подальшим відмиванням (2 x 10 хв). Візуалізацію реакції проводили при інкубації препаратів з діамінобензидином – хромогенним субстратом пероксидази - за загальноприйнятою методикою. Негативним контролем слугували зразки, які не інкубували з первинними антитілами. Після відмивання двічі по 5 хв в дистильованій воді на вологі препарати наносили реагент для заключення CC-Mount ("Sigma", USA) і підсушували у термостаті за температури 37°C протягом 1 год. Аналіз препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа з використанням масляно-імерсійного об'єктива x 100. Підраховували не менш ніж 200 клітин в кожному препараті. Результати реакції оцінювали напівкількісно за принципом Астальді-Верга, згідно якого досліджувані клітини поділяли на групи в залежності від інтенсивності специфічного забарвлення коричневого кольору. Дані виражали в умовних одиницях шляхом розрахунку середнього цитохімічного коефіцієнту (СЦК) за формулою: $СЦК = (0 \cdot a + 1 \cdot б + 2 \cdot в + 3 \cdot г + 4 \cdot д) / 100$, де а – д – відсоток однотипних клітин з певним ступенем забарвлення (а – відсутність, б – слабопозитивна реакція, в – помірно позитивна, г – виражено позитивна, д - різко позитивна реакція) (Грушка та ін., 2017).

2.8. Імуноцитохімічне визначення експресії Fas-рецептора (CD95) в імунокомпетентних клітинах

Рівень експресії Fas-рецептора (CD 95) визначали на фіксованих метанол-ацетоном (1:1) препаратах ІКК загальноприйнятим імуноцитохімічним методом з використанням мишачих моноклональних анти-CD-95 антитіл (BD Biosciences). Інкубацію цитопрепаратів з первинними антитілами проводили при 4°C протягом 18 год, з вторинними (міченими пероксидазою антитілами до IgG мишей, Sigma, USA) - протягом 1 год при кімнатній температурі. Візуалізацію реакції проводили за допомогою діамінобензидину, її інтенсивність оцінювали напівкількісним методом у балах — від 0 до 4 з наступним підрахунком середнього цитохімічного коефіцієнту (СЦК) за формулою $СЦК = (0 \times A + 1 \times B + 2 \times V + 3 \times Г + 4 \times Д) / 100$, де 0,1,2,3,4 – ступінь забарвлення, А,Б,В,Г,Д – кількість клітин відповідної інтенсивності забарвлення (Павлович та ін., 2014).

2.9. Оцінка ушкодження та життєздатності клітин

2.9.1. Тест з трипановим синім для оцінки життєздатності клітин

Після виділення клітин з тимуса, лімфатичних вузлів визначали їх життєздатність у клітинних суспензіях за проникністю плазматичної мембрани для 0,2% розчину трипанового синього, приготовленого на 0,9% NaCl (Strober, 2001). Загальну кількість клітин визначали підрахунком клітин у камері Горяєва (Strober, 2001). Відсоток життєздатних клітин у отриманих суспензіях становив близько 90%.

2.9.2. Метод ДНК-комет (лужний варіант)

Ступінь ушкодження ДНК клітин визначали методом лужного геле-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет) (Afanasieva et al., 2010) з деякими модифікаціями. Метод дозволяє виявляти одониткові розриви ДНК та лужнолабільні ділянки що утворюються внаслідок генотоксичного впливу різних факторів. Ступінь ушкодження ДНК визначали на свіжовиділених клітинах тимуса, лімфатичних вузлів а клітинах яєчників. З виділених клітин готували суспензії концентрацією 2×10^4 клітин/мл. Отриману суспензію клітин у кількості по 80 мкл змішували з 0,5% розчином легкоплавкої агарози у ЗФР та наносили на предметні скельця, попередньо покриті 1% розчином тугоплавкої агарози. Препарати витримували 10 хв на льоду, після чого поміщали у горизонтальний посуд з лізуючим розчином на 2 години за температури 4 С. Обробка зразків у буфері з високим вмістом солі призводить до лізису клітинних мембран та екстракції білків, внаслідок чого ДНК здатна виходити з клітини.

Препарат з лізованими клітинами витримували 30 хв у лужному буфері (pH > 13) та поміщали у камеру для горизонтального електрофорезу. Електрофорез проводили протягом 30 хв при напрузі 24 В і силі струму 100 мА. По закінченню електрофоретичного розділення проводили нейтралізацію шляхом триразового занурення препаратів у посуд з трис-буфером (pH 7,5) на 5 хв, висушували на повітрі та забарвлювали. Забарвлення проводили із застосуванням флуоресцентного барвника DAPI (4',6-діамідіно-2- феніліндол) у концентрації 0,5 мкг/мл у ЗФР, для чого наносили краплину барвника безпосередньо на клітини та поміщали у темряву на 10 хвилин. Препарати висушували та фіксували у спирті. Аналіз електрофореграм проводили візуально за допомогою флуоресцентного мікроскопа «Люам І-1» та

відеосистеми передачі зображення на комп'ютер із використанням водно-імерсійного об'єктива ($\times 30$). Для оцінки ступеня ушкодження ДНК застосовували напівкількісний метод аналізу, заснований на визначенні інтенсивності флуоресцентного забарвлення та довжини “хвоста” комети. На кожному мікропрепараті аналізували не менше 100 окремо розташованих «ДНК-комет». Комети поділяли за загальновизнаною класифікацією (Collins, 2004; Cardoso et al., 2022) в залежності від ступеня вивільнення ДНК на 5 типів з відповідним числовим значенням від 0 до 4, залежно від співвідношення ДНК у “голові” та “хвості” комети (рис 2.2, 2.3). Клас 0 відповідає інтактним клітинам без ознак ушкодження ДНК, тоді як класи 1–4 відображають поступове зростання ступеня фрагментації ДНК. Ступінь ушкодження ДНК при цьому визначали як індекс ДНК-комет (ІДК), який обчислювали за формулою: $ІДК = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \sum n$, де n_0 – n_4 – число ДНК-комет кожного типу, $\sum n$ – сума підрахованих ДНК-комет (Sorochinska & Mikhaileenko, 2008; Грушка та ін., 2017)

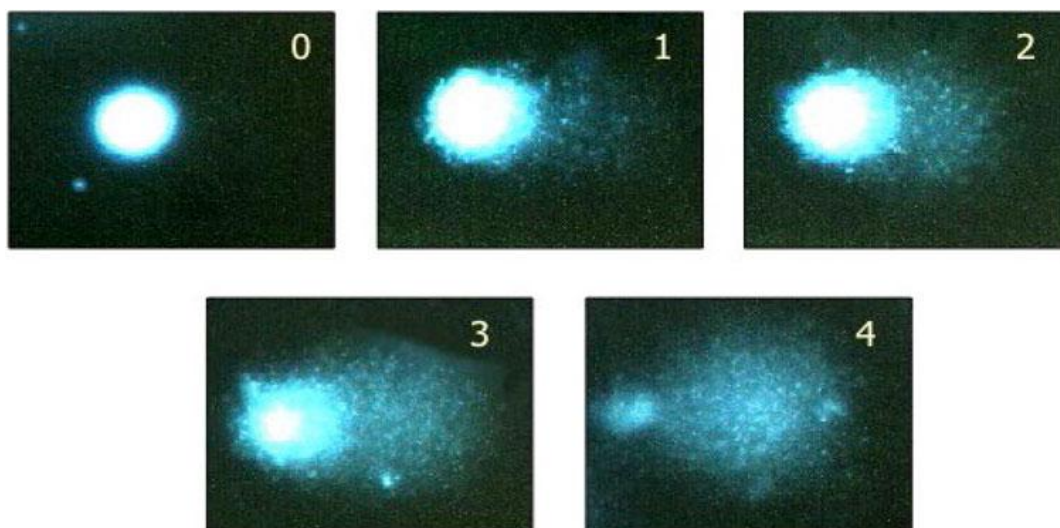


Рисунок 2.2. Класи пошкодження ДНК (0–4) за результатами лужного методу ДНК-комет за (Cardoso et al., 2022).

ДНК-комети поділяли за класифікацією на 5 класів залежно від співвідношення ДНК у «голові» та «хвості» комети. Виділяли такі класи ушкодження ДНК (0–4):

- 0 - інтактні клітини, відсутня міграція ДНК; комета має округлу форму без формування хвоста;
- 1 - мінімальні ушкодження ДНК, спостерігається незначна міграція ДНК з формуванням слабо вираженого хвоста комети;
- 2 - помірні ушкодження ДНК, ДНК мігрує до периферії хвоста комети, що свідчить про збільшення кількості розривів ДНК;
- 3 - виражені ушкодження ДНК, міграція ДНК досягає краю хвоста комети та супроводжується його розширенням у перпендикулярному напрямку;
- 4 - тяжкі ушкодження ДНК, характеризуються максимальною міграцією ДНК, значним розширенням хвоста та зменшенням головки комети, що свідчить про масову фрагментацію ДНК (Møller et al., 2023).

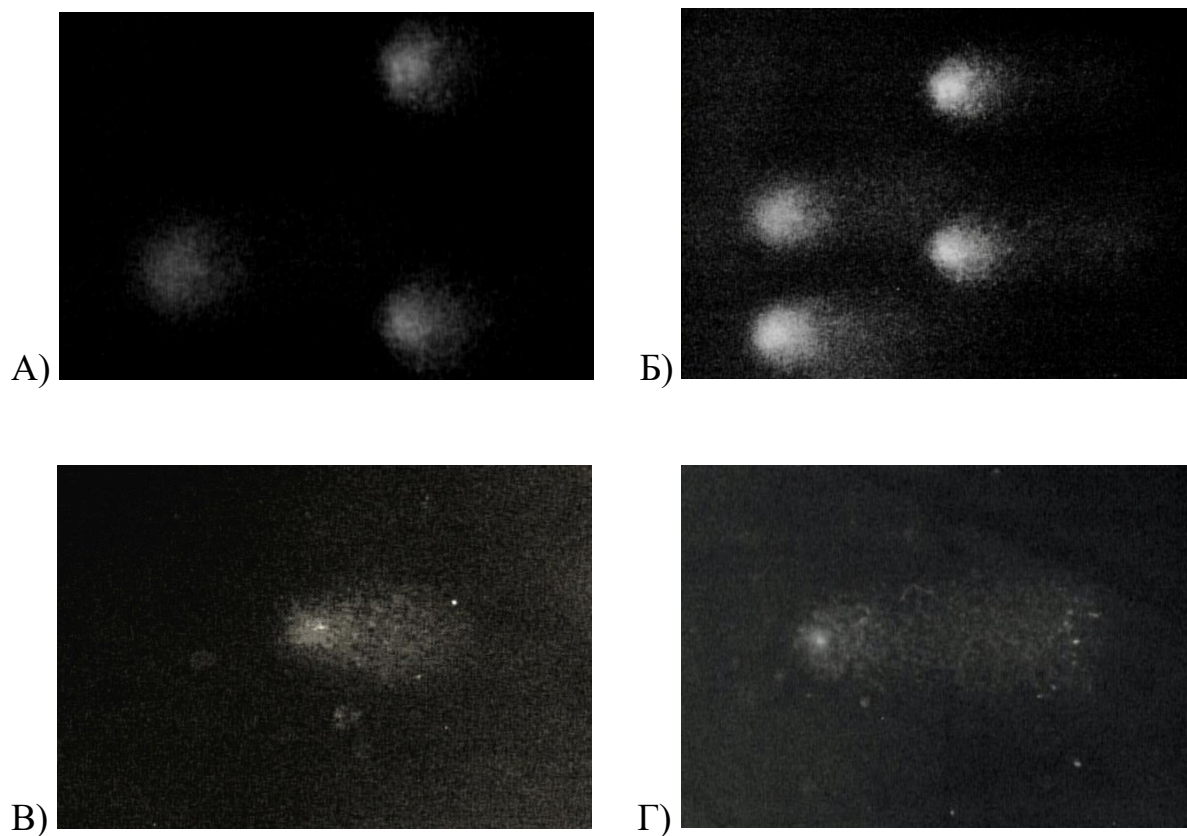


Рисунок 2.3. Клітини тимуса мишей. Метод ДНК-комет. А - контроль: переважають клітини з інтактною ДНК (0–1 класи); Б, В, Г - Б, В, Г — імуноопосередковане ушкодження: представлені клітини з різним ступенем ушкодження ДНК -помірним (2 клас), вираженим (3 клас) та максимальним (4 клас).

Забарвлення барвником DAPI. Мікрофото з люмінесцентного мікроскопа Nikon Eclipse E200, масляно-імерсійний об'єктив Plan Fluor x100.

2.9.3. Метод прижиттєвого подвійного флуоресцентного забарвлення клітин барвниками нуклеїнових кислот

Оцінку шляхів клітинної загибелі проводили методом прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот Hoechst 33342 і йодид пропідіума (Crowley et al., 2016). Морфологічний метод вважають «золотим стандартом» вивчення апоптозу, оскільки не всі біохімічні показники виявляються при деяких видах апоптозу, або мають місце і при некротичній загибелі. Барвники, що зв'язуються з хроматином, дозволяють оцінити характерні морфологічні ознаки апоптозу, зокрема конденсацію хроматину, його периферичне розташування, ущільнення та фрагментацію ядра. Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, США) проникає через неушкоджені клітинні мембрани та забарвлює ядра в синій колір, тоді як йодид пропідіума (Sigma-Aldrich, США) проникає лише в клітини з порушеною цілісністю мембрани та забарвлює їх ядра в червоний колір, що (за відсутності морфологічних ознак апоптозу) дозволяє ідентифікувати некротичну загибель клітин (рис. 2.4). Клітини без ушкодження плазматичної мембрани та без апоптотичних ядер рахувались як життєздатні. Для проведення забарвлення ресуспендували $0,5-1 \times 10^6$ клітин в 180 мкл ЗФР, додавали 20 мкл розчину барвників (до кінцевої концентрації 10 мкмоль/л кожного барвника). Клітини інкубували в темряві протягом 25 хв при 37° С. Барвник відмивали в ЗФР центрифугуванням 5 хв, 200g. Осад ресуспендували і фіксували додаванням 50 мкл 5% розчином формаліну на ЗФР протягом 2 хвилин. Після відмивання (центрифугування 5 хв, 500 g) осад ресуспендували в 10 мкл дистильованої води та готували мазки. Для підрахунку клітин використовували відеосистему передачі зображення з люмінесцентного мікроскопа "Люмам І-1" (водно-імерсійний об'єктив х 85) на комп'ютер. Визначали відсоток живих,

некротичних та апоптотичних клітин при підрахунку не менш ніж 200 клітин (Грушка., 2017).

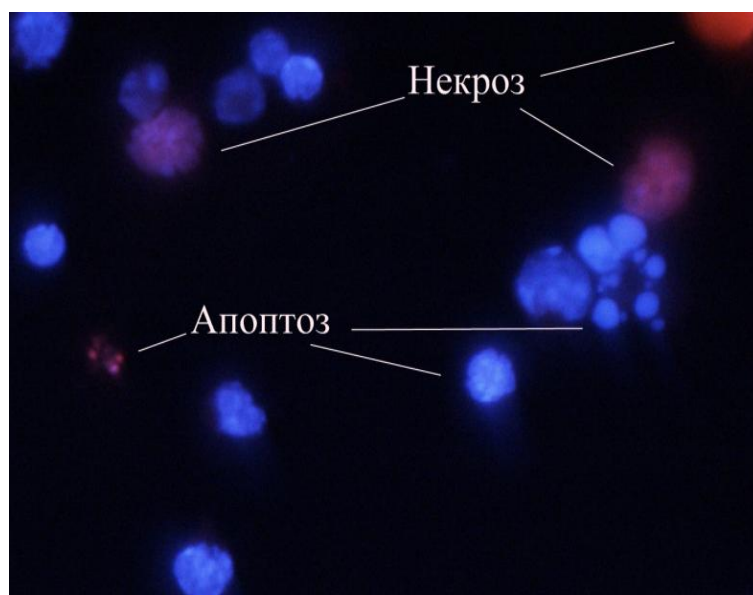
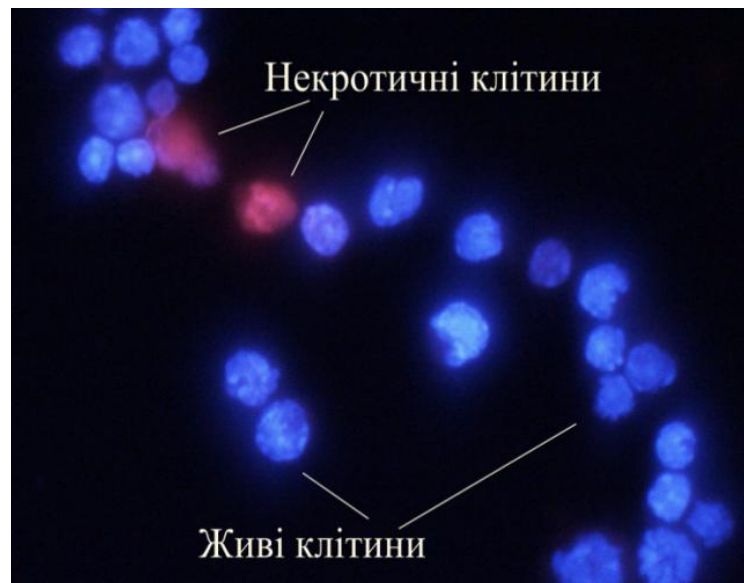


Рисунок 2.4. Клітини тимуса мишей. Оцінка життєздатності та типів клітинної загибелі імункомпетентних клітин методом прижиттєвого подвійного флуоресцентного забарвлення барвниками Hoechst 33342 і йодид пропідіума. Мікрофото з люмінесцентного мікроскопа Nikon Eclipse E200, масляно-імерсійний об'єктив Plan Fluor x100.

2.10. Визначення рівня експресії мРНК генів HAS2, COX2 та GREM1 у кумулюсних клітинах методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР)

Виділені кумулюсні клітини переносили у пробірку з 5–10 мкл середовища або фізіологічного розчину та центрифугували 5 хв при 5000 обертів. Отриманий гомогенат використовували для виділення РНК. Тотальну РНК виділяли з фолікулярних клітин за допомогою набору Trizol RNA-prep. У пробірку із досліджуваним зразком додавали 500 мкл Trizol реагенту, інтенсивно перемішували до гомогенної емульсії і залишали суміш на 3 хв при 4° С. До проби додавали 100 мкл суміші хлороформу та ізоамілового спирту у співвідношенні 49:1, інтенсивно перемішували та термосували 3 хв при 4°С. Для роз'єднання фаз проби центрифугували 5 хв при 14000 об/хв. Супернатант відбирали, переносили у чисту пробірку, додавали рівний об'єм ізопропілового спирту, перемішували і залишали на 30 хв при – 20°С. Після центрифугування впродовж 15 хв при 14000 об/хв супернатант обережно видаляли і до осаду додавали 1 мл холодного 75% етилового спирту. Суміш перемішували і центрифугували 5 хв при 14000 об/хв. До отриманого осаду після висушування при 65°С протягом 3 хв додавали 50 мкл екстракційного буфера (ЕкстраГенТМ), інтенсивно перемішували до отримання гомогенної суспензії та залишали протягом 15 хв при кімнатній температурі або витримували 5 хв при 65°С. Після цього знов перемішували вміст пробірки і переносили в охолоджувач (4° С). Для отримання кДНК з виділеної РНК проводили зворотну транскрипцію з використанням набору First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Lithuania).

Методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) збільшували кількість фрагменту досліджуваного гена. Для кількісної оцінки експресії генів використовували по парі специфічних праймерів генів HAS2, COX2 і GREM1, а також гену GAPDH (внутрішній контроль). Ампліфікаційна суміш для ПЛР

містила 2,5 мкл 10-кратного Taq -буферу із сульфатом амонію, 2,5 ммоль хлориду магнію, 0,2 ммоль суміші чотирьох нуклеотидтрифосфатів, 20 ммоль відповідного праймеру та 0,5 ОД рекомбінантної Taq-полімерази і 4 мкл розчину кДНК. Об'єм доводили до 25 мкл деіонізованою водою. Програма для ампліфікації складалася з 30-36 циклів: денатурація - 94° С, 30 с, приєднання праймерів – 55° С, 50 с (для HAS2, COX2 і GREM1), 58° С, 60 с (для GAPDH) і елонгація – 72° С, 60 с. ПЛР проводили в термоциклері GeneAmp System 2700. Розділення ампліфікованих фрагментів здійснювали за допомогою електрофорезу, як зазначено вище.

Отримані ампліфікати розділяли горизонтальним електрофорезом в 1,5%-му агарозному гелі у тріс-боратному буфері (TBE буфер) наступного складу: 0,089 моль Тріс-основа, 0,089 моль борна кислота, 20 ммоль ЕДТА, рН 8,0 з додаванням бромистого етидію. Візуалізацію та оцінку яскравості ампліфікатів після електрофорезу при 160 В протягом 25 хв проводили за допомогою транслюмінатора та програмного забезпечення Vitran (Shepel et al., 2018).

Таблиця 2.1.

Праймери, використані для проведення ПЛР, і розмір ампліфікатів

Ген	Послідовність праймерів (прямий, зворотній)	Розмір ампліфікату /bp
COX2	прямий 5'- GAAGGAACTCAGCACTGCATC -3' зворотній 5'- CAGTCCGGGTACAGTCACACT -3'	213
GREM1	прямий 5'- AAGGCACTTCCTGTACTCTGC - 3' зворотній 5'- TACGACTGAGATGTCAGGGAGA -3'	256
HAS2	прямий 5'- CCTCCAGTTAGTGTCTGGGTTC - 3' зворотній 5'- CTGTGCAGCTATTCCTGTGTTC -3'	409
GAPDH	прямий 5'- GGGTGTGAACCACGAGAAATATGA-3' зворотній 5'- AGCACCAGTGGATGCAGGGATGAT-3'	240

2.11. Дослідження активації NF-κB методом імуноблотингу

З метою визначення активації NF-κB проводили гель-електрофорез ядерних екстрактів печінки в поліакриламідному гелі (SDS-PAGE) з наступним переносом білків на нітроцелюлозну мембрану. Імуноблотинг проводили з використанням моноклональних антитіл до p65-субодиниці NF-κB (Monoclonal Anti-NF-κB p65, Clone NF-12, Sigma, USA). Дослідження виконано на ядерних екстрактах, отриманих від тварин кожної експериментальної групи (не менше трьох незалежних зразків).

Печінку контрольних тварин і мишей, яким вводили КонаА, заморожували в рідкому азоті і гомогенізували в 10-кратному об'ємі буферу (HEPES - 10 ммоль/л, pH=7,9, MgCl₂ - 1,5 ммоль/л, KCl - 10ммоль/л, дитіотреїтол – 0,5 ммоль/л, ЕДТА - 0,1 ммоль/л, PMSF - 0,2 ммоль/л, коктейль інгібіторів протеаз – 0,4 %). Після фільтрування гомогенат інкубували при 0° С 15 хв та центрифугували (14000 g, 15 хв, 4° С) (Lu et al., 2005). Після ретельного видалення супернатанту осад ресуспендували в чотирикратному по відношенню до маси проби печінки об'ємі гіпертонічного буферу (HEPES - 20 ммоль/л, pH=7,9, MgCl₂ - 1,5 ммоль/л, KCl - 10ммоль/л, NaCl-420 ммоль/л, дитіотреїтол – 0,5 ммоль/л, ЕДТА - 0,2 ммоль/л, PMSF - 0,2 ммоль/л, коктейль інгібіторів протеаз – 0,4 %, гліцерол - 25%), інкубували при 0° С на шейкері протягом 30 хв та центрифугували (14000 g, 15 хв, 4° С). В отриманих супернатантах (ядерних екстрактах печінки) визначали концентрацію білків з використанням Bradford reagent (Sigma, USA) за методом Бредфорд (Bradford, 1976).

В отримані ядерні екстракти (4 об'єми) вносили Sample buffer (1 об'єм, Трис-HCl 0,4 М, pH=6,8, гліцерол – 50%, SDS -10%, бромфеноловий синій - 0,04%, β-меркаптоетанол - 4,5%) та піддавали денатурації (5 хв на киплячій водяній бані). Проводили електрофорез ядерних екстрактів (кількість білка -

100 мкг на лінію) в 10% поліакриламідному гелі (SDS-PAGE) в Трис-гліциновому буфері за методом Леммлі (Laemmli, 1970).

Перенос на нітроцелюлозні мембрани (напівсухим методом) здійснювали на обладнанні і за протоколом Cleaver Scientific LTD (CSL Semi Dry Blotting Unit) в трансфер-буфері, рН 8,3 (192 ммоль/л гліцин, 25 ммоль/л Трис, 20% етанол) (Towbin et al., 1979). Контроль ефективності електрофорезу, переносу білків на мембрану та гібридизації здійснювали з використанням системи Chemichrome Western Control (Sigma, USA), яка містить маркери молекулярної маси білків та мишачий IgG (позитивний контроль на вторинні антитіла і візуалізацію результатів).

Після промивання в ЗФР мембрани блокували в ЗФР, який містив 3% знежиреного сухого молока і 0,1 % Твін-20 (ЗФР-М-Т) протягом години на шейкері при кімнатній температурі. Гібридизацію з первинними анти-р65 антитілами (1:1000 в ЗФР-М-Т) проводили на шейкері протягом 2 годин. Мембрани відмивали в ЗФР з 0,1% Твін-20 (3х10 хвилин), піддавали гібридизації протягом 2-х годин при кімнатній температурі з вторинними антитілами (кролячі мічені пероксидазою антитіла до мишачого IgG, Sigma, USA) в розведенні 1:2000 в ЗФР-М-Т, після чого відмивали в ЗФР з 0,1% Твін-20 (3х5хв).

Візуалізацію проводили в 0,05% розчині діамінобензидину і 0,01% перекису водню на 25 ммоль/л ТрисHCl (рН 7,2). Інтенсивність забарвлення визначали методом комп'ютерної денситометрії з використанням програмного забезпечення для аналізу зображень і виражали в умовних одиницях як інтегральну оптичну щільність. Відносну інтенсивність сигналу розраховували порівняно з позитивним контролем NF-κB. Аналіз виконано щонайменше на трьох незалежних блотах, отриманих із зразків трьох окремих тварин кожної експериментальної групи (Макогон та ін., 2012).

2.12. Оцінка транслокації NF-κB в ядра клітин методом імуноцитохімії

З метою визначення локалізації p65 субодиниці NF-κB в клітинах використовували імунопероксидазний метод. Гетеродимер даного транскрипційного фактору знаходиться в цитоплазмі в неактивному стані, а локалізація p65 в ядрах означає, що NF-κB був активований і транслокований в ядро. Імуноцитохімічне виявлення p65 субодиниці NF-κB проводили на відбитках тканини печінки, а також на суспензіях клітин, виділених з тимуса та лімфатичних вузлів мишей через 20 годин після введення КонА.

Відбитки печінки або мазки виділених з тимуса, лімфовузлів фіксували 2 хв в суміші метанол-ацетон, 1:1 при кімнатній температурі з наступним промиванням в ЗФР. Всі інкубаційні цикли, що передбачені при імуноцитохімічному дослідженні, проводили у вологій камері при кімнатній температурі. Ендогенну пероксидазу блокували протягом 30 хвилин (0,3% H₂O₂, 0,1% азид натрію в ЗФР). Блокування неспецифічного зв'язування антитіл проводили в 3% розчині бичачого сироваткового альбуміну з 0,1% азиду натрію протягом 30 хв. Після промивання в ЗФР (двічі по 5 хв) препарати інкубували протягом 18 год при T 4° C з первинними антитілами (моноклональні антитіла до p65 субодиниці NF-κB, "Sigma", USA, 1:200, розведені в ЗФР). Після ретельного відмивання в ЗФР (двічі по 10 хв.) проводили інкубацію з вторинними антитілами (мічені пероксидазою кролячі антимишачі антитіла, "Sigma", USA, 1:100) протягом 60 хв. Зразки відмивали в ЗФР (двічі по 10 хв). Візуалізацію реакції проводили при інкубації препаратів з діамінобензидином за загальноприйнятою методикою. Негативним контролем слугували зразки, які не інкубували з первинними антитілами. Підраховували не менш як 200 клітин в кожному препараті, дослідження проведено на клітинах печінки, тимуса і лімфовузлів, отриманих в 5 в окремих незалежних експериментах. Результати реакції оцінювали напівкількісно за

принципом Астальді, згідно якого досліджувані клітини поділяють на групи в залежності від інтенсивності специфічного забарвлення. Дані виражали в умовних одиницях шляхом розрахунку середнього цитохімічного коефіцієнту - СЦК за формулою: $СЦК = (0 \cdot a + 1 \cdot b + 2 \cdot v + 3 \cdot g + 4 \cdot d) / 100$, де а – д – відсоток однотипних клітин з певним ступенем забарвлення (а – відсутність реакції, б – слабопозитивна реакція, в – помірно позитивна, г – виражено позитивна, д – різко позитивна реакція).

2.13. Використані речовини

- БСА - бичачий сироватковий альбумін (Bovine Serum Albumin, Sigma, USA), який використовували для індукції імунокомплексної імунної відповіді. Речовину вводили у зростаючих дозах 150, 200, 250 та 300 мг/кг;
- ЛПС - ліпополісахарид (Lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4, Sigma, St. Louis, MO, USA), який застосовували для моделювання системної ендотоксемії та активації вродженого імунітету. Препарат вводили у дозі 3 мг/кг маси тіла миші;
- Кон А - конканавалін А (Concanavalin A, Sigma, USA), який використовували для індукції Т-клітинно-опосередкованого імунного ушкодження печінки. Речовину вводили у дозі 25 мг/кг маси тіла;
- Перекис водню (H_2O_2 , Україна) використовували як індуктор оксидативного стресу для моделювання ушкодження клітин активними формами кисню в умовах *in vitro*. Речовину застосовували у концентрації 0,5 ммоль/л;
- Гіпохлорит аніон ($NaOCl$, Україна) використовували для моделювання окисного та хлорокисного ушкодження клітин, що виникає під час активації фагоцитуючих клітин вродженого імунітету. Речовину застосовували у концентрації 100 мкг/мл;

- 4-ГК - 4-гідроксиквіназолін (4-hydroxyquinazoline, Sigma, USA) використовували як інгібітор полі(АДФ-рибозо)полімерази-1 (ПАРП-1). Препарат вводили внутрішньоочеревинно у дозі 100 мг/кг маси тіла двічі на тиждень. У моделі імунокомплексного ушкодження (БСА) 4-ГК вводили за 1 год до введення антигену; у моделі Кон А-індукованого ушкодження - за 2 год до введення Кон А; у моделі ЛПС-індукованої ендотоксемії - за 1 год до введення ЛПС;
- 3-АБА - 3-амінобензамід (3-aminobenzamide, Sigma, USA), який також є інгібітором ПАРП-1, розчиняли у фізіологічному розчині та вводили внутрішньоочеревинно у дозі 100 мг/кг маси тіла за 2 год до введення Кон А та за 1 год до введення ЛПС;
- Андрографолід (Andrographolide, Sigma, USA) використовували як природну протизапальну сполуку та інгібітор сигнального шляху NF-κB. Препарат застосовували у дозі 100 мг/кг маси тіла, розчинений у 5 % диметилсульфоксиді (ДМСО), та вводили внутрішньоочеревинно за 2 год до введення Кон А;
- Куркумін (Curcumin, Sigma, USA), суспендований у 5% етанолі, вводили внутрішньоочеревинно у дозі 100 мг/кг маси тіла за 2 год до та через 1 год після введення КонА;
- Гліциризинат амонію (ГА, Ammonium glycyrrhizinate, Sigma, USA) використовували як інгібітор HMGB1 для оцінки його ролі у розвитку імуноопосередкованого ушкодження. Препарат застосовували у дозах 10, 50, 100 та 200 мг/кг;
- ГС - 2-етил-6-метил-3-гідроксипіридину сукцинат, який використовували як антиоксидантний та мембраностабілізуючий засіб. Препарат застосовували у дозі 100 мг/кг маси тіла та вводили внутрішньоочеревинно один раз на тиждень на тлі імунізації БСА;

- Кверцетин застосовували у дозі 4,5 мг/кг маси тіла миші, вводячи препарат за 12 год до введення ЛПС. З огляду на низьку розчинність кверцетину у воді, спочатку його розчиняли у невеликому об'ємі етилового спирту, після чого доводили до необхідної концентрації фосфатно-сольовим буфером (ФСБ);
- Цитрат германію (ЦГ) (ТОВ «Нанотехнології і наноматеріали», Україна), отриманий методом електроімпульсної нанотехнології (Патент України № 38391; Косінов, Каплуненко, 2009), який характеризується високим ступенем чистоти (99,99 % Ge), біодоступністю та екологічною безпекою, використовували як наноструктуровану сполуку германію у дозі 100 мг/кг маси тіла.
- Наночастинки срібла (НЧС, AgNPs) — сферичної форми, розміром 30 нм, з концентрацією 8 мг/мл (за металом) та характерним коричневим забарвленням. НЧС синтезовані в Інституті біоколоїдної хімії ім. Ф.Д. Овчаренка НАН України методом хімічної конденсації за оригінальним протоколом із використанням таких реагентів: нітрат срібла (AgNO_3 , BioXtra, >99%, Sigma-Aldrich), карбонат калію (K_2CO_3 , 99,995% trace metals basis, Sigma-Aldrich) та танін (ACS reagent, Sigma-Aldrich). Отримані НЧС не проявляли генотоксичності (тест *in vitro* на культурі клітин CHO-K1, кометний аналіз; тест *in vivo* на щурах лінії Wistar, кометний аналіз) та не мали мутагенного ефекту (тест-об'єкти - апікальні меристеми *Allium cepa* та миші лінії BALB/c, метод аналізу хромосомних аберацій і мікроядерний тест) (рис. 2.5). Перед введенням AgNPs розводили у воді для ін'єкцій. Досліджували вплив НЧС при введенні у дозі 2 мг/кг маси тіла внутрішньовенно. Препарат вводили за 1 год до введення БСА відповідно до схеми імунізації тварин. Кратність введення становила 6 разів ($n = 8$ тварин у групі). Контрольним тваринам вводили фізіологічний розчин (Ступчук, 2018; Срібна та ін., 2018).

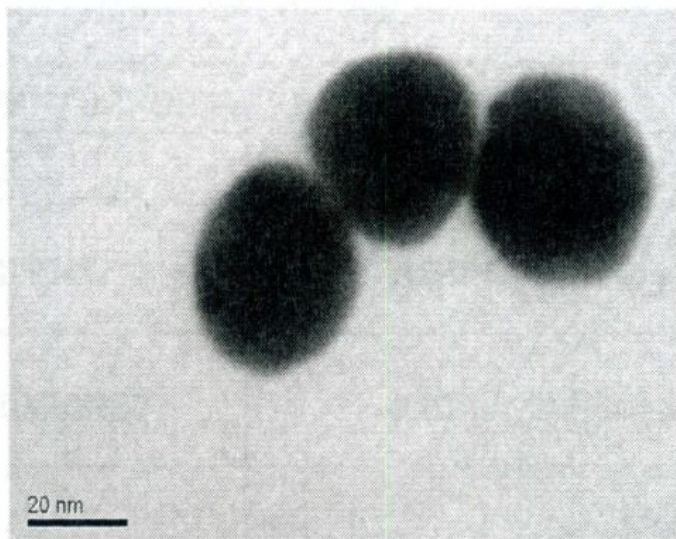


Рисунок 2.5. Електронно-мікроскопічне зображення НЧС.

- Трипановий синій (Sigma-Aldrich, США) використовували для визначення життєздатності клітин методом виключення барвника та оцінки відсотка клітин із збереженою цілісністю плазматичної мембрани.
- Флуоресцентні барвники Hoechst 33342 та пропідій йодид (Sigma-Aldrich, США), використовували для оцінки життєздатності клітин та визначення апоптотичних і некротичних змін;
- DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma-Aldrich, США) використовували для візуалізації ДНК у клітинах при аналізі методом ДНК-комет;
- 3,3'-діамінобензидин (DAB, 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, Sigma-Aldrich, USA) - хромогенний субстрат пероксидази, який використовується для візуалізації імуноцитохімічної реакції шляхом утворення коричневого нерозчинного продукту;
- Культуральне середовище DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) з 15 мМ HEPES та концентрацією Ca^{2+} - 1,71 мМ (Sigma-Aldrich, США), використовували для культивування клітин та підтримання їх життєздатності *in vitro*.

- первинні антитіла: поліклональна кроляча сироватка, специфічна до полі(АДФ-рибози) (BD Pharmingen, США), для імуоцитохімічного визначення вмісту полі(АДФ-рибози) в досліджуваних клітинах;
- вторинні антитіла: козячі антитіла до імуноглобулінів G кроля, кон'юговані з пероксидазою хрому (Sigma-Aldrich, США), для візуалізації специфічної імуоцитохімічної реакції;
- первинні антитіла: моноклональні мишачі антитіла до p65 субодиниці NF-κB (Sigma США), для визначення p65-субодиниці NF-κB у досліджуваних зразках;
- вторинні антитіла: кролячі антитіла до імуноглобулінів миші, кон'юговані з пероксидазою хрому (HRP-anti-mouse IgG, SigmaСША), для візуалізації специфічного зв'язування первинних антитіл.

2.14. Загальна схема експерименту

Модель імунокомплексного ушкодження, індукованого БСА

Першу експериментальну модель імуноопосередкованого ушкодження відтворювали шляхом введення мишам бичачого сироваткового альбуміну (БСА) з метою індукції імунокомплексної патології. Дозу БСА підвищували кожні 7 днів. Досліджувані сполуки 4-ГК, ГС, НЧС вводили тваринам у зазначених дозах за 1-2 години до введення БСА відповідно до схеми експерименту. Після завершення експерименту тварин декапітували та проводили забір органів (печінки, аорти, селезінки, тимусу, лімфатичних вузлів та яєчників), а також сироватки крові для подальших досліджень. За умов дії БСА оцінювали функціональну активність нейтрофілів, інтенсивність процесів ПОЛ за вмістом МДА, визначали рівень ушкодження ДНК у клітинах імунної та репродуктивної системи, а також аналізували життєздатність клітин, функціональний стан оваріальної системи, експресію мРНК генів HAS2, COX2 та GREM1 та рівень активації ПАРП за вмістом полі(АДФ-рибози).

Етап	Препарат/вплив	Доза та режим введення
Індукція	БСА	150 → 200 → 250 → 300 мг/кг (поетапно, кожні 7 днів)
Додатково	4-ГК	100 мг/кг, за 1 год до БСА, 2 рази/тиждень
	ГС	100 мг/кг, за 1 год до БСА, 1 раз/тиждень
	НЧС	2 мг/кг, за 1 год до БСА, 1 раз/тиждень
Завершення	Декапітація	Забір органів та крові

Модель Т-клітинно-опосередкованого ушкодження печінки, індукованого введенням КонаА

Другу експериментальну модель імуноопосередкованого ушкодження відтворювали шляхом введення мишам конканаваліну А (КонаА), що індукує Т-клітинно-опосередковане ушкодження печінки. Досліджувані сполуки 4-ГК, 3-АБА, куркумін та андрографолід вводили тваринам у зазначених дозах за 2 год до введення КонаА відповідно до схеми експерименту. Після завершення експерименту (через 20 год після введення КонаА) тварин декапітували та проводили забір органів (печінки, тимуса та лімфатичних вузлів), а також сироватки крові для подальших досліджень. За умов впливу КонаА оцінювали функціональну активність нейтрофілів, інтенсивність оксидативного стресу за показниками ПОЛ - вмістом МДА та активністю СОД і каталази, рівень ушкодження ДНК у ІКК, їх життєздатність і шляхи клітинної загибелі. Досліджували NF-κB-опосередковані механізми ушкодження, зокрема активацію NF-κB (за результатами імуноблотингу та імуноцитохімічного визначення ядерної транслокації p65-субодиниці), а також його взаємозв'язок з активацією PARP-1 за вмістом полі(АДФ-рибози). Додатково оцінювали вплив 4-ГК, куркуміну та андрографоліду на окремі досліджувані показники. Проводили гістологічні та цитологічні дослідження.

Етап	Препарат/вплив	Доза та режим введення
Індукція	КонаА	25 мг/кг
Додатково	4-ГК / 3-АБА	100 мг/кг, за 2 год до КонаА
	Куркумін	100 мг/кг, за 2 год до КонаА та через 1 год після
	Андрографолід	100 мг/кг, за 2 год до КонаА та через 1 год після
Завершення	Декапітація	Через 20 год після введення КонаА, забір органів

Модель системної ендотоксемії, індукованої ЛПС

Третю експериментальну модель імуноопосередкованого ушкодження відтворювали введенням мишам ЛПС, що індукує розвиток системної ендотоксемії. Досліджувані сполуки 4-ГК, 3-АБА, ГА, кверцетин та цитрат германію (ЦГ) вводили тваринам у зазначених дозах до введення ЛПС відповідно до схеми експерименту. Після завершення експерименту (через 20 год після введення ЛПС) тварин декапітували та проводили забір імунокомпетентних органів (тимуса та лімфатичних вузлів) та сироватки крові для подальших досліджень. При впливі ЛПС оцінювали функціональну активність нейтрофілів, інтенсивність процесів ПОЛ за вмістом МДА, визначали рівень ушкодження ДНК у клітинах імунної системи, аналізували життєздатність клітин та роль HMGB1 у розвитку імуноопосередкованих ушкоджень.

Етап	Препарат/вплив	Доза та режим введення
Індукція	ЛПС	3 мг/кг
Додатково	4-ГК / 3-АБА	100 мг/кг, за 1 год до ЛПС
	ГА	10, 50, 100 та 200 мг/кг.
	Кверцетин	4,5 мг/кг, за 12 год до ЛПС
	ЦГ	100 мг/кг, за 24 та 1 год до ЛПС
Завершення	Декапітація	Через 20 год після введення ЛПС, забір органів та крові

Модель оксидативного стресу in vitro

Четверту експериментальну модель використовували для відтворення оксидативного стресу in vitro у ІКК. Оксидативне ушкодження індукували додаванням H_2O_2 або гіпохлорит-аніону (OCl^-), що призводить до генерації АФК. За умов оксидативного стресу in vitro оцінювали прямий вплив інгібіторів ПАРП-1 (4-ГК та 3-АБА) на рівень ушкодження ДНК, життєздатність та рівень загибелі клітин тимуса і лімфатичних вузлів.

Етап	Препарат/вплив	Доза та режим введення
Індукція	H_2O_2	0,5 ммоль/л
	Гіпохлорит	100 мкг/мл
	Інкубація	37 °C
Додатково	4-ГК / 3-АБА	100 мкмоль/л / 2 ммоль/л,, за 15 хв до H_2O_2 та NaOCl
Завершення	Аналіз клітин	Через 1 год після інкубації

2.15. Методи статистичної обробки результатів дослідження

Порівняння двох груп даних здійснювали після перевірки нормальності розподілу за критеріями Колмогорова–Смирнова або Д’Агостіно–Пірсона. За нормального розподілу статистичну обробку проводили з використанням t-критерію Стюдента; результати подавали як $M \pm m$ (середнє $\pm$ стандартна похибка середнього). За відсутності нормального розподілу застосовували непараметричний критерій Манна–Уїтні, а дані подавали як медіану [мінімальне; максимальне значення]. Значення $p < 0,05$ вважали статистично значущими. Порівняння трьох і більше груп даних здійснювали після

перевірки нормальності розподілу за критеріями Колмогорова-Смирнова або Д'Агостіно-Пірсона.

За нормального розподілу застосовували однофакторний дисперсійний аналіз (one-way ANOVA) з подальшим множинним порівнянням за тестом Ньюмена-Кейлса (post hoc). У разі відсутності нормального розподілу використовували непараметричний аналог ANOVA – критерій Краскела-Уолліса з наступним порівнянням між групами з використанням критерію Данна. Значення $p < 0,05$ вважали статистично значущими. Статистичну обробку даних здійснювали з використанням програм STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., USA) та GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, USA).

РОЗДІЛ 3

ВІДТВОРЕННЯ МОДЕЛЕЙ ІМУНООПОСЕРЕДКОВАНОГО УШКОДЖЕННЯ

3.1. Розробка та характеристика моделі імунокомплексного ушкодження у мишей, індукованого БСА

На початковому етапі досліджень було розроблено експериментальну модель системної гіперімунокомплексемії у мишей шляхом тривалої імунізації чужорідним білковим антигеном - бичачим сироватковим альбуміном (БСА) з метою вивчення механізмів імунокомплекс-опосередкованого ушкодження. У межах експериментальної моделі проводили оцінку основних параметрів гуморальної та клітинної ланок імунітету, зокрема: 1) наявності імунних комплексів у системному кровообігу та їх відкладання у тканинах різних органів; 2) морфологічних змін у їх гістоструктурі; 3) функціонального стану клітин природного та адаптивного імунітету (нейтрофілів, моноцитів/макрофагів, Т- і В-лімфоцитів центральних та периферичних органів імунної системи); 4) життєздатності імуноцитів, проявів генотоксичного стресу та основних шляхів їх загибелі (Макогон та ін., 2014, патент).

3.1.1. Оцінка утворення та фіксації імунних комплексів і гістоструктурні зміни тканин

Після введення БСА мишам виявлено зміни гуморальної ланки імунної системи. Встановлено зростання вмісту циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в сироватці крові за умов впливу БСА з $45,9 \pm 4,0$ у.о. у контролі до $56,7 \pm 3,6$ у.о. ($p < 0,05$). Підвищення рівня ЦІК у сироватці крові супроводжувалося

вираженим посиленням їх фіксації в тканинах досліджуваних органів. За результатами імунофлуоресцентного дослідження відбитків органів мишей, імунізованих БСА, встановлено збільшення відкладення імунних комплексів (ІК), яке оцінювали напівкількісно за 4-бальною шкалою. Так, у печінці інтенсивність відкладення ІК зростала з $0,38 \pm 0,18$ у.о. в контролі до $3,17 \pm 0,30$ у.о. при дії БСА ($p < 0,001$). У селезінці відповідні показники становили $0,63 \pm 0,18$ у.о. в контролі та $3,00 \pm 0,30$ у.о. при дії БСА ($p < 0,001$). В аорті рівень фіксації ІК збільшувався з $0,25 \pm 0,16$ у.о. до $1,50 \pm 0,23$ у.о. при дії БСА ($p < 0,01$). Найінтенсивніше світіння спостерігалось у печінці та селезінці (рис. 3.1).

Таким чином, отримані результати свідчать, що застосована схема довготривалої імунізації мишей ксеногенним білком сприяє формуванню та накопиченню імунних комплексів у тканинах. Найбільш виражене їх накопичення відзначалося в органах, що забезпечують кліренс імунних комплексів та характеризуються високою насиченістю клітинами вродженого і адаптивного імунітету, що підтверджує ефективність відтворення імунокомплексної моделі ушкодження (Павлович та ін., 2014; Макогон та ін., 2014, патент).

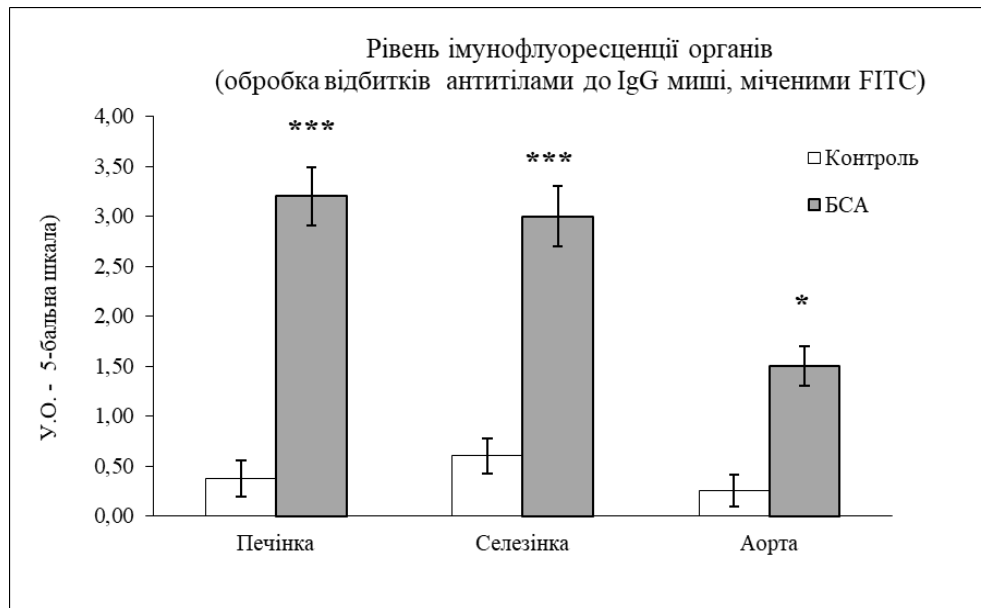


Рисунок 3.1. Імуофлуоресцентний аналіз фіксації імуоглобулінів в тканинах.

Примітка: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем.

З метою морфологічного підтвердження системних патологічних змін у мишей, яким вводили БСА, було проведено гістологічне дослідження печінки, селезінки та аорти. У всіх досліджених органах виявлено ознаки судинного ушкодження різного ступеня вираженості. Відзначалося порушення мікроциркуляції, що проявлялося розширенням перисинусоїдальних просторів, набряком паренхіми, підвищеною проникністю судинної стінки з виходом лейкоцитів та формуванням запальних інфільтратів. Сукупність виявлених змін відповідає морфологічним ознакам васкуліту. Ушкодження судин і фіксація ІК відзначалися в усіх досліджуваних органах, проте більш виражені зміни спостерігалися в печінці та селезінці, які характеризуються високою щільністю клітин моноцитарно-макрофагального ряду (Павлович та ін., 2014; Макогон та ін., 2014, патент).

3.1.2. Функціональна активність клітин вродженого імунітету та інтенсивність перекисного окиснення ліпідів

За умов інтенсивного впливу БСА відзначалися ознаки активації клітин як адаптивного, так і вродженого імунітету. Рівень клітинної сенсibilізації лімфоцитів до антигену оцінювали методом реакції гальмування адгезії лімфоцитів (РГАЛ), що ґрунтується на зміні їх адгезивних властивостей у присутності відповідного антигену. У контрольних мишей інкубація клітин лімфатичних вузлів з БСА супроводжувалася незначним підвищенням адгезії до скла (на 10,5 %). У імунізованих тварин при інкубації лімфоцитів з антигеном реєструвалося достовірне зниження кількості адгезованих клітин (на 33,6 %, $p < 0,01$ при порівнянні з контролем). Медіана зміни адгезії у контрольній групі становила 1,45 [– 8,83; 40,93], тоді як у групі імунізованих тварин вона становила – 21,60 [– 71,40; – 18,50] (критерій Манна-Уїтні, $p = 0,0093$). Зниження адгезії в РГАЛ є ознакою антиген-специфічної сенсibilізації, що підтверджує формування клітинної імунної відповіді (Павлович та ін., 2014). Активація клітинного імунітету супроводжувалася посиленням ефекторних механізмів вродженого імунітету, зокрема активацією нейтрофілів.

Встановлено значне посилення генерації АФК, зокрема супероксид-аніон-радикала, що підтверджувалося зростанням відсотка формазан-позитивних клітин у НСТ-тесті та підвищенням ЦХП, який відображає інтенсивність внутрішньоклітинних метаболічних процесів в окремій клітині. За даними НСТ-тесту нейтрофілів периферичної крові мишей, виявлено збільшення відсотка формазан-позитивних клітин з $24,9 \pm 2,9$ % в контролі до $69,2 \pm 4,0$ % ($p < 0,001$) та ЦХП з $0,30 \pm 0,03$ в контролі до $0,92 \pm 0,08$ ($p < 0,01$).

Паралельно підвищувався СЦК реакції на вміст катіонних білків (ЛКТ), який у контрольних мишей становив $0,068 \pm 0,003$ у.о., тоді як за умов

імунізації зростав до $0,33 \pm 0,05$ ($p < 0,001$) (табл. 3.1). Отримані показники відображають підвищення функціонально-метаболічної активності клітин неспецифічної резистентності. Неферментативні катіонні білки лізосом, окрім антимікробної дії, характеризуються прозапальними властивостями та здатністю посилювати судинну проникність і активацію лейкоцитів. Ознакою індукованого імунізацією запального процесу був зсув лейкограми крові вліво, що супроводжувався збільшенням загального відсотка нейтрофілів (з $12,8 \pm 3,4\%$ у контролі до $33,0 \pm 6,3\%$ у імунізованих тварин, $p < 0,01$) та паличкоядерних нейтрофільних гранулоцитів (з $4,8 \pm 1,5\%$ у контролі до $9,3 \pm 1,2\%$, $p < 0,01$).

Досліджуючи стан ПОЛ у печінці мишей за умов імунокомплексної патології, індукованої введенням БСА, оцінювали рівень малонового діальдегіду (МДА) у тканині печінки. У групі БСА відзначено достовірне підвищення рівня МДА в печінковій тканині приблизно у 2,3 раза ($p < 0,05$) (табл. 3.1).

Отримані результати свідчать, що імунокомплексне ушкодження БСА супроводжується активацією клітин вродженого імунітету та посиленням їх функціонально-метаболічної активності. Підвищення генерації АФК нейтрофілами, збільшення вмісту лізосомальних катіонних білків та зсув лейкоцитарної формули крові у бік нейтрофілії відображають розвиток системної запальної реакції. Одночасне підвищення рівня продуктів ПОЛ у печінці свідчить про формування оксидативного стресу, який може відігравати важливу роль у механізмах ушкодження клітин та тканин за умов імунокомплексної патології. Таким чином, виявлені зміни відображають тісний зв'язок між активацією імунної системи, генерацією АФК та розвитком оксидативного стресу клітин.

Таблиця 3.1.

Показники функціонально-метаболічної активності клітин вродженого імунітету та інтенсивності перекисного окиснення ліпідів за умов дії БСА

Параметр	Показник	Контроль	БСА
Киснезалежна активність нейтрофілів (НСТ-тест)	Формазан-позитивні клітини, %	$24,9 \pm 2,9$	$69,2 \pm 4,0^{***}$
	Цитохімічний показник	$0,30 \pm 0,03$	$0,92 \pm 0,08^{**}$
Лізосомальні катіонні білки	Середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК)	$0,068 \pm 0,003$	$0,33 \pm 0,05^{***}$
Нейтрофіли Периферичної крові (лейкограма)	Загальна кількість нейтрофілів, %	$12,8 \pm 3,4$	$33,0 \pm 6,3^{**}$
	Паличкоядерні нейтрофіли, %	$4,8 \pm 1,5$	$9,3 \pm 1,2^{**}$
Перекисне окиснення ліпідів	МДА, нмоль/мг тканини	$4,7 \pm 0,3$	$10,8 \pm 0,6^*$

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем.

3.1.3. Оцінка інтегральної цілісності геному імунокомпетентних клітин

Ступінь ушкодження ДНК в імунокомпетентних клітинах при введенні БСА, оцінювали за допомогою методу ДНК-комет, згідно з яким довжина та інтенсивність світіння хвоста комети позитивно корелюють зі ступенем ушкодження ДНК. Показано, що інтегральний індекс ушкодження ДНК (ІДК), який враховує зміни кількості всіх типів комет із різним ступенем ушкодження, через 6 тижнів після початку введення БСА збільшувався як в клітинах лімфатичних вузлів, так і в клітинах тимуса в 4 рази ($p < 0,001$ відносно контролю) (рис. 3.2). Отримані дані свідчать про розвиток генотоксичного стресу в клітинах центрального і периферичних органів імунної системи.

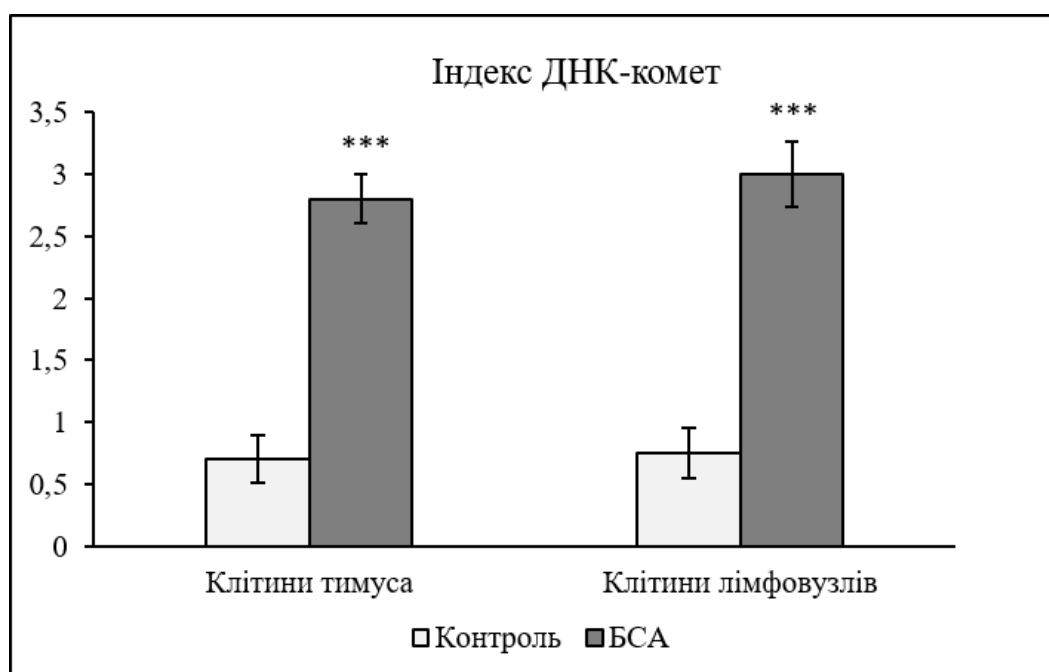


Рисунок 3.2. Індекс ушкодження ДНК (ІДК) у клітинах тимуса та лімфатичних вузлів за умов введення БСА (метод ДНК-комет).

Примітка: *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем.

За умов введення БСА відбувається ушкодження ДНК клітин тимуса: зменшується відсоток клітин тимуса 0/1-го класу до $9,86 \pm 3,01 \%$ ($p < 0,05$) порівняно з $30,80 \pm 7,65 \%$ у контролі, а також клітин 2-го класу до $13,66 \pm 2,45 \%$ порівняно з $27,40 \pm 4,36 \%$ ($p < 0,05$). Разом з тим, відсоток клітин 4-го класу зростає до $47,64 \pm 4,99 \%$ ($p < 0,05$) порівняно з $21,41 \pm 7,60 \%$ в контролі. Відсоток клітин 3-го класу статистично не відрізняється від контрольних значень і складає, відповідно, $28,84 \pm 1,55 \%$ (в контролі $20,39 \pm 3,75\%$) (рис. 3.3) (Грушка та ін., 2015).

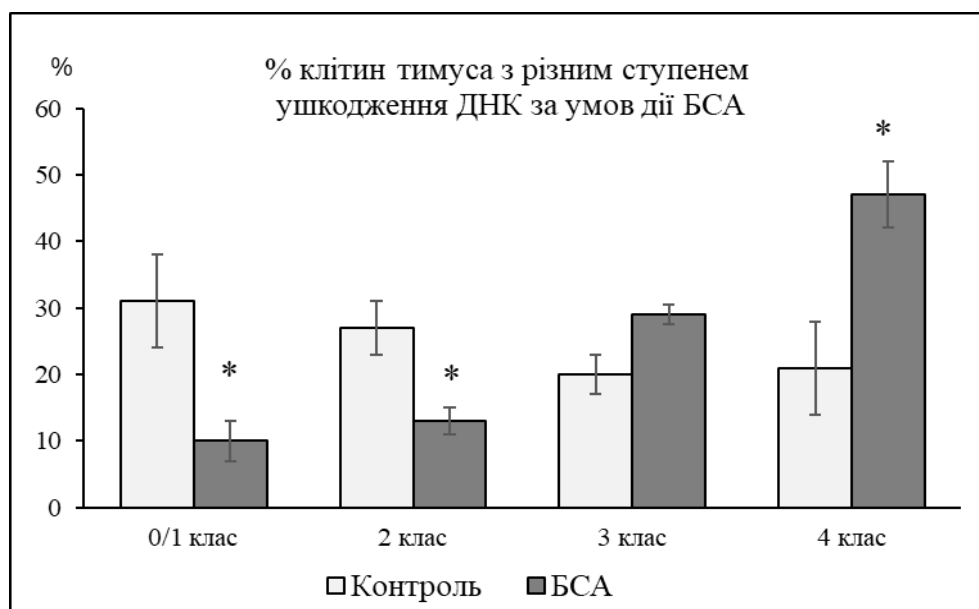


Рисунок 3.3. Вплив БСА-індукованого імунокомплексного ушкодження на ступінь ушкодження ДНК клітин тимуса (метод ДНК-комет).

Примітка: * $p < 0,05$ - порівняно з контролем.

Також під дією БСА відбувається ушкодження ДНК клітин лімфатичних вузлів: зменшується відсоток клітин 0/1-го і 2-го класів до, відповідно $17,13 \pm 6,00 \%$ ($p < 0,05$) і $12,92 \pm 1,55 \%$ ($p < 0,01$) у порівнянні з $39,46 \pm 6,13 \%$ та $27,83 \pm 2,27 \%$ у контролі. Водночас відсоток клітин з ушкодженням 4-го класу зростає до $47,03 \pm 5,38 \%$ ($p < 0,001$) у порівнянні з $13,60 \pm 2,2 \%$ в контролі. Відсоток клітин 3-го класу статистично не відрізняється від контрольних значень і становить $22,88 \pm 4,44 \%$ (рис. 3.4) (Грушка та ін., 2015). Таким чином, встановлено, що введення мишам протягом 6 тижнів чужорідного білка БСА, призводить до розвитку генотоксичного стресу клітин тимусу та лімфатичних вузлів.

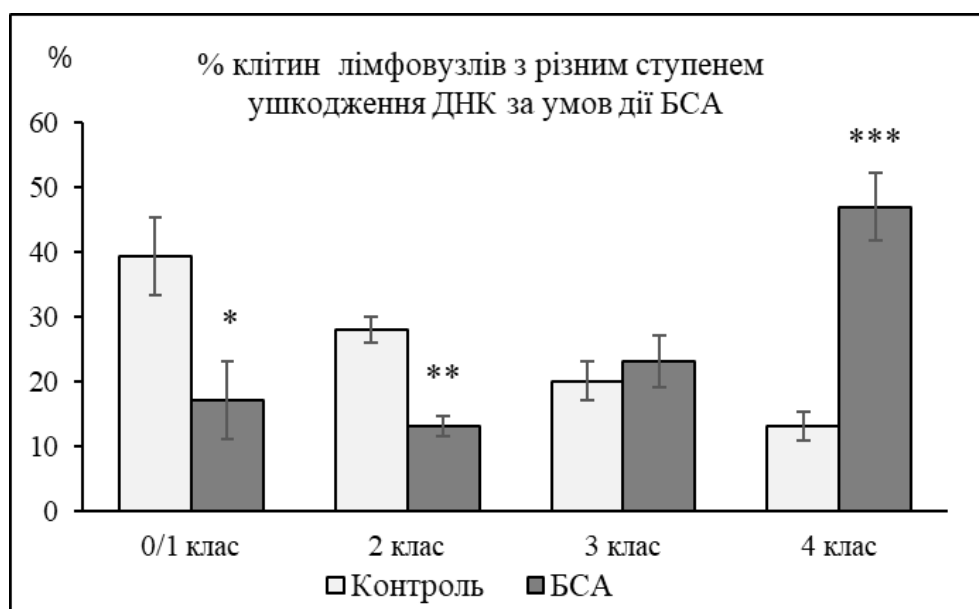


Рисунок 3.4. Вплив БСА-індукованого імунотоксичного ушкодження на ступінь ушкодження ДНК клітин лімфатичних вузлів (метод ДНК-комет).

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем.

3.1.4. Дослідження шляхів загибелі клітин імунокомпетентних органів

Відомо, що розвиток імунної відповіді, який супроводжується посиленням проліферації та диференціації імунокомпетентних клітин, завершується активаційно-індукованою загибеллю лімфоцитів, який є важливим гомеостатичним механізмом, спрямованим на обмеження надмірних імунних та запальних реакцій. У нашому експерименті введення чужорідного білка БСА, що призводило до розвитку імунокомплексного ушкодження, супроводжувалося підвищенням рівня клітинної загибелі як у тимусі, так і в лімфатичних вузлах.

У клітинах лімфатичних вузлів відсоток живих клітин знижувався з $87,1 \pm 1,5$ % в контролі до $76,9 \pm 1,2$ % ($p < 0,001$) за умов введення БСА. При цьому відсоток некротичних клітин зростав з $4,76 \pm 0,78$ % до $10,05 \pm 0,58$ % ($p < 0,001$), що відповідає збільшенню у 2,1 раза. Відсоток клітин з ознаками апоптозу також достовірно підвищувався - з $8,16 \pm 0,86$ % до $13,05 \pm 0,9$ %, (у 1,6 рази в порівнянні з контролем; $p < 0,01$), що свідчить про активацію програмованої загибелі імуноцитів (рис. 3.5). Подібна тенденція спостерігалася і в клітинах тимуса: відсоток живих тимоцитів знижувався з $91,7 \pm 0,79$ % у контролі до $87,56 \pm 1,35$ % ($p < 0,05$) у імунізованих БСА тварин. Некротична загибель посилювалася з $2,7 \pm 0,36$ % до $4,44 \pm 0,70$ % ($p < 0,05$), що відповідає збільшенню приблизно у 1,6 раза. Водночас відсоток клітин з морфологічними ознаками апоптозу зростав з $5,6 \pm 0,7$ % до $8,0 \pm 1,38$ % (у 1,4 раза), однак ці зміни були статистично недостовірними (рис. 3.5).

Отримані результати свідчать, що гіперімунокомплексемія, індукована БСА, супроводжується зниженням життєздатності імунокомпетентних клітин та активацією механізмів їх загибелі, вираженість і характер яких залежать від органа імунної системи. Посилення некротичної загибелі спостерігається як у

клітинах тимуса, так і в клітинах лімфатичних вузлів, що вказує на системний характер ушкодження за умов довготривалого антигенного навантаження. При цьому більш вираженим некроз був у клітинах лімфатичних вузлів, що може бути пов'язано з їх безпосередньою участю в імунній відповіді та вищим метаболічним навантаженням (Макогон, патент 2014; Грушка та ін., 2015).

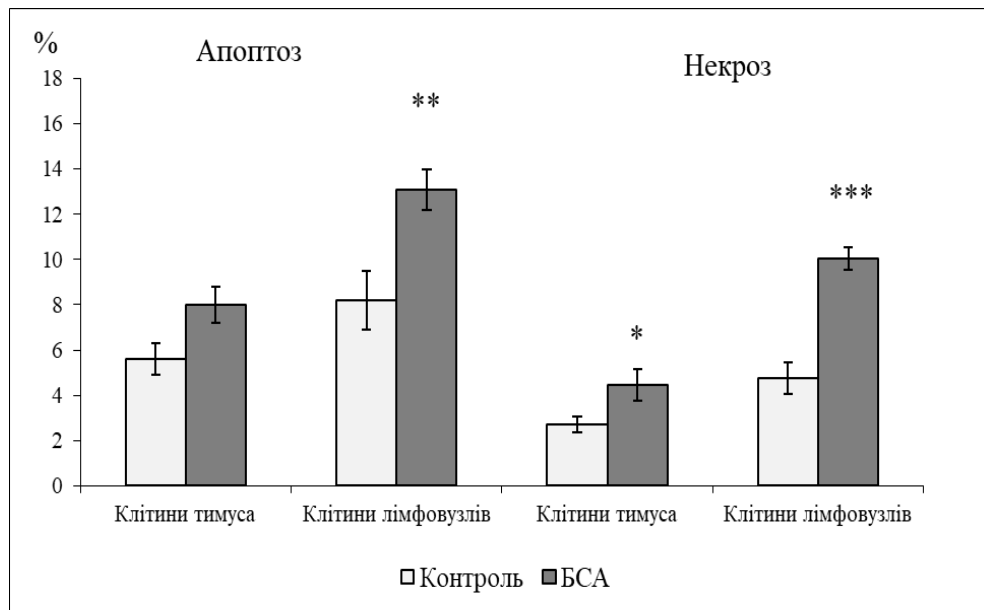


Рисунок 3.5. Вплив БСА-індукованого імунокомплексного ушкодження на відсоток апоптотичних та некротичних клітин тимуса та лімфатичних вузлів мишей.

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем.

3.1.5. Вплив БСА-індукованого ушкодження на функціональний стан оваріальних клітин

При дослідженні було проаналізовано вплив введення БСА на оваріальну функцію, зокрема на параметри мейотичного дозрівання ооцитів, рівень апоптозу клітин фолікулярного мікрооточення та ступінь ушкодження ДНК в оваріальних клітинах. Це дозволило оцінити адекватність моделі імунокомплексного ушкодження для подальшого вивчення механізмів розвитку та можливостей корекції дисфункції яєчників.

3.1.5.1. Мейотичне дозрівання ооцитів

За умов введення БСА було досліджено функціональний стан клітин яєчника. Встановлено, що введення антигену супроводжується пригніченням мейотичного дозрівання ооцитів як на стадії метафази I, так і на стадії метафази II - відповідно у 1,35 і 1,38 рази порівняно з контрольними значеннями. Зокрема, зменшувався відсоток ооцитів, що розчинили зародковий пухирець (метафаза I), до $62,16 \pm 4,89 \%$ ($p < 0,05$), тоді як у контролі - $84,05 \pm 3,5 \%$, а також відсоток ооцитів, які сформували перше полярне тільце (метафаза II), до $41,09 \pm 4,38 \%$ ($p < 0,05$) порівняно з $56,99 \pm 2,17 \%$ у контрольній групі (рис. 3.6). Отримані результати свідчать, що імунокомплексне ушкодження, індуковане введенням БСА самицям мишей, призводить до пригнічення процесів мейотичного дозрівання ооцитів *in vitro* на стадіях метафази I та метафази II (Shepel et al., 2016).

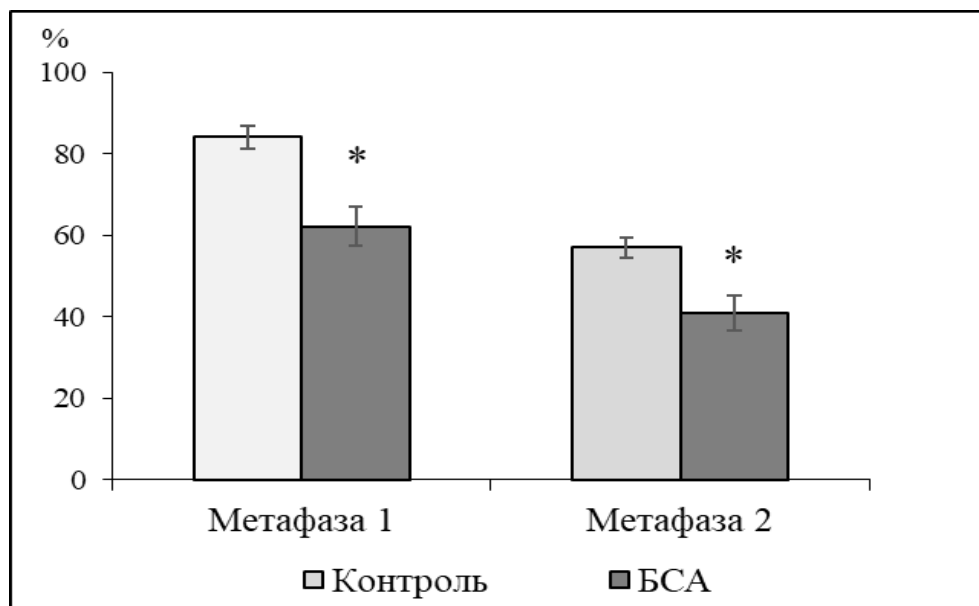


Рисунок 3.6. Вплив БСА-індукованого імунокомплексного ушкодження на мейотичне дозрівання ооцитів мишей.

Примітка: * $p < 0,05$ - порівняно з контролем.

3.1.5.2. Експресія генів HAS2, COX2 і Grem1

Нами було досліджено зміни експресії генів hyaluronan synthase 2 (HAS2), cyclooxygenase-2 (COX2) та gremlin 1 (GREM1) на рівні мРНК у кумулююсних клітинах за умов експериментального імунокомплексного ушкодження яєчників, викликаного тривалим введенням БСА (рис. 3.7). Встановлено, що в контрольних мишей мРНК цих генів виявлялася у всіх зразках кумулююсних клітин: ПЛР-ампліфікація зворотно транскрибованої мРНК давала специфічні смуги розміром 409 п.н. (HAS2), 213 п.н. (COX2) та 256 п.н. (GREM1), що відповідало очікуваним розмірам ампліфіконів. За умов тривалого введення БСА відзначалося достовірне зниження експресії мРНК усіх досліджуваних генів порівняно з контролем. Зокрема, експресія HAS2 зменшувалася приблизно у 2 рази ($p < 0,001$), COX2 - у 1,8 рази ($p < 0,001$), а GREM1 - у 1,4 рази ($p < 0,01$). Отримані результати свідчать про значне порушення функціональної активності кумулююсних клітин, що супроводжується порушенням процесів кумулююсного розширення та формування позаклітинного матриксу.

Таким чином, системне імунокомплексне ушкодження, індуковане тривалим введенням БСА, призводить до пригнічення експресії генів HAS2, COX2 та GREM1 у кумулююсних клітинах, що, ймовірно, пов'язано зі зниженням якості ооцитів та функціональної активності яєчників (Shepel et al., 2016).

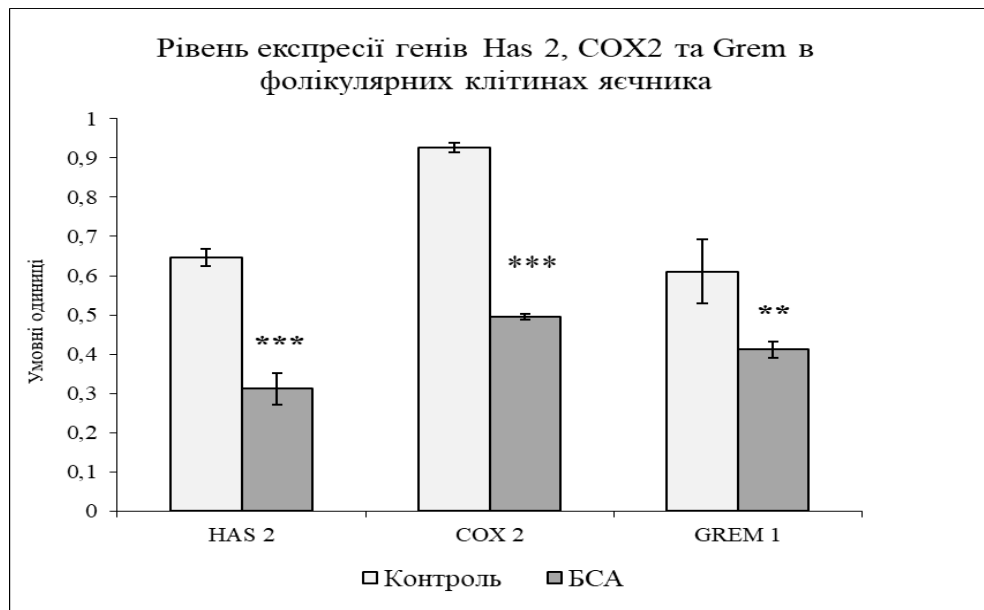


Рисунок 3.7. Зміна експресії генів HAS2, COX2 і GREM1 на рівні мРНК у кумулюючих клітинах мишей в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження, індукованого введенням БСА.

Примітка: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем.

3.1.6. Генотоксичний стрес в оваріальних клітинах за умов БСА-індукованого ушкодження

Оскільки функціональна активність клітин фолікулярного оточення визначає якість і розвиток ооцитів, було проаналізовано стан генетичного апарату клітин гранульози з метою з'ясування можливих причин порушення оогенезу. Введення БСА спричиняло достовірне зростання кількості гранульозних клітин з високим ступенем ушкодження ДНК, що свідчить про розвиток у них генотоксичного стресу (рис. 3.8). Це супроводжувалося підвищенням відсотка клітин 3-го та 4-го класів за класифікацією ступеня ушкодження ДНК у тесті ДНК-комет. Клітини 3-го класу характеризуються вираженим ушкодженням ДНК, що вказує на значний рівень клітинного стресу, тоді як 4-й клас відображає найтяжчий ступінь ушкодження та глибоку фрагментацію генетичного матеріалу, що є ознакою інтенсивного генотоксичного впливу. Відсоток комет 3-го класу становив $25,17 \pm 1,83 \%$ ($p < 0,01$), що суттєво перевищувало відповідний показник у контролі ($8,17 \pm 0,75 \%$). Відповідно, відсоток клітин з ушкодженням ДНК 4-го класу досягав $32,00 \pm 2,61 \%$ ($p < 0,01$) порівняно з $3,50 \pm 0,84 \%$ у контрольній групі. Водночас відзначалося зменшення відсотка клітин 0–1-го класів до $28,67 \pm 2,66 \%$ у групі БСА порівняно з $80,17 \pm 1,47 \%$ у контролі ($p < 0,01$), що свідчить про суттєве зниження частки клітин із інтактною або мінімально ушкодженою ДНК (Срібна та ін., 2016). Таким чином, БСА-індуковане імунне ушкодження супроводжується достовірним зростанням відсотка клітин гранульози з високим ступенем ушкодження ДНК, що свідчить про розвиток вираженого генотоксичного стресу в фолікулярному оточенні.

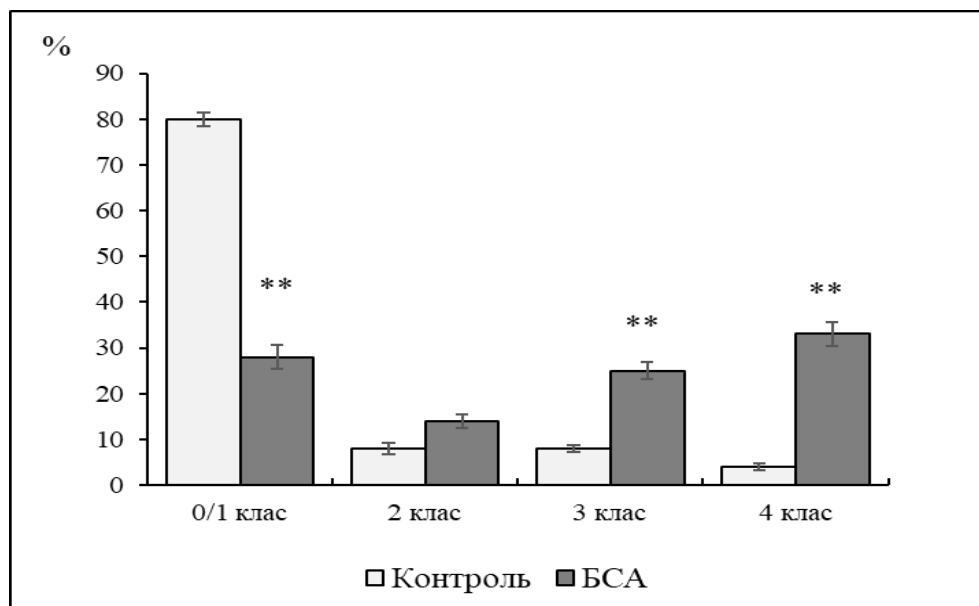


Рисунок 3.8. Вплив БСА-індукованого імунокомплексного ушкодження на ступінь ушкодження ДНК гранулярних клітин (метод ДНК-комет).

Примітка: ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем.

3.1.7. Визначення шляхів загибелі оваріальних клітин за умов імунокомплексного ушкодження, індукованого БСА

При імунокомплексному ушкодженні спричиненому введенням БСА, встановлено достовірне зниження життєздатності оваріальних клітин та посилення їх клітинної загибелі. Так, відсоток живих клітин зменшувався до $56,7 \pm 2,9 \%$ ($p < 0,01$) у порівнянні з $73,7 \pm 3,7 \%$ у контрольній групі. При цьому спостерігалось достовірне зростання відсотка клітин з морфологічними ознаками некрозу до $22,10 \pm 2,3 \%$, у порівнянні в контролі - $7,3 \pm 1,7 \%$ ($p < 0,01$). Разом з тим відсоток клітин з ознаками апоптозу вірогідно не змінювався і становив $21,19 \pm 1,8 \%$ у групі БСА порівняно з $19,1 \pm 2,7 \%$ у контролі (рис. 3.9). (Shepel et al., 2016).

Отримані дані свідчать про переважання некротичного типу клітинної загибелі в оваріальних клітинах за умов БСА-індукованого імунокомплексного ушкодження. Таким чином, БСА-індуковане імунокомплексне ушкодження супроводжується односпрямованими порушеннями в імунній та репродуктивній системах. Встановлено розвиток генотоксичних змін у клітинах тимуса, лімфатичних вузлів та оваріальних клітинах. У репродуктивній системі виявлені зміни проявляються порушенням оваріальної функції, що включає ушкодження ооцитів і пригніченням їх мейотичного дозрівання *in vitro*, зниження життєздатності клітин фолікулярного оточення внаслідок переважання некротичної загибелі, а також зменшення експресії ключових генів оваріальних клітин.

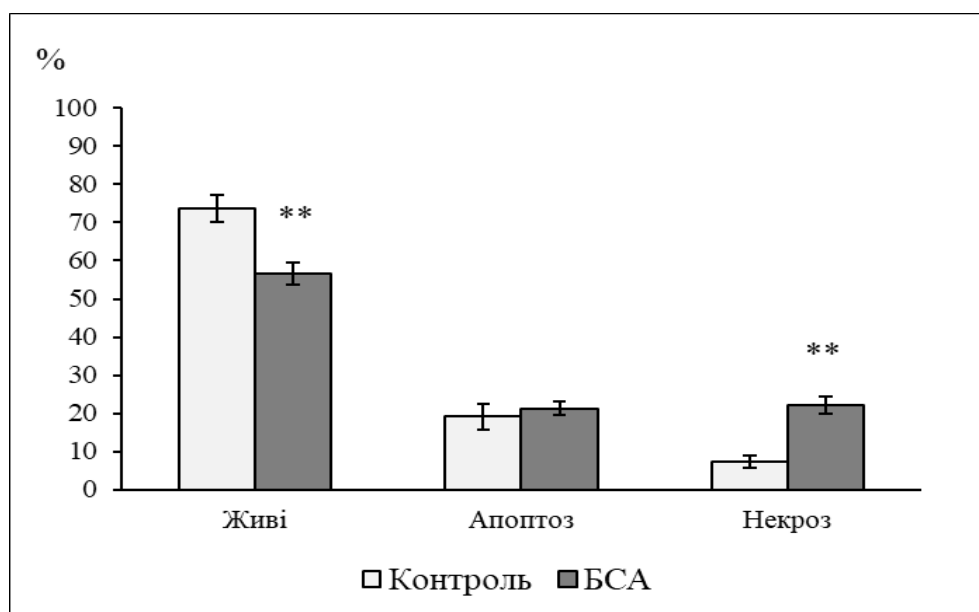


Рисунок 3.9. Вплив БСА-індукованого імунокомплексного ушкодження на відсоток живих, апоптотичних та некротичних оваріальних клітин мишей.

Примітка: ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем.

3.2. Відтворення моделі Т-клітинного ушкодження печінки у мишей

Відомо, що поліклональний мітоген конканавалін А індукує розвиток імунного гепатиту Т-клітинного генезу, який в експерименті відтворює основні механізми імунного ураження печінки. Ця модель розглядається як одна з найбільш інформативних для дослідження патогенезу аутоімунних захворювань печінки людини. У межах цієї моделі проведено комплексну оцінку основних параметрів клітинних ланок імунної системи, зокрема клітин адаптивного та вродженого імунітету; морфологічних змін гістоструктури уражених органів; функціонального стану імунних клітин, а також їх життєздатності, ступеня генотоксичного стресу та шляхів клітинної загибелі.

3.2.1. Показники ушкодження печінки, активації клітин вродженого імунітету та оксидативного стресу за умов КонА-індукованого гепатиту

Дослідженнями показано, що через 20 год після введення КонА у тварин відзначено істотні зміни показників функціонально-метаболічної активності клітин вродженого імунітету. Активність АЛТ у сироватці крові, що відображає ступінь ушкодження печінкових клітин, достовірно зросла із $1,7 \pm 0,5$ ммоль/(л·год) у контролі до $59,7 \pm 9,1$ ммоль/(л·год) у дослідній групі ($p < 0,001$). Даний фермент у значній кількості наявний в гепатоцитах і локалізується в їх цитоплазмі. Збільшення активності АЛТ в сироватці свідчить про ушкодження плазматичної мембрани гепатоцитів, тобто про посилення некротичного компонента ушкодження паренхіми. За результатами НСТ-тесту виявлено підвищення киснезалежного метаболізму нейтрофілів: кількість формазанпозитивних клітин зросла з $24,9 \pm 2,9$ % у контролі до $42,6 \pm 4,0$ % після введення КонА ($p < 0,001$), тоді як цитохімічний показник збільшився утричі - з $0,27 \pm 0,02$ до $0,69 \pm 0,02$ ($p < 0,001$). Вміст катіонних

білків у нейтрофілах також значно перевищував контрольні значення: середній цитохімічний коефіцієнт підвищився з $0,049 \pm 0,003$ до $0,28 \pm 0,05$ ($p < 0,001$). З боку клітинного складу периферичної крові виявлено виражені зміни лейкограми. Загальна кількість нейтрофілів збільшилася більш ніж удвічі – з $20,6 \pm 8,6 \%$ у контролі до $55,6 \pm 8,5 \%$ ($p < 0,05$). Найбільш вираженим було зростання відсотка паличкоядерних нейтрофілів – у 6 разів, з $4,0 \pm 1,5 \%$ до $24,1 \pm 2,4 \%$ ($p < 0,001$) (табл. 3.2). Одночасно у тканині печінки спостерігалось суттєве посилення інтенсивності перекисного окиснення ліпідів, що підтверджувалося підвищенням рівня малонового діальдегіду (МДА). Встановлено, що його вміст збільшувався більш ніж удвічі – з $6,80 \pm 1,30$ нмоль/мг білка у контрольній групі до $13,18 \pm 3,15$ нмоль/мг білка ($p < 0,001$) (табл. 3.2) (Макогон та ін., 2015). При дії КонА відзначалося підвищення рівня МДА, що відображає посилення процесів перекисного окиснення ліпідів у тканині печінки. Зростання його вмісту супроводжувало розвиток ушкодження паренхіми за умов КонА-індукованого імунного гепатиту. Отже, КонА-індуковане ушкодження печінки супроводжується комплексом змін, що включають різке зростання активності АЛТ у сироватці крові, підвищення показників НСТ-тесту та вмісту катіонних білків нейтрофілів, що свідчить про їх активацію та посилення киснезалежного метаболізму. Зміни лейкограми проявляються збільшенням відсотка нейтрофілів, зокрема паличкоядерних форм, тоді як підвищення рівня МДА в печінці відображає розвиток оксидативного стресу. Сукупність цих показників підтверджує активну участь клітин вродженого імунітету у формуванні ушкодження печінкової тканини за умов КонА-індукованого імунного гепатиту.

Таблиця 3.2.

Показники ушкодження печінки, функціонально-метаболічної активності клітин вродженого імунітету та інтенсивності перекисного окиснення ліпідів за умов КонА-індукованого гепатиту

Параметр	Показник	Контроль	Кон А
АЛТ	ммоль/(л·год)	$1,7 \pm 0,5$	$59,7 \pm 9,1^{***}$
Киснезалежна активність нейтрофілів (НСТ-тест)	Формаган-позитивні клітини, %	$24,9 \pm 2,9$	$42,6 \pm 4,0^{***}$
	Цитохімічний показник	$0,27 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,02^{***}$
Лізосомальні катіонні білки	Середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК)	$0,049 \pm 0,003$	$0,28 \pm 0,05^{***}$
Нейтрофіли Периферичної крові (лейкограма)	Загальна кількість нейтрофілів, %	$20,6 \pm 8,6$	$55,6 \pm 8,5^*$
	Паличкоядерні нейтрофіли, %	$4,0 \pm 1,5$	$24,1 \pm 2,4^{***}$
Перекисне окиснення ліпідів	МДА, нмоль/мг білка	$6,80 \pm 1,30$	$13,18 \pm 3,15^{***}$

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем.

3.2.2. Оцінка інтегральної цілісності геному імунокомпетентних клітин за умов введення Кон А

Експериментально встановлено, що за умов введення КонА в клітинах тимуса та лімфатичних вузлів спостерігається виражене ушкодження ДНК, про що свідчить достовірне підвищення ІДК (рис. 3.10). Порівняно з контролем, значення ІДК достовірно зростало в обох досліджуваних органах імунної системи. Зокрема, у клітинах тимуса ІДК збільшувався у 5 разів — з $0,36 \pm 0,03$ до $1,80 \pm 0,24$ ($p < 0,01$). У клітинах лімфатичних вузлів ІДК підвищувався у 5,5 рази — з $0,33 \pm 0,07$ до $1,82 \pm 0,18$ ($p < 0,01$). Отримані дані свідчать про односпрямоване та статистично значуще зростання ступеня фрагментації ДНК у клітинах центральних і периферичних органів імунної системи за умов дії КонА.

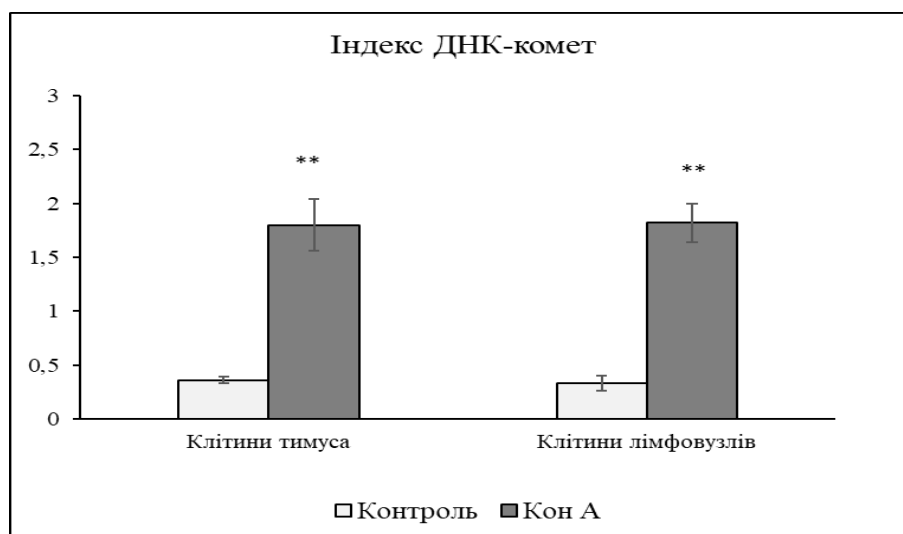


Рисунок 3.10. Індекс ушкодження ДНК (ІДК) у клітинах тимуса та лімфатичних вузлів за умов введення конканаваліну А (КонА), метод ДНК-комет.

Примітка: ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем.

Для більш детальної характеристики ушкодження ДНК було проведено аналіз розподілу клітин за класами комет (0–4), що дозволило оцінити не лише загальну інтенсивність ушкодження ДНК, а й кількісно визначити відсоток клітин із різним ступенем порушення її цілісності. Такий підхід дає змогу оцінити зміни ступеня ушкодження ДНК та встановити перерозподіл клітин між класами від мінімального до важкого проявів їх ушкодження. За умов дії КонаА у тимусі достовірно збільшувався відсоток клітин усіх класів ушкодження ДНК (1–4): 1-го класу - з $6,88 \pm 2,37 \%$ до $11,51 \pm 1,57 \%$ ($p < 0,05$); 2-го - з $5,09 \pm 1,01 \%$ до $21,86 \pm 3,71 \%$ ($p < 0,05$); 3-го - з $3,21 \pm 0,39 \%$ до $24,61 \pm 3,33 \%$ ($p < 0,05$); 4-го - з $2,38 \pm 0,68 \%$ до $12,70 \pm 2,96 \%$ ($p < 0,05$). Одночасно достовірно знижувався відсоток клітин 0-го класу - з $82,44 \pm 1,79 \%$ до $29,31 \pm 7,51 \%$ ($p < 0,01$) (рис. 3.11), що відображає зменшення кількості клітин без ознак фрагментації ДНК. Аналогічні зміни розподілу за класами комет спостерігалися і в клітинах лімфатичних вузлів (рис. 3.12): відзначалося зменшення відсотка клітин 0-го класу та одночасне зростання відсотка клітин із різними ступенями ушкодження ДНК (класи 1–4). Перерозподіл клітин між класами ушкодження був односпрямованим у центральному та периферичному органах імунної системи (Грушка, 2025).

Таким чином, моделювання імуноопосередкованого гепатиту за допомогою КонаА супроводжується розвитком вираженої генотоксичності у лімфоцитах тимуса та лімфатичних вузлів. Отримані результати підтверджуються достовірним підвищенням інтегрального індексу ушкодження ДНК та залученням усіх класів фрагментації ДНК за шкалою комет-тесту від незначного до важкого ступеня (класи 1–4).

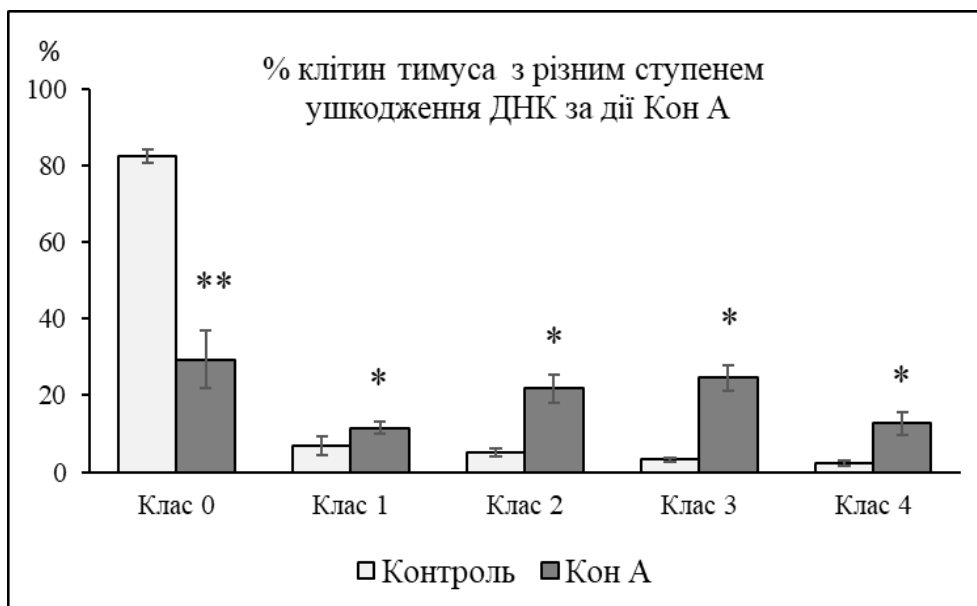


Рисунок 3.11. Вплив введення конканаваліну А (КонА) на ступінь ушкодження ДНК клітин тимуса (метод ДНК-комет).

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем.

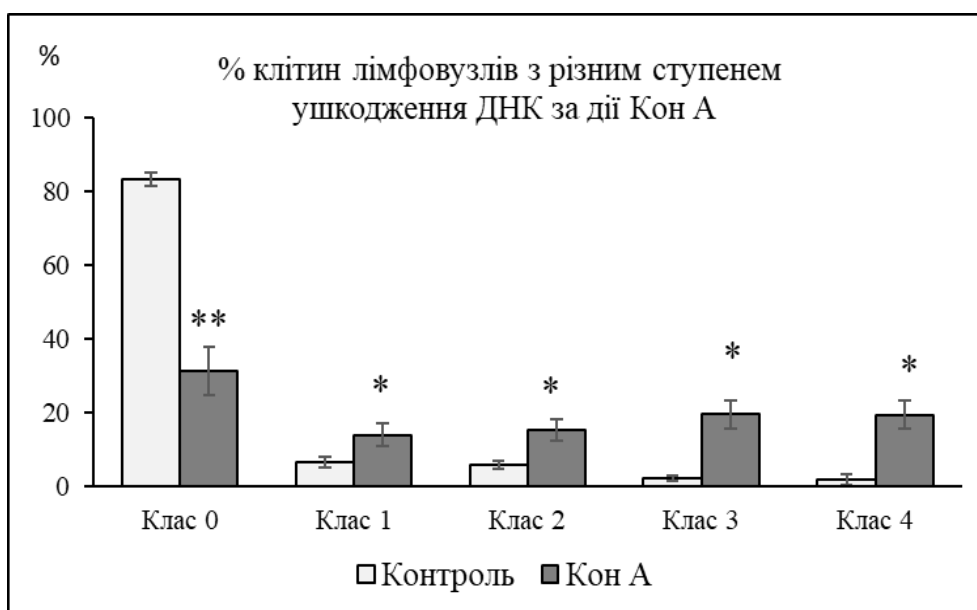


Рисунок 3.12. Вплив введення конканаваліну А (КонА) на ступінь ушкодження ДНК клітин лімфатичних вузлів (метод ДНК-комет).

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем.

3.2.3. Оцінка життєздатності та шляхів загибелі імунокомпетентних клітин при введенні КонА

При відтворенні моделі аутоімунного гепатиту шляхом введення поліклонального активатора Т-клітин - КонА з використанням методу прижиттєвого подвійного забарвлення, було встановлено достовірне зниження відсотка життєздатних імунокомпетентних клітин. У тимусі цей показник зменшувався з $92,0 \pm 3,9 \%$ у контролі до $80,3 \pm 6,1 \%$ після дії КонА ($p < 0,001$). У лімфовузлах аналогічно спостерігалось зниження відсотка життєздатних клітин з $92,6 \pm 2,2 \%$ до $81,4 \pm 3,0 \%$ ($p < 0,001$). Показано, що відбувається запуск механізмів обмеження імунозапальної відповіді, що проявляється закономірним посиленням апоптозу ІКК. Крім того, введення КонА спричинило значне зростання некротичної загибелі клітин тимуса та лімфовузлів, що може сприяти подальшому посиленню запальної відповіді (рис. 3.13).

Однак за відносним зростанням більш вираженим було зростання саме апоптотичної загибелі як у центральному, так і периферичних органах імунної системи. Зокрема, у клітинах тимуса рівень некрозу після введення КонА збільшувався в 2,6 рази, тоді як апоптоз у 3,6 рази. У клітинах лімфатичних вузлів некроз зростав у 2,4 рази, а апоптоз у 2,8 рази порівняно з контролем. Водночас за абсолютними значеннями відсоток клітин із ознаками некрозу перевищував показники апоптотичної загибелі в обох досліджуваних органах. При цьому більш виражені зміни відзначалися у клітинах тимуса. Посилення апоптозу імунокомпетентних клітин при введенні КонА може бути пов'язане з інтенсивною Т-клітинною активацією та підвищеною продукцією прозапальних цитокінів ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$), які здатні запускати механізми програмованої клітинної загибелі.

Таким чином, отримані результати засвідчують, що КонА-індуковане ушкодження супроводжується зменшенням кількості життєздатних клітин і розвитком апоптотично-некротичних процесів у тимусі та лімфатичних вузлах. При цьому встановлено узгоджене зростання показників клітинної загибелі в обох досліджуваних органах із переважанням некротичного компонента. Більш виражене відносне посилення апоптозу може відображати активацію механізмів обмеження надмірної імунозапальної відповіді (Макогон та ін., 2015; Грушка, 2025).

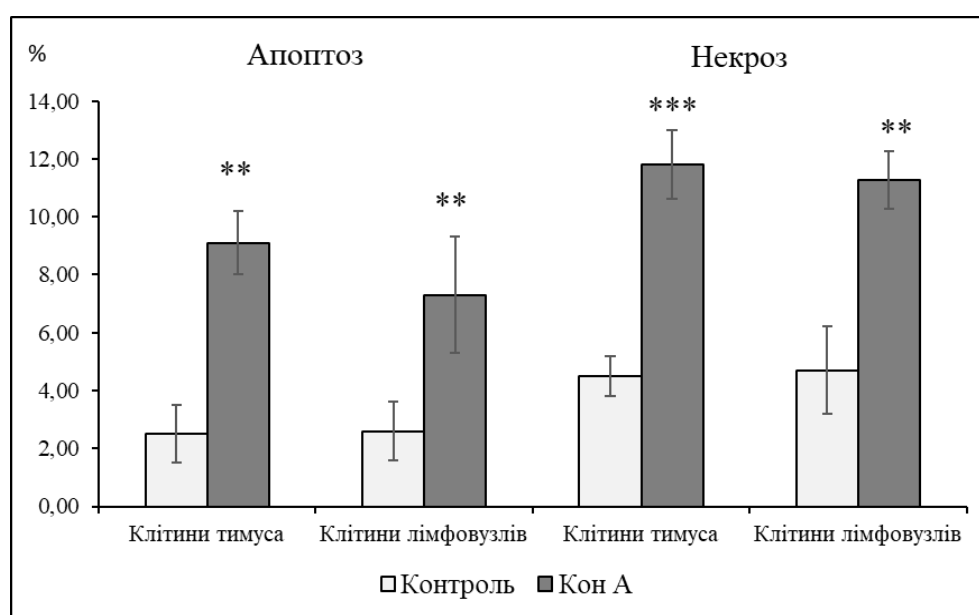


Рисунок 3.13. Вплив введення конканаваліну А (КонА) на відсоток апоптотичних та некротичних клітин тимуса та лімфатичних вузлів мишей.

Примітка: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем.

3.2.4. Гістоструктурні зміни печінки при КонА-індукованому ушкодженні

Встановлено, що через 20 год після введення КонА відзначалося значне підвищення сумарних гістологічних показників як у судинному руслі, так і в паренхімі печінки. У порівнянні з контрольною групою, де зміни були відсутні або мінімальні, у тварин, яким вводили КонА, реєстрували вірогідне посилення наростання вираженості патологічних змін ($p < 0,001$). Це проявлялося розширенням судин, тромбоутворенням, змінами судинної стінки та периваскулярними набряками, а також деструктивними змінами паренхіми - дистрофією та загибеллю гепатоцитів, що свідчить про те, що КонА спричиняє поступове наростання ураження печінки з максимумом патологічної реакції через 20 годин після його введення. Ці зміни були пролонгованими та суттєвими також і через 48 годин (рис. 3.14) (Павлович та ін., 2016). При цьому сумарний показник гістологічних змін у судинному руслі та паренхімі перевищував контрольні значення з тенденцією до зростання упродовж досліджуваного періоду. Виявлені морфологічні зміни включали як судинні, так і паренхіматозні порушення.

Подальший аналіз динаміки ушкодження показав, що патологічні зміни в судинному руслі розвиваються раніше, ніж в паренхімі печінки і виявляються вже через 6 годин після введення КонА (рис. 3.15). В цей термін сумарний показник судинних порушень зростав більш ніж в 20 разів в порівнянні з контролем за даними напівкількісної оцінки, яка включала розширення і повнокрів'я судин, набряк, морфологічні зміни судинної стінки та тромбоутворення за п'ятибальною шкалою (Павлович та ін., 2016).

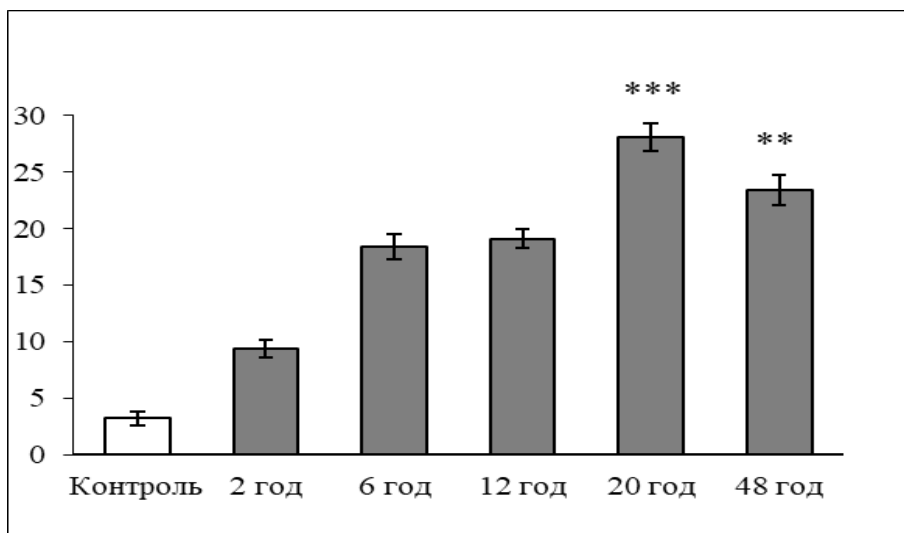


Рисунок 3.14. Сумарна гістологічна оцінка змін в судинному руслі та паренхімі печінки через 20 год після введення КонА. За віссю ординат - сумарний показник змін за напівкількісною шкалою (0 - відсутність змін, 1 - незначні, 2 - суттєві, 3- виражені, 4 - дуже виражені зміни).

Примітка: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем.

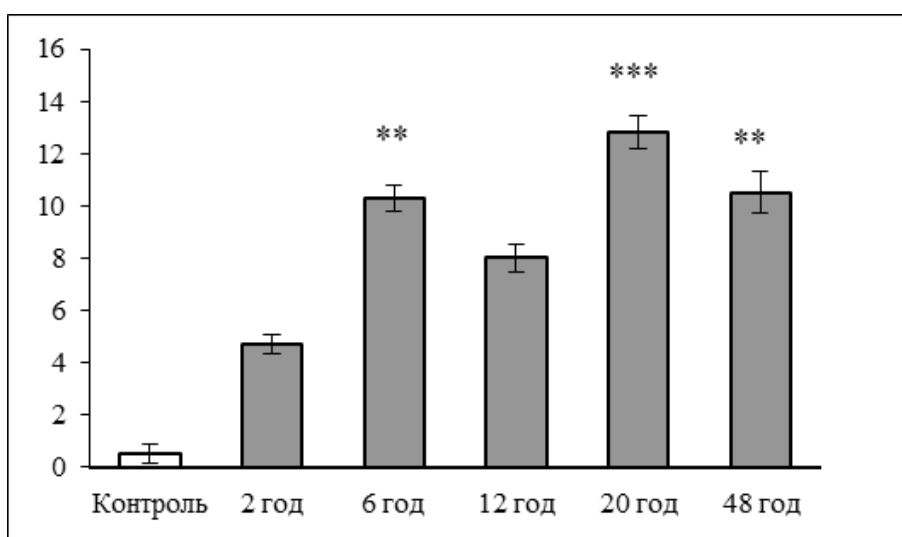


Рисунок 3.15. Загальна гістологічна оцінка судинних порушень в динаміці КонА-індукованого гепатиту. За віссю ординат - сумарний показник змін за напівкількісною шкалою (0 - відсутність змін, 1 - незначні, 2 - суттєві, 3- виражені, 4 - дуже виражені зміни).

Примітка: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем.

Патологічні зміни судин печінки за всіма показниками з'являлися вже через 6 годин після введення КонА, тоді як перші порушення паренхіми за окремими показниками гістологічної шкали виявлялися через 12 годин (рис. 3.16). Патологічні зміни мікроциркуляторного русла за умов введення КонА поступово наростали та досягали максимальної вираженості через 20 годин експерименту.

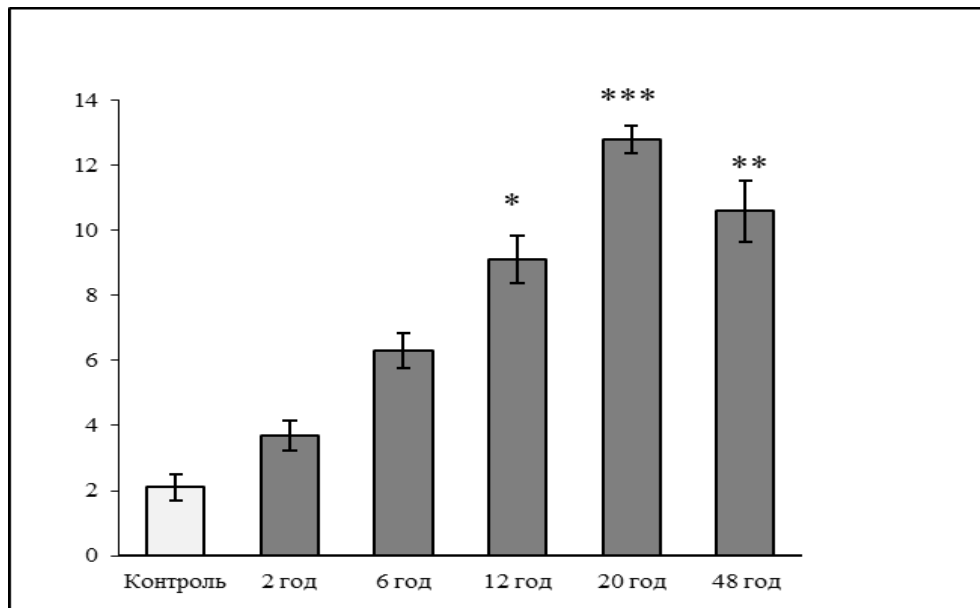


Рисунок 3.16. Загальна гістологічна оцінка порушень паренхіми в динаміці КонА-індукованого гепатиту. За віссю ординат - сумарний показник змін за напівкількісною шкалою (0 - відсутність змін, 1 - незначні, 2 - суттєві, 3- виражені, 4 - дуже виражені зміни).

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем.

Для підтвердження результатів напівкількісної оцінки було проведено детальне гістологічне дослідження печінки. Мікроскопічний аналіз дозволив візуалізувати характерні структурні зміни як у судинному руслі, так і в паренхімі органа. У контрольних тварин (рис. 3.17 А) структура печінки збережена: правильна балочна організація, гепатоцити розташовані радіально відносно центральної вени, цитоплазма клітин однорідна, ядра мають чіткі контури та рівномірну структуру хроматину. Синусоїди вузькі, рівномірні, з нормальною ендотеліальною вистілкою.

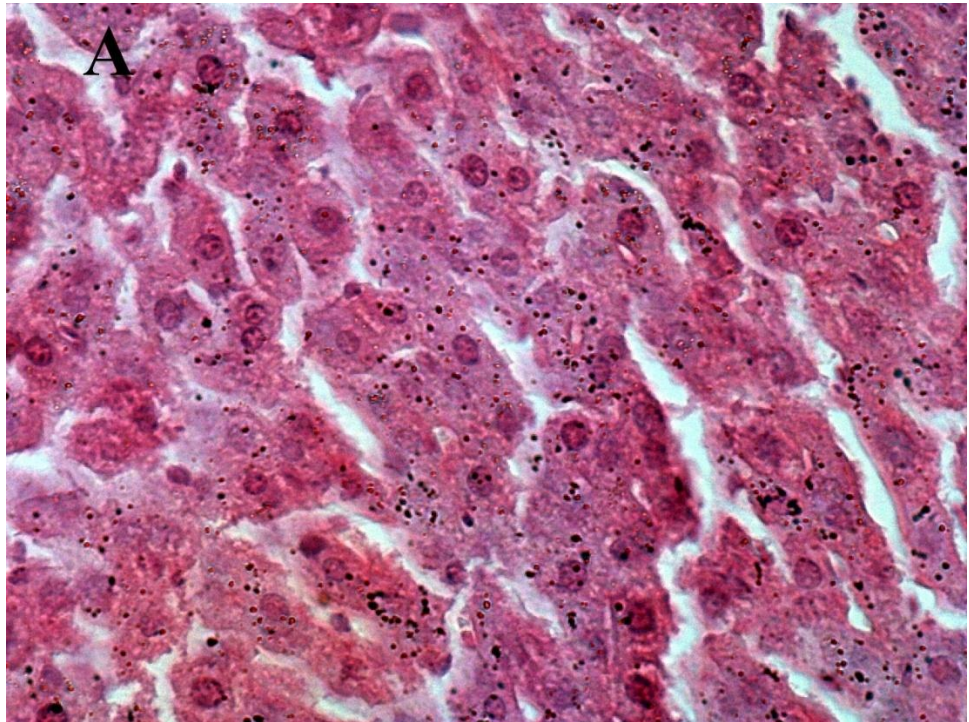


Рисунок 3.17 А. Гістоструктура печінки контрольних мишей: трабекулярна структура збережена, без порушень. Забарвлення гематоксилін-еозином, окуляр x10, об'єктив x40.

У тварин після введення КонА (рис. 3.17 Б, В) виявляли виражені судинні та паренхіматозні зміни: різке розширення та повнокрів'я судин із застійними явищами і мікротромбами, периваскулярні набряки та потовщення судинної стінки. У паренхімі реєстрували балонну дистрофію гепатоцитів, вакуолізацію цитоплазми, порушення цілісності плазмолеми, розвиток цитолізу, некробіозу або некрозу. В окремих ділянках фіксували некротичні осередки з повною деструкцією трабекулярної структури та злиттям клітин у безструктурні конгломерати (рис. 3.18 Б, В) (Павлович та ін., 2016).

Введення поліклонального мітогену КонА чітко відтворює експериментальну модель імунного ураження печінки мишей Т-клітинного генезу. За цих умов було встановлено: 1) системне ушкодження організму з активацією клітин уродженого імунітету, зокрема нейтрофілів, що супроводжується посиленням їхнього киснезалежного метаболізму та продукції катіонних білків; 2) розвиток вираженого генотоксичного стресу в імунокомпетентних клітинах тимуса та лімфатичних вузлів; 3) зниження життєздатності імуноцитів за рахунок посилення апоптозу та некротичної загибелі; 4) розвиток структурних змін у печінці, які проявлялися ранніми порушеннями у судинному руслі та наступним ураженням паренхіми із розвитком деструктивних процесів у гепатоцитах.

Таким чином, КонА-індуковане ушкодження відтворює основні механізми імунопатологічних процесів, що характеризують використану модель як адекватну для вивчення патогенезу імуноопосередкованих захворювань печінки.

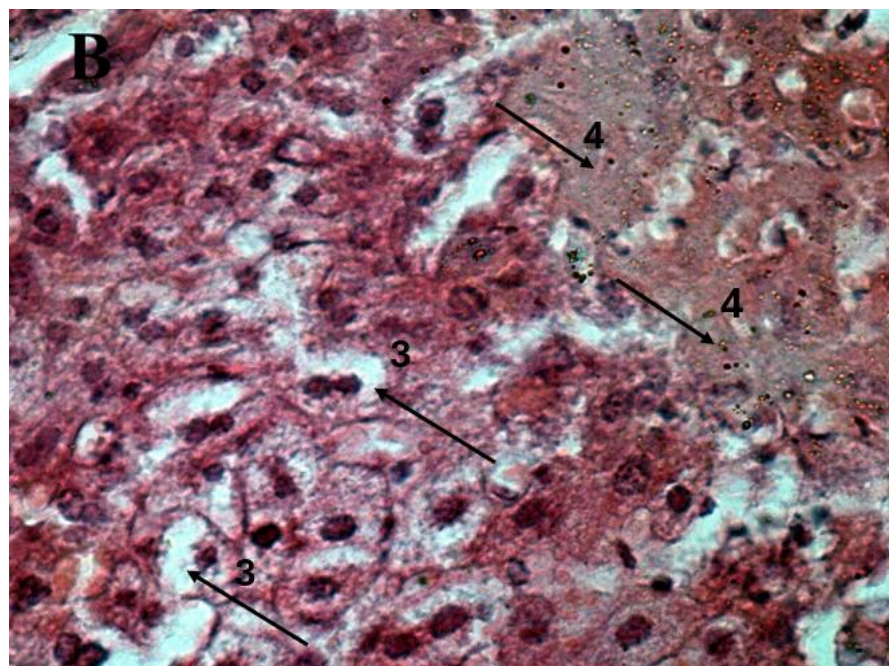
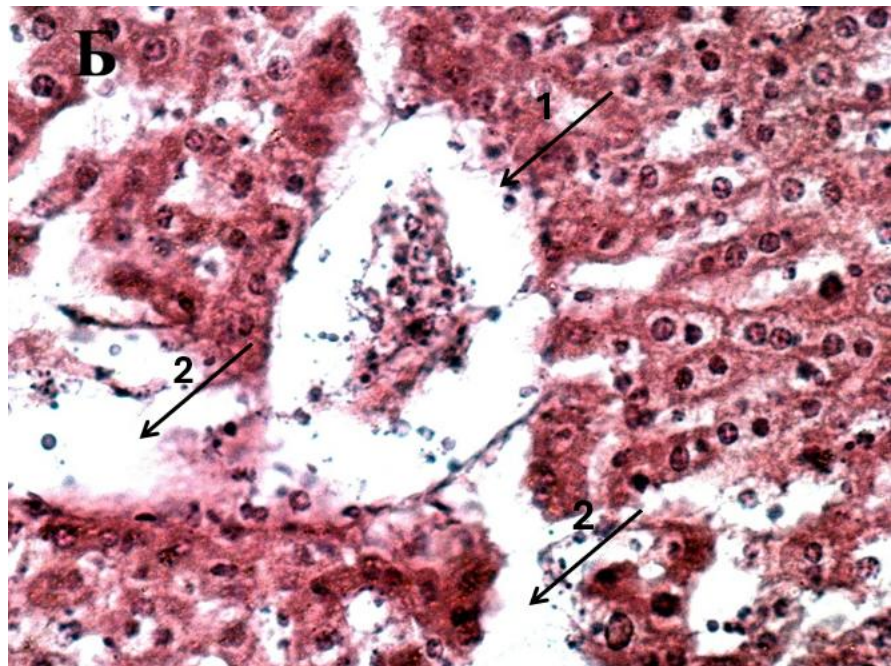


Рисунок 3.18. Гістоструктура печінки за умов дії КонаА (Б, В).
Забарвлення гематоксилін-еозином, окуляр x10, об'єктив x40. 1 -розширення
та повнокрів'я судин; 2 – набряк тканини; 3 - дистрофічні зміни гепатоцитів
(вакуолізація цитоплазми); 4 -некротичні зміни гепатоцитів.

3.3. Відтворення моделі ендотоксемії, індукованої ліпополісахаридом

На наступному етапі досліджень було використано модель ендотоксемії, індукованої ліпополісахаридом (*E. coli*, серотип 0111:B4), яка є класичною та широко застосовується для відтворення системних і органних імуноопосередкованих запальних процесів у мишей. У цій експериментальній моделі оцінювали: 1) зміни клітинного складу крові та показників лейкограми; 2) функціональний стан клітин вродженого та адаптивного імунітету; 3) прояви генотоксичного стресу; 4) життєздатність імуноцитів та шляхи їх загибелі; 5) гістоструктуру органів імунної системи.

3.3.1. Активація клітин вродженого імунітету та інтенсивність перекисного окиснення ліпідів за умов дії ЛПС

Було показано, що внутрішньоочеревинне введення ендотоксину через 20 год спричиняло посилення функціонально-метаболічної активності імуноцитів. За даними НСТ-тесту нейтрофілів Нф периферичної крові мишей збільшувався відсоток формазан-позитивних клітин з $23,8 \pm 6,0 \%$ в контролі до $63,0 \pm 7,3 \%$ при введенні ЛПС ($p < 0,001$), а також зростав ЦХП (який відображає активність кисенезалежного метаболізму в окремій клітині) з $0,34 \pm 0,06$ в контролі до $0,96 \pm 0,04$ ($p < 0,001$). Про активацію клітин вродженого імунітету також свідчило достовірне підвищення середнього цитохімічного коефіцієнта (СЦК) реакції на катіонні білки. Так, у контролі цей показник становив $0,04 \pm 0,01$ у контролі, тоді як при введенні ЛПС зростав до $0,31 \pm 0,04$ ($p < 0,001$) (табл. 3.3).

За даними лейкограми крові, показано збільшення відсотка паличкоядерних Нф в крові з $3,77 \pm 0,6\%$ в контролі до $12,74 \pm 1,1\%$ при дії ЛПС ($p < 0,01$), а також відсотка загальних Нф з $21,17 \pm 3,4\%$ (контроль) до $44,8$

$\pm 4,6$ (ЛПС, $p < 0,05$), тобто було виявлено значну нейтрофілію із зсувом лейкограми вліво, що є характерною ознакою системного запального процесу (табл. 3.3). Також, введення ЛПС спричиняло вірогідне підвищення вмісту ТБК-реактивних продуктів (ТБК-РП) у тканині печінки, що свідчить про активацію процесів перекисного окиснення ліпідів і розвиток оксидативного стресу. Так, після введення ЛПС рівень ТБК-РП зріс майже вдвічі з $30,88 \pm 2,18$ нмоль/г тканини у контролі до $56,9 \pm 3,96$ нмоль/г тканини ($p < 0,05$) (табл. 3.3).

Таким чином, отримані результати свідчать, що внутрішньочеревне введення ЛПС викликає виражену системну активацію клітин вродженого імунітету, що проявляється зростанням функціонально-метаболічної активності нейтрофілів, підвищенням вмісту катіонних білків, вираженою нейтрофілією зі зсувом лейкограми вліво та посиленням процесів перекисного окиснення ліпідів у печінці. Розвиток оксидативного стресу є важливим патогенетичним компонентом ендотоксемії і підтверджує адекватність використаної моделі.

Таблиця 3.3.

Показники функціонально-метаболічної активності клітин вродженого імунітету та інтенсивності перекисного окиснення ліпідів за умов дії ЛПС

Параметр	Показник	Контроль	ЛПС
Киснезалежна активність нейтрофілів (НСТ-тест)	Формазан-позитивні клітини, %	$23,8 \pm 6,0$	$63,0 \pm 7,3^{***}$
	Цитохімічний показник	$0,34 \pm 0,06$	$0,96 \pm 0,04^{***}$
Лізосомальні катіонні білки	Середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК)	$0,04 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,04^{***}$
Нейтрофіли периферичної крові (лейкограма)	Загальна кількість нейтрофілів, %	$21,17 \pm 3,4$	$44,8 \pm 4,6^*$
	Паличкоядерні нейтрофіли, %	$3,77 \pm 0,6$	$12,74 \pm 1,1^{**}$
Перекисне окиснення ліпідів	ТБК-РП, нмоль/г тканини	$30,88 \pm 2,18$	$56,9 \pm 3,9^*$

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем.

3.3.2. Оцінка інтегральної цілісності геному імунокомпетентних клітин за умов дії ЛПС

Методом комет-електрофорезу поодиноких клітин було встановлено, що введення ЛПС мишам призводило до вираженого порушення інтегральної цілісності геному. Індекс пошкодження ДНК (ІДК) достовірно зростав як у клітинах тимуса, так і лімфатичних вузлів: у тимусі з $0,38 \pm 0,14$ у контролі до $2,40 \pm 0,13$ після введення ЛПС ($p < 0,001$), у лімфатичних вузлах з $0,55 \pm 0,19$ до $2,07 \pm 0,29$ відповідно ($p < 0,001$) (рис. 3.19). У клітинах лімфатичних вузлів після введення ЛПС відзначали зниження відсотка клітин із відсутніми або мінімальними ушкодженнями ДНК (0/1 клас) з понад 80 % у контролі до близько 35 % у дослідній групі ($p < 0,01$). Одночасно суттєво зростав відсоток клітин із вираженим ушкодженням ДНК (3 клас) із незначних значень у контролі до майже 30 % після введення ЛПС (рис. 3.20).

Такий же вплив виявлено й у клітинах тимуса. Відсоток клітин 0/1 класу знижувався більш ніж у чотири рази ($p < 0,01$), тоді як відсоток клітин із вираженим ушкодженням ДНК (3 клас) зростав у кілька разів, досягаючи понад 35% (рис. 3.21).

Таким чином, введення ЛПС мишам за розробленою схемою супроводжується розвитком вираженого генотоксичного стресу в клітинах тимуса та лімфатичних вузлів. Це підтверджується достовірним зростанням інтегрального індексу ушкодження ДНК, а також перерозподілом клітин за класами ушкодження: істотним зменшенням відсотка клітин із неушкодженим або мінімально ушкодженим геномом (0/1 клас) та зростанням відсотка клітин із вираженим ушкодженням (3 клас). Отримані дані свідчать, що дія ЛПС призводить не лише до активації клітинних реакцій запалення, а й до суттєвого ушкодження генетичного апарату імунокомпетентних клітин (Грушка та ін., 2019).

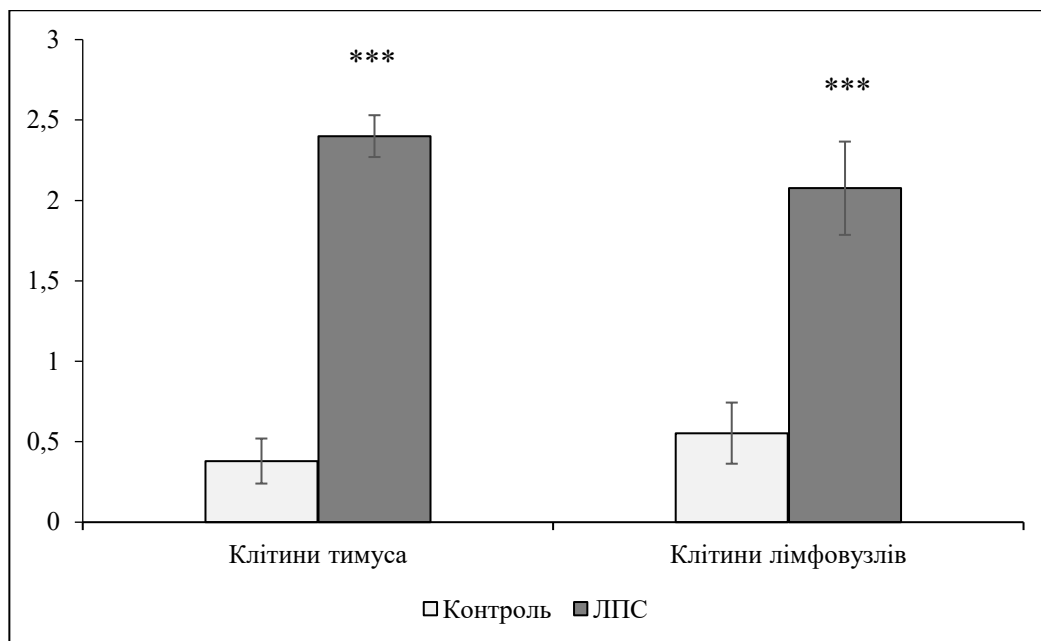


Рисунок 3.19. Індекс ушкодження ДНК (ІДК) у клітинах тимуса та лімфатичних вузлів за умов введення ЛПС (метод ДНК-комет).

Примітка: *** $p < 0,01$ - порівняно з контролем.

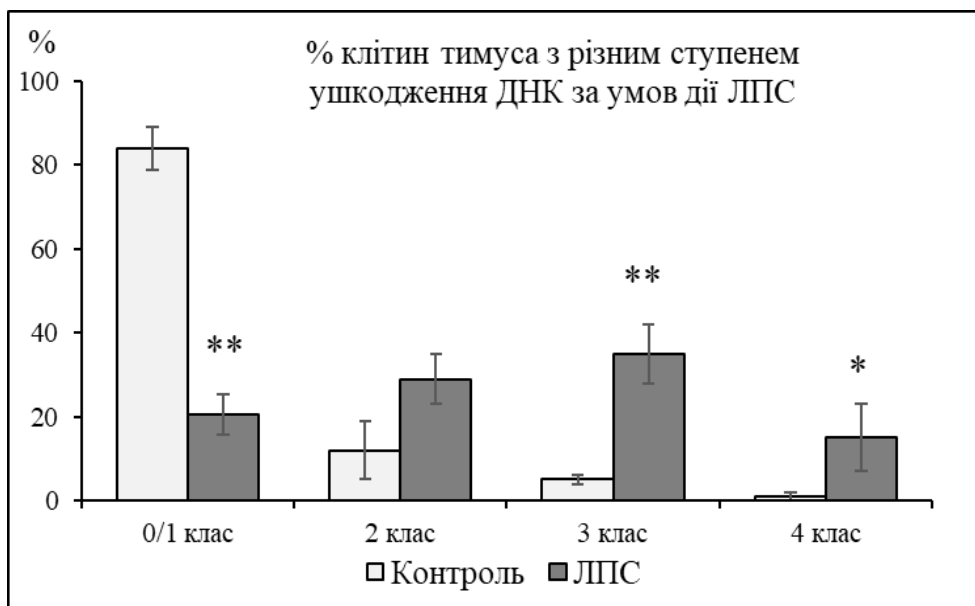


Рисунок 3.20. Вплив введення ліпополісахариду (ЛПС) на ступінь ушкодження ДНК клітин тимуса (метод ДНК-комет).

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем.

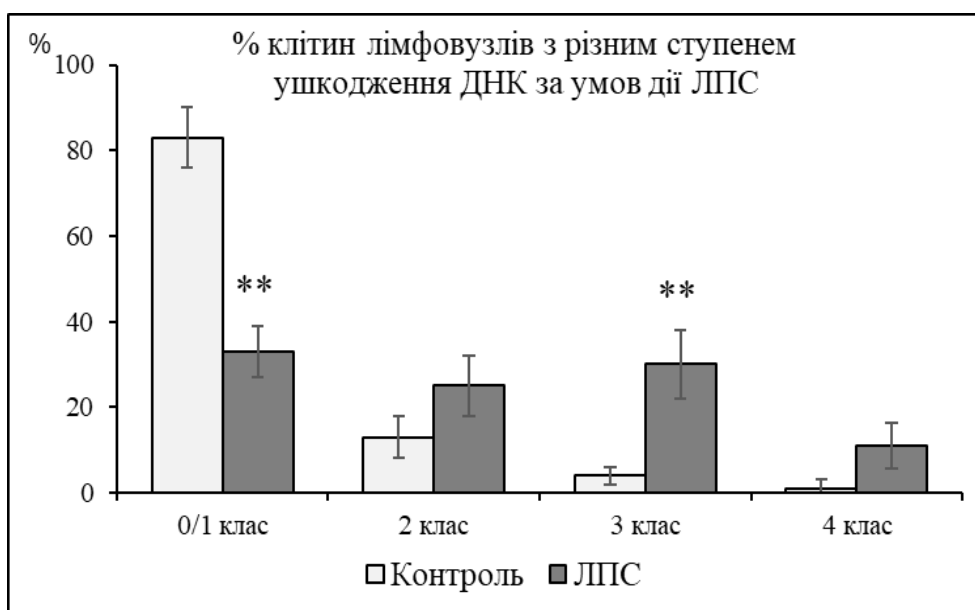


Рисунок 3.21. Вплив введення ліпополісахариду (ЛПС) на ступінь ушкодження ДНК клітин лімфатичних вузлів (метод ДНК-комет).

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем.

3.3.3. Оцінка життєздатності та шляхів загибелі імунокомпетентних клітин за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії

З огляду на раніше виявлений генотоксичний стрес за умов ендотоксемії було проведено оцінку життєздатності та шляхів загибелі імуноцитів, оскільки співвідношення між їх виживанням, апоптозом та некрозом визначає інтенсивність і перебіг імунозапальних процесів. Відомо, що ліпополісахарид є активатором клітин вродженого імунітету, який через рецептори TLR4 індукує продукцію прозапальних цитокінів, АФК та інших медіаторів запалення. Ці процеси можуть призводити до ушкодження клітин, порушення цілісності ДНК та до активації механізмів клітинної загибелі.

Було встановлено, що введення ЛПС супроводжувалося вірогідним зниженням кількості живих клітин. У лімфоцитах, виділених із лімфатичних вузлів, відсоток життєздатних клітин зменшувався з $95,1 \pm 0,8\%$ у контролі до $81,7 \pm 2,3\%$ при дії ЛПС ($p < 0,001$). Подібні зміни спостерігалися й у клітинах тимуса, де відсоток живих клітин знижувався з $95,7 \pm 0,9\%$ у контрольних тварин до $72,5 \pm 4,1\%$ після введення ЛПС ($p < 0,05$). Зниження життєздатності відбувалося за рахунок посилення клітинної загибелі як апоптотичним, так і некротичним шляхом (рис.3.22).

Детальний аналіз засвідчив, що введення ЛПС супроводжувалося вираженим підвищенням рівня апоптозу імунокомпетентних клітин. У тимусі його відсоток зростав у 4,5 раза ($p < 0,01$), а в лімфатичних вузлах у 3,0 раза порівняно з контрольними значеннями ($p < 0,05$).

Посилення апоптозу імунокомпетентних клітин може розглядатися як один із компенсаторних механізмів обмеження надмірної імунної активації за умов системної запальної відповіді. Разом з тим, надмірна активація апоптозу може призводити до порушення клітинного складу імунних органів та зниження їх функціональної активності.

При моделюванні ендотоксемії у мишей некротична загибель в клітинах як первинного, так і вторинного органів імунітету посилювалася в більшій степені. Нами встановлено, що відсоток некротичних клітин тимуса та лімфовузлів при введенні ліпополісахариду зростає в 13,8 і в 6,1 рази, відповідно ($p < 0,01$) (Грушка та ін., 2019). Переважання некротичної загибелі клітин при ЛПС-індукованій ендотоксемії може бути пов'язане з розвитком оксидативних і метаболічних порушень в імунокомпетентних клітинах.

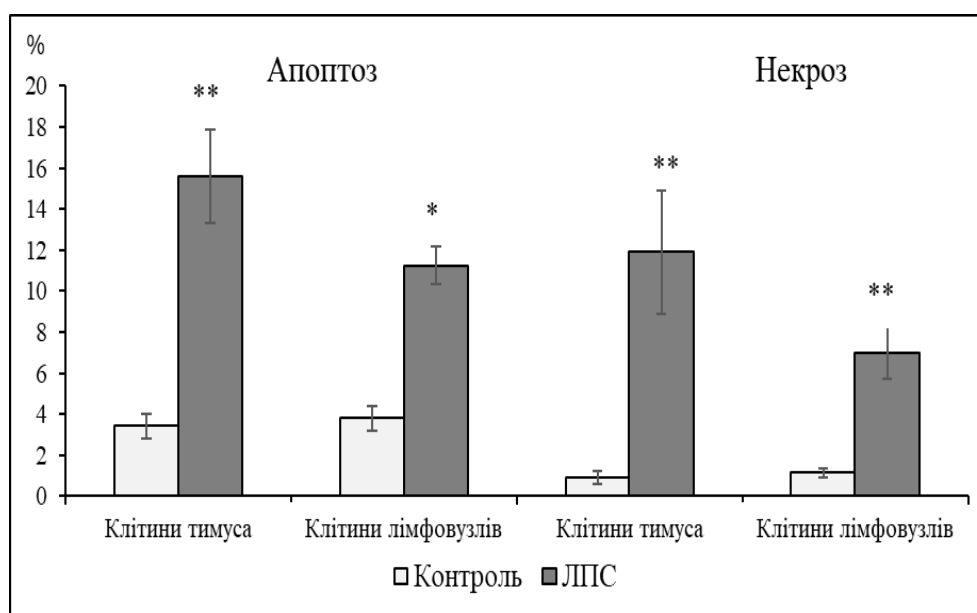


Рисунок 3.22. Вплив введення ліпополісахариду (ЛПС) на відсоток апоптотичних та некротичних клітин тимуса та лімфатичних вузлів мишей.

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем.

3.3.4. Гістоструктурні зміни органів імунної системи та печінки за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії

Експериментально встановлено, що введення ЛПС індукувало розвиток вираженої імунзапальної реакції у досліджуваних органах. В усіх імункомпетентних органах (тимусі, лімфатичних вузлах) виявлялися значні порушення мікроциркуляції з ушкодженням судин як артеріального, так і венозного типів, проявами ендотеліальної дисфункції, формуванням набряків і крововиливів. У тимусі відзначалося збіднення периферичних відділів часточок клітинними елементами, переважно за рахунок зменшення кількості незрілих лімфоцитів порівняно з контролем. Водночас спостерігалось збільшення кількості епітеліоретикулоцитів та укрупнення тимічних тілець. Наявність каріопікнозу ядер і деструктивних змін тимоцитів свідчила про посилення апоптотичних і некротичних процесів в умовах ендотоксемії (рис. 3.23).

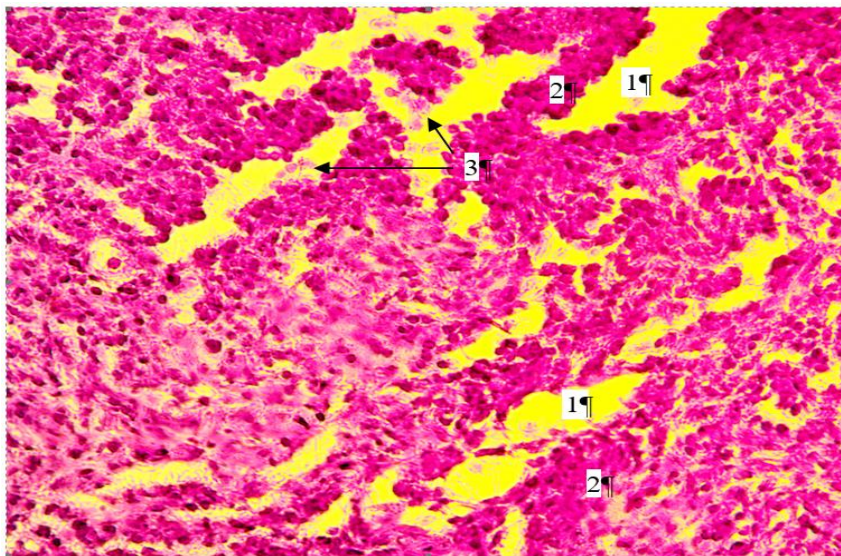


Рисунок 3.23. Гістоструктурні зміни в тимусі мишей за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії. 1 – набряк периферичного відділу часточки; 2 – пікноз ядер; 3 – деструкція окремих тимоцитів. Забарвлення гематоксилін-еозином. Окуляр $\times 10$, об'єктив $\times 40$.

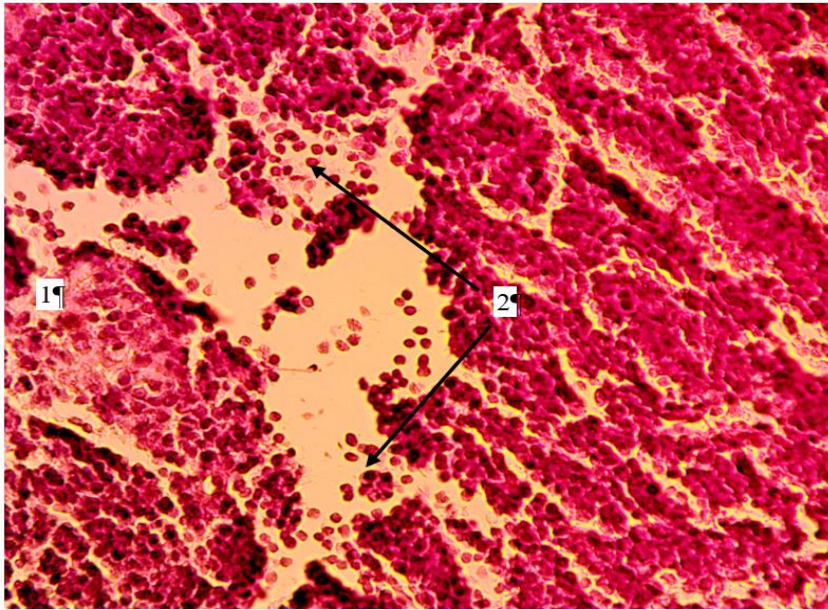
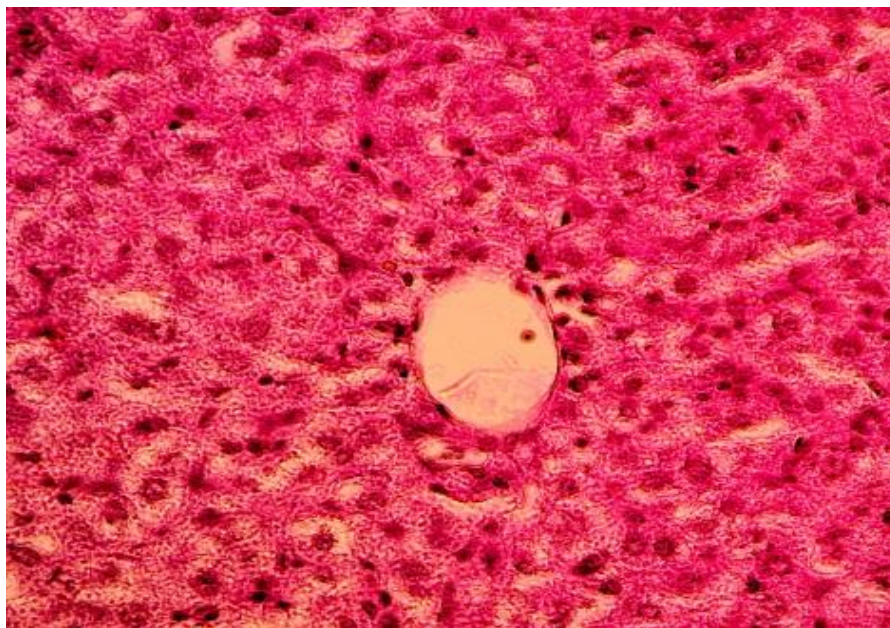


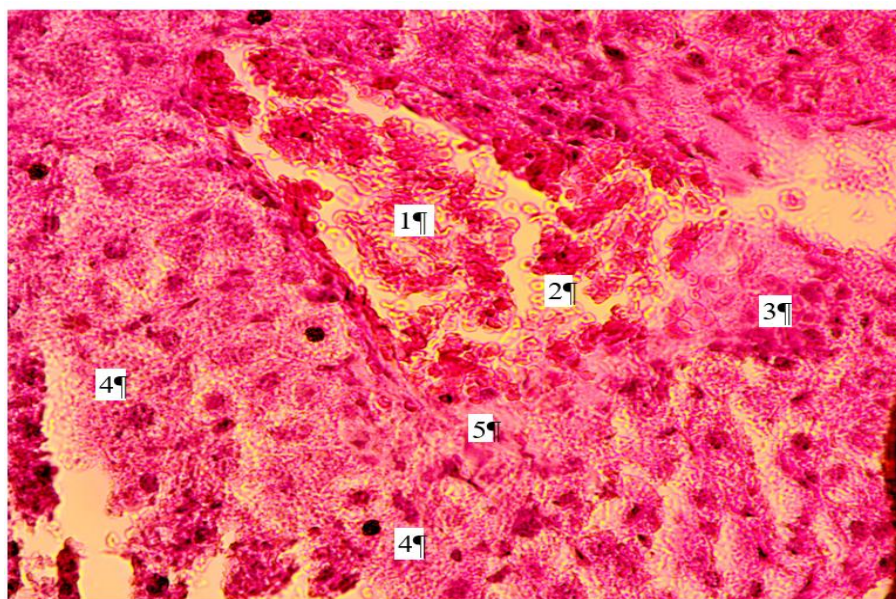
Рисунок 3.24. Гістоструктурні зміни в лімфовузлі мишей за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії. 1 – ділянка некрозу; 2 – геморагічне просякання тканини. Забарвлення гематоксилін-еозином. Окуляр $\times 10$, об'єктив $\times 40$.

У лімфатичних вузлах реєструвалася активація клітинних елементів у перифолікулярних (тимуснезалежних) зонах, а також розвиток дистрофічних процесів і макрофагально-плазмоцитарних реакцій у тимусзалежних зонах. Зменшувалися розміри та кількість лімфоїдних фолікулів; у світлих центрах виявлялися клітини у стані каріопікнозу та каріорексису. Клітинний склад збіднювався за рахунок зменшення кількості середніх і великих лімфоцитів. Стінки посткапілярних венул були розшарованими, набряклими з вираженою деструкцією ендотелію (рис. 3.24). Зменшення кількості незрілих тимоцитів у кортикальній зоні ймовірно, може бути пов'язане з підвищеною чутливістю цих клітин до оксидативного стресу та цитокін-опосередкованого ушкодження. Подібні зміни свідчать про порушення процесів диференціації та проліферації Т-лімфоцитів у тимусі.

Найбільш виражені зміни виявлялися у печінці. В умовах ендотоксемії спостерігалось прогресування дистрофічних та проліферативних процесів у паренхімі, активація й гіпертрофія зірчастих ретикулоендотеліоцитів. Порушення мікроциркуляції з розширенням і повнокрів'ям судин різних діаметрів супроводжувалося ушкодженням їх стінок із розривленням та розволокненням, а також дистрофічними змінами ендотеліоцитів, що зумовлювало формування виражених периваскулярних набряків із білковмісною рідиною. Місцями спостерігалися локуси дифузного геморагічного просякання тканини печінки. Відзначалася міграція лейкоцитів і формування вогнищевої та дифузної лімфоцитарної інфільтрації, поєднаної з явищами некробіозу гепатоцитів (рис. 3.25 А, Б) (Павлович та ін., 2024).



A



B

Рисунок 3.25. Гістоструктурні зміни в печінці мишей. А – контроль: трабекулярна структура збережена, без порушень; Б - дія ЛПС: 1 - розширення і повнокрів'я судини; 2 - периваскулярний набряк; 3 - вогнищева лімфоцитарна інфільтрація тканини; 4 - некробіоз; 5 - некроз окремих гепатоцитів. Забарвлення гематоксилін-еозином. Окуляр $\times 10$, об'єктив $\times 40$.

Отже, результати гістологічного аналізу показали, що за умов експериментальної ЛПС-індукованої ендотоксемії розвиваються виражені морфологічні порушення в органах імунної системи та печінці. Вони включають порушення кровообігу, ушкодження судинних стінок, некробіотичні та некротичні зміни клітин, набряки й геморагічне просякання тканин. Особливо виражені ушкодження виявлялися у печінці, що супроводжувалося інтенсивною активацією ретикулоендотеліоцитів і лімфоцитарною інфільтрацією. Отримані результати підтверджують провідну роль ЛПС у запуску системних імунозапальних реакцій та формуванні глибоких структурних порушень у життєво важливих органах.

При виконанні досліджень було відтворено та детально охарактеризовано три експериментальні моделі імуноопосередкованого ушкодження у мишей: імунокомплексної патології, індукованої введенням БСА; Т-клітинного імуного гепатиту, спричиненого конканаваліном А; та ендотоксемії, викликаной ліпополісахаридом. Комплексний аналіз дозволив оцінити системні та органні прояви імунозапальних реакцій, включно з показниками функціонально-метаболічної активності клітин вродженого й адаптивного імунітету, станом інтегральної цілісності геному, особливостями шляхів клітинної загибелі та морфологічними змінами уражених органів.

Показано, що всі три моделі супроводжувалися розвитком вираженого генотоксичного стресу, зниженням життєздатності імунокомпетентних клітин та активацією як апоптозу, так і некрозу. При цьому за умов БСА-індукованого ушкодження та ендотоксемії провідну роль відігравав некротичний шлях клітинної загибелі, що супроводжувалося достовірним підвищенням відсотка некротично загиблих клітин та зміщенням співвідношення апоптоз/некроз у бік некрозу за показниками відсоткового розподілу клітин, тоді як у моделі КонА-індукованого гепатиту переважала апоптотична загибель. Морфологічні дослідження підтвердили наявність глибоких деструктивних

змін в органах імунної системи (тимус, лімфатичні вузли) та виражене ушкодження органів-мішеней (печінки), що супроводжувалося запальними інфільтратами, набряками, геморагічним просяканням та некрозом клітин паренхіми. Крім того, у моделі БСА-індукованого імунокомплексного ушкодження встановлено зміни репродуктивної системи, що проявлялися ушкодженням ДНК, змінами експресії генів, порушенням клітинного поділу (зокрема на стадії метафази), а також посиленням апоптотичної й некротичної загибелі оваріальних клітин. Отримані морфологічні дані узгоджуються з результатами біохімічних та цитологічних досліджень, які свідчать про розвиток вираженого генотоксичного та оксидативного стресу за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії.

Таким чином, результати третього розділу та їх аналіз засвідчили, що незалежно від механізму індукції (імунні комплекси, поліклональна активація Т-клітин чи дія бактеріального ендотоксину), імуноопосередковане ушкодження характеризується спільними ознаками: розвитком генотоксичного стресу, активацією прозапальних реакцій, порушенням життєздатності імунних клітин і глибокими гістоструктурними пошкодженнями органів імунної системи. Отримані результати обґрунтовують доцільність дослідження ролі ПАРП-1 як ключового регулятора молекулярних механізмів розвитку імуноопосередкованого ушкодження. У наступному розділі (розділ 4) буде розглянуто внесок ПАРП-1 у розвиток імуноопосередкованих ушкоджень різного генезу та оцінено його значення як потенційної терапевтичної мішені.

РОЗДІЛ 4

РОЛЬ ПОЛІ(АДФ-РИБОЗО)ПОЛІМЕРАЗИ-1 (ПАРП-1) У РОЗВИТКУ ІМУНООПОСЕРЕДКОВАНОГО УШКОДЖЕННЯ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ ПОРУШЕНЬ ІМУННОЇ ТА РЕПРОДУКТИВНОЇ СИСТЕМ САМИЦЬ МИШЕЙ

4.1. Дослідження ролі ПАРП-1 в ушкодженні ДНК та загибелі лімфоцитів за умов оксидативного стресу *in vitro*

Однією з головних причин імуноопосередкованого ушкодження є оксидативний стрес, що виникає внаслідок надмірного утворення активних форм кисню та гіпохлориту. Ці реактивні сполуки здатні безпосередньо ушкоджувати ДНК, ініціюючи каскад клітинних відповідей. Центральне місце серед них належить ПАРП-1 - ферменту, що регулює процеси репарації ДНК, індукцію клітинної загибелі та активацію прозапальних сигнальних шляхів. Разом з тим, надмірна активація ПАРП-1 супроводжується швидким виснаженням клітинних енергетичних ресурсів, що може зумовлювати некротичну загибель клітин і посилення запальної реакції. З огляду на те, що ПАРП-1 розглядається як перспективна терапевтична мішень для корекції імунозапальних процесів, актуальним є експериментальне вивчення ефектів та механізмів дії його інгібіторів.

4.1.1. Оцінка інтегральної цілісності геному клітин

Ми провели дослідження на імуноцитах, моделюючи ушкодження клітин *in vitro* в умовах оксидативного стресу. Для цього було відтворено оксидативне ушкодження ізольованих лімфоцитів шляхом їх інкубації з

перекисом водню (H_2O_2) та гіпохлорит-аніоном (ГХ), що дало змогу оцінити роль ПАРП-1 у регуляції генотоксичного стресу та шляхів клітинної загибелі *in vitro*. H_2O_2 та ГХ належать АФК і утворюються активованими нейтрофілами та макрофагами, відіграють ключову роль у механізмах бактерицидності та є важливими ефекторами неспецифічного імунітету. Оскільки нами раніше було показано активацію клітин вродженого імунітету в моделях імуноопосередкованого ушкодження використання цих оксидантів є обґрунтованим для відтворення *in vitro* оксидативного стресу за умов імунозапальних процесів. Для з'ясування ролі ПАРП-1 та оцінки ефективності його фармакологічного інгібування було використано два інгібітори - 3-амінобензамід (3-АБА) та 4-гідроксиквіназолін (4-ГК).

За даними аналізу ДНК-комет, інкубація інтактних клітин тимуса й лімфатичних вузлів з H_2O_2 та ГХ призводила до вираженого ушкодження ДНК, що супроводжувалося достовірним зростанням інтегрального індексу ушкодження ДНК (ІДК) (рис. 4.1, 4.2). Встановлено, що преінкубація клітин лімфатичних вузлів з інгібіторами ПАРП сприяла послабленню генотоксичних ефектів оксидантів, на що вказує зменшення ІДК при застосуванні як 3-АБА, так і 4-ГК. Однак у клітинах тимуса за умов ушкодження H_2O_2 застосування 3-АБА не супроводжувалося статистично значущими змінами (рис. 4.1, 4.2).

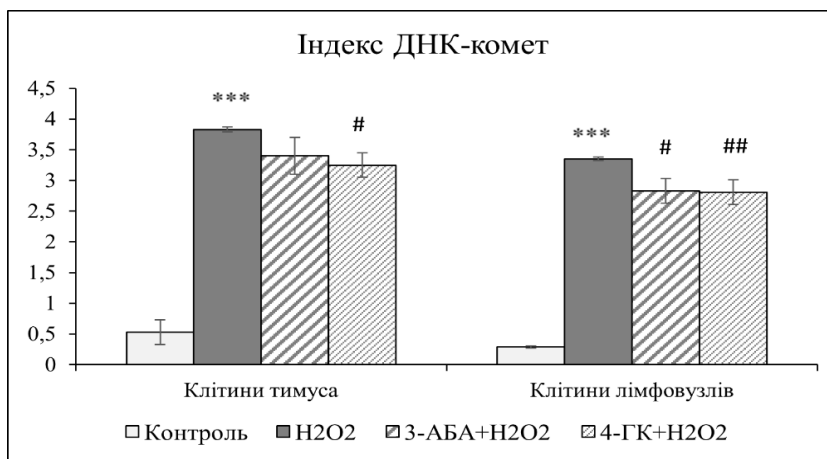


Рисунок 4.1. Індекс ДНК-комет клітин, виділених з тимуса і лімфатичних вузлів інтактних мишей, інкубованих з блокаторами ПАРП - 3-амінобензамідом (3-АБА) та 4-гідроксиквіназоліном (4-ГК), в умовах оксидативного ушкодження, індукованого перекисом водню (H₂O₂).

Примітка: *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ - порівняно з дією H₂O₂.

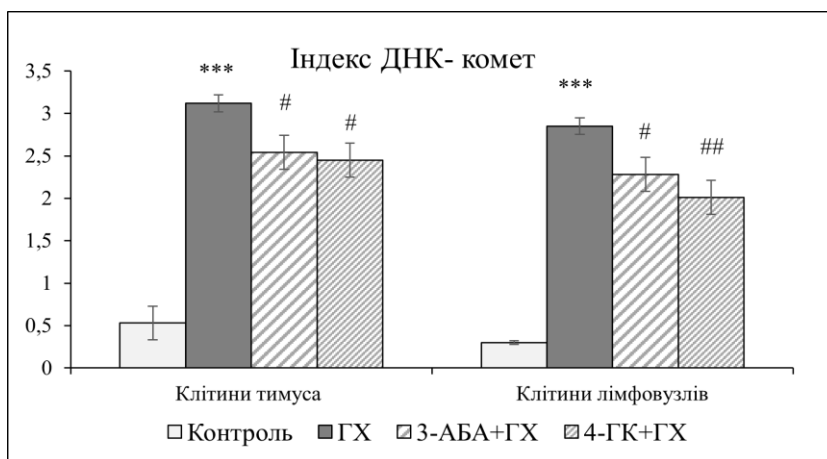


Рисунок 4.2. Індекс ДНК-комет клітин, виділених з тимуса і лімфатичних вузлів інтактних мишей, інкубованих з блокаторами ПАРП - 3-амінобензамідом (3-АБА) та 4-гідроксиквіназоліном (4-ГК), в умовах оксидативного ушкодження, індукованого гіпохлорит-аніоном (ГХ).

Примітка: *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ - порівняно з дією гіпохлориту (ГХ).

Як H_2O_2 , так і ГХ індукували виражений генотоксичний стрес, що проявлявся різким зростанням відсотка клітин із сильним ушкодженням ДНК (комети 3–4 класів). Застосування інгібіторів ПАРП-1 суттєво зменшувало відсоток таких клітин (рис. 4.3, 4.4). При дії H_2O_2 відсоток клітин із сильним ушкодженням ДНК у тимусі зростав з $7,2 \pm 4,7$ % до $98,3 \pm 0,95$ % ($p < 0,001$) по відношенню до контролю. Внесення в середовище інкубації 3-АБА зменшувало цей показник до $78,8 \pm 16,1$ %, а внесення 4-ГК - до $75,2 \pm 7,1$ % ($p < 0,01$) по відношенню до дії тільки перекису. Подібні дані були отримані в експериментах з клітинами, виділеними з лімфатичних вузлів: кількість імуніцитів із сильно ушкодженою ДНК була $4,0 \pm 1,1$ % у контролі; $89,0 \pm 2,0$ % при дії H_2O_2 ($p < 0,001$) по відношенню до контролю. Додавання в середовище інкубації інгібіторів зменшувало цей показник до $60,0 \pm 14,0$ % (3-АБА) та до $66,7 \pm 12,1$ % (4-ГК) ($p < 0,05$) по відношенню до дії тільки перекису в обох випадках.

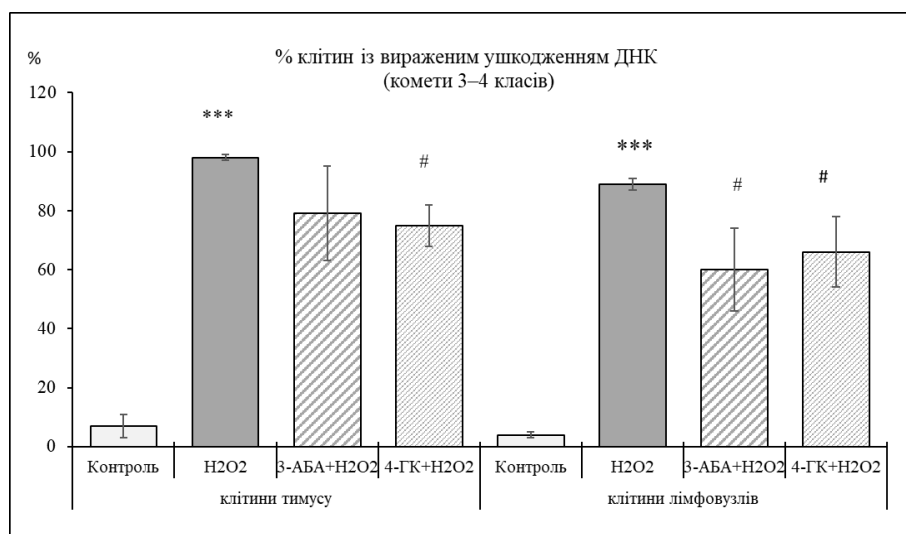


Рисунок 4.3. Вплив інгібіторів ПАРП-1 (3-АБА, 4-ГК) на відсоток клітин із вираженим ушкодженням ДНК (комети 3-4 класів) за умов інкубації з H_2O_2 .

Примітка: *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$ - порівняно з дією H_2O_2 .

В умовах гіпохлорит-індукованого оксидативного стресу обидва застосовані блокатори ПАРП-1 значно зменшували відсоток імуніцитів із сильно ушкодженою ДНК. У клітинах тимуса цей показник становив $7,2 \pm 4,7$ % у контролі та $79,1 \pm 4,9$ % при інкубуванні з гіпохлоритом ($p < 0,001$) порівняно з контролем. Преінкубація з 3-АБА знижувала кількість тимоцитів з сильно ушкодженою ДНК до $51,6 \pm 9,4$ %, а з 4-ГК - знижувала до $45,6 \pm 7,8$ % ($p < 0,01$) по відношенню до дії тільки гіпохлориту в обох випадках. У клітинах лімфатичних вузлів гіпохлорит також спричиняв виражене ушкодження: відсоток клітин 3-4 класів становив $4,0 \pm 1,2$ % у контролі та $72,3 \pm 4,3$ % при дії ГХ ($p < 0,001$) порівняно з контролем. Додавання інгібіторів ПАРП-1 зменшувало цей показник до $44,5 \pm 7,7$ % (3-АБА) та $33,4 \pm 8,8$ % (4-ГК) ($p < 0,01$) (рис. 4.3, 4.4). Отже, за умов ушкодження H_2O_2 кількість комет 3-4 класів зменшувалася при дії 3-АБА та 4-ГК приблизно в 1,3–1,5 раза залежно від типу клітин. При дії ГХ зниження було більш вираженим і становило 1,5–2,2 раза залежно від типу клітин (Грушка та ін., 2017).

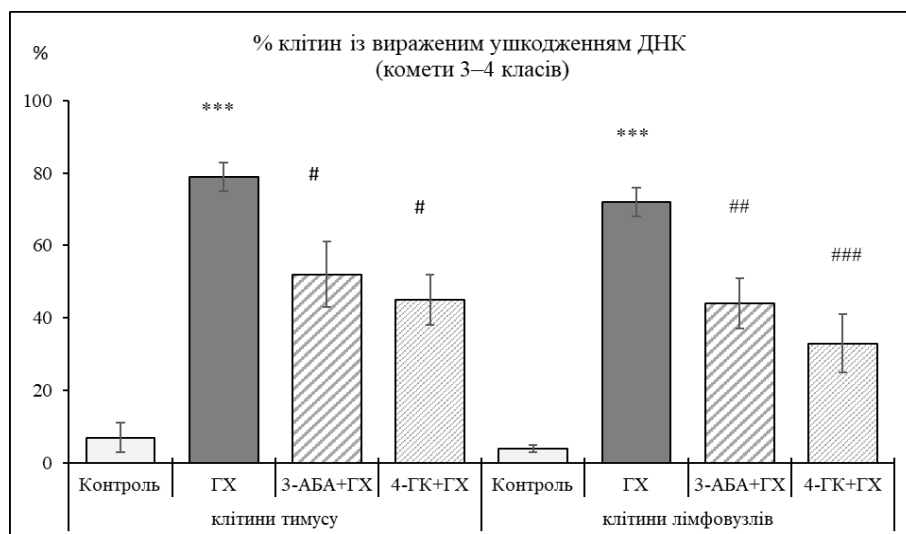


Рисунок 4.4. Вплив інгібіторів ПАРП-1 (3-АБА, 4-ГК) на відсоток клітин із вираженим ушкодженням ДНК (комети 3-4 класів) за умов інкубації з гіпохлорит-аніоном (ГХ).

Примітка: *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ - порівняно з дією гіпохлориту (ГХ).

4.1.2. Життєздатність клітин і шляхи їх загибелі

Оскільки генотоксичний стрес, в залежності від його інтенсивності та функціонального стану клітин, може призводити до їх загибелі, ми застосували метод прижиттєвого подвійного забарвлення, який дає можливість диференціювати живі, некротичні та апоптотичні клітини. АФК, зокрема перекис водню та гіпохлорит-аніон, здатні спричиняти ушкодження нуклеїнових кислот, білків і мембран клітин, що супроводжується порушенням їх функціонального стану. За таких умов порушення цілісності ДНК може активувати ферменти системи репарації, зокрема ПАРП-1, що відіграє важливу роль у регуляції життєздатності клітин та шляхів їх загибелі.

При інкубації лімфоцитів з H_2O_2 спостерігалось зниження відсотка живих клітин з $94,3 \pm 0,8 \%$ у контролі до $85,9 \pm 1,5 \%$ ($p < 0,001$ по відношенню до контролю), а при інкубації з ГХ до $85,3 \pm 2,4 \%$ ($p < 0,01$). Зниження життєздатності лімфоцитів відбувалося за рахунок посилення як некротичної, так і апоптотичної загибелі (рис. 4.5, 4.6). Обидва застосовані інгібітори ПАРП-1 зменшували відсоток некротично загиблених клітин, проявляючи безпосередній цитопротективний ефект на клітини. В наших експериментах, що моделювали дію оксидантів за умов запального процесу, пригнічення активності ПАРП сприяло підвищенню життєздатності лімфоцитів і послабленню некротичної загибелі, індукованої H_2O_2 або ГХ. Більш виражений ефект спостерігався при застосуванні селективнішого інгібітора 4-ГК, який зменшував відсоток некротичних клітин у 2,0 раза при дії H_2O_2 та у 2,7 раза при дії ГХ (рис. 4.5, 4.6). При цьому застосування інгібіторів ПАРП не супроводжувалося статистично значущими змінами апоптозу. Це має важливе значення, оскільки апоптоз імунокомпетентних клітин є фізіологічним процесом, спрямованим на зниження інтенсивності імунних і запальних

реакцій, тоді як їх некротична загибель супроводжується посиленням запалення та може відігравати провідну роль у розвитку аутоімунних процесів.

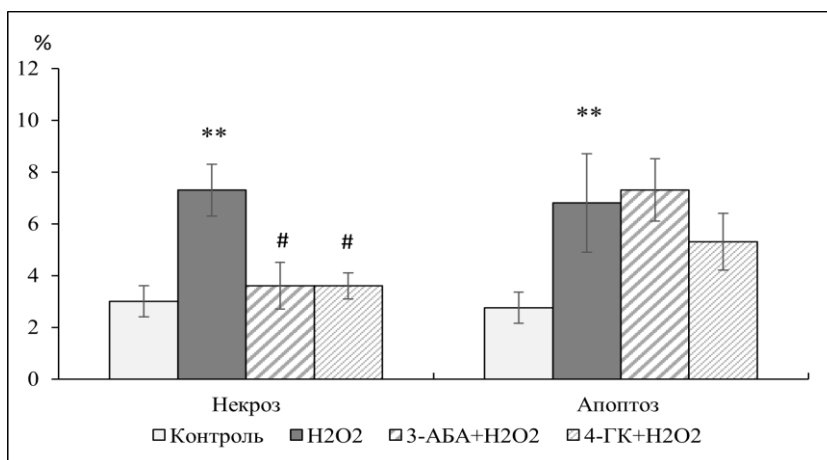


Рисунок 4.5. Некротична та апоптотична загибель клітин, виділених з лімфатичних вузлів інтактних мишей, при їх інкубації з блокаторами ПАРП-1 (3-АБА, 4-ГК) в умовах ушкодження, індукованого H₂O₂.

Примітка: ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$ - порівняно з дією H₂O₂.

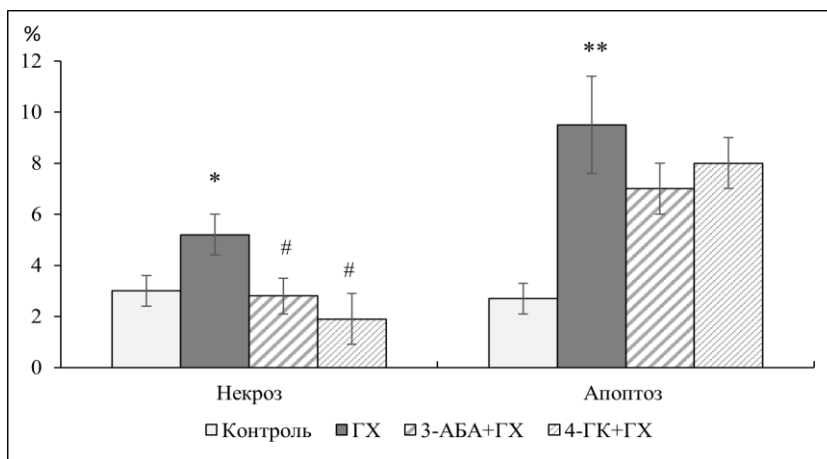


Рисунок 4.6. Некротична та апоптотична загибель клітин, виділених з лімфатичних вузлів інтактних мишей, при їх інкубації з блокаторами ПАРП-1 (3-АБА, 4-ГК) в умовах ушкодження, індукованого гіпохлорит-аніоном (ГХ).

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$ - порівняно з дією гіпохлориту (ГХ).

Отримані результати свідчать, що в умовах оксидативного ушкодження переважаючим механізмом клітинної загибелі імуніцитів є некроз. Це узгоджується з уявленнями про те, що надмірна активація ПАРП-1 може спричиняти енергетичне виснаження клітин, що є одним із ключових механізмів розвитку некротичної загибелі. Отже, при відтворенні оксидативного стресу *in vitro* інкубація клітин тимуса та лімфатичних вузлів із H_2O_2 або ГХ супроводжувалася значним ушкодженням ДНК і зниженням життєздатності імуніцитів. Застосування інгібіторів ПАРП-1 зменшувало ІДК та сприяло підвищенню відсотка життєздатних лімфоцитів, переважно за рахунок зниження рівня некрозу (Грушка та ін., 2017). Отримані результати свідчать про прямий цитопротективний ефект інгібіторів ПАРП-1 за умов оксидативного стресу, що проявляється зменшенням некротичної загибелі клітин та підвищенням життєздатності імуніцитів. Важливо, що цей ефект спостерігався в умовах *in vitro*, тобто без участі системних імунних механізмів, характерних для експериментів *in vivo*.

4.2. Дослідження ролі ПАРП-1 в розвитку імуніопосередкованого ушкодження (моделі БСА, КонА, ЛПС)

Оскільки ПАРП-1 відіграє ключову роль у розпізнаванні ушкодженої ДНК та регуляції клітинної відповіді на стрес, нами було досліджено вплив фармакологічного інгібування цього ферменту на ступінь ушкодження ДНК та шляхи загибелі клітин імунної та репродуктивної систем за умов імуніопосередкованого ушкодження. Для подальшої оцінки ефективності інгібіторів ПАРП-1 в умовах системного імуніопосередкованого ушкодження було використано три експериментальні моделі *in vivo*: БСА-індуковане імунікомплексне ушкодження, КонА-індукований Т-клітинний гепатит та ЛПС-індуковану ендотоксемию. Застосування різних моделей дозволило

оцінити роль ПАРП-1 за умов надмірної активації механізмів імунної відповіді та визначити його вплив на розвиток генотоксичного стресу та клітинного ушкодження.

4.2.1. Оцінка дозозалежних ефектів інгібітора ПАРП-1 4-ГК у моделі КонА-індукованого гепатиту

На першому етапі роботи було проаналізовано дозозалежний вплив інгібітора ПАРП-1 4-гідроксиквіназоліну (4-ГК) у дозах 50, 100 та 150 мг/кг у моделі КонА-індукованого ушкодження печінки у мишей. Необхідність цього дослідження зумовлена тим, що ефективність фармакологічної дози може змінюватися залежно від характеру патологічного процесу, інтенсивності запальної реакції та імунореактивності експериментальної лінії тварин.

Застосування інгібітора ПАРП-1 за умов КонА-індукованого гепатиту супроводжувалося послабленням ушкодження печінки, що відображалось у зниженні активності аланінамінотрансферази (АЛТ) у сироватці крові. Відомо, що підвищення активності цього ферменту є наслідком порушення цілісності плазматичних мембран гепатоцитів і виходу внутрішньоклітинних ферментів у кровотік при некротичному ушкодженні клітин печінки. Найбільш виражений гепатопротективний ефект спостерігався при застосуванні дози 50 мг/кг, тоді як при підвищенні дози захисна дія інгібітора дещо зменшувалася (рис. 4.7) (Макогон та ін., 2015).

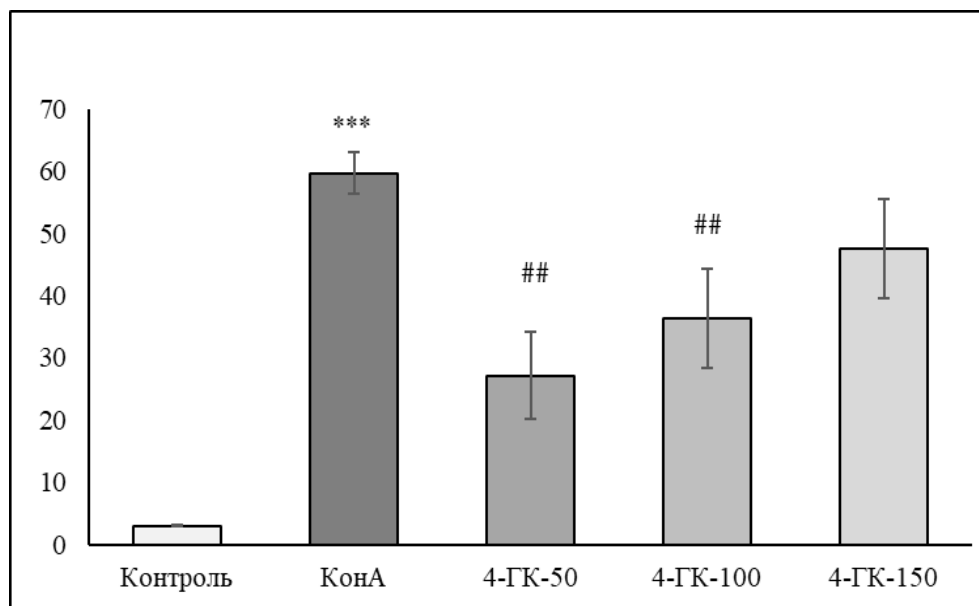


Рисунок 4.7. Вплив 4-ГК в дозах 50, 100 та 150 мг/кг на активність АЛТ в сироватці крові мишей через 20 год після введення КонА. За віссю ординат – активність ферменту в ммоль пірувата/л за годину.

Примітка: *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем; ## $p < 0,01$ - порівняно групою КонА.

Дослідження показників оксидативного стану печінкової тканини показало, що введення КонА супроводжувалося активацією процесів ПОЛ. Це проявлялося значним підвищенням рівня малондіальдегіду (МДА) у печінці та порушенням балансу між ПОЛ і антиоксидантною системою.

Через 20 год після введення КонА, коли за результатами гістологічних та біохімічних досліджень відзначалося максимальне ушкодження печінки та найбільше накопичення МДА, застосування 4-ГК сприяло зменшенню процесів ПОЛ. Зокрема, введення цього інгібітора у дозах 50 та 100 мг/кг супроводжувалося суттєвим зменшенням вмісту МДА в печінковій тканині, приблизно у 1,3 раза порівняно з групою КонА, а оскільки МДА одним із основних продуктів перекисної деградації мембранних фосфоліпідів,

зниження його рівня свідчить про зменшення оксидативного ушкодження клітин (рис. 4.8).

Отримані результати свідчать про участь ПАРП-1 у посиленні процесів ПОЛ при Кон А-індукованому гепатиті. Разом з тим рівень МДА за цих умов залишався вищим за контрольні значення. Навіть максимальна доза 4-ГК (150 мг/кг) практично не впливала на зниження вмісту МДА у печінці мишей. (Макогон та ін., 2015).

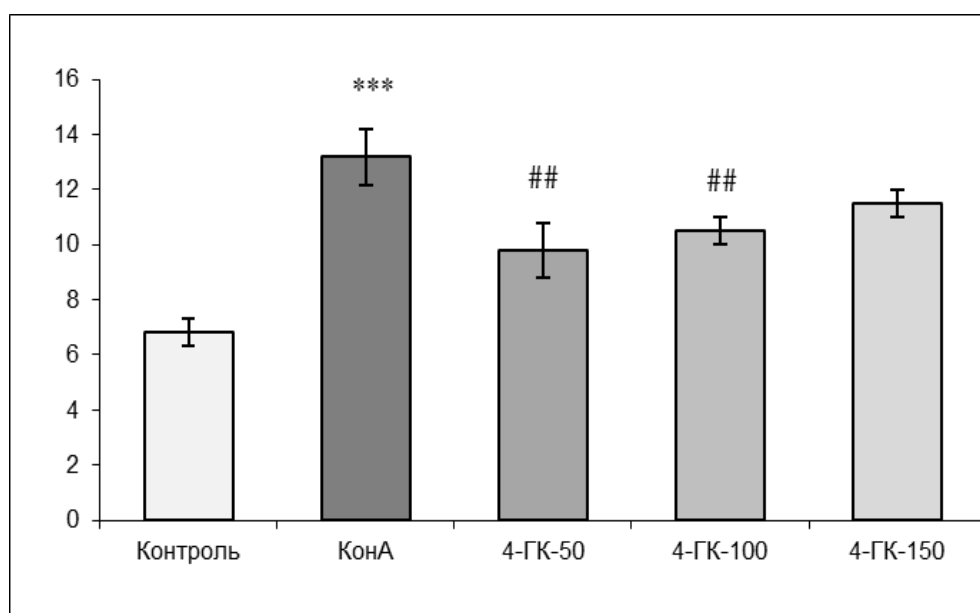


Рисунок 4.8. Вплив 4-ГК (у дозах 50, 100 та 150 мг/кг) на рівень МДА в печінці мишей через 20 год після введення КонА. За віссю ординат – вміст МДА в гомогенатах печінки в нмоль/мг білка.

Примітка: *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем; ## $p < 0,01$ - порівняно з групою КонА.

Для з'ясування можливих механізмів змін оксидативного стану печінки було досліджено активність ферментів антиоксидантної системи. Встановлено, що через 20 год після введення КонА активність каталази та

супероксиддисмутази у гомогенаті печінки не відрізнялася від контрольних значень. Введення 4-ГК також не спричиняло суттєвих змін цих показників. Це свідчить, що зменшення накопичення МДА при інгібуванні ПАРП-1 пов'язане передусім із послабленням процесів ПОЛ, а не з активацією ферментативної антиоксидантної системи.

Поряд із гепатопротективним ефектом інгібітора ПАРП-1 спостерігалось також послаблення системних імунозапальних реакцій. За даними лейкограми периферичної крові, введення 4-ГК (рис. 4.9). За даними лейкограми периферичної крові, введення 4-ГК супроводжувалося зниженням відсотка паличкоядерних нейтрофільних гранулоцитів порівняно з групою КонА (рис. 4.9). Це може свідчити про вплив інгібітора ПАРП-1 на процеси дозрівання або мобілізації нейтрофільних гранулоцитів без істотного впливу на їх загальний вміст у периферичній крові (Макогон та ін., 2015).

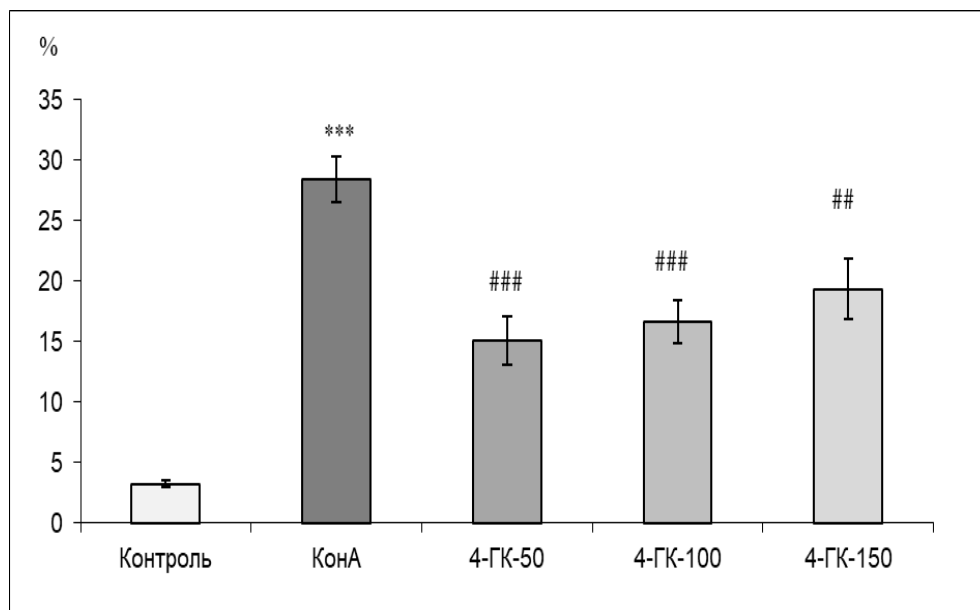


Рисунок 4.9. Вплив 4-ГК в дозах 50, 100 та 150 мг/кг на відсоток паличкоядерних нейтрофільних гранулоцитів в лейкограмі крові мишей через 20 год після введення КонА.

Примітка: *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем; ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ - порівняно з групою КонА

Таким чином, отримані результати свідчать про важливу роль ПАРП-1 у механізмах ушкодження гепатоцитів при імуноопосередкованому запаленні печінки, зокрема через посилення некротичної загибелі клітин та оксидативного стресу. Встановлено, що дози 50 та 100 мг/кг 4-ГК забезпечували подібний рівень цитопротективного ефекту, тоді як подальше підвищення дози не супроводжувалося посиленням захисної дії препарату. Це може бути пов'язано з важливою фізіологічною роллю ПАРП-1 у регуляції процесів репарації ДНК, експресії генів і клітинної життєздатності, тому надмірне пригнічення активності ферменту може обмежувати позитивний ефект інгібітора.

Було також важливо дослідити дозозалежний вплив інгібування ПАРП-1 на життєздатність і загибель імунокомпетентних клітин. Некротична загибель таких клітин може супроводжуватися вивільненням внутрішньоклітинного вмісту, включаючи аутоантигени, що здатне посилювати імунні та запальні реакції. Натомість програмована загибель клітин шляхом апоптозу виконує важливу гомеостатичну функцію, обмежуючи надмірну імунну відповідь.

Ми встановили, що при введенні 4-ГК у дозах 50 та 100 мг/кг спостерігалось збільшення відсотка живих клітин тимуса та лімфатичних вузлів (табл. 4.1). Підвищення життєздатності клітин відбувалося переважно за рахунок зменшення некротичної загибелі. Так, рівень некрозу тимоцитів знижувався у 2,1 раза при застосуванні дози 50 мг/кг, у 1,6 раза при дозі 100 мг/кг та у 2,0 раза при дозі 150 мг/кг. В клітинах лімфатичних вузлів спостерігалася подібна тенденція: рівень некротичної загибелі зменшувався у 1,8 раза при введенні 4-ГК у дозі 50 мг/кг, у 1,7 раза при дозі 100 мг/кг та у 1,6 раза при дозі 150 мг/кг порівняно з групою КонА. Що стосується апоптозу, то достовірне його зниження спостерігалось лише при застосуванні 4-ГК у дозі 100 мг/кг в клітинах тимусу (рис. 4.10, 4.11) (Макогон та ін., 2015).

Таблиця 4.1.

Життєздатність клітин, виділених з імунокомпетентних органів, при введенні мишам інгібітора ПАРП 4-ГК у дозах 50, 100 та 150 мг/кг за умов КонА-індукованого гепатиту. Дані представлені у відсотках від їх загальної кількості.

Вплив	Контроль	КонА	4-ГК 50 мг/кг	4-ГК 100 мг/кг	4-ГК 150 мг/кг
Клітини тимусу	92,0 ± 3,9	80,3 ± 6,1 ***	88,2 ± 3,3 #	87,4 ± 4,7 #	85,2 ± 6,0
Клітини лімфовузлів	92,6 ± 2,2	81,4 ± 3,0 ***	84,3 ± 3,7 #	86,3 ± 2,6 #	85,6 ± 4,8 #

Примітка: *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$ - порівняно з групою КонА.

Отримані результати свідчать, що інгібування ПАРП-1 за умов КонА-індукованого ушкодження печінки супроводжується послабленням некротичної загибелі імунокомпетентних клітин. Встановлено, що дози 50 та 100 мг/кг 4-ГК проявляли подібний цитопротективний ефект, тоді як подальше підвищення дози не супроводжувалося його посиленням. З огляду на це, для подальших експериментальних досліджень було обрано дозу 100 мг/кг, яка забезпечувала стабільний цитопротективний ефект і була використана для подальшого аналізу механізмів дії інгібітора ПАРП-1 у різних експериментальних моделях.

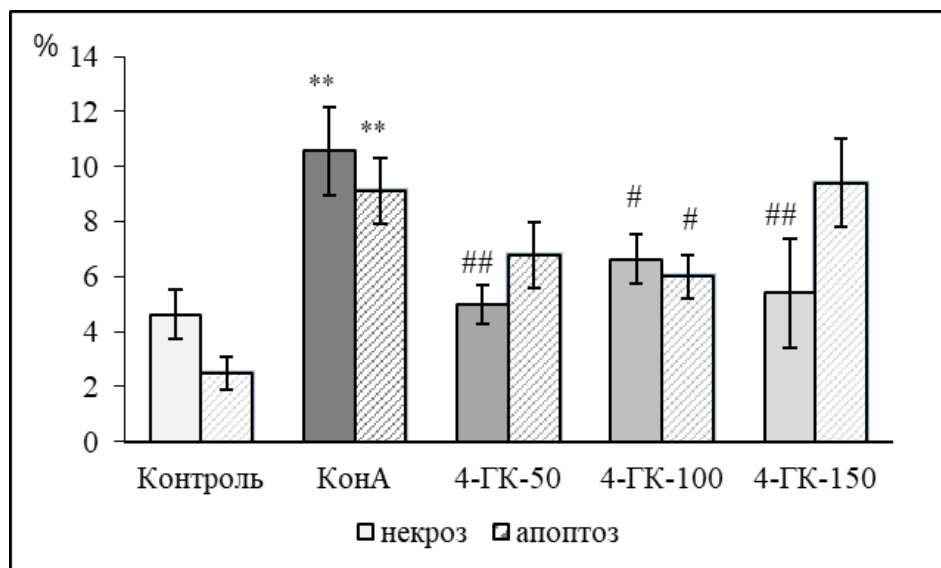


Рисунок 4.10. Зміни апоптотичної та некротичної загибелі клітин тимуса за умов дії КонА та введення 4-ГК (50, 100 і 150 мг/кг маси тіла мишей).

Примітка: ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ - порівняно з групою КонА.

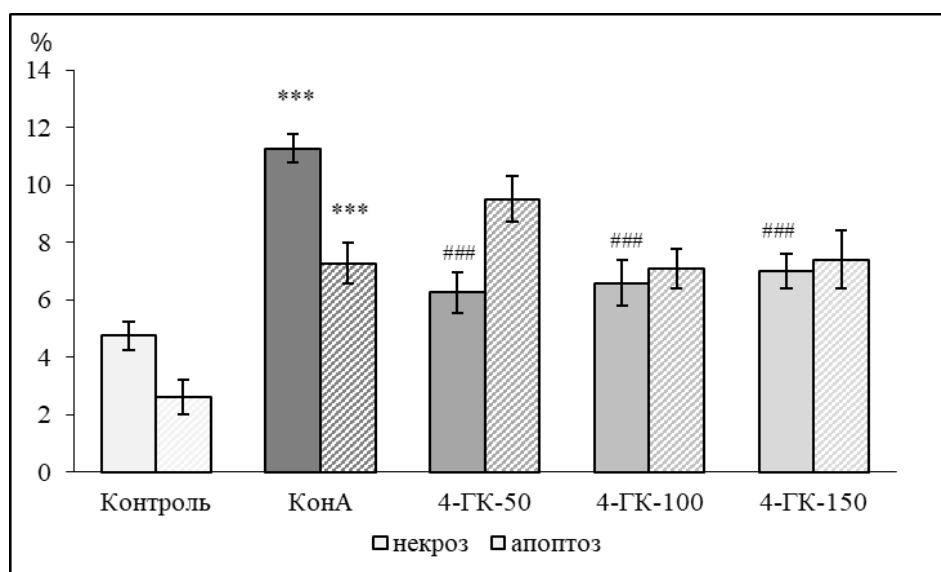


Рисунок 4.11. Зміни апоптотичної та некротичної загибелі клітин лімфатичних вузлів за умов дії КонА та введення 4-ГК (50, 100 і 150 мг/кг маси тіла мишей).

Примітка: *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем; ### $p < 0,001$ - порівняно з групою КонА.

4.2.2. Вплив інгібування ПАРП-1 на інтегральну цілісність геному імунокomпетентних клітин

Застосування інгібіторів ПАРП-1 у всіх досліджуваних моделях (БСА, Кона та ЛПС) достовірно знижувало рівень ушкодження ДНК та відсоток клітин із тяжкими порушеннями геному, що підтверджує їхню ефективність у корекції імуніопосередкованих порушень та збереженні інтегральної цілісності геному.

Застосування інгібіторів ПАРП-1 за умов дії Кона сприяло зниженню рівня ушкоджень ДНК у клітинах імунної системи. Зокрема, 4-ГК призводив до зниження ІДК у клітинах тимуса з $1,8 \pm 0,24$ до $0,39 \pm 0,06$ ($p < 0,01$), а при дії 3-АБА до $0,83 \pm 0,13$ ($p < 0,01$). Подібне достовірне зменшення ІДК виявлено і в клітинах лімфатичних вузлів. При дії Кона ІДК становив $1,82 \pm 0,18$ та зменшувався до $0,56 \pm 0,18$ ($p < 0,01$), а при дії 3-АБА до $0,81 \pm 0,10$ ($p < 0,01$) (Грушка, 2025).

Аналіз розподілу клітин за класами ушкодження показав, що введення 4-ГК та 3-АБА достовірно зменшувало відсоток клітин тимуса з тяжкими ушкодженнями ДНК (комети 3–4 класів) порівняно з групою Кона та збільшувало відсоток клітин з інтактною ДНК (клас 0). Також достовірно зростав відсоток клітин із мінімально фрагментованою ДНК (клас 1) при застосуванні 3-АБА, тоді як при введенні 4-ГК зміни не досягали статистичної значущості. Водночас відсоток клітин із помірними порушеннями ДНК (2 клас) в клітинах тимуса достовірно знижувався при введенні 4-ГК (рис. 4.12, А).

Що стосується клітин лімфатичних вузлів, то зміни при дії блокаторів ПАРП були менш вираженими. При Кона-індукованому ушкодженні введення 4-ГК та 3-АБА достовірно зменшувало відсоток клітин з кометами 3–4 класів та збільшувало відсоток клітин 0 класу. При цьому відсоток клітин

1 та 2 класів у вторинних імунних органах суттєво не змінювався (рис. 4.12, Б). Порівняно з тимусом, у лімфатичних вузлах перерозподіл клітин за класами ушкодження був менш вираженим, що може свідчити про більшу чутливість тимоцитів до Кона-індукованого ушкодження (Грушка, 2025).

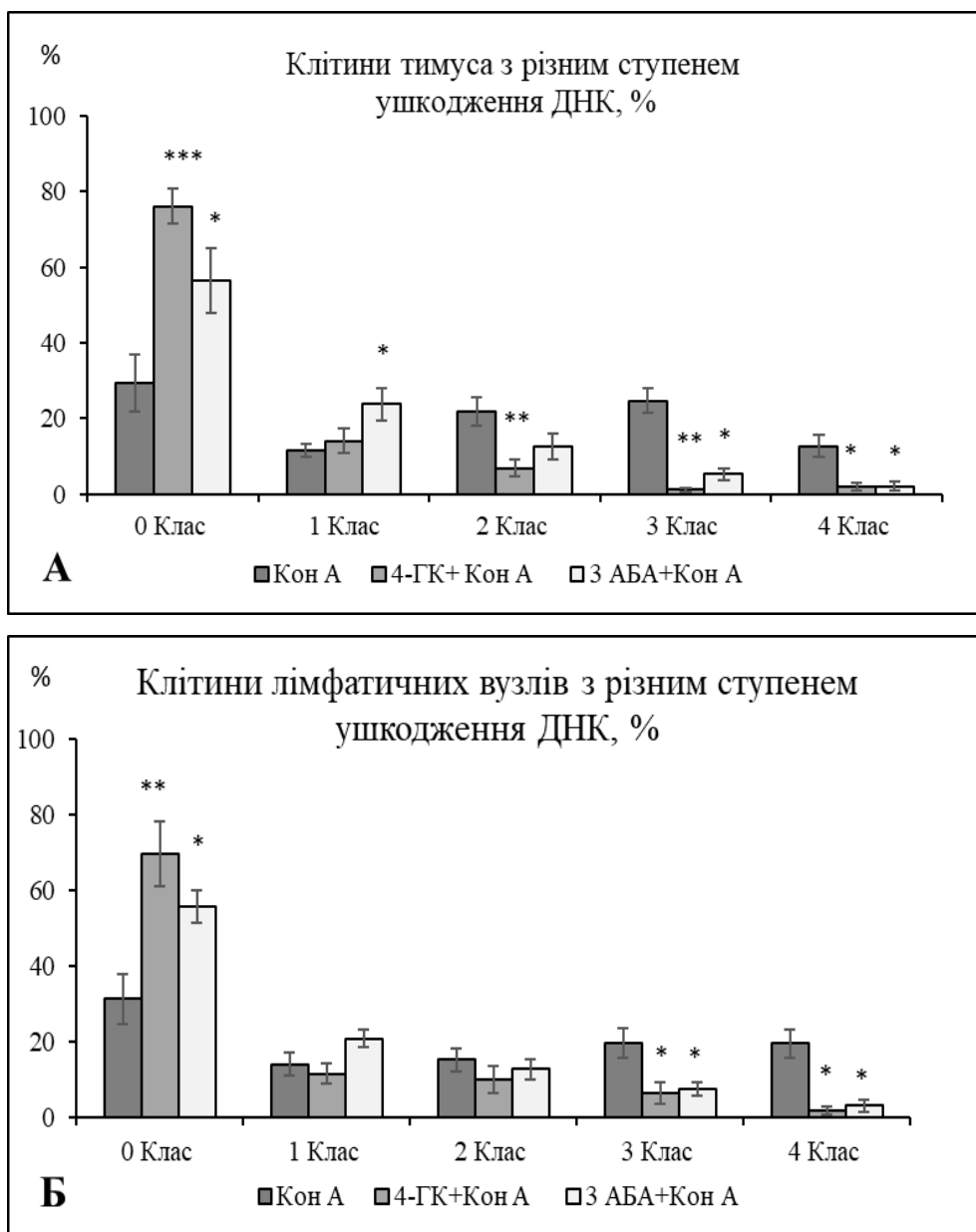


Рисунок 4.12. Вплив інгібіторів ПАРП (3-АБА, 4-ГК) на відсоток клітин тимуса (А) та лімфатичних вузлів (Б) з різним ступенем ушкодження ДНК за умов Кона індукованого гепатиту.

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з групою КонА.

В наступній моделі ЛПС-індукованої ендотоксемії застосування інгібіторів ПАРП-1 також сприяло зниженню рівня ушкодження ДНК у клітинах імунної системи. Введення 4-ГК сприяло зниженню ІДК у клітинах тимуса з $2,35 \pm 0,11$ до $1,16 \pm 0,30$ ($p < 0,01$), а при дії 3-АБА до $1,61 \pm 0,25$ ($p < 0,01$). Подібне достовірне зменшення ІДК виявлено і в клітинах лімфатичних вузлів. При дії ЛПС ІДК становив $2,08 \pm 0,29$ та зменшувався до $0,78 \pm 0,18$ ($p < 0,01$) при введенні 4-ГК і до $1,15 \pm 0,10$ ($p < 0,01$) при застосуванні 3-АБА. Також відзначалися зміни в розподілі клітин за рівнем їх ушкодження ДНК при введенні інгібіторів ПАРП-1 (4-ГК та 3-АБА). В клітинах обох досліджуваних органів імунної системи відбувалось суттєве зниження відсотка імуноцитів із вираженими ушкодженнями ДНК (3 та 4 класи) та достовірне збільшення відсотка клітин 0-1 класу як у тимусі, так і в лімфатичних вузлах порівняно з дією ЛПС (рис. 4.13, А, Б). Крім цього, знижувався відсоток клітин 2 класу, що характеризує незначне ушкодження ДНК. Причому найбільш виражений ефект відзначався при застосуванні 4-ГК. Отримані дані свідчать про зниження інтенсивності генотоксичного стресу в імунних органах при дії інгібіторів ПАРП-1 за умов системної ендотоксемії (Grushka et al., 2019).

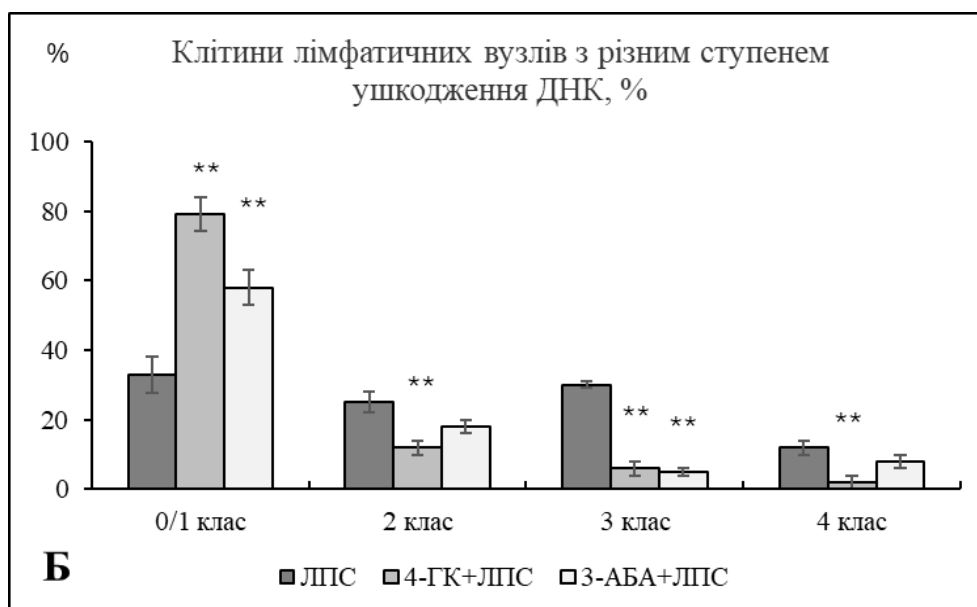
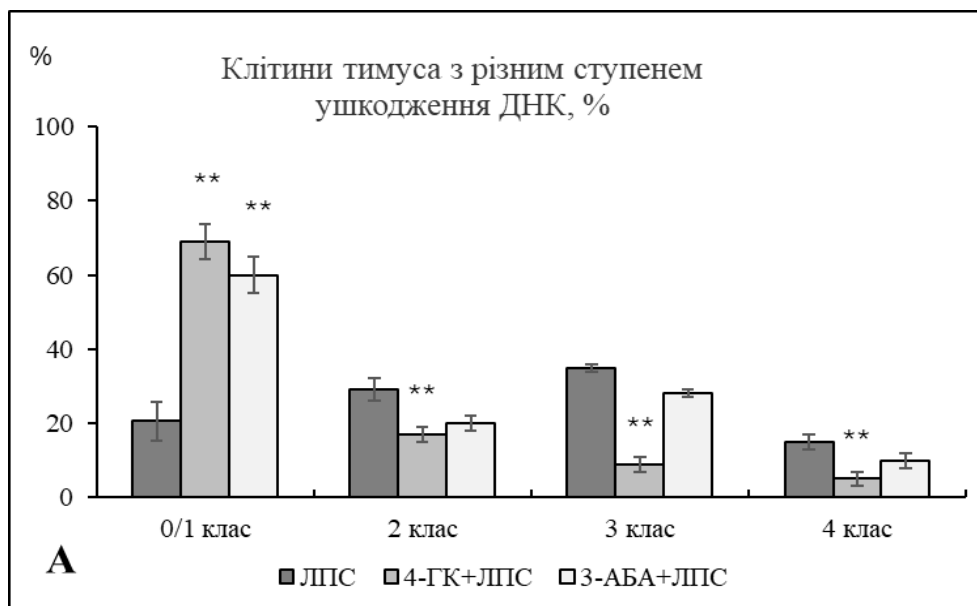


Рисунок 4.13. Вплив інгібіторів ПАРП-1 (3-АБА, 4-ГК) на відсоток клітин тимуса (А) та лімфатичних вузлів (Б) з різним ступенем ушкодження ДНК в умовах системної ендотоксемії.

Примітка: ** $p < 0,01$ - порівняно з групою ЛПС.

Оскільки в моделі *in vitro* та у двох попередніх моделях *in vivo* (КонА-індукований гепатит і ЛПС-індукована ендотоксемія) інгібітор 4-ГК демонстрував найбільш виражений протективний ефект, подальші дослідження були зосереджені саме на цьому інгібіторі. Установлено, що через 6 тижнів після початку імунізації БСА підвищувався інтегральний показник ушкодження ДНК (ІДК) як у клітинах лімфатичних вузлів, так і в клітинах тимуса, що відображає розвиток генотоксичного стресу в клітинах центрального та периферичного органів імунної системи.

Застосування 4-ГК на тлі імунізації БСА супроводжувалося достовірним зниженням ІДК порівняно з імунізованими тваринами. У клітинах тимуса ІДК знижувався з $2,8 \pm 0,2$ до $0,8 \pm 0,1$ ($p < 0,01$) при дії 4-ГК, а в клітинах лімфатичних вузлів з $3,0 \pm 0,26$ до $1,8 \pm 0,2$ ($p < 0,01$). Крім того, за умов БСА-індукованого ушкодження збільшувався відсоток комет 3-4 класів, що характеризують виражене ушкодження ДНК. Введення імунізованим мишам інгібітора ПАРП-1 4-ГК призводило до достовірного зменшення відсотка клітин з 3 та 4 класами ушкодження ДНК (рис. 4.14 А, Б). У клітинах тимуса при цьому також знижувався відсоток клітин 2 класу, що свідчить про перерозподіл клітин за рівнем ушкодження ДНК не лише за рахунок зменшення тяжких форм, але й помірних ушкоджень. Разом з тим, інгібітор 4-ГК сприяв зростанню відсотка клітин як тимуса, так і лімфовузлів із неушкодженою ДНК (Грушка, 2017).

Отримані результати свідчать, що фармакологічне інгібування ПАРП-1 сприяє збереженню цілісності ДНК і зменшенню рівня генотоксичного стресу в клітинах імунної системи за умов різних моделей імуноопосередкованого ушкодження. Оскільки ушкодження геному розглядається як один із механізмів активації програм клітинної загибелі, наступним етапом досліджень стало вивчення впливу інгібіторів ПАРП-1 на життєздатність і шляхи смерті імуніцитів.

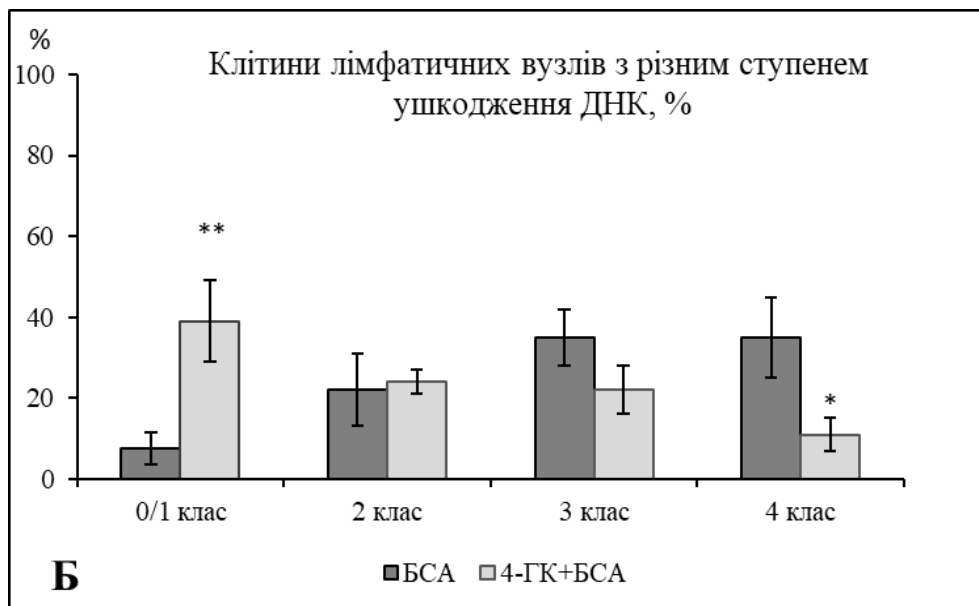
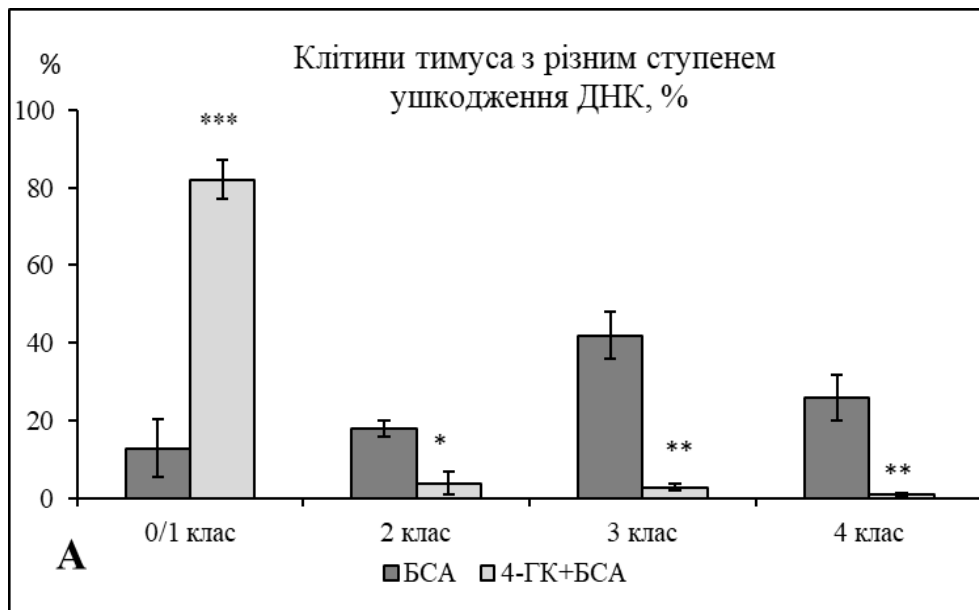


Рисунок 4.14. Вплив інгібітора ПАРП-1 4-ГК на відсоток клітин тимуса (А) та лімфатичних вузлів (Б) з різним ступенем ушкодження ДНК за умов експериментального системного імунокомплексного ушкодження, індукованого БСА.

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з групою БСА.

4.2.3. Вплив інгібування ПАРП-1 на життєздатність і шляхи загибелі імунікомпетентних клітин

Інтегральна цілісність геному тісно пов'язана з балансом між виживанням клітин та їх загибеллю, тому наступним етапом дослідження стала оцінка впливу інгібіторів ПАРП-1 на життєздатність і механізми клітинної загибелі імуніцитів, оскільки за умов імуніопосередкованого ушкодження спостерігалися відмінності у співвідношенні апоптозу та некрозу залежно від моделі ушкодження.

Модель КонА-індукованого гепатиту

Використовуючи подвійне флуоресцентне фарбування йодидом пропідію та Hoechst 33342, ми виявили, що одноразове введення 4-ГК перед введенням КонА забезпечувало виражений захист імуніцитів від загибелі. У клітинах тимуса відсоток життєздатних клітин зростав із $79 \pm 6\%$ у групі КонА до $88 \pm 3\%$ у групі КонА + 4-ГК ($p < 0,01$). У клітинах лімфатичних вузлів цей показник зростав із $81,4 \pm 1,0\%$ (КонА) до $86,3 \pm 2,6\%$ (КонА + 4-ГК; $p < 0,05$). Як показано на рисунку (рис. 4.15), КонА спричиняв достовірне підвищення як некрозу, так і апоптозу імунних клітин. Встановлено, що 4-ГК зменшував некротичну загибель клітин тимуса та лімфатичних вузлів, індуковану КонА, з $10,8 \pm 4,1 \%$ до $4,9 \pm 2,1 \%$ ($p < 0,05$) та з $11,3 \pm 1,6 \%$ до $6,2 \pm 2,2 \%$ ($p < 0,01$) відповідно. Водночас введення 4-ГК не впливало на відсоток апоптотичних клітин тимуса і лімфатичних вузлів у мишей, яким вводили КонА. Таким чином, отримані дані свідчать, що інгібітор ПАРП-1 4-ГК відновлював життєздатність імунних клітин у моделі КонА-індукованого гепатиту у мишей за рахунок зменшення некротичної клітинної загибелі (Грушка, 2025; Grushka et al., 2014).

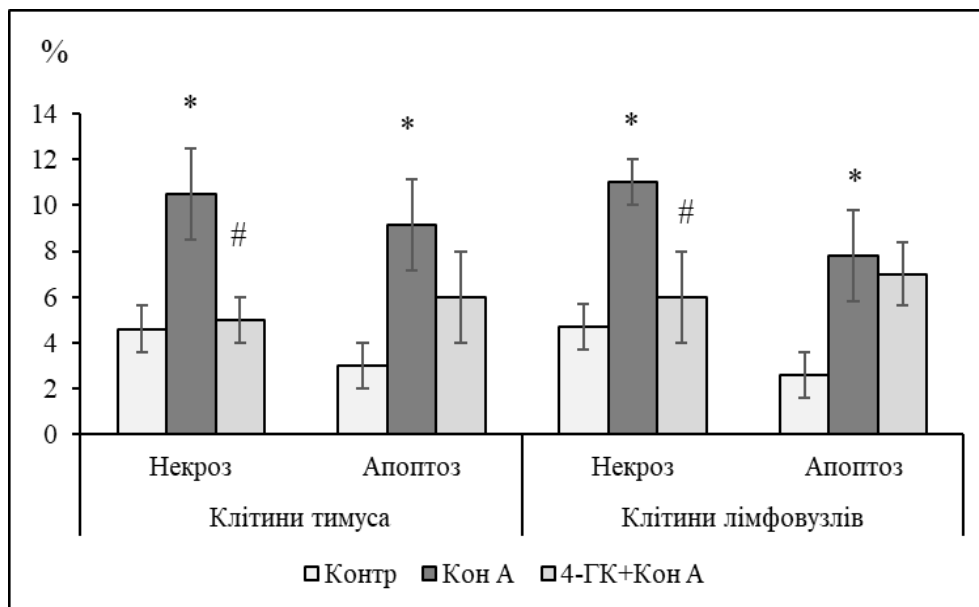


Рисунок 4.15. Вплив 4-ГК на шляхи загибелі клітин, виділених з тимуса та лімфатичних вузлів за умов дії КонА.

Примітка: * $p < 0,05$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$ - порівняно з групою КонА.

Модель системної ентотоксемії

В наших експериментах було встановлено, що введення 4-ГК покращувало життєздатність клітин за умов дії бактеріального ендотоксину. У лімфоцитах лімфатичних вузлів відсоток життєздатних клітин зростав з $81,75 \pm 2,30$ % при дії ЛПС до $90,03 \pm 1,69$ % при дії 4-ГК ($p < 0,05$). Подібні зміни спостерігалися й у клітинах тимуса, де відсоток живих клітин збільшувалася з $72,54 \pm 4,12$ % при дії ЛПС до $89,33 \pm 1,63$ % при дії 4-ГК ($p < 0,05$). В обох органах вірогідно зменшувався відсоток некротичних клітин. У лімфатичних вузлах - із $7,0 \pm 1,39$ % до $1,41 \pm 0,39$ % ($p < 0,05$), а в тимусі - $11,89 \pm 3,09$ % до $1,43 \pm 0,57$ % ($p < 0,05$) (рис. 4.16.). Отже, підвищення життєздатності клітин відбувалося головним чином за рахунок послаблення їх некротичної загибелі, яка при ентотоксемії переважала над апоптозом (Grushka et al., 2019).

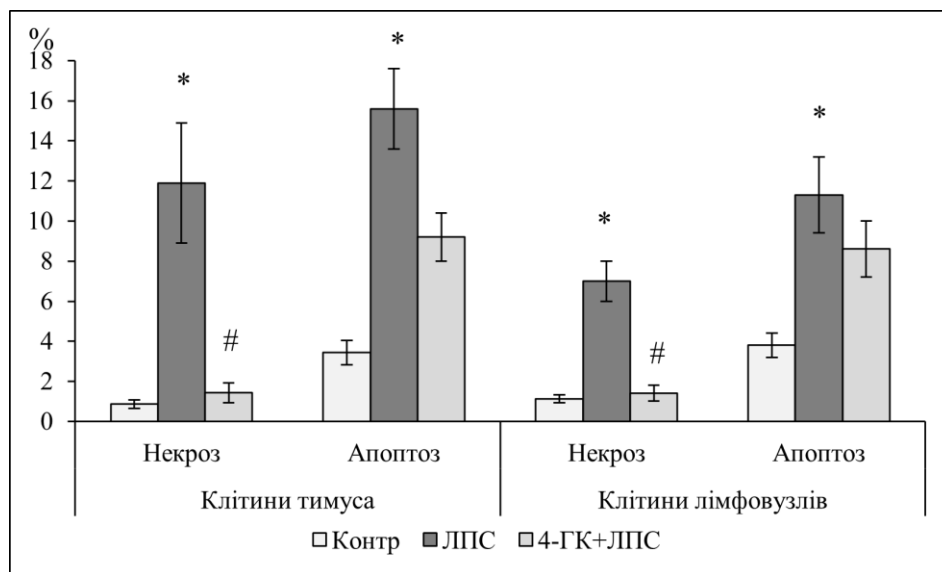


Рисунок 4.16. Вплив 4-ГК на шляхи загибелі клітин, виділених з тимуса та лімфатичних вузлів за умов дії ЛПС.

Примітка: * $p < 0,05$ - порівняно з контролем, # $p < 0,05$ - порівняно з групою ЛПС.

Модель імунокомплексної патології (БСА).

Введення чужорідного білка в нашому експерименті призводило до зменшення відсотка живих клітин та посилення некротичного шляху клітинної загибелі як у клітинах тимуса, так і у клітинах лімфатичних вузлів порівняно з контролем. Фармакологічне інгібування ПАРП за допомогою 4-ГК призводило до покращення життєздатності ІКК внаслідок зменшення їх некротичної загибелі. У клітинах лімфатичних вузлів відсоток некротичних клітин знижувався з $5,83 \pm 0,46 \%$ за умов імунізації до $2,50 \pm 0,52 \%$ при введенні 4-ГК імунізованим мишам ($p < 0,01$). Застосування інгібітора ПАРП-1 на тлі гіперімунокомплексемії призводило до зменшення кількості некротичних клітин тимуса з $3,55 \pm 0,99 \%$ до $1,57 \pm 0,30 \%$ ($p < 0,05$). Водночас апоптоз у цій моделі не зазнавав статистично значущих змін, хоча в клітинах лімфатичних вузлів спостерігалася тенденція до його зниження, однак вона не досягла статистично значущої (рис. 4.17). Представлені результати свідчать, що застосування 4-ГК мало подібну за направленістю і вираженістю протективну дію на клітини первинного і вторинного органів імунної системи. Інгібування ПАРП-1 призводило до послаблення прозапальної та імуногенної некротичної загибелі і не зменшувало апоптоз лімфоцитів (Грушка, 2017).

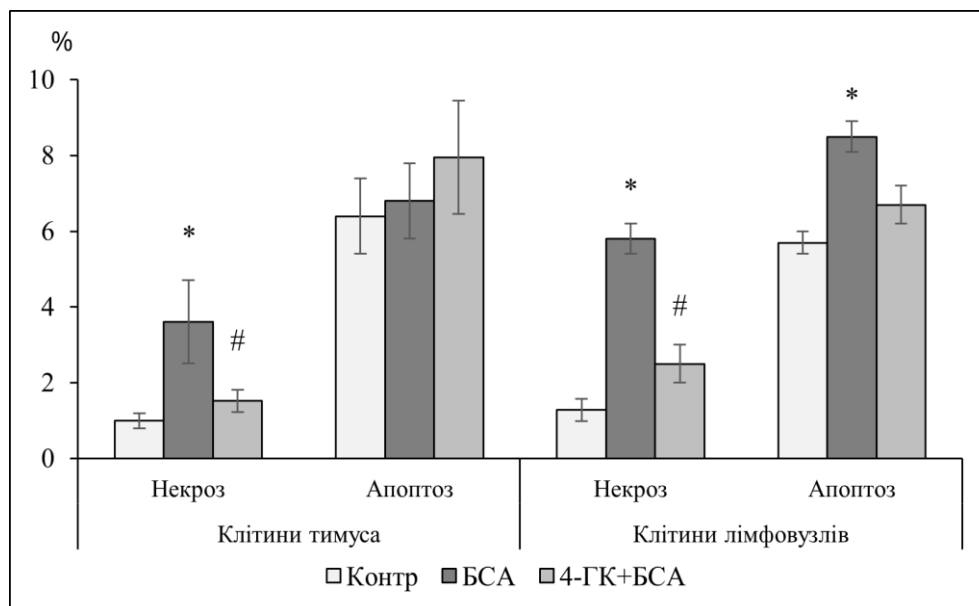


Рисунок 4.17. Вплив 4-ГК на шляхи загибелі клітин, виділених з тимуса та лімфатичних вузлів за умов експериментального системного імунокомплексного ушкодження, індукованого БСА.

Примітка: * $p < 0,05$ - порівняно з контролем, # $p < 0,05$ - порівняно з групою БСА.

Отже, представлені результати свідчать, що застосування 4-ГК мало подібну за спрямованістю і вираженістю протективну дію на клітини первинного і вторинного органів імунної системи. У всіх трьох моделях інгібування ПАРП-1 сприяло збереженню життєздатності імуніцитів насамперед за рахунок зменшення некротичної загибелі, тоді як рівень апоптозу залишався незмінним.

4.2.4. Вплив інгібування ПАРП-1 на активацію клітин природного імунітету

Клітини природного імунітету є першою лінією захисту організму та визначають інтенсивність ранньої запальної відповіді за умов імуноопосередкованого ушкодження. Оскільки нами було встановлено участь ПАРП-1 у регуляції клітинного стресу та життєздатності імуніцитів, подальші дослідження було спрямовані на з'ясування впливу інгібування цього ферменту на функціонально-метаболічну активність клітин природного імунітету

Показано, що введення інгібітора ПАРП-1 4-ГК за умов імунокомплексного ушкодження, індукованого БСА сприяло нормалізації відсотка Нф периферичної крові за даними лейкограми, зокрема молодих паличкаядерних форм. За умов імунізації їх відсоток становив $9,3 \pm 1,2 \%$, тоді як при введенні 4-ГК на тлі імунізації знижувався до $2,9 \pm 0,7 \%$ ($p < 0,01$). Також інгібування ПАРП-1 сприяло зменшенню відсотка сегментоядерних нейтрофілів за умов імунізації БСА з $23,8 \pm 15,8 \%$ до $11,4 \pm 6,4 \%$ ($p < 0,05$).

У моделі гіперімунокомплексемії також отримані дані, що свідчать про зниження генерації АФК нейтрофілами за умов інгібування ПАРП-1. Зокрема, введення 4-ГК призводило до зменшення показників НСТ-тесту, тобто зниження відсотка формазан-позитивних клітин в 1,7 рази ($p < 0,01$), що відображає пригнічення утворення АФК і може бути одним із механізмів цитопротективної дії інгібітора *in vivo*. Також спостерігалось зниження цитохімічного показника НСТ при дії 4-ГК в 2,1 рази ($p < 0,01$).

Подібні зміни виявлено і щодо вмісту катіонних білків лізосом. Напівкількісний лізосомально-катіонний тест (ЛКТ) показав, що за умов імунізації БСА введення 4-ГК супроводжувалося достовірним зменшенням середнього цитохімічного коефіцієнта (СЦК) реакції. Вміст катіонних білків у

нейтрофілах знижувався приблизно у 3 рази порівняно з групою БСА ($p < 0,001$) (табл. 4.1) (Срібна та ін., 2016).

В моделі ЛПС-індукованої ендотоксемії інгібування ПАРП-1 також супроводжувалося нормалізацією нейтрофільної ланки крові. Зокрема, відсоток паличкоядерних нейтрофілів знижувався з $18,20 \pm 1,89 \%$ у групі ЛПС до $8,03 \pm 1,03 \%$ у групі 4-ГК+ЛПС ($p < 0,05$). Аналогічне зниження відбувалося що до сегментоядерних нейтрофілів, відсоток яких зменшувався з $35,40 \pm 3,94 \%$ у групі ЛПС до $23,89 \pm 3,66 \%$ у групі 4-ГК+ЛПС ($p < 0,05$) (Grushka et al., 2019). Введення ЛПС спричиняло активацію функціонально-метаболічної активності нейтрофілів, що підтверджувалося підвищенням показників НСТ-тесту та вмісту катіонних білків.

Застосований 4-ГК послаблювало ці зміни в умовах ендотоксемії, про що свідчить зменшення відсотка клітин-ефекторів запалення нейтрофілів в крові. 4-ГК при дії ЛПС достовірно знижував генерацію активних форм кисню в нейтрофілах, про що свідчило зменшення відсотка формазапозитивних клітин більше чим у 1,5 рази ($p < 0,05$), а також зниження ЦХП майже у 2 рази ($p < 0,05$). Крім того, застосування 4-ГК пригнічувало синтез лізосомальних факторів, активований введенням ЛПС, зокрема КБ. За допомогою лізосомально-катіонного тесту ми встановили, що 4-ГК призводив до зменшення середнього цитохімічного коефіцієнту реакції на вміст КБ в 2,9 рази ($p < 0,01$) (табл. 4.1). Таким чином, інгібування ПАРП-1 за умов ендотоксемії супроводжувалося послабленням запальної відповіді.

За умов КонА-індукованого ушкодження відзначалися зміни в нейтрофільній ланці периферичної крові. Введення інгібітора ПАРП-1 4-ГК за цих експериментальних умов сприяло нормалізації показників лейкограми, зокрема зменшенню відсотка молодих форм нейтрофілів. Відсоток паличкоядерних нейтрофілів у групі КонА становив $28,4 \pm 6,6 \%$, а при застосуванні 4-ГК знижувався до $16,6 \pm 1,8 \%$ ($p < 0,05$). Водночас відсоток

сегментоядерних нейтрофілів у групі КонА становив $37,5 \pm 1,4 \%$, а при введенні 4-ГК становив $43,0 \pm 2,3 \%$, тобто відзначалося його незначне підвищення. При цьому суттєвих змін у загальній кількості нейтрофілів не виявлено у лейкограмі крові при дії 4-ГК на фоні КонА. Це свідчить про те, що інгібування ПАРП-1 зменшувало утворення паличкоядерних нейтрофілів, але не впливало на загальний пул цих клітин у кровотоці, тобто не було пов'язане з їхнім вилученням шляхом клітинної загибелі (Макогон та ін., 2015). Також, при дії КонА спостерігалася виражена активація клітин природного імунітету, що проявлялася підвищенням інтенсивності НСТ-реакції, збільшенням відсотка формазан-позитивних клітин та підвищенням вмісту катіонних білків лізосом. Введення 4-ГК при дії Кон А достовірно знижував генерацію АФК в нейтрофілах, про що свідчило зменшення відсотка формазан-позитивних клітин у 1,2 раза ($p < 0,05$). Значення ЦХП знижувалося у 1,3 раза, однак ця різниця порівняно з групою КонА не досягала статистичної значущості. Крім цього, у групі Кон А значення СЦК достовірно підвищувалося порівняно з контролем, що свідчить про посилення дегрануляції нейтрофілів. Введення 4-ГК при цьому супроводжувалося достовірним зниженням цього показника в 1,8 раза ($p < 0,05$) (табл. 4.1). Отже, у моделі КонА-індукованого ушкодження інгібування ПАРП-1 за допомогою 4-ГК зменшувало відсоток молодих форм нейтрофілів та супроводжувалося відносним підвищенням сегментоядерних клітин. Одночасно знижувалася функціонально-метаболічна активація нейтрофілів: достовірно зменшувався відсоток формазан-позитивних клітин і рівень катіонних білків лізосом, тоді як показник ЦХП істотно не змінювався.

Таким чином, у досліджуваних моделях імуноопосередкованого ушкодження інгібування ПАРП-1 за допомогою 4-ГК послаблювало нейтрофільну активацію: зменшувало відсоток нейтрофілів у периферичній крові та знижувало показники НСТ- і лізосомально-катіонного тестів, що свідчить про пригнічення функціонально-метаболічної активності нейтрофілів.

Разом з тим у моделі КонА-індукованого гепатиту відзначалося збільшення відсотка сегментоядерних нейтрофілів і відсутність достовірного зниження показника ЦХП, що може свідчити про модель-специфічні особливості регуляції нейтрофільної відповіді за умов Т- клітинно-опосередкованого ушкодження печінки.

Таблиця 4.2.

Вплив інгібітора ПАРП-1 4-ГК на показники функціонально-метаболічної активності клітин вродженого імунітету за умов імуноопосередкованого ушкодження.

Параметри	БСА	4-ГК+БСА	КонА	4-ГК+КонА	ЛПС	4-ГК+ЛПС
Катіонні білки (середній цитохімічний Коефіцієнт)	0,33±0,05	0,11±0,01***	0,27±0,01	0,15±0,04#	0,32±0,02	0,11±0,01++
НСТ – тест (% формазан-позитивних клітин)	69,2±4,0	39,6±5,3**	46,0±3,0	38,2±2,5#	71,3±9,5	38,0±3,3+
НСТ-тест (цитохімічний Показник)	0,92±0,08	0,42±0,05**	0,56±0,08	0,43±0,02	1,03±0,11	0,5±0,03+

Примітка: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ - порівняно з групою БСА; # $p < 0,05$ - порівняно з групою КонА; + $p < 0,05$, ++ $p < 0,01$ - порівняно з групою ЛПС.

4.2.5. Вплив інгібування ПАРП-1 на інтенсивність перекисного окиснення ліпідів

Після введення КонА, БСА та ЛПС у мишей спостерігалось виражене посилення процесів ПОЛ у печінці, що відображалось зростанням рівня малонового діальдегіду (МДА) та ТБК-реактивних продуктів (ТБК-РП) - кінцевих метаболітів деградації мембранних фосфоліпідів. Ці дані свідчать про розвиток оксидативного стресу за умов імуноопосередкованого ушкодження різного генезу, що є важливою ланкою у формуванні клітинної дисфункції та запальних процесів. В наших експериментальних моделях вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів визначали з використанням різних одиниць вимірювання залежно від експериментальної моделі. У моделі Т-клітинного гепатиту встановлено, що після введення КонА вміст МДА у печінці зростав у 1,9 рази порівняно з контролем ($p < 0,05$). Застосування 4-ГК сприяло зменшенню вмісту МДА в печінці порівняно з групою КонА у 1,3 рази, так за умов дії тільки КонА рівень МДА становив $13,18 \pm 3,14$ нмоль/мг білка, тоді як при введенні 4-ГК - $9,8 \pm 2,07$ нмоль/мг білка ($p < 0,05$) (Grushka et al., 2014). За умов ЛПС-індукованої ендотоксемії встановлено, що після введення ЛПС вміст ТБК-РП у тканині зростав приблизно в 2 рази по відношенню до контролю ($p < 0,05$). Застосування інгібітора ПАРП-1 4-ГК за умов дії ЛПС призводило до істотного зниження вмісту ТБК-РП в печінці – в 1,7 рази порівняно з дією тільки ЛПС (з $56,9 \pm 3,9$ до $33,29 \pm 1,8$ нмоль/г тканини; $p < 0,05$) (Грушка та ін., 2019). У моделі імунокомплексного ушкодження (БСА) встановлено, що вміст МДА при дії БСА зростав приблизно у 2,2 раза та становив $10,8 \pm 0,6$ нмоль/мг тканини ($p < 0,05$), тоді як при застосуванні 4-ГК знижувався в 1,4 рази і становив - $7,05 \pm 1,1$ нмоль/мг тканини ($p < 0,05$), що свідчить про зменшення інтенсивності ПОЛ за умов інгібування ПАРП-1.

Отже, отримані результати засвідчують, що фармакологічне інгібування ПАРП-1 за допомогою 4-ГК у всіх досліджуваних експериментальних моделях супроводжувалося зниженням рівня продуктів ПОЛ в печінці, що свідчить про послаблення процесів ПОЛ та зменшення інтенсивності оксидативного стресу. Найбільш виражений ефект спостерігався в моделі системної ЛПС-ендотоксемії.

4.2.6. Вплив інгібітора полі(АДФ-рибозо)полімерази-1 4-ГК на утворення та відкладання імунних комплексів у тканинах

Нами показано, що імунізація БСА призводила до активації клітин як вродженого, так і адаптивного імунітету. Це спричиняло зростання вмісту циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) в крові та їх відкладання в тканинах печінки, селезінки та аорти імунізованих мишей. В наших подальших дослідженнях щодо оцінки впливу інгібітора ПАРП-1 4-ГК на утворення та відкладання імунних комплексів встановлено, що введення 4-ГК імунізованим тваринам сприяло суттєвому зменшенню ЦІК в крові з $56,7 \pm 15,6$ у.о. до $36,4 \pm 8,8$ у.о. у групі імунізація з 4-ГК - ($p < 0,01$ порівняно з групою БСА). Інгібування ПАРП-1 також послаблювало відкладання імунних комплексів (ІК) в тканинах. Встановлено, що за умов імунізації БСА введення 4-ГК достовірно зменшувало відкладання імуноглобулінів в кліренсних органах, таких як печінка з $2,50 \pm 0,3$ у.о. до $0,7 \pm 0,3$ у.о. ($p < 0,05$), селезінка з $3,25$ у.о. $\pm 0,3$ до $1,0 \pm 0,3$ у.о. ($p < 0,01$), а також судинах (аорті) - з $1,75 \pm 0,36$ до $0,44 \pm 0,2$ у.о. ($p < 0,05$) (рис. 4.18).

Отже, за умов фармакологічного інгібування ПАРП-1, утворення та відкладання ІК значно зменшувались, що свідчить про патогенетичну роль ПАРП-1 в розвитку гіперімунокомплексемії. Інгібітор ПАРП-1 4-ГК за даних експериментальних умов виявляв виражену протективну дію.

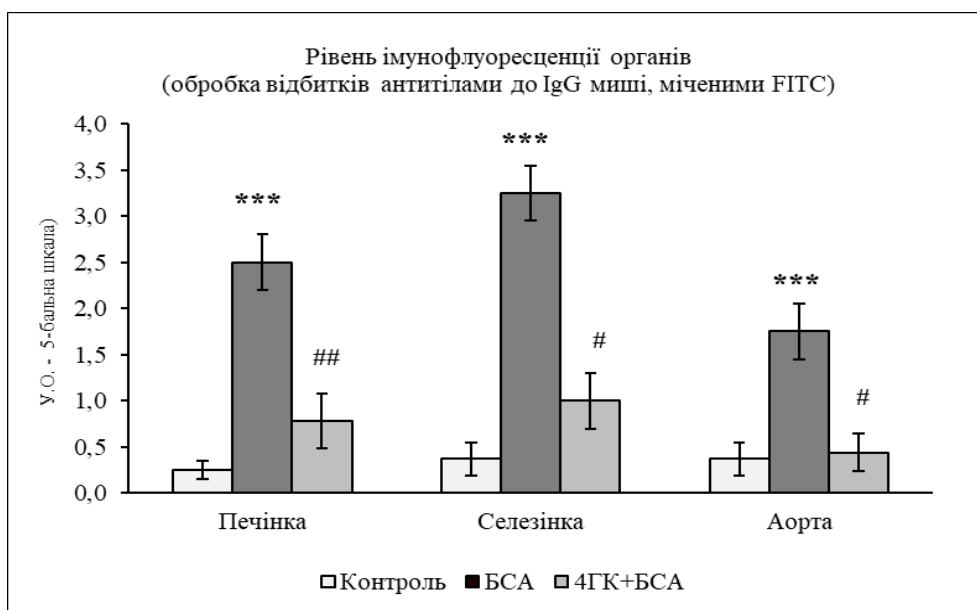


Рисунок 4.18. Інтенсивність імуофлуоресценції в печінці, селезінці та аорті мишей за умов імунокомплексного ушкодження БСА та введення інгібітора ПАРП-1- 4-ГК. По осі ординат - умовні одиниці (у.о.) напівкількісної оцінки рівня депозитів імунних комплексів.

Примітка: *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ - порівняно з групою БСА.

4.2.7. Дослідження активації полі(АДФ-рибозо)полімерази-1 при ушкодженні імунокомплексного генезу

Наступним етапом дослідження було визначення рівня активації ядерного ферменту ПАРП-1 у клітинах імунокомпетентних органів при ушкодженні імунокомплексного генезу. Активування цього ферменту ми визначали шляхом оцінювання кількості синтезованого ферментом продукту – полімеру АДФ-рибози у клітинах тимусу і пахових лімфовузлів методом імуноцитохімії із застосуванням антитіл, специфічних до полі(АДФ-рибози). Інтенсивність реакції визначали за 4-бальною шкалою (0–4 бали) напівкількісно, відповідно до інтенсивності забарвлення клітин, що відображало рівень синтезу полі(АДФ-рибози) у клітинах. У результаті імуноцитохімічного аналізу встановили наявність полі(АДФ-рибози) у клітинах тимусу та лімфовузлів мишей при імунокомплексному ушкодженні. На рис. 4.19 А у контрольній групі клітини характеризуються мінімальною інтенсивністю забарвлення. На рис. 4.19 Б у тварин після введення БСА визначається виражене коричневе ядерне забарвлення, що відповідає накопиченню полі(АДФ-рибози) та супроводжується інтенсивним відкладенням хромогену діамінобензидину у позитивно реагуючих клітинах.

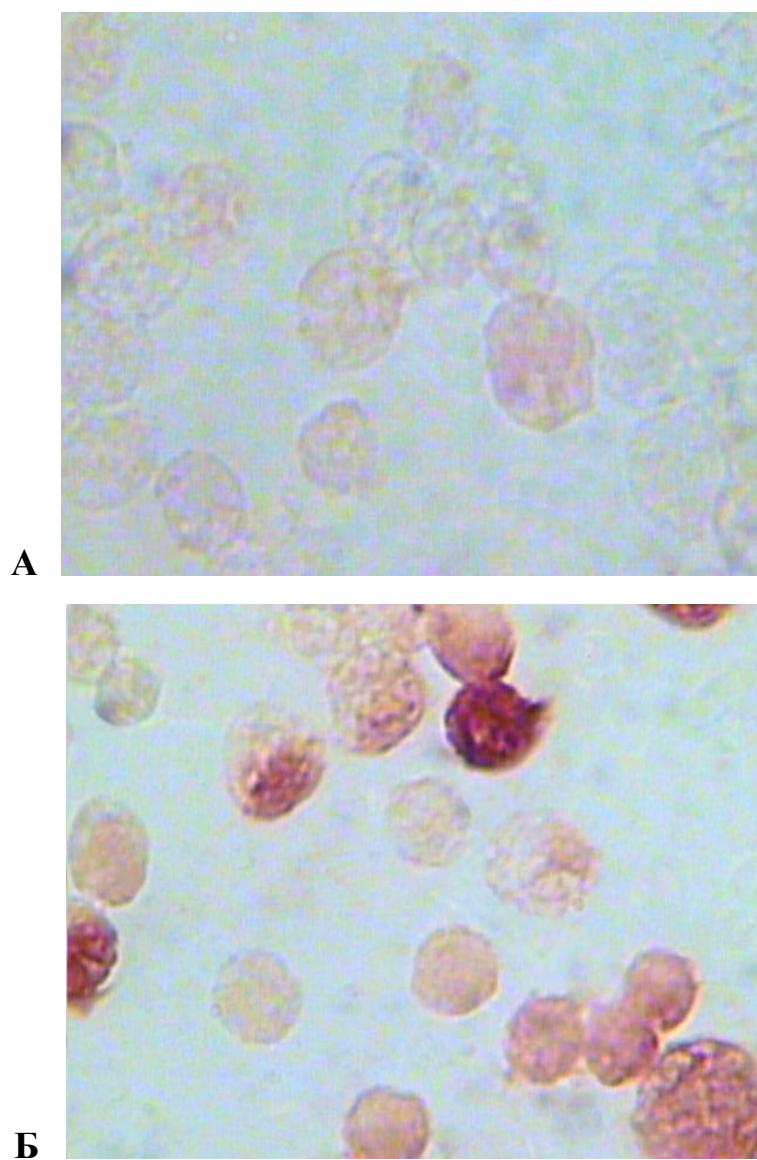


Рисунок 4.19. Наявність полі(АДФ-рибози) у тимоцитах мишей (імуноцитохімія, реакція з DAB, $\times 500$). А - конторль, Б – вплив БСА.

Для визначення відносної кількості клітин із різним ступенем активації ПАРП-1 розраховували середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК). У клітинах тимусу мишей за умов імунокомплексного ушкодження показник СЦК підвищувався з $0,09 \pm 0,04$ у контролі до $0,23 \pm 0,01$ ($p < 0,01$), що у 2,5 рази перевищувало контрольні значення. У клітинах лімфатичних вузлів СЦК зростав з $0,073 \pm 0,01$ до $0,22 \pm 0,03$ ($p < 0,001$), що було приблизно у 3 рази вище порівняно з контролем. Отримані дані свідчать про підвищене накопичення полі(АДФ-рибози) у ядрах імунокомпетентних клітин (рис. 4.16) та, відповідно, активацію полі(АДФ-рибозо)полімерази-1 за умов імунокомплексного ушкодження. Введення інгібітора ПАРП-1 4-ГК призводило до вірогідного зменшення активації ферменту як в клітинах тимуса з $0,23 \pm 0,01$ до $0,10 \pm 0,01$ ($p < 0,01$), так і в клітинах лімфатичних вузлів $0,22 \pm 0,03$ до $0,11 \pm 0,01$ ($p < 0,01$). Таким чином, за умов гіперімунокомплексемії введення 4-ГК знижувало СЦК відповідно у 2,3 та 2 рази (рис. 4.20) (Грушка, 2017).

Отже, за умов імуноопосередкованого ушкодження імунокомплексного генезу відбувається виражена активація ПАРП-1 у клітинах імунної системи, тоді як введення 4-ГК за цих умов ефективно пригнічує активність ферменту, наближаючи імуноцитохімічні показники до контрольних значень.

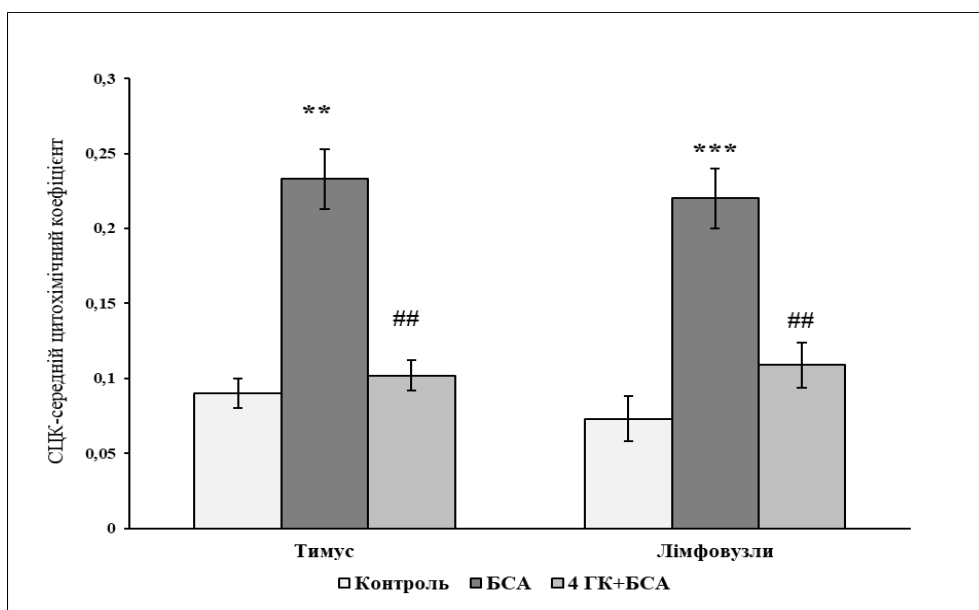


Рисунок 4.20. Рівень активності ПАРП-1 в клітинах тимусу та лімфатичних вузлів мишей за умов імунокомплексного ушкодження БСА та введення 4-ГК (за даними імуноцитохімічного виявлення полі(АДФ-рибози) (ПАР), що синтезується ферментом ПАРП-1 з використанням моноклональних анти-ПАР антитіл). За віссю ординат - середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) інтенсивності забарвлення клітин.

Примітка: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем; ## $p < 0,01$ - порівняно з групою БСА.

4.3. Молекулярно-генетичні механізми дисфункції репродуктивної системи самиць мишей у моделі БСА-індукованого імунокомплексного ушкодження

4.3.1. Імуноцитохімічне дослідження активності ПАРП-1 в клітинах яєчника

Яєчник є імунологічно чутливим органом, оскільки функціонування фолікулярного апарату значною мірою залежить від локальної імунної регуляції. Клітини фолікулярного оточення (гранульозні клітини, клітини теки та кумулюс-оофорний комплекс) забезпечують підтримку та дозрівання ооцитів, а їх ушкодження може призводити до зниження оваріального резерву та фертильності. У проведених нами дослідженнях встановлено, що імунокомплексне ушкодження супроводжується вираженою активацією ПАРП-1 у клітинах яєчника. Імуноцитохімічний аналіз виявив достовірне зростання середнього цитохімічного коефіцієнта (СЦК) у фолікулярних клітинах після введення БСА з $0,09 \pm 0,01$ у контролі, до $0,31 \pm 0,03$ ($p < 0,01$) (рис. 4.21) при дії ушкоджуючого фактора, що свідчить про підвищене накопичення полі(АДФ-рибози) та активацію ферменту. Разом з тим, застосування інгібітора ПАРП-1 4-ГК достовірно знижувало активність ферменту з $0,31 \pm 0,03$ до $0,12 \pm 0,01$ ($p < 0,05$), наближаючи показники до контрольних значень. Таким чином, за умов імунокомплексного ушкодження було показано, що в клітинах яєчника відбувається виражена активація ферменту ПАРП-1, яка ефективно пригнічується інгібітором 4-ГК (Shepel et al., 2016).

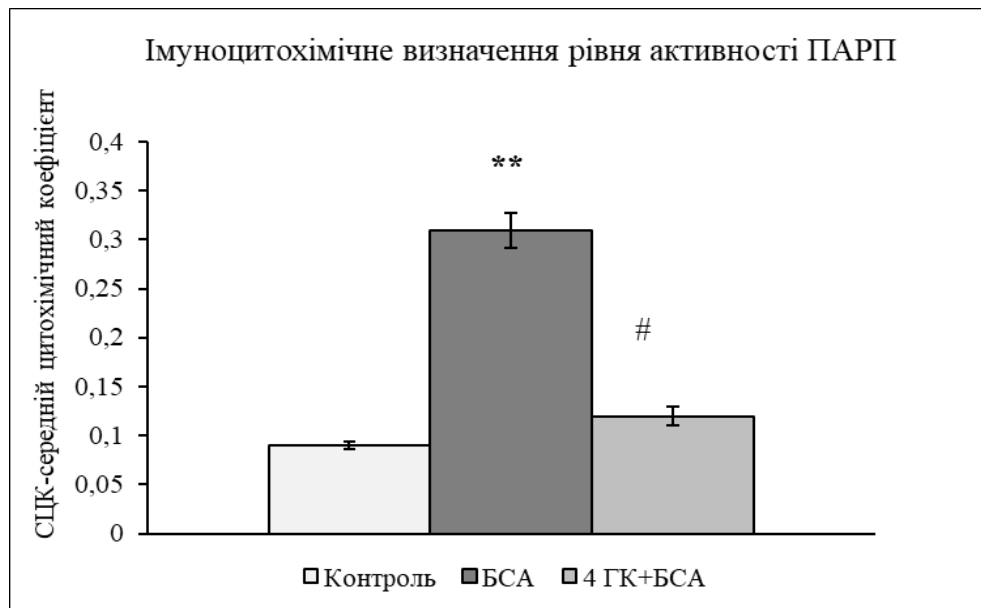


Рисунок 4.21. Рівень активності ПАРП-1 у клітинах яєчника мишей за умов імунокомплексного ушкодження БСА та введення 4-ГК (за даними імуноцитохімічного виявлення полі(АДФ-рибози) (ПАР), що синтезується ферментом ПАРП-1 з використанням моноклональних анти-ПАР антитіл). За віссю ординат - середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) інтенсивності забарвлення клітин.

Примітка: ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$ - порівняно з групою БСА.

4.3.2. Вплив інгібування ПАРП-1 на інтегральну цілісність геному клітин фолікулярного оточення, їх життєздатність та шляхи загибелі

На наступному етапі було досліджено вплив інгібітора ПАРП-1 4-ГК на інтегральну цілісність геному оваріальних клітин, їх життєздатність та шляхи загибелі. Отримані результати представлені на рис. 4.22 та засвідчили, що інгібування ПАРП-1 знижувало рівень генотоксичного стресу та сприяло підтриманню функціональної здатності клітин. У контрольній групі

переважна більшість клітин мала інтактну або мінімально ушкоджену ДНК (0/1 клас), яка становила $80 \pm 1,5 \%$, тоді як відсоток клітин із помірними та тяжкими ушкодженнями був незначним. 2 клас становив $8 \pm 1,17 \%$, 3 клас - $8 \pm 0,8 \%$, 4 клас - $4 \pm 0,8 \%$. За умов впливу БСА відзначалося достовірне зростання відсотка клітин із важкими ушкодженнями ДНК (3–4 клас), який підвищувався до $25 \pm 1,8 \%$ в 3-му класі та $33 \pm 2,6 \%$ в 4-му класі ($p < 0,01$) порівняно з контролем в обох випадках. Це супроводжувалося зменшенням відсотка клітин із інтактною та малоушкодженою ДНК (0/1 клас) до $28 \pm 2,6 \%$ ($p < 0,01$).

Введення 4-ГК на тлі впливу БСА сприяло відновленню показників інтегральної цілісності геному та зменшенню відсотка кумулюючих клітин із тяжкими ушкодженнями (3 та 4 клас) відповідно до $10 \pm 0,5 \%$ та $12 \pm 0,8 \%$ ($p < 0,05$ відносно групи БСА). При цьому відсоток клітин 0/1 класу зростав до $55 \pm 1,0 \%$ ($p < 0,05$). Таким чином, фармакологічне інгібування ПАРП-1 супроводжувалося зниженням рівня генотоксичного стресу та відновленням геномної цілісності ДНК клітин фолікулярного оточення.

Отже, отримані дані свідчать, що імунокомплексне ушкодження спричиняє виражене порушення інтегральної цілісності геному клітин фолікулярного оточення, тоді як застосування інгібітора ПАРП-1 4-ГК суттєво зменшує ці порушення, наближаючи показники до контрольних значень.

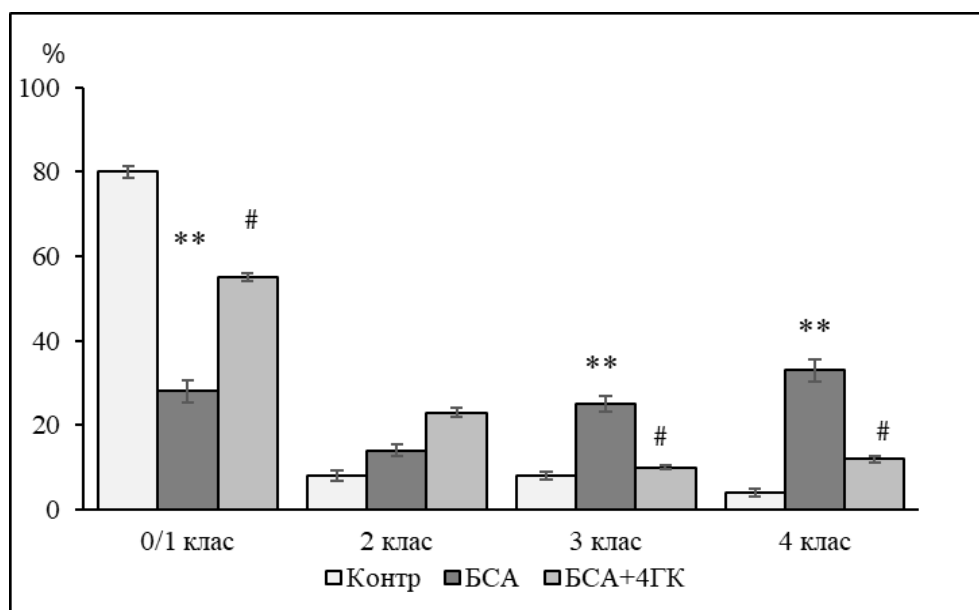


Рисунок 4.22. Вплив інгібітора ПАРП-1 4-ГК на відсоток кумулюсних клітин з різним ступенем ушкодження ДНК за умов експериментального імунотоксичного ушкодження, індукованого БСА.

Примітка: ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$ - порівняно з групою БСА.

Виявлені порушення інтегральної цілісності геному супроводжувалися зниженням життєздатності кумулюсних клітин при БСА-індукованому ушкодженні. Встановлено, що при дії БСА відбувається зниження відсотка життєздатних кумулюсних клітин (від $73,7 \pm 3,7$ % до $56,7 \pm 2,9$ %). Відсоток клітин з морфологічними ознаками апоптозу збільшувалася з $19,1 \pm 3,3$ % до $22,1 \pm 1,8$ %, але найбільш виражено зросла некротична загибель клітин від $7,3 \pm 1,7$ % в контрольній групі до $22,1 \pm 2,3$ % за умов експериментального системного імунотоксичного ушкодження. Введення мишам 4-ГК за таких умов, призводило до позитивного ефекту на клітини репродуктивної системи. Відсоток живих гранулярних клітин збільшився до $69,7 \pm 3,8$ %, у той час як

відсоток некротичних клітин зменшувався порівняно з групою БСА до $9,1 \pm 2,5$ %) (рис. 4.23). Відсоток апоптотичних клітин при дії 4-ГК на тлі ушкодження БСА вірогідно не змінювався у оваріальних клітинах (Срібна та ін., 2016).

Тобто, фармакологічне інгібування ПАРП-1 за допомогою 4-ГК достовірно сприяло життєздатності клітин гранульози та призводило до зниження некротичної загибелі до рівня, близького до контрольного, не впливаючи при цьому на апоптоз. Це свідчить, що протективна дія 4-ГК реалізується переважно через пригнічення некротичного шляху клітинної загибелі.

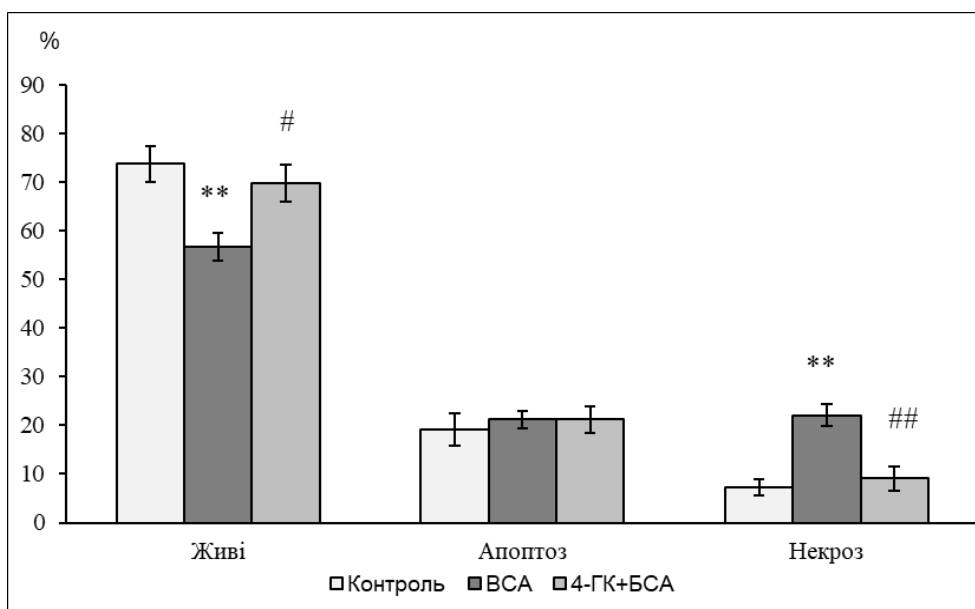


Рисунок 4.23. Вплив 4-ГК на життєздатність та шляхи загибелі кумулюючих клітин за умов експериментального імунотоксичного ушкодження, індукованого БСА.

Примітка: ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ порівняно з групою БСА.

4.3.3. Вплив інгібування ПАРП-1 на мейотичне дозрівання ооцитів та експресію генів маркерів мейотичного дозрівання (HAS2, COX2, GREM1)

Проведеними дослідженнями встановлено, що за умов експериментального імунокомплексного ушкодження, індукованого БСА, відбувалося зниження життєздатності кумулюсних клітин, яке супроводжувалося порушенням мейотичного дозрівання ооцитів. Відсоток ооцитів, що перебували в метафазі I та метафазі II, достовірно знижувався порівняно з контрольними тваринами. За умов дії БСА відсоток цих клітин у метафазі I зменшувався з $88,0 \pm 4,0$ % у контролі до $72,0 \pm 3,0$ % ($p < 0,01$), а в метафазі II — з $48,2 \pm 2,0$ % до $33,4 \pm 2,0$ % ($p < 0,05$) (Срібна та ін., 2016).

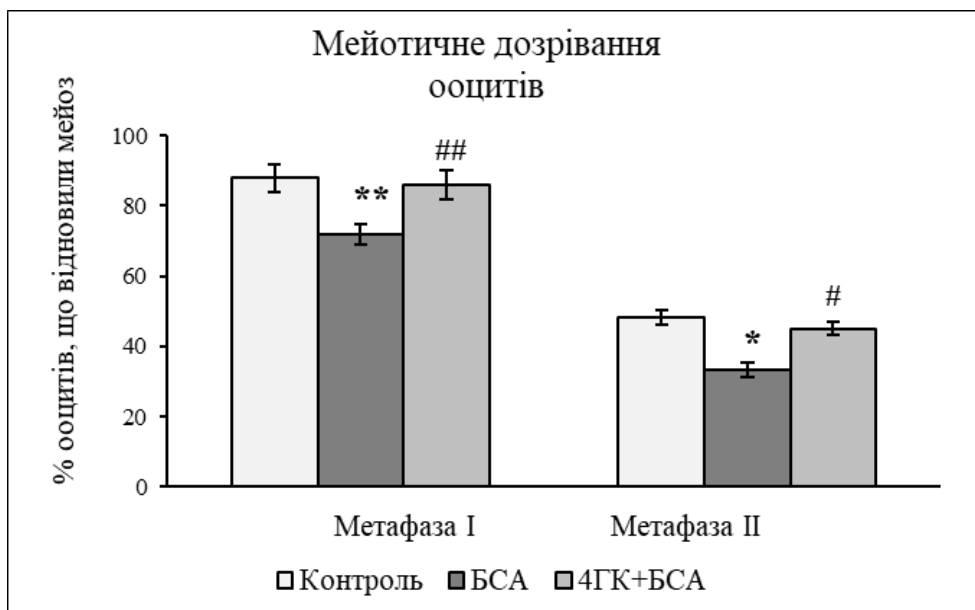


Рисунок 4.24. Вплив 4-ГК на відсоток ооцитів у метафазі I та метафазі II за умов експериментального імунокомплексного ушкодження, індукованого БСА.

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем, # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ - порівняно з групою БСА.

Введення 4-ГК на тлі БСА сприяло частковому відновленню мейотичного дозрівання ооцитів, що проявлялося підвищенням відсотка клітин у метафазі I (до $86,00 \pm 4,00 \%$) та II (до $45,11 \pm 2,00 \%$) порівняно з групою БСА (рис. 4.24) з наближенням цих показників до контрольних значень, що свідчить про виражений цитопротективний ефект інгібітора ПАРП-1 (рис. 4.24).

Наступна серія експериментів була спрямована на дослідження рівнів експресії генів HAS2, COX2 і GREM1 в кумулюючих клітинах, які пов'язані з розвитком ооцитів мишей. Як показали отримані результати, за нормальних умов мРНК, що кодують ці гени були виявлені у всіх досліджуваних зразках клітин кумулюса: ПЛР-ампліфікація зворотно транскрибованої мРНК дала специфічні смуги 409, 213 та 256 п.н., що відповідало очікуваним розмірам фрагментів Has2, Cox2 та GREM1 відповідно. Моделювання експериментального імунокомплексного ушкодження мишей, індукованого БСА, призвело до значного зниження експресії мРНК для всіх трьох генів у порівнянні з контрольними мишами, що вказує на порушення розширення кумулюса та, отже, на зниження якості ооцитів. Введення 4-ГК мишам, яким попередньо вводили БСА, достовірно підвищувало експресію мРНК COX2 та GREM1 порівняно з групою тварин, які отримували лише БСА, тоді як для HAS2 спостерігалася лише тенденція до зростання (близько 34 %), яка не досягала вірогідного значення (рис.4.25).

Таким чином, інгібування ПАРП-1 сприяє зниженню вираженості порушень функції яєчників, індуковані БСА в моделі імунокомплексного ушкодження у мишей. Отримані результати свідчать, що 4-ГК не лише зменшує ушкодження ДНК у клітинах фолікулярного оточення, але й підтримує їхню функціональну активність, необхідну для забезпечення повноцінного дозрівання ооцитів. (Shepel et al., 2016).

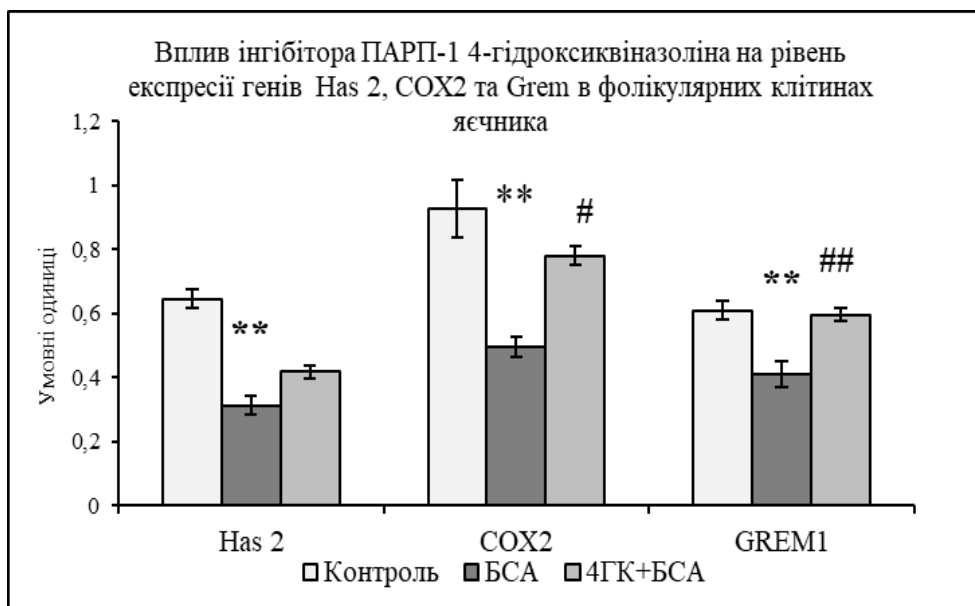


Рисунок 4.25. Вплив 4-ГК на рівень експресії генів GREM1, HAS2 і COX2 у кумулюсних клітинах мишей за умов експериментального імунокомплексного ушкодження, індукованого БСА.

Примітка: ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ - порівняно з групою БСА.

Отже, фармакологічне інгібування PARP-1 призводить до зниження вираженості імунокомплексного ушкодження, що супроводжується зменшенням активації PARP-1 у імунокомпетентних клітинах. Отримані результати підтверджують патогенетичну роль PARP-1 у розвитку імуноопосередкованих ушкоджень.

Застосування інгібітора PARP-1 4-ГК у моделях БСА, КонА та ЛПС знижувало ушкодження ДНК імунокомпетентних клітин, підвищувало їх життєздатність за рахунок зменшення некротичної загибелі, нормалізувало лейкограму, зменшувало генерацію АФК, вміст катіонних білків і процеси ПОЛ у печінці. Важливим проявом фармакологічного інгібування PARP-1 було суттєве зменшення відкладання імуноглобулінів у кліренсних органах, таких як печінка, селезінка та судини. Крім того, встановлено, що введення 4-ГК супроводжувалося пригніченням активації PARP-1 як у клітинах імунної системи, так і в інших досліджуваних органах, що за даними імуноцитохімічного аналізу проявлялося суттєвим зниженням рівня полі(АДФ-рибози) та наближенням показників активності PARP-1 до контрольних значень.

У репродуктивній системі інгібування PARP-1 за умов імунокомплексної патології сприяло зниженню генотоксичного стресу, збереженню цілісності ДНК, зменшувало некротичну загибель кумулюючих клітин, а також сприяло підвищенню експресії генів HAS2, COX2 і GREM1, що супроводжувалося покращенням мейотичного дозрівання ооцитів. Сукупність отриманих даних свідчить про протективний вплив інгібування PARP-1 на функціональний стан яєчника та репродуктивний потенціал.

Таким чином, фармакологічне інгібування PARP-1 може розглядатися як перспективний підхід до зниження генотоксичного стресу та підтримання гомеостазу імунної та репродуктивної систем.

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ РОЛІ АЛАРМІНУ HMGB1 У РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ІМУНОПОСЕРЕДКОВАНИХ РОЗЛАДІВ ІМУННОЇ СИСТЕМИ

У попередніх розділах встановлено, що в досліджуваних моделях експериментального імуноопосередкованого ушкодження переважала некротична загибель імунокомпетентних клітин. З огляду на провідну роль некрозу в розвитку надмірної імунної відповіді, було проаналізовано участь білка HMGB1, одного з типових ендогенних молекул небезпеки (DAMP), що вивільняється з клітин під час некротичної загибелі. Вивільнений HMGB1 виступає сигналом небезпеки, підсилює дію прозапальних цитокінів та сприяє активації імунних клітин. Разом з тим, враховуючи взаємозв'язок між активацією ПАРП-1 та HMGB1 (які можуть взаємно посилювати один одного), наступним етапом роботи стало дослідження впливу фармакологічного інгібування HMGB1 на показники інтегральної цілісності геному та життєздатності імунокомпетентних клітин.

5.1. Дослідження впливу гліциризинату амонію як інгібітора HMGB1 на інтегральну цілісність геному імунокомпетентних клітин

Оскільки раніше нами було встановлено, що введення ендотоксину грамнегативних мікроорганізмів (ЛПС) спричиняє генотоксичний стрес, який супроводжується вираженим ушкодженням ДНК, зниженням життєздатності клітин та зростанням некротичної та апоптотичної загибелі, наступним етапом було проаналізовано залучення HMGB1 у ці процеси та можливість їх фармакологічної корекції. У мишей з ендотоксемією відзначалося достовірне

підвищення кількості клітин лімфовузлів із високим ступенем розривів ДНК (комети 3 і 4 типу) та відповідне зменшення відсотка клітин із інтактною або малоушкодженою ДНК (0–1 клас) (табл. 5.1).

В своїх експериментах ми використали гліциризинат амонію (ГА) для дослідження його впливу на морфофункціональні показники імунокомпетентних клітин у мишей з ендотоксемією. Застосування цього інгібітора чинило цитопротективну дію на клітини лімфатичних вузлів, що проявлялося послабленням генотоксичного стресу, індукованого ЛПС. Ефект препарату мав дозозалежний характер і визначався його концентрацією. За даними методу ДНК-комет, введення найменшої дози ГА (10 мг/кг) не спричиняло статистично значущих змін ступеня ушкодження ДНК, хоча відзначалася тенденція до його зниження. Однак збільшення дози ГА до 50, 100 та 200 мг/кг супроводжувалося зменшенням відсотка клітин із тяжким ушкодженням ДНК (комети 3–4 класу) у 2,3; 3,7 та 10 разів відповідно порівняно з групою ЛПС (табл. 5.1). (Кондрацька та ін., 2020). В цьому дослідженні встановлено статистично значущу різницю між впливом ГА у дозах 50, 100 та 200 мг/кг ($p < 0,05$) на ступінь ушкодження ДНК клітин лімфовузлів. Інгібування НМGB1 гліциризинатом амонію проявляє виражений дозозалежний цитопротективний ефект, достовірно знижуючи відсоток клітин із тяжкими ушкодженнями ДНК (комети 3-4 класу) у 2,3–10 разів та відновлюючи геномну цілісність імунокомпетентних клітин за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії. Враховуючи, що максимальна доза (200 мг/кг) виявляла менш сприятливий вплив на органи репродуктивної системи, для подальших досліджень клітин тимуса було обрано оптимальну дозу 100 мг/кг.

Таблиця 5.1.

Вплив гліциризинату амонію (ГА) на ступінь ушкодження ДНК клітин лімфатичних вузлів за умов експериментального введення ЛПС

Вплив	Ступінь ушкодження ДНК	
	Комети 0-1 класу	Комети 3-4 класу
Контроль	90,67±2,9	1,0±0,5
ЛПС	69,43±3,2***	22,0±3,5***
ЛПС+ ГА 10 мг/кг	65,33±3,6***	18,17±2,9
ЛПС+ ГА 50 мг/кг	83,17±1,1##	9,50±0,4##+
ЛПС+ ГА 100 мг/кг	88,43±2,6###	6,0±0,7#+
ЛПС+ ГА 200 мг/кг	92,17±3,8##	2,19±0,5#+

Примітка: *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ - порівняно з групою ЛПС; + $p < 0,05$ - порівняно з групами ЛПС + ГА.

Дослідження ступеня ушкодження ДНК в клітинах тимусу показало, що за умов ендотоксемії ГА сприяє зменшенню кількості тимоцитів із тяжким ушкодженням ДНК (табл. 5.2). Відбувається зменшення ІДК в клітинах тимусу у 2 рази ($p < 0,05$) порівняно з групою ЛПС. Застосування ГА чинить протективний ефект на клітини центрального органу імунної системи – тимусу, зменшуючи в них інтенсивність генотоксичного стресу. Однак цей ефект був менш вираженим порівняно з дією препарату на периферичні органи імунної системи - лімфатичні вузли. Так, у групі ЛПС + ГА, де інгібітор був застосований у дозі 100 мг/кг, у лімфатичних вузлах кількість комет із тяжким ступенем ушкодження ДНК зменшувалася приблизно у 3,7 раза, тоді як у тимусі лише у 1,9 раза.

Таким чином, використання ГА чинило виражену цитопротективну дію на клітини лімфатичних вузлів та тимусу, що проявлялося у зниженні відсотка клітин із тяжким ушкодженням ДНК та, відповідно, послабленні генотоксичного стресу (Кондрацька та ін., 2020).

Таблиця 5.2.

Вплив гліциризинату амонію (ГА) на ступінь ушкодження ДНК клітин тимусу за умов експериментального введення ЛПС

Вплив	Ступінь ушкодження ДНК	
	Комети 0-1 класу	Комети 3-4 класу
Контроль	92,45±2,5	1,5±1,5
ЛПС	41,27±5,1*	47,53±3,3*
ЛПС+ ГА 100 мг/кг	71,27±3,5*#	24,67±4,2*#

Примітка: *P < 0,05 - порівняно з контролем; #P < 0,05 - порівняно з групою ЛПС.

5.2. Дослідження впливу гліциризинату амонію як інгібітора HMGB1 на життєздатність та шляхи загибелі імунокомпетентних клітин

Оскільки розвиток імунного запалення тісно пов'язаний із клітинною загибеллю, у цьому розділі було проаналізовано зміни життєздатності клітин лімфатичних вузлів при застосуванні ГА за умов ендотоксемії. Для дослідження були використані дози препарату (10, 50, 100 та 200 мг/кг). Введення ЛПС супроводжувалося різким зниженням відсотка живих лімфоцитів ($p < 0,001$), підвищенням відсотка клітин із ознаками апоптозу ($P < 0,05$) та вираженим зростанням некротичної загибелі ($p < 0,001$) (табл. 5.3).

Застосування ГА у найменшій із досліджених доз - 10 мг/кг не супроводжувалося статистично значущими змінами загибелі клітин лімфатичних вузлів порівняно з групою ЛПС. Однак, введення препарату у дозах 50, 100 та 200 мг/кг достовірно підвищувало відсоток живих клітин за рахунок зменшення некротичної та апоптотичної загибелі (табл.5.3). Найбільш виражений ефект спостерігався при застосуванні 100 мг/кг.

Таблиця 5.3.

Вплив ГА на життєздатність та загибель клітин лімфатичних вузлів за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії

Вплив	Живі	Апоптоз	Некроз
Контроль	86,81±2,3	9,13±2,3	4,06±0,8
ЛПС	49,78±2,7***	19,89±3,0*	30,11±3,0***
ЛПС+ ГА 10 мг/кг	52,83±1,1*	19,65±2,6*	28,33±2,0**
ЛПС+ ГА 50 мг/кг	64,79±1,3***##	15,03±0,6	20,19±1,6***##
ЛПС+ ГА 100 мг/кг	67,71±1,9***###	12,29±0,8#	18,86±0,9***##
ЛПС+ ГА 200 мг/кг	63,60±2,9***##	13,60±1,0	22,80±2,3***

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем;
$p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ - порівняно з групою ЛПС.

РОЗДІЛ 6

ВИВЧЕННЯ NF-κB-ОПОСЕРЕДКОВАНИХ МЕХАНІЗМІВ УШКОДЖЕННЯ ПЕЧІНКИ Т-КЛІТИННОГО ГЕНЕЗУ В МОДЕЛІ КОНА-ІНДУКОВАНОГО ГЕПАТИТУ

NF-κB є одним із ключових транскрипційних факторів, що регулюють прозапальну відповідь при Т-клітинно-опосередкованому ушкодженні печінки. Зважаючи на його центральну роль у розвитку цитокін-опосередкованих механізмів та ушкодження печінки, наступним етапом дослідження стало визначення рівня активації NF-κB у моделі КонА-індукованого гепатиту, а також оцінка впливу його інгібування на перебіг імуніопосередкованого ушкодження.

6.1. Оцінка активації NF-κB у клітинах печінки та імунікомпетентних органів при КонА-індукованому гепатиті за даними імуноблотингу та імуніцитохімічних досліджень

При активації NF-κB відбувається його транслокація з цитоплазми, де даний фактор присутній конститутивно в неактивному стані, в ядра клітин. Визначення рівня p65-субодиниці NF-κB в ядерних екстрактах дозволяє оцінити її перехід в ядра, тобто ступінь активації цього транскрипційного фактору. Для підтвердження активації NF-κB було застосовано два незалежні методи. Першим із них був імуноблотинг ядерних екстрактів печінки з використанням антитіл до p65-субодиниці NF-κB. Аналіз специфічного забарвлення нітроцелюлозних мембран показав, що після введення КонА відбувається поступове підвищення інтенсивності смуг, які відповідають білку з молекулярною масою 65 кДа. Посилення сигналу спостерігалось в динаміці

експерименту та досягало максимуму через 20 год після введення КонА (рис. 6.1 А).

Денситометричний аналіз підтвердив достовірне збільшення відносного вмісту p65 у ядерній фракції клітин печінки порівняно з контролем, причому найвищі значення показника реєстрували через 20 год після введення КонА (рис. 6.1 Б). Таким чином, встановлено посилення транслокації NF-κB з цитоплазми в ядра, що свідчить про активацію даного транскрипційного фактору в печінці при розвитку КонА-індукованого імуноопосередкованого ушкодження печінки.

Другий метод – імуноцитохімічний аналіз підтвердив значну активацію NF-κB в печінці за умов її імуноопосередкованого ушкодження Т-клітинного генезу. Для виявлення p65 субодиниці NF-κB застосовували імунопероксидазний метод. За таких умов локалізація в p65 в цитоплазмі вказує на те, що гетеродимер даного транскрипційного фактора знаходиться в неактивній формі. І навпаки, наявність p65 в ядрі означає, що відбулася активація і транслокація в ядро гетеродимеру NF-κB, де він, відповідно, є здатним активувати транскрипцію NF-κB –залежних генів. Показано, що в клітинах паренхіми печінки відбувається транслокація NF-κB з цитоплазми в ядра: середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) інтенсивності забарвлення ядер гепатоцитів, викликаного фіксацією антитіл до p65-субодиниці NF-κB, підвищувався з $0,06 \pm 0,02$ в контролі до $0,42 \pm 0,09$ через 20 годин після введення КонА ($p < 0,001$). Значна активація NF-κB в цей строк розвитку імунного ураження печінки була характерною також для клітин імунної системи. У тимусі СЦК p65 у ядрах імуноцитів зростав з $0,09 \pm 0,02$ у контролі до $0,35 \pm 0,05$ після введення КонА ($p < 0,001$). У лімфатичних вузлах відповідний показник підвищувався з $0,08 \pm 0,01$ до $0,23 \pm 0,03$ ($p < 0,01$) (рис. 6.2).

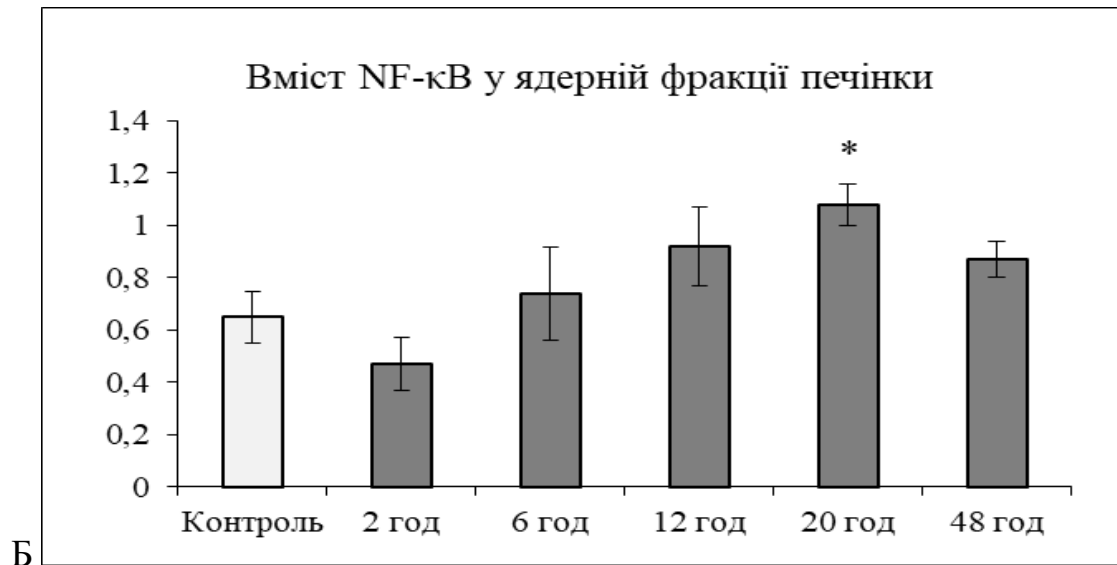
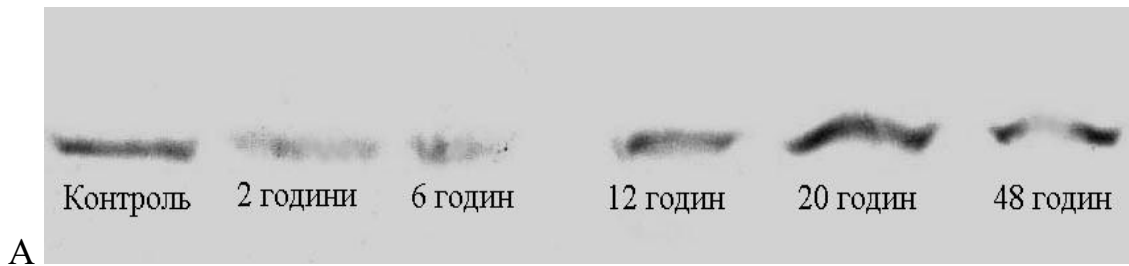


Рисунок 6.1. Вміст NF-κB (p65) у ядерних екстрактах печінки через 2, 6, 12, 20 і 48 год після введення КонА (імуноблотинг).

А) Репрезентативне зображення імуноблоту ядерних екстрактів печінки (Контроль, КонА). Смуги відповідають білку з молекулярною масою 65 кДа.

Б) Відносний вміст p65 у ядерній фракції печінки за даними денситометричного аналізу. По осі ординат - дані денситометрії в умовних одиницях (у.о.), виражені як відношення інтенсивності смуги p65 до позитивного контролю.

Примітка: * $p < 0,05$ - порівняно з контролем.

Виявлене підвищення рівня ядерної локалізації р65-субодиниці NF-κB у клітинах печінки та імунокомпетентних органів узгоджується з результатами імуноблотингу ядерних екстрактів. При цьому максимальні значення показників реєстрували у ті ж часові терміни, що свідчить про узгодженість та відтворюваність результатів, отриманих різними методами. Це підтверджує системний характер активації NF-κB при КонА-індукованому імуноопосередкованому ушкодженні. Таким чином, за результатами імуноблотингу та імуноцитохімічних досліджень встановлено, що введення КонА призводить до транслокації NF-κB з цитоплазми до ядер клітин печінки, зокрема гепатоцитів, а також до ядер клітин центральних і периферійних органів імунітету. Це свідчить про виражену активацію NF-κB за умов імуноопосередкованого процесу, індукованого КонА.

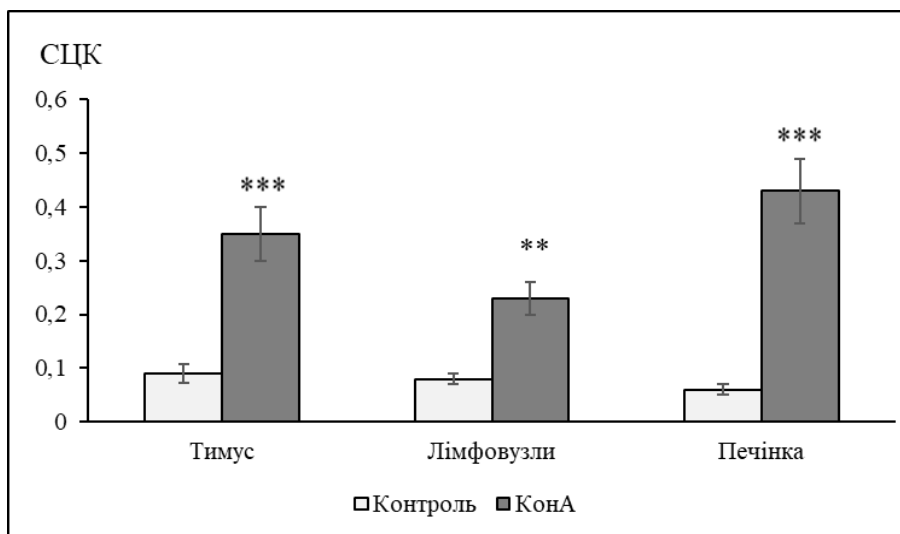


Рисунок 6.2. Зміни вмісту NF-κB у ядрах клітин тимуса, лімфатичних вузлів, печінки через 20 год після введення КонА (за даними імуноцитохімії з використанням антитіл до р65-субодиниці NF-κB). По осі ординат - СЦК інтенсивності забарвлення ядер клітин.

Примітка: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ порівняно з контролем.

6.2. Дослідження NF-κB-опосередкованих механізмів участі ПАРП-1 в патогенезі КонА-індукованого гепатиту

В клітинах печінки та імунокомпетентних органів за допомогою імуноцитохімічного методу (з використанням антитіл до p65-субодиниці даного транскрипційного фактору) на моделі імуноопосередкованого гепатиту визначали відносну кількість клітин з ядерною локалізацією p65-субодиниці NF-κB, що дозволяло оцінити її транслокацію в ядра, а, отже і ступінь активації NF-κB, при застосуванні специфічного інгібітора ПАРП-1 4-ГК.

Було досліджено участь ПАРП-1 в активації NF-κB при імунозапальних процесах в печінці методом імуноблотингу ядерних екстрактів печінки, з використанням анти-p65 антитіл. Показано, що КонА спричиняє значні кількісні зміни вмісту p65-субодиниці NF-κB в ядрах клітин печінки, а застосування 4-ГК призводить до зниження транслокації білка (рис. 6.3 А, Б).

Введення КонА через 20 год спричиняло активацію NF-κB у паренхімних клітинах печінки, що проявлялося транслокацією p65-субодиниці з цитоплазми у ядро гепатоцитів та зростанням СЦК інтенсивності ядерного забарвлення антитілами до p65. За умов інгібування ПАРП-1 відбувалося суттєве зменшення транслокації p65 в ядра гепатоцитів, однак рівень активації NF-κB був більшим, ніж показники у контрольних тварин.

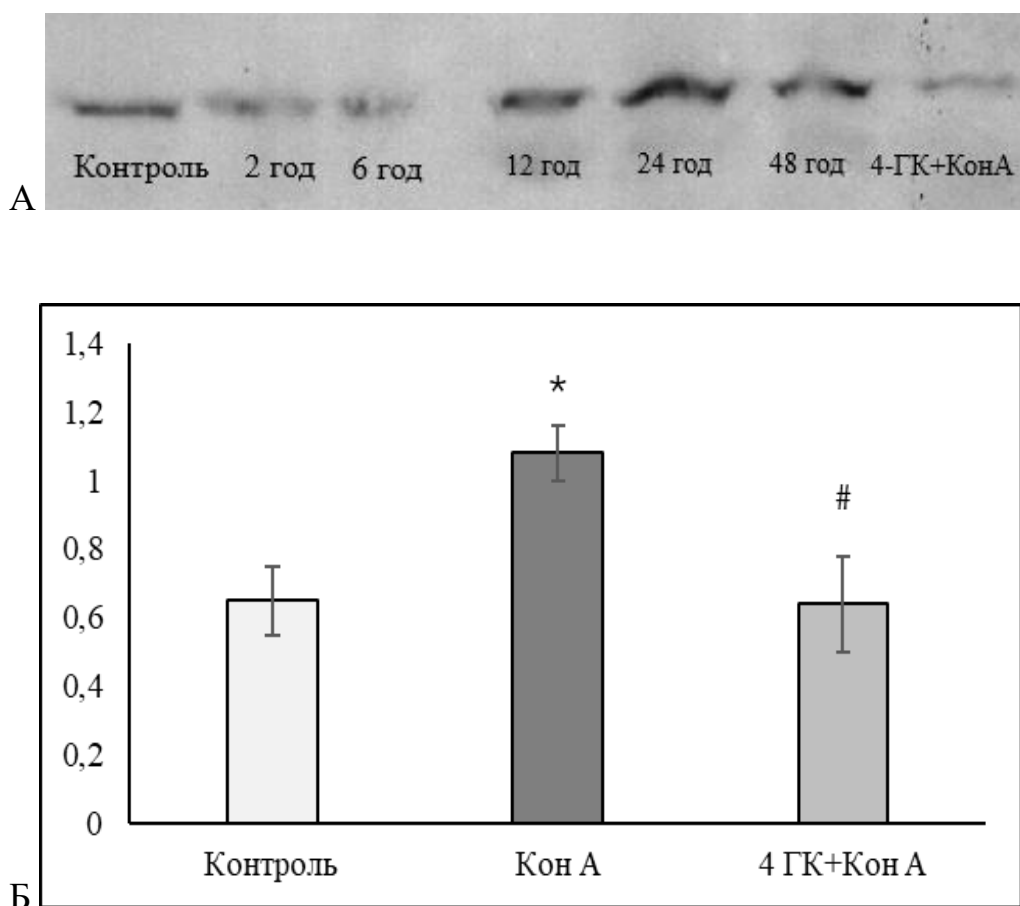


Рисунок 6.3. Вміст NF-κB (p65) у ядерних екстрактах печінки мишей через 20 год після введення КонА та за умов інгібування ПАРП-1 (4-ГК) (імуноблотинг).

А) Репрезентативне зображення імуноблоту ядерних екстрактів печінки (Контроль, КонА, 4-ГК+КонА). Смути відповідають білку з молекулярною масою 65 кДа.

Б) Відносний вміст p65 у ядерній фракції печінки за даними денситометричного аналізу. По осі ординат - дані денситометрії в умовних одиницях (у.о.), виражені як відношення інтенсивності смуги p65 до позитивного контролю.

Примітка: * $p < 0,05$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$ - порівняно з групою КонА.

Виражена активація NF-κB була характерною також для клітин імунної системи. Значне зростання СЦК субодиниці p65 відзначалося як в імунocyтах, виділених з первинного органу імунітету тимусу, так і в периферійних імуноткомпетентних клітинах. Застосування інгібітора ПАРП-1 4-ГК за цих експериментальних умов призводило до послаблення активації NF-κB у тимоцитах та лімфоцитах пахових лімфатичних вузлів (рис. 6.4). При цьому в клітинах тимуса спостерігалася нормалізація СЦК інтенсивності забарвлення ядер анти-p65 антитілами до рівня контрольних значень.

Отримані результати узгоджуються з сучасними уявленнями про функціональний зв'язок між активністю ПАРП-1 та сигнальним шляхом NF-κB. Відомо, що ПАРП-1 може виступати коактиватором NF-κB, сприяючи транскрипції прозапальних генів та підтриманню імунотзапальної відповіді. Тому пригнічення активності ПАРП-1 здатне обмежувати ядерну транслокацію p65-субодиниці NF-κB і зменшувати інтенсивність запальних процесів у тканині печінки.

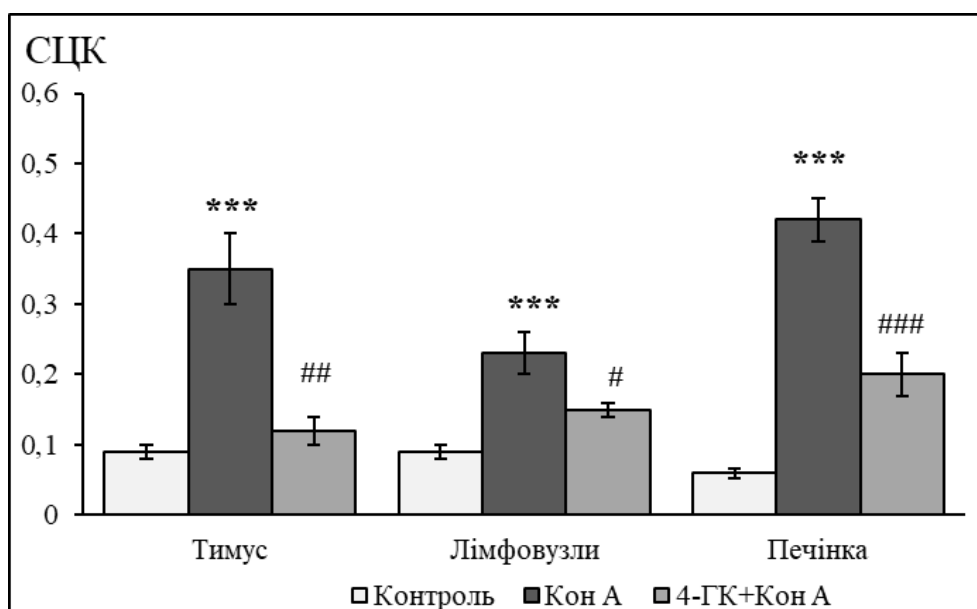


Рисунок 6.4. Вплив 4-ГК на вміст NF-κB (p65) у ядрах клітин тимуса, лімфатичних вузлів та печінки через 20 год після введення КонА (за даними імуноцитохімії з використанням антитіл до p65-субодиниці NF-κB). По осі ординат - СЦК інтенсивності забарвлення ядер клітин.

Примітка: *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем, # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ - порівняно з групою КонА.

Таким чином, за імуноцитохімічними даними, введення КонА призводить до вираженої активації NF-κB. Інгібування ПАРП-1 за умов КонА-індукованого імуноопосередкованого процесу супроводжується зменшенням ядерної локалізації p65 в клітинах печінки та імунокомпетентних органів. Отже, інгібітор ПАРП-1 4-ГК виявився ефективним засобом послаблення активації NF-κB при КонА-індукованому гепатиті. Наведені дані свідчать, що в наших експериментальних умовах моделі КонА-індукованого імуноопосередкованого гепатиту одним із механізмів впливу ядерного ферменту ПАРП-1 на імунозапальні процеси в печінці є активація транскрипційного фактора NF-κB.

6.3. Вплив куркуміну на життєздатність та шляхи загибелі імунікомпетентних клітин за умов КонА-індукованого гепатиту

Оскільки в попередніх експериментах нами було встановлено активацію NF-κB при розвитку КонА-індукованого імуніопосередкованого ушкодження печінки, наступним етапом роботи стало дослідження впливу його прямого інгібування на життєздатність та шляхи загибелі імунікомпетентних клітин. Для цього був використаний куркумін - блокатор NF-κB, який чинить багатоспрямований протизапальний вплив, зокрема через модулювання активності NF-κB та інших сигнальних шляхів, з метою оцінки його протективної дії при імуніопосередкованих ураженнях печінки.

Дослідження шляхів загибелі ІКК показало, що введення інгібітора активації NF-κB куркуміну само по собі не викликало значної загибелі клітин, виділених з тимуса та лімфатичних вузлів (табл. 6.1). Відсоток живих, некротичних і апоптотичних клітин суттєво не відрізнявся від контрольних величин, хоча можна відмітити деяке зменшення клітинної загибелі в усіх досліджуваних органах.

Таблиця 6.1.

Вплив куркуміну на кількість живих, некротичних і апоптотичних клітин імунікомпетентних органів (% від загальної кількості клітин).

		Живі клітини	Некроз	Апоптоз
Контроль	Тимус	92,8±0,8	3,1±1,0	4,3±0,8
Куркумін		93,5±1,1	1,9±0,5	2,5±0,8
Контроль	Лімфатичні вузли	89,8±1,0	5,9±0,8	3,4±0,7
Куркумін		91,7±0,7	5,8±0,7	2,5±0,8

Введення КонА призводило до вірогідного зменшення кількості живих ІКК і посилення некротичної та апоптотичної їх загибелі в усіх досліджуваних органах (табл. 6.2). Застосування куркуміну при КонА-індукованому гепатиті призводило до значного зменшення загибелі клітин тимуса і лімфатичних вузлів, викликаного КонА, про що свідчить зростання відсотка живих клітин. Протективний ефект куркуміну за умов КонА-індукованого гепатиту проявлявся переважно у зменшенні некротичної загибелі клітин, тоді як рівень апоптозу достовірно не змінювався. Отримані дані свідчать про залучення NF-κB до механізмів посилення клітинної загибелі, зокрема некротичної, при КонА-індукованому ушкодженні.

Таблиця 6.2.

Вплив куркуміну на кількість живих, некротичних і апоптотичних клітин імунокомпетентних органів (% від загальної кількості клітин) за умов КонА індукованого гепатиту.

		Живі клітини	Некроз	Апоптоз
Контроль	Тимус	90,5±0,7	3,8±0,7	5,9±0,8
КонА		69,8±3,4***	6,3±0,7*	23,9±3,2***
КонА+куркумін		76,3±4,4***	2,4±0,8 ^{##}	21,2±4,4***
Контроль	Лімфатичні вузли	87,2±1,8	5,0±0,6	7,8±1,3
КонА		71,6±1,1***	9,7±0,5***	18,8±1,4***
КонА+куркумін		74,6±1,3***	7,3±0,7*, #	18,1±0,9***

Примітка: *p < 0,05; ***p < 0,001 - порівняно з контролем, #p < 0,05; ##p < 0,01 - порівняно з групою КонА.

6.4. Активація NF-κB у печінці мишей за умов КонА-індукованого гепатиту при застосуванні андрографоліду

У цій частині роботи ми застосували ще один блокатор NF-κB - андрографолід (АНД), який є фармакологічним інгібітором активації NF-κB. Андрографолід є біологічно активною сполукою рослинного походження, для якої показана здатність пригнічувати NF-κB-залежні сигнальні шляхи та зменшувати вираженість запальної відповіді. З огляду на встановлену нами активацію NF-κB при КонА-індукованому імуноопосередкованому ушкодженні печінки, було доцільним дослідити вплив АНД на рівень ядерної транслокації p65-субодиниці NF-κB у тканині печінки.

Проведеними дослідженнями з використанням методу імуноблотингу було показано транслокацію NF-κB в ядра клітин печінки, що свідчить про активацію даного транскрипційного фактора. Застосування АНД за умов дії КонА призводило до зменшення кількості p65-субодиниці NF-κB в ядрах ($p < 0,05$) за даними денситометричного аналізу імуноблотів, тобто останній виявився ефективним інгібітором активації NF-κB при даній патології (рис.6.5) (Макогон та ін., 2012).

Отримані дані свідчать, що АНД знижує ядерну транслокацію p65-субодиниці NF-κB, тим самим пригнічуючи його активацію в тканині печінки при КонА-індукованому імуноопосередкованому ушкодженні, зумовленому надмірною активацією Т-клітинної ланки імунної системи.

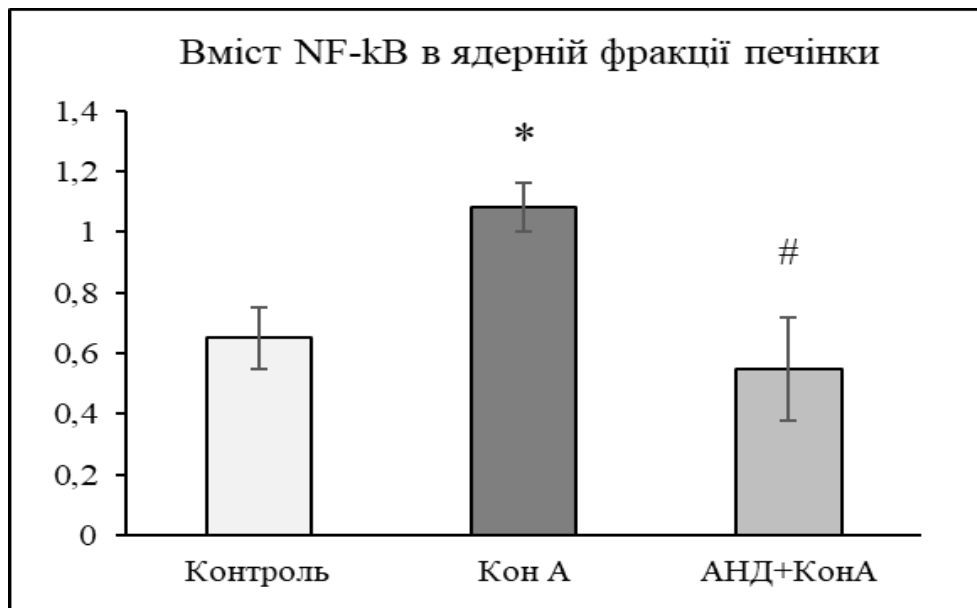


Рисунок 6.5. Вплив андрографоліду на активацію NF-κB у печінці мишей за умов КонА-індукованого гепатиту.

Визначення вмісту p65-субодиниці NF-κB в ядерних екстрактах печінки за допомогою імуноблотингу. Відносна кількість p65 в ядерних екстрактах печінки при застосуванні АНД за умов КонА-індукованого гепатиту.

За віссю ординат - дані денситометричного аналізу в умовних одиницях (у.о.), виражені як відношення інтенсивності смуги p65 до позитивного контролю.

Примітка: * $p < 0,001$ - порівняно з контролем, # $p < 0,05$ - порівняно з групою КонА.

6.5. Життєздатність та шляхи загибелі імунокомпетентних клітин за умов дії андрографоліду в моделі КонА-індукованого імунного гепатиту

Застосування АНД у моделі КонА-індукованого імуноопосередкованого ушкодження печінки за результатами імуноблотингу дозволило встановити, що АНД знижує ядерну транслокацію р65-субодиниці NF-κB. Раніше нами було показано, що введення мишам іншого інгібітора NF-κB– куркуміну, супроводжувалося зменшенням некротичної загибелі імунокомпетентних клітин. У зв'язку з цим було вирішено перевірити, чи матиме андрографолід подібний протективний ефект, зокрема щодо впливу на життєздатність клітин та співвідношення апоптотичного і некротичного шляхів їх загибелі. За результатами аналізу шляхів клітинної загибелі у клітинах тимуса через 20 год після введення КонА встановлено суттєві зміни некротичного та апоптотичного шляхів загибелі (рис. 6.6).

За таких експериментальних умов визначення кількості живих, некротичних та апоптотичних клітин тимуса показало, що введення КонА супроводжувалося вираженим зменшенням відсотка життєздатних тимоцитів. У контролі відсоток живих клітин становив $91 \pm 1,5 \%$, тоді як через 20 год після введення КонА знижувався до $75 \pm 12 \%$ ($p < 0,05$). Застосування АНД на тлі КонА-індукованого ушкодження призводило до відновлення цього показника до $92 \pm 0,58 \%$ ($p < 0,05$ порівняно з групою КонА), що відповідало рівню контрольних значень. При цьому КонА призводив до достовірного підвищення обох показників клітинної загибелі: так, рівень некрозу зростав з $3,8 \pm 0,59 \%$ до $12,0 \pm 2,0 \%$, а апоптозу - з $5,8 \pm 1,0 \%$ до $13,0 \pm 1,8 \%$ ($p < 0,05$ порівняно з контролем), що свідчить про активацію обох основних механізмів клітинної смерті прозапального некротичного та програмованого апоптотичного.

Введення АНД послаблювало клітинну загибель, спричинену КонА, сприяючи виживанню тимоцитів за рахунок зменшення як некрозу, так і апоптозу. Так, відсоток некротичних клітин знижувався до $5,0 \pm 0,68 \%$ (порівняно з $12,0 \pm 2,0 \%$ у групі КонА; $p < 0,05$), а апоптотичних до $2,36 \pm 0,5 \%$ (порівняно з $13,0 \pm 1,8 \%$ у групі КонА; $p < 0,05$). Слід зазначити, що дія застосованого інгібітора NF- κ B на апоптотичну загибель клітин тимуса була більш вираженою (Макогон та ін., 2012).

Отримані результати свідчать, що фармакологічне інгібування NF- κ B андрографолідом за умов КонА-індукованого імуноопосередкованого ушкодження супроводжується достовірним зменшенням як некротичної, так і апоптотичної загибелі тимоцитів, із найбільш вираженим впливом на апоптотичний шлях, водночас суттєво пригнічуючи і прозапальний некротичний шлях клітинної загибелі. Відомо, що природні інгібітори NF- κ B, такі, як куркумін і андрографолід, можуть пригнічувати транслокацію цього транскрипційного фактора до ядра клітини, реалізуючи це через різні молекулярні механізми. Із аналізу наших даних, отриманих при застосуванні двох різних за механізмами дії інгібіторів активації NF- κ B, випливає, що в посиленні як апоптотичної, так і некротичної загибелі ІКК за умов розвитку гострого КонА-індукованого запального процесу в печінці задіяні NF- κ B-опосередковані механізми.

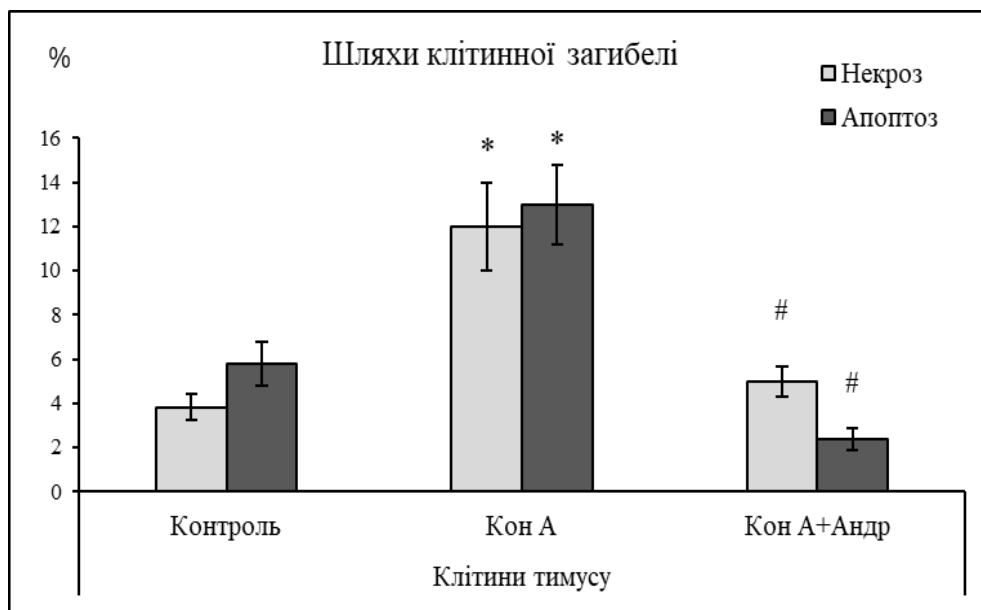


Рисунок 6.6. Вплив андрографоліду на кількість некротичних і апоптотичних клітин тимусу (% від загальної кількості клітин) за умов КонА-індукованого гепатиту.

Примітка: * $p < 0,05$ - порівняно з контролем, # $p < 0,05$ - порівняно з групою КонА.

Отже, наші дослідження показали, що за умов КонА-індукованого імуноопосередкованого ушкодження печінки методом імуноблотингу виявлено посилення транслокації NF-κB з цитоплазми до ядер клітин, що свідчить про активацію цього фактора в тканині печінки. Підвищення ядерного вмісту p65-субодиниці NF-κB відображає залучення даного сигнального шляху до реалізації імунозапального процесу при Т-клітинно-опосередкованому ушкодженні печінки.

Введення інгібітора ПАРП-1 4-ГК, а також інгібітора NF-κB – андрографоліду супроводжувалося зменшенням транслокації NF-κB до ядер, що вказує на ефективне пригнічення його активації за даних експериментальних умов. Зокрема, встановлено, що 4-ГК достовірно знижував ядерний вміст p65 у клітинах печінки, тимуса та лімфатичних вузлів через 20 год після введення КонА, що свідчить про системний характер впливу інгібування ПАРП-1 на NF-κB-опосередковані механізми імунного запалення.

Важливо зазначити, що як інгібування активації NF-κB, так і інгібування ПАРП-1 сприяли підвищенню виживання клітин, що продемонстровано на клітинах тимуса та лімфатичних вузлів. При цьому характер впливу на шляхи клітинної загибелі відрізнявся. При цьому АНД зменшував як некротичну, так і апоптотичну загибель клітин, тоді як 4-ГК достовірно знижував переважно некротичний шлях клітинної загибелі, який характеризується вираженими прозапальними ефектами та потенційною здатністю підтримувати подальшу імунну активацію. Отримані результати свідчать про участь ПАРП-1 у розвитку імунного ушкодження печінки, зокрема через посилення некротичної загибелі клітин та підтримання запального процесу.

Нами показано, що NF-κB і ПАРП-1 відіграють суттєву роль у розвитку імунного запалення печінки в моделі КонА-індукованого гепатиту. Одним із механізмів участі цих ядерних факторів у патогенезі імунного гепатиту є посилення клітинної загибелі, насамперед некротичної, яка має виражений

прозапальний характер. Інгібування NF-κB та ПАРП-1 чинить виражену протизапальну й антинекротичну дію за умов експериментального імунного гепатиту Т-клітинного генезу, що дозволяє розглядати їх як ключові регуляторні механізми, модулювання яких може бути ефективним підходом до фармакологічної корекції імуноопосередкованих ушкоджень печінки.

Підсумовуючи викладене, отримані результати підтверджують ключову роль NF-κB та ПАРП-1 у патогенезі імуноопосередкованого ушкодження печінки та порушенні життєздатності імунокомпетентних клітин. Водночас встановлені зміни ядерної транслокації NF-κB і зміни клітинної загибелі, які вказують на тісний зв'язок цих процесів із розвитком оксидативного стресу та порушенням окисно-відновного балансу, оскільки активація NF-κB є чутливою до рівня активних форм кисню та стану антиоксидантної системи клітини. Це зумовлює доцільність подальшого дослідження можливостей фармакологічної корекції імуноопосередкованих ушкоджень шляхом застосування сполук з антиоксидантними та імуномодуючими властивостями, здатних впливати як на окисно-відновні процеси, так і на механізми регуляції запальної відповіді.

У зв'язку з цим наступний розділ присвячено аналізу впливу антиоксидантних речовин та наноструктурованих сполук на функціональний стан імунокомпетентних та репродуктивних клітин за умов моделювання імуноопосередкованого ушкодження.

РОЗДІЛ 7

ВПЛИВ ІМУНОМОДУЛЯТОРІВ - АНТИОКСИДАНТНИХ РЕЧОВИН ТА НАНОСТРУКТУРОВАНИХ СПОЛУК МЕТАЛІВ НА ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ІМУНОКОМПЕТЕНТНИХ КЛІТИН ТА ОВАРІАЛЬНИХ КЛІТИН ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ІМУНООПОСЕРЕДКОВАНОГО УШКОДЖЕННЯ

У результаті проведених досліджень встановлено, що імуноопосередковане ушкодження клітин супроводжується активацією ПАРП-1 та NF-κB- ключових регуляторів клітинної відповіді на ушкодження. Надмірна активація цих молекулярних механізмів призводить до посилення фрагментації ДНК та підвищення загибелі клітин як імунної, так і репродуктивної систем. Підвищення рівня ТБК-реактивних продуктів (зокрема МДА) у поєднанні з активацією нейтрофілів свідчить про суттєву роль оксидативного стресу у механізмах імуноопосередкованого ушкодження.

З огляду на провідну роль оксидативного стресу у формуванні ушкоджень ДНК, перспективним є подальший пошук сполук, здатних м'яко модулювати зазначені процеси без порушення фізіологічних механізмів клітинної відповіді. Особливий інтерес становлять антиоксиданти, зокрема кверцетин та етилметилгідроксипіридину сукцинат, які поєднують антиоксидантні та протизапальні властивості й можуть впливати на рівень АФК та інтенсивність пероксидного окиснення ліпідів.

Крім того, перспективним напрямом є дослідження наноструктурованих сполук металів, зокрема наночастинок срібла (AgNP) та цитрату германію, які можуть модулювати сигнальні шляхи, пов'язані з АФК та NF-κB, а також впливати на процеси клітинної загибелі.

Таким чином, на даному етапі доцільним є дослідження впливу зазначених антиоксидантів і наноматеріалів на механізми функціонування імунокомпетентних та оваріальних клітин при активації імунної відповіді.

7.1. Вплив кверцетину на інтегральну цілісність геному, життєздатність та шляхи клітинної загибелі імунокомпетентних клітин за умов ЛПС-індукованого ушкодження

У межах розробленої експериментальної моделі ЛПС-індукованого процесу оцінено вплив кверцетину на стан інтегральної цілісності геному, життєздатність та шляхи клітинної загибелі клітин тимуса і лімфатичних вузлів. Введення ЛПС тваринам спричиняло виражене зростання генотоксичного стресу в клітинах тимуса та лімфатичних вузлів, що проявлялося збільшенням відсотка клітин із помірними та тяжкими ушкодженнями ДНК та зменшенням відсотка клітин 0–1 класу. У тимусі відсоток клітин 0-1 класу знижувався з $94,0 \pm 3\%$ у контролі до $53,2 \pm 3\%$ при дії ЛПС. Водночас кількість клітин 2 класу зростала до $20 \pm 1\%$, а 3 класу - до $21 \pm 2\%$. Аналогічні зміни відзначалися і в клітинах лімфатичних вузлів, де відсоток клітин 0-1 класу зменшувався з $83 \pm 2\%$ у контролі до $50 \pm 4\%$ при дії ЛПС, тоді як кількість клітин 2 та 3 класів зростала до $24 \pm 2\%$ і $19 \pm 2\%$ відповідно (рис. 7.1) (Грушка та ін., 2026).

Профілактичне введення кверцетину за умов дії ЛПС зменшувало відсоток клітин із помірними (2 клас) та вираженими (3 класи) ушкодженнями ДНК і збільшувало відсоток інтактних клітин та клітин з мінімальними ушкодженнями (0/1 клас) як у тимусі, так і в лімфатичних вузлах, що свідчить про його виражений захисний ефект. Зокрема, у тимоцитах відсоток інтактних клітин (0-1 клас) зростав з $53,2 \pm 3\%$ при дії ЛПС до $90 \pm 3\%$ (наближаючись до контрольного рівня - $94,0 \pm 3\%$). У лімфатичних вузлах також

спостерігалось зростання відсотка інтактних клітин з $50 \pm 4 \%$ до $85 \pm 3 \%$ (контроль - $83 \pm 2 \%$). Водночас достовірно знижувався відсоток ІКК 2-го класу та 3-го класу (рис. 7.1). У групі контролю з кверцетином показники суттєво не відрізнялися від інтактного контролю. Отже, профілактичне застосування кверцетину на тлі дії ліпополісахариду сприяє зменшенню рівня одноланцюгових розривів ДНК в імунокомпетентних клітинах і підтриманню їх структурної цілісності.

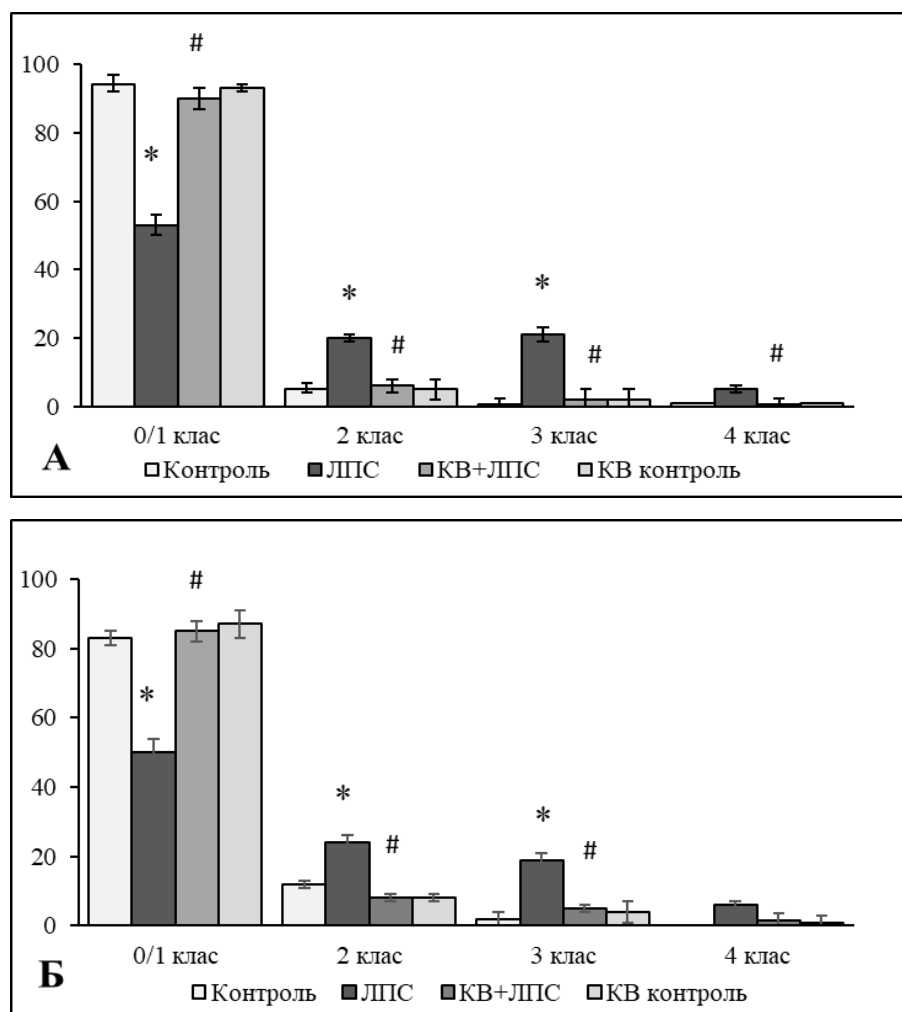


Рисунок 7.1. Вплив профілактичного введення кверцетину на ступінь ушкодження ДНК клітин тимуса (А) та лімфатичних вузлів (Б) за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії.

Примітка: * $p < 0,05$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$ - порівняно з групою ЛПС.

З метою комплексної оцінки цитопротективного ефекту кверцетину додатково досліджено показники життєздатності та шляхів клітинної загибелі. Введення ЛПС призводило до достовірного зменшення життєздатності тимоцитів: відсоток живих клітин знижувався з $90,69 \pm 2,16$ % у контролі до $45,05 \pm 7,27$ % ($p < 0,01$). Це було зумовлено зростанням як апоптотичної ($20,82 \pm 8,45$ % проти $4,00 \pm 1,81$ % у контролі), так і некротичної загибелі клітин ($25,23 \pm 7,23$ % проти $5,10 \pm 0,93$ %, $p < 0,05$). Аналогічна тенденція спостерігалася і в клітинах лімфатичних вузлів. При дії ЛПС відсоток живих клітин лімфатичних вузлів знижувався з $75,12 \pm 5,01$ % у контролі до $46,67 \pm 4,52$ % ($p < 0,01$). При цьому відбувалося як зростання апоптозу ($20,02 \pm 2,04$ % проти $9,87 \pm 1,89$ %; $p < 0,01$), так і некрозу ($32,11 \pm 4,51$ % проти $14,88 \pm 5,63$ %, $p < 0,01$) (Рис.7.2).

Профілактичне введення кверцетину зменшувало клітинну загибель у ІКК. Зокрема у клітинах тимусу введення кверцетину сприяло збільшенню кількості живих тимоцитів до $79,60 \pm 3,59$ %, що статистично не відрізнялося від контролю, а також зменшувало рівень некрозу до $9,40 \pm 0,93$ % ($p < 0,01$ порівняно з ЛПС). Зниження апоптозу мало тенденцію до нормалізації, однак достовірних змін не було виявлено (рис. 7.2 А). У клітинах лімфатичних вузлів кверцетин підвищував відсоток живих клітин ($p < 0,05$) та достовірно знижував апоптоз з $20,02 \pm 2,04$ % до $10,14 \pm 1,65$ % ($p < 0,05$), тоді як зменшення некрозу було менш вираженим — з $32,11 \pm 4,51$ % до $21,29 \pm 3,00$ % (рис. 7.2 Б) (Грушка та ін., 2026).

Профілактичне введення кверцетину достовірно знижувало клітинну загибель у тимусі та лімфатичних вузлах за умов дії ЛПС, причому характер цитопротективного ефекту залежав від органа імунної системи: у тимусі переважно зменшувалися прояви некрозу, тоді як у лімфатичних вузлах більш вираженим було зниження апоптозу.

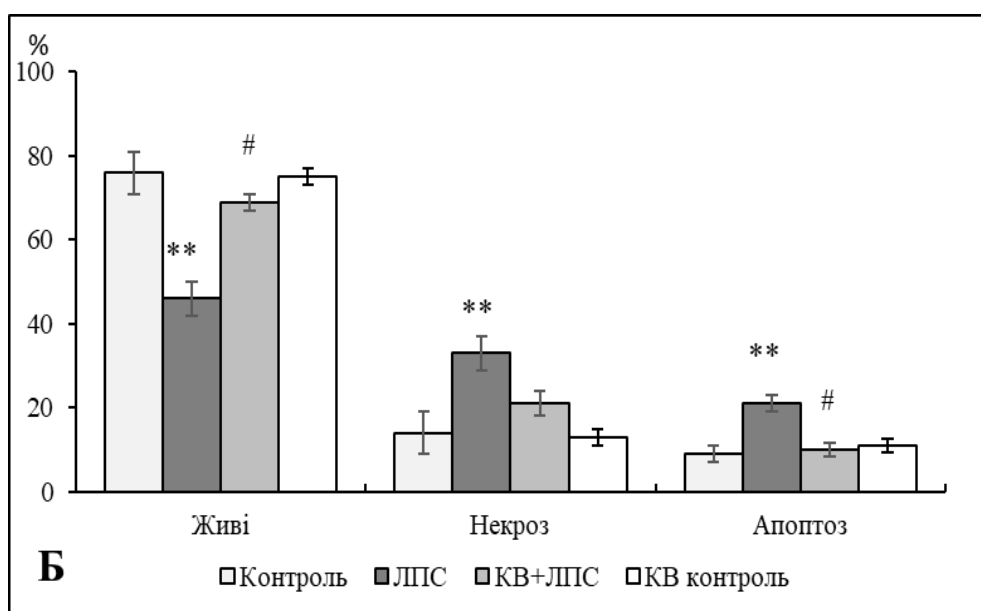
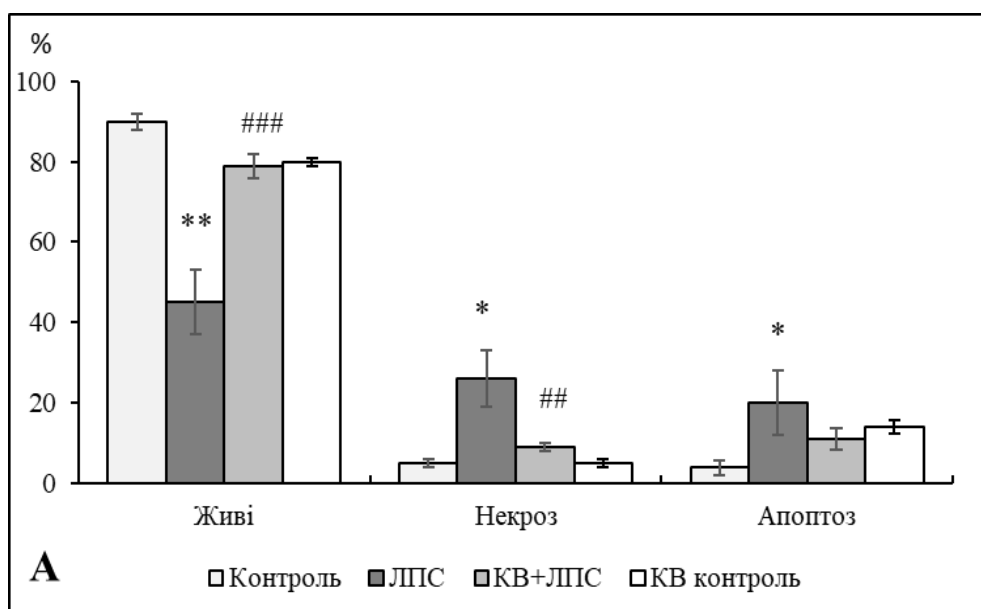


Рисунок 7.2. Вплив профілактичного введення кверцетину за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії на життєздатність та шляхи загибелі клітин тимуса (А) та лімфатичних вузлів (Б).

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ - порівняно з групою ЛПС.

7.2. Протективний вплив етилметилгідроксипіридину сукцинату на інтегральну цілісність ДНК та функціональний стан клітин імунної й репродуктивної систем за умов імунокомплексного ушкодження

Оскільки нами було показано, що введення БСА індукує імунозапальну відповідь, що супроводжується активацією клітинної ланки адаптивного імунітету, підвищенням індексу активації нейтрофілів та посиленням функціонально-метаболічної активності клітин неспецифічної резистентності і зростанням рівня ТБК-реактивних продуктів, наступним етапом стало дослідження можливості фармакологічної корекції пов'язаних із цим генотоксичних та оксидативних ушкоджень.

Перспективним підходом є застосування антиоксидантних і цитопротективних засобів, здатних зменшувати інтенсивність зазначених процесів. Одним із таких препаратів є етилметилгідроксипіридину сукцинат (ГС), який характеризується антиоксидантними та мембраностабілізуючими властивостями. Раніше в нашому відділі було встановлено, що ГС чинить позитивний вплив на функціональний стан міометрія матки мишей за умов імунізації БСА (Литвиненко, 2014), що обґрунтовує доцільність його подальшого дослідження.

У зв'язку з цим на моделі експериментального імунокомплексного ушкодження, нами досліджено вплив ГС на інтегральну цілісність ДНК, життєздатність і шляхи загибелі клітин імунної та репродуктивної систем. Окрему увагу в досліді було приділено оцінці мейотичного дозрівання ооцитів та рівня експресії генів GREM1, HAS2 та COX2 у кумулюсних клітинах, які відіграють важливу роль у регуляції функціонального стану кумулюсних клітин та мейотичного дозрівання ооцитів.

7.2.1. Інтегральна цілісність геному, життєздатність та шляхи загибелі імунокомпетентних клітин при застосуванні ГС за умов імунокомплексного ушкодження

За умов дії БСА у клітинах тимуса відзначалося порушення цілісності ДНК. Це проявлялося суттєвим зменшенням відсотка клітин 0-1-го класу до $6,25 \pm 0,67 \%$ порівняно з $66,88 \pm 1,50 \%$ у контролі ($p < 0,01$) та зростанням відсотка клітин із більш вираженими ушкодженнями ДНК. Зокрема, відсоток клітин 2-го, 3-го і 4-го класів збільшувався відповідно до $20,38 \pm 0,53 \%$, $34,25 \pm 0,72 \%$ і $39,13 \pm 0,90 \%$ порівняно з $10,38 \pm 0,59 \%$, $12,38 \pm 0,57 \%$ і $10,33 \pm 0,42 \%$ у контрольній групі.

За цих умов введення ГС сприяло зменшенню відсотка клітин із тяжкими ушкодженнями ДНК (3 та 4 класи) та збільшенню відсотка клітин з інтактною ДНК або мінімальними ушкодженнями (0–1 клас). Зокрема, кількість клітин 3-го і 4-го класів зменшувалася до $17,65 \pm 1,19 \%$ і $15,20 \pm 1,92 \%$ ($p < 0,05$) відповідно, тоді як у групі БСА ці показники становили $34,25 \pm 0,72 \%$ і $39,13 \pm 0,90 \%$. Відсоток клітин 2-го класу істотно не відрізнявся від значень у групі БСА. Водночас відсоток клітин 0–1-го класу зростав до $45,69 \pm 1,05 \%$ порівняно з $6,25 \pm 0,67 \%$ ($p < 0,05$) у групі БСА. При введенні ГС інтактним тваринам ми не спостерігали суттєвих змін розподілу за класами ушкодження в клітинах тимуса - клітини 0–1-го, 3-го і 4-го класів залишалися у межах контрольних величин. Однак спостерігалось збільшення відсотка клітин 2-го класу до $17,63 \pm 1,52 \%$ при $10,33 \pm 0,59 \%$ у контролі ($p < 0,05$) (Рис. 7.3 А).

При ушкодженні БСА у клітинах лімфатичних вузлів також відзначалося порушення цілісності ДНК, що проявлялося збільшенням відсотка клітин із максимальним ступенем ушкодження (4-й клас) та одночасним зменшенням відсотка для яких характерна відсутність первинних

пошкоджень ДНК (0-1-го класу). Введення ГС при дії БСА сприяло зменшенню цих змін, зокрема зниженню відсотка клітин 4-го класу. При цьому зростає відсоток клітин 0-1-го класу, інтактних або з мінімальними ушкодженнями (рис. 7.3.Б) (Срібна та ін., 2016).

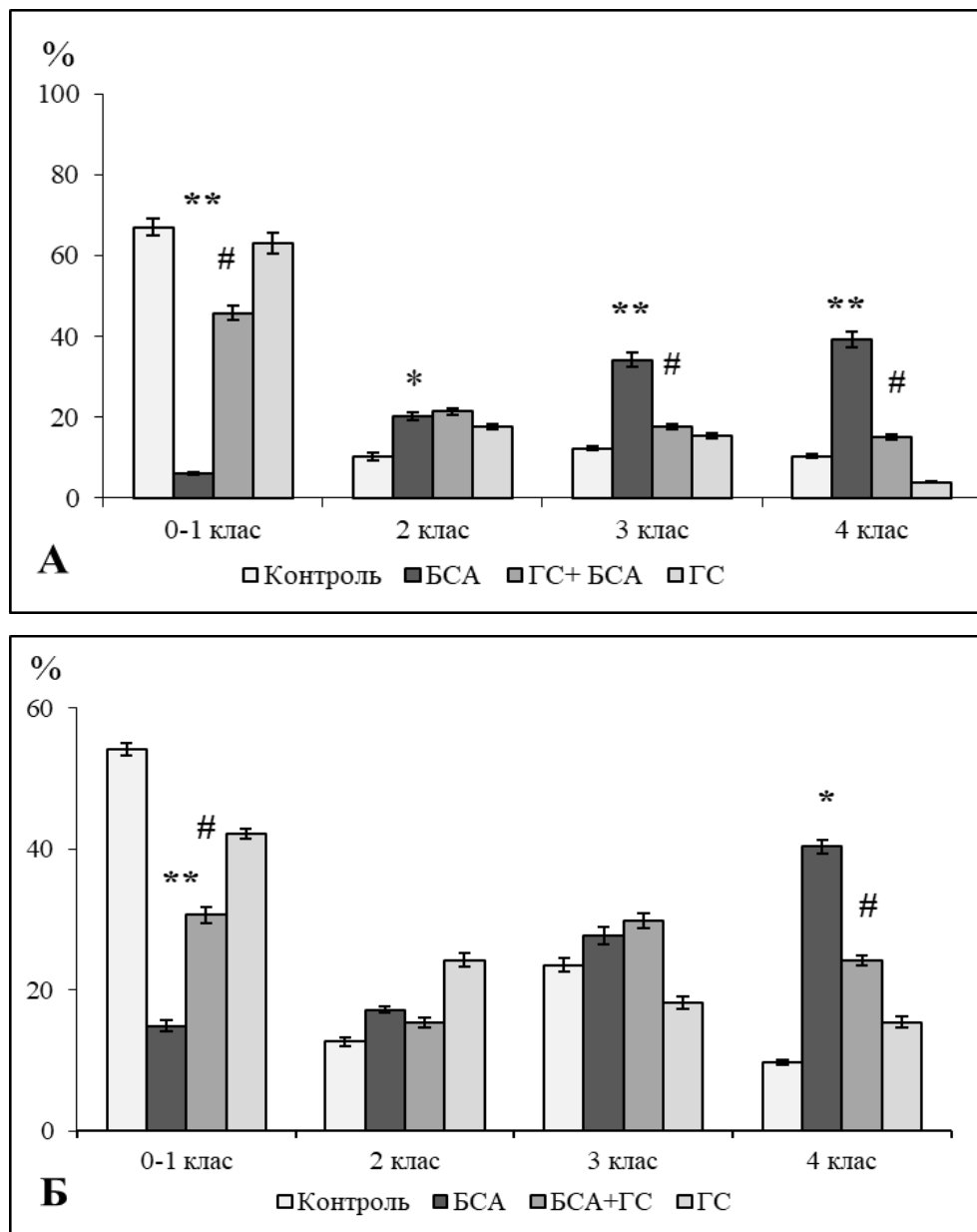


Рисунок 7.3. Вплив введення ГС на ступінь ушкодження ДНК клітин тимуса (А) та лімфатичних вузлів (Б) за умов експериментального імунокомплексного ушкодження.

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем, # $p < 0,05$ - порівняно з групою БСА.

7.2.2. Інтегральна цілісність геному кумулюсних клітин, їх життєздатність та шляхи загибелі при застосуванні ГС за умов імунокомплексного ушкодження

Згідно з даними методу ДНК-комет встановлено, що у кумулюсних клітинах фолікулів за умов імунокомплексного ушкодження спостерігалось виражене ушкодження ДНК. Середнє значення ІДК у контрольній групі становило $0,49 \pm 0,05$. За умов БСА-індукованого ушкодження показник зростав до $2,38 \pm 0,03$, що свідчить про різке посилення фрагментації ДНК у кумулюсних клітинах. Введення ГС імунізованим мишам супроводжувалося достовірним зниженням генотоксичного стресу, що проявлялося зменшенням ІДК у 1,75 раза до $1,36 \pm 0,04$, що вказує на часткове відновлення інтегральної цілісності геному порівняно з групою БСА. Крім цього, ушкодження кумулюсних клітин супроводжувалося збільшенням клітин із вираженими та тяжкими ушкодженнями ДНК (3-го та 4-го класів) та зменшенням відсотка клітин 0-1-го класу, для яких характерна відсутність первинних пошкоджень або мінімальні пошкодження ДНК.

За умов БСА-індукованого ушкодження введення ГС мишам значно знижувало генотоксичний стрес, сприяючи зменшенню відсотка кумулюсних клітин з високим рівнем ушкодження ДНК (3-го та 4-го класів), що становить, відповідно, $9,97 \pm 1,95 \%$ ($p < 0,05$) і $8,58 \pm 1,13 \%$ ($p < 0,05$) порівняно з даними у групі БСА - $25,17 \pm 1,83 \%$ і $32,00 \pm 2,61 \%$ (Рис 7.4). Водночас на тлі введення ГС зростала кількість клітин 0-1-го класу до $58,69 \pm 3,00 \%$ ($p < 0,05$) проти $28,67 \pm 2,66 \%$ у групі БСА.

При введенні ГС контрольним мишам достовірних змін у відсотку кумулюсних клітин 0–1-го, 3-го і 4-го класів ($75,40 \pm 1,52 \%$, $5,40 \pm 0,55 \%$ і $2,20 \pm 0,84 \%$ відповідно) не виявлено, однак відзначалося збільшення відсотка

клітин 2-го класу до $17,00 \pm 1,00$ % ($p < 0,05$) порівняно з $8,17 \pm 1,17$ % у контролі. (Срібна та ін., 2016).

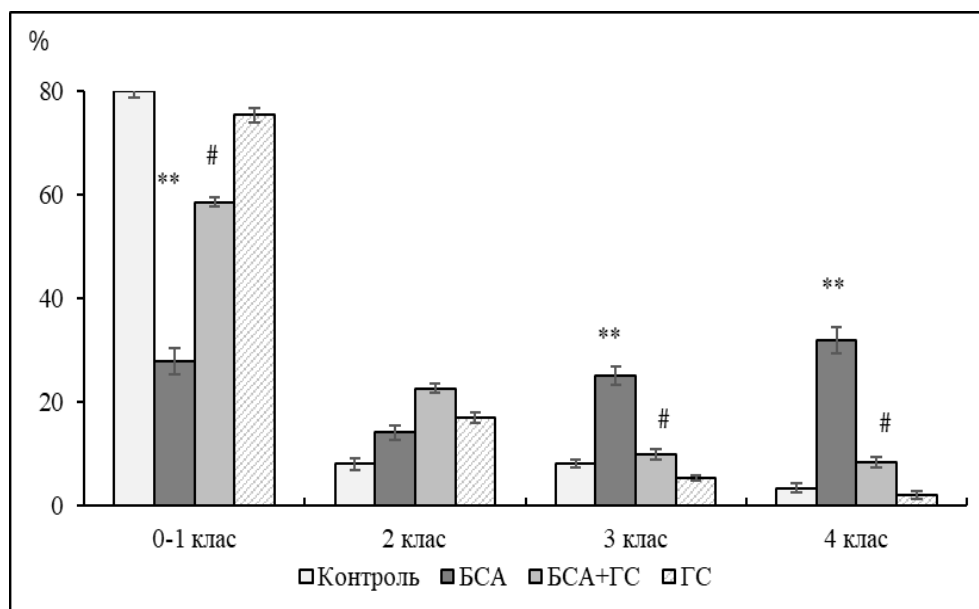


Рисунок 7.4. Вплив введення ГС на ступінь ушкодження ДНК кумулюючих клітин за умов експериментального імунокомплексного ушкодження.

Примітка: ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$ - порівняно з групою БСА.

У кумулюючих клітинах за умов імунокомплексного ушкодження застосування ГС супроводжується зменшенням вираженості клітинної загибелі. Так, відсоток живих клітин збільшується, тоді як відсоток клітин з морфологічними ознаками некрозу знижується порівняно з показниками у групі БСА (рис. 7.5). Встановлено, що введення ГС на тлі імунізації БСА підвищувало відсоток живих кумулюючих клітин до $69,17 \pm 0,95$ % при $56,13 \pm 0,97$ % у групі БСА ($p < 0,01$), знижувало відсоток клітин з ознаками некрозу до $6,50 \pm 0,50$ % з $22,00 \pm 0,91$ % ($p < 0,01$) та вірогідно не впливало на відсоток клітин з ознаками апоптозу порівняно з дією БСА.

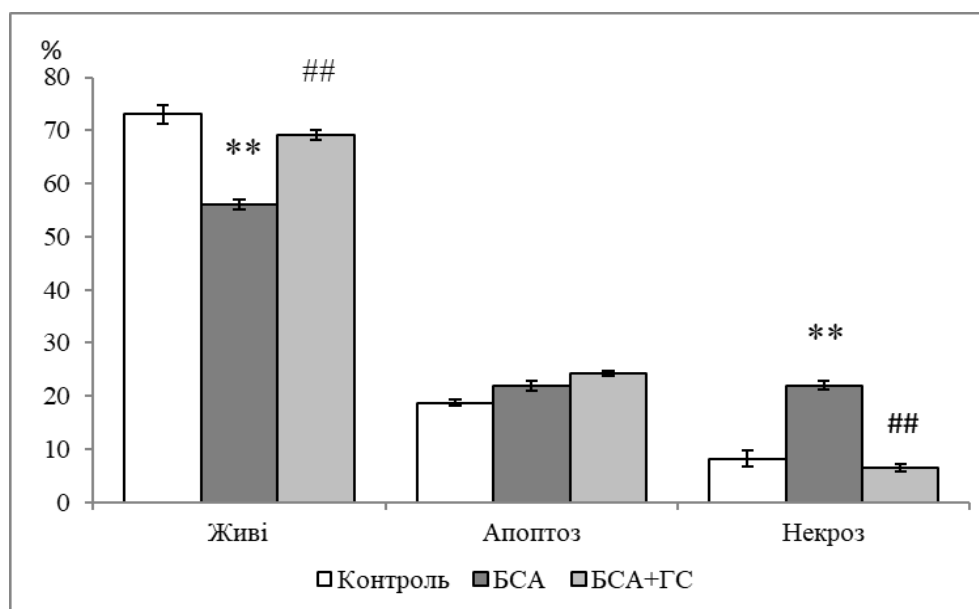


Рисунок 7.5. Вплив введення ГС на життєздатність та шляхи загибелі кумулюючих клітин за умов БСА-індукованого ушкодження.

Примітка: ** $p < 0,01$ – порівняно з контролем; ## $p < 0,01$ – порівняно з групою БСА.

7.2.3. Вплив ГС на мейотичне дозрівання ооцитів та експресію генів у кумулюсних клітинах за умов імунокомплексного ушкодження

Використовуючи модель експериментального системного імунокомплексного ушкодження, нами досліджено вплив ГС на мейотичне дозрівання ооцитів мишей та зміни експресії генів гремліну 1 (GREM1), гіалуронансинтази 2 (HAS2) та циклооксигенази-2 (COX2) у кумулюсних клітинах. Ці гени відіграють важливу роль під час оогенезу та можуть характеризувати функціональний стан кумулюсних клітин і компетентність ооцитів до мейотичного дозрівання.

Нами встановлено, що введення ГС в умовах дії БСА підвищувало відсоток ооцитів, здатних до відновлення мейозу (метафаза I) ($p < 0,05$) та формування першого полярного тільца (метафаза II) ($p < 0,05$). Зокрема, відсоток ооцитів, що досягали метафази I, збільшувався до $82,69 \pm 4,71$ % при $72,65 \pm 6,21$ % у групі БСА, а метафази II — до $47,00 \pm 4,61$ % при $32,67 \pm 5,89$ % відповідно у порівнянні з БСА ($p < 0,05$).

За цих експериментальних умов також було досліджено рівень експресії оваріальних генів HAS2, COX2 і GREM1, які залучені до процесів овуляції й відіграють важливу роль у проліферації та диференціюванні клітин кумулюсного оточення ооцитів. Встановлено, що при застосуванні ГС за умов імунокомплексного ушкодження спостерігається підвищення рівнів мРНК генів COX2, GREM1 і HAS2 (рис. 7.6).

Таким чином, встановлено, що введення препарату ГС за умов системного імунокомплексного ушкодження зменшує ступінь ушкодження ДНК у клітинах тимуса, лімфатичних вузлів та кумулюсних клітинах, знижує відсоток клітин із максимальним рівнем фрагментації ДНК та підвищує відсоток клітин без первинних ушкоджень ДНК або з мінімальними ушкодженнями ДНК. Крім того, застосування ГС чинить позитивний вплив на

здатність ооцитів до мейотичного дозрівання та їх якість, що підтверджується збільшенням відсотка ооцитів, які відновили мейоз і сформували перше полярне тільце. Введення цього антиоксиданта також підвищує життєздатність кумулюсних клітин, що проявляється зменшенням відсотка клітин із ознаками некротичної загибелі та супроводжується підвищенням рівнів мРНК COX2, GREM1 і HAS2, що свідчить про відновлення функціонального стану кумулюсно-ооцитарного комплексу.

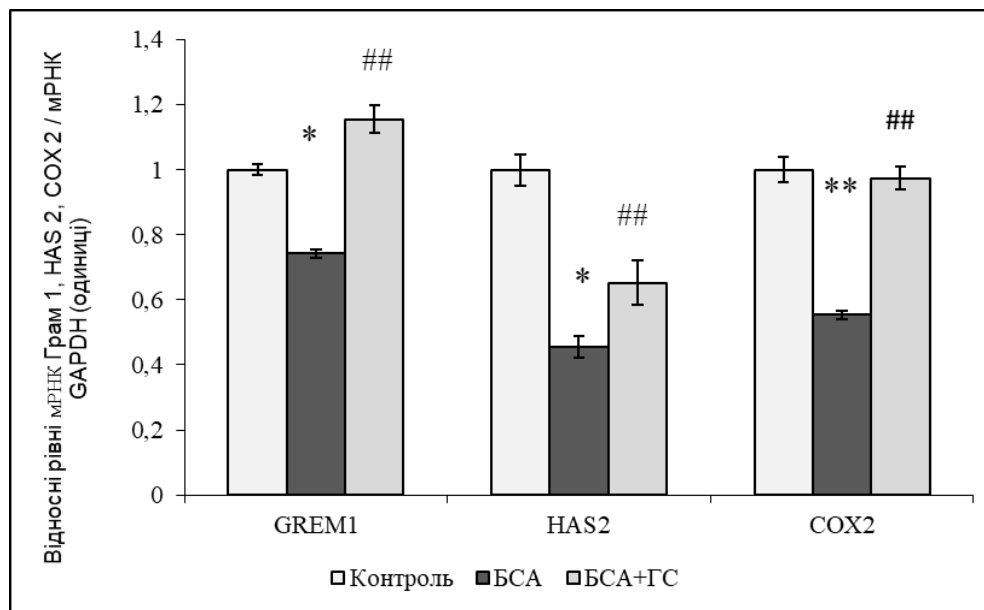


Рисунок 7.6. Вплив ГС на рівень експресії генів HAS2, COX2 і GREM1 у кумулюсних клітинах яєчників мишей в умовах експериментального системного імунокомплексного ушкодження, індукованого імунізацією БСА.

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем; ## $p < 0,01$ - порівняно з групою БСА.

7.3. Вплив цитрату германію на розвиток генотоксичного стресу, життєздатність та шляхи загибелі імунокомпетентних клітин за умов ендотоксемії

У наступній серії досліджень вивчено нанопрепарат цитрат германію (ЦГ), що має виражені імуностимулюючі, протизапальні та антиоксидантні властивості та активно вивчається у медичних і ветеринарних дослідженнях (Федорук, 2016; Федорук, 2017). Було оцінено вплив ЦГ на ступінь ушкодження ДНК імунокомпетентних клітин, їх життєздатність та шляхи загибелі за умов імуноопосередкованого ушкодження, індукованого ЛПС.

Методом комет-електрофорезу поодиноких клітин встановлено, що введення ЛПС супроводжувалося вираженим ушкодженням ДНК імуоцитів, що свідчить про розвиток генотоксичного стресу. ІДК достовірно підвищувався у клітинах тимуса до $2,35 \pm 0,11$ (при $0,66 \pm 0,25$ у контролі) та лімфатичних вузлів до $1,98 \pm 0,32$ (при $0,55 \pm 0,19$; $p < 0,05$). Також зростав відсоток клітин із високим рівнем ушкодження ДНК: у тимусі до $46,41 \pm 12,09$ % порівняно з $8,92 \pm 7,29$ % у контролі ($p < 0,05$), у лімфатичних вузлах до $27,61 \pm 6,81$ % порівняно з $2,23 \pm 1,27$ % у контролі ($p < 0,01$) (рис. 7.7 А, Б). Отримані дані підтверджують розвиток вираженого генотоксичного стресу в ІКК мишей за умов ендотоксемії.

Застосування ЦГ сприяло зниженню ІДК тимоцитів та клітин лімфатичних вузлів до $0,13 \pm 0,02$ та $0,3 \pm 0,05$ відповідно ($p < 0,001$). Крім того, суттєво знижувалася кількість імуоцитів із вираженим ушкодженням ДНК: у тимусі до $1,2 \pm 0,49$ % ($p < 0,01$), у лімфатичних вузлах до $4,25 \pm 0,90$ % ($p < 0,05$) порівняно з групою ЛПС (рис. 7.7 А, Б). Зниження як інтегрального індексу ушкодження ДНК, так і відсотка клітин із тяжкими її пошкодженнями свідчить про ефективне обмеження генотоксичного стресу при дії ЦГ. Отримані дані свідчать про цитопротективну дію ЦГ за умов

ендотоксемії (Грушка та ін., 2019), яка, ймовірно, реалізується через антиоксидантні властивості препарату та його здатність знижувати інтенсивність запальної відповіді.

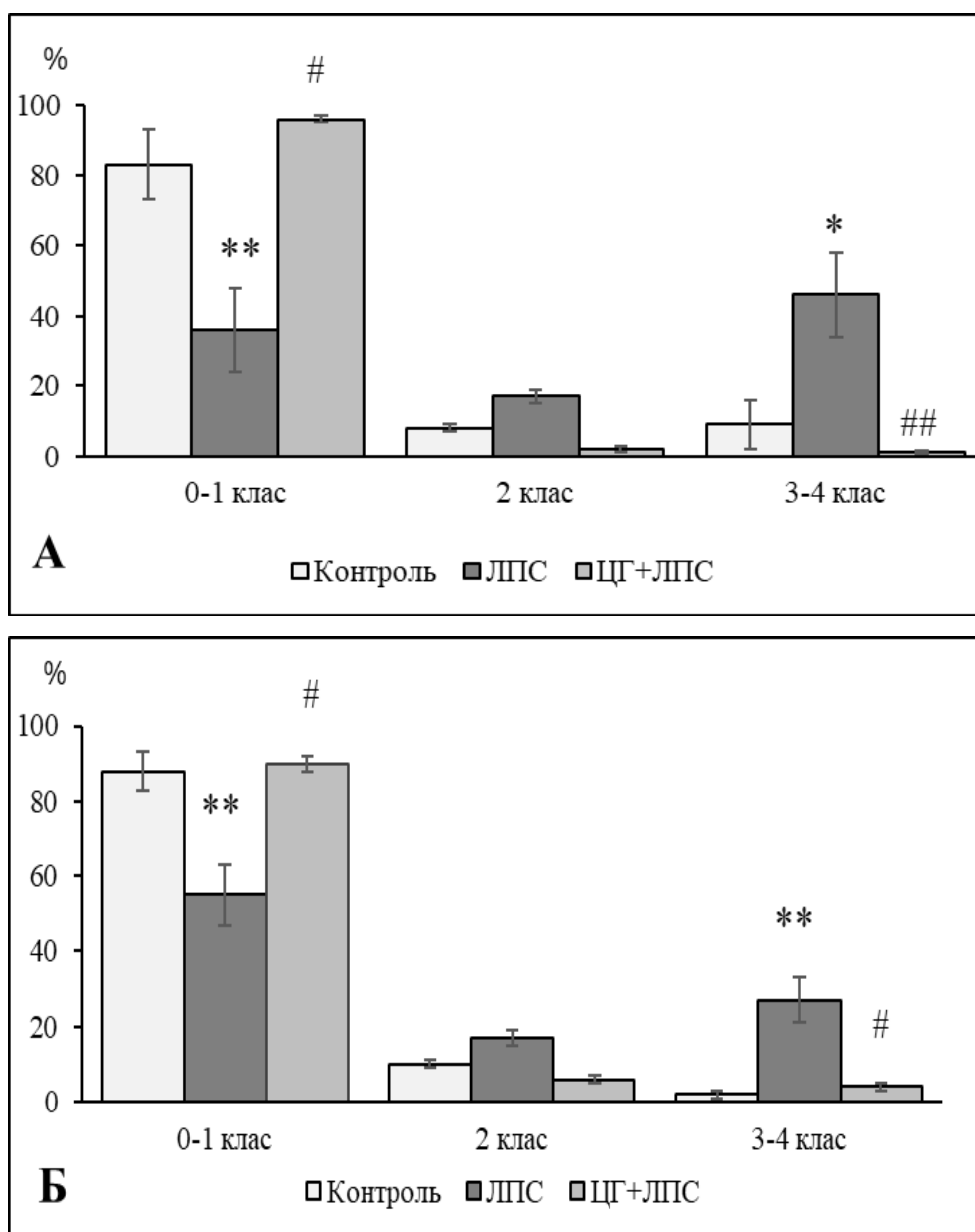


Рисунок 7.7. Вплив цитрату германію (ЦГ) на ступінь ушкодження ДНК у клітинах тимуса та лімфатичних вузлів за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії.

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ - порівняно з групою ЛПС.

На тлі такого значного ушкодження ДНК за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії знижувалася життєздатність клітин тимуса та лімфатичних вузлів. Відсоток некротичних клітин зростав у 10,8 раза в тимусі та у 6,1 раза в лімфатичних вузлах порівняно з контролем ($p < 0,01$). Застосування ЦГ значно покращувало життєздатність імуніцитів. У клітинах тимуса ЦГ достовірно зменшував некротичну загибель, тоді як зниження апоптозу мало характер тенденції. У клітинах лімфатичних вузлів ЦГ достовірно зменшував як некроз, так і апоптоз, причому антинекротичний ефект був більш вираженим (рис. 7.8 А, Б). Ймовірно, такий ефект цитрату германію пов'язаний з його здатністю зменшувати інтенсивність оксидативного стресу та стабілізувати клітинні мембрани, що може сприяти збереженню інтегральної цілісності геному та життєздатності клітин. Зменшення некротичної загибелі може запобігати надмірній активації запальної відповіді за умов ендотоксемії. Отже, застосування ЦГ чинить виражений цитопротективний вплив на клітини тимуса та лімфатичних вузлів, зменшуючи ступінь ушкодження ДНК, підвищуючи життєздатність імуніцитів та обмежуючи розвиток некротичних і апоптотичних процесів за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії.

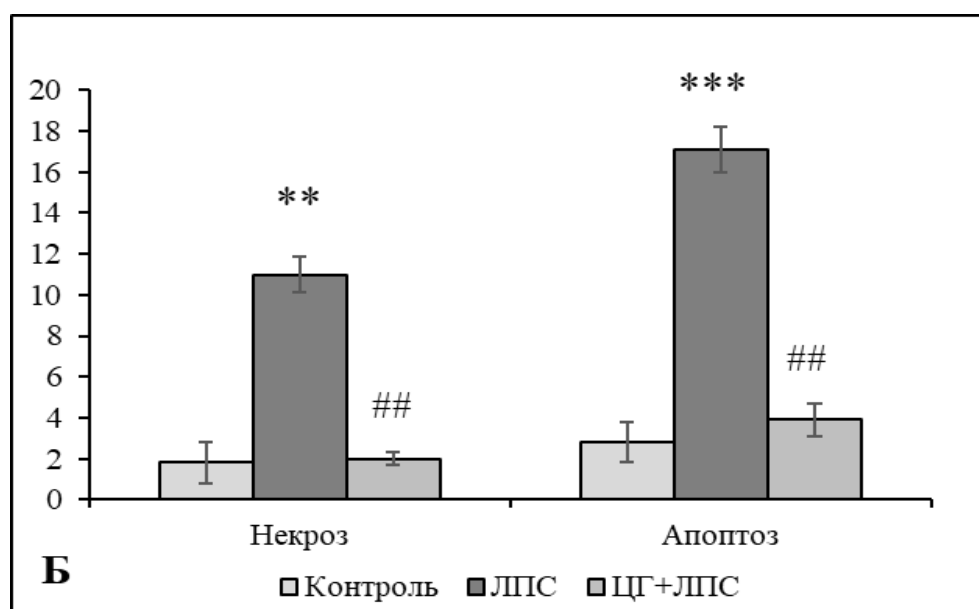
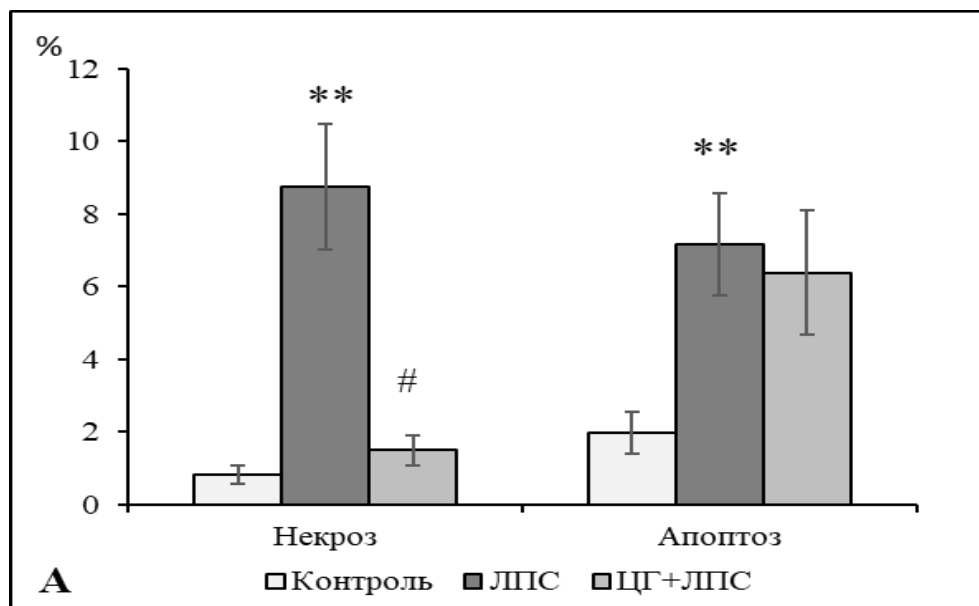


Рисунок 7.8. Вплив цитрату германію (ЦГ) на життєздатність та шляхи загибелі клітин тимуса (А) та лімфатичних вузлів (Б) за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії.

Примітка: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ - порівняно з контролем;

$p < 0,05$; ## $p < 0,01$ - порівняно з групою ЛПС.

7.4. Вплив наночастинок срібла на інтегральну цілісність ДНК та функціональний стан клітин імунної й репродуктивної систем за умов імунокомплексного ушкодження

Наступним етапом дослідження була оцінка дії наночастинок срібла (НЧС) на інтегральну цілісність ДНК та функціональний стан клітин імунної й репродуктивної систем за умов БСА-індукованого імунокомплексного ушкодження. Зокрема, було проаналізовано наслідки внутрішньовенного введення НЧС на показники функціонального стану жіночої репродуктивної системи мишей. Оцінювали ступінь мейотичного дозрівання ооцитів, життєздатність фолікулярних клітин, а також рівні експресії мРНК генів HAS2, COX2 і GREM1.

7.4.1. Ступінь ушкодження ДНК, життєздатність та шляхи загибелі імунокомпетентних клітин за умов дії НЧС при імунокомплексному ушкодженні

Отримані результати досліджень показали, що за умов введення БСА відбувається ушкодження ДНК клітин тимуса. Зокрема, різко зменшувався відсоток клітин з 0–1 та 2 класами ушкодження до $9,00 \pm 0,91$ % та $8,00 \pm 0,31$ % відповідно, порівняно з $70,17 \pm 1,72$ % і $15,67 \pm 1,03$ % у контролі. Натомість значно зростає відсоток клітин 3-го та 4-го класів до $37,50 \pm 0,58$ % і $45,50 \pm 1,26$ % відповідно, в порівнянні з $8,83 \pm 0,75$ % і $5,33 \pm 1,03$ % у контролі, що свідчить про розвиток вираженого генотоксичного стресу.

За умов імунізації БСА і введення НЧС спостерігали суттєве зменшення ушкодження ДНК клітин тимуса порівняно з групою БСА. Збільшувався відсоток клітин тимуса 0-1 та 2-го класу до $72,15 \pm 6,21$ % та $22,18 \pm 2,14$ % у порівнянні з, відповідно, $9,00 \pm 0,91$ % та $8,00 \pm 0,31$ % за умов

дії БСА. Тоді як відсоток клітин 3 та 4-го класів зменшувався до $5,67 \pm 0,46 \%$ і $0,00 \%$ у порівнянні з, відповідно, $37,50 \pm 0,58 \%$ та $45,50 \pm 1,26 \%$ за умов імунізації БСА (табл.7.1).

Введення НЧС інтактним тваринам супроводжувалося збільшенням кількості клітин тимуса з 0-1 класу до $89,65 \pm 5,44 \%$ у порівнянні з $70,17 \pm 1,72 \%$ в контролі та зменшення відсотка клітин 2 і 3 класів до, відповідно, $8,35 \pm 0,42\%$ і $2,00 \pm 0,17\%$ у порівнянні з $15,67 \pm 1,03 \%$ і $8,83 \pm 0,75\%$ у контролі. Для клітин 4-го класу достовірних змін не встановлено.

Це свідчить про виражений протективний ефект НЧС щодо інтегральної цілісності ДНК клітин тимуса за умов імунокомплексного ушкодження.

Таблиця 7.1.

Зміни ступеня ушкодження ДНК клітин тимуса за умов БСА-індукованого імунокомплексного ушкодження та при введенні наночастинок срібла (НЧС).

Група тварин	0-1 клас (%)	2-клас (%)	3 клас (%)	4 клас (%)
Контроль	$70,17 \pm 1,72$	$15,67 \pm 1,03$	$8,83 \pm 0,75$	$5,33 \pm 1,03$
БСА	$9,00 \pm 0,91^*$	$8,00 \pm 0,31^*$	$37,50 \pm 0,58^*$	$45,50 \pm 1,26^*$
БСА+НЧС	$72,15 \pm 6,21^\#$	$22,18 \pm 2,14^\#$	$5,67 \pm 0,46^\#$	$0,00^\#$
НЧС	$89,65 \pm 5,44^*$	$8,35 \pm 0,42$	$2,00 \pm 0,17^*$	$0,00$

Примітка: $*p < 0,05$ - порівняно з контролем; $^\#p < 0,05$ - порівняно з групою БСА.

За цих умов також відзначалося виражене ушкодження ДНК клітин лімфатичних вузлів. Зокрема, відсоток клітин з ядрами 0–1 класів

зменшувався до $6,65 \pm 0,39$ % порівняно з $65,13 \pm 7,94$ % у контролі. Водночас значно зростала частка клітин 3-го та 4-го класів до $41,00 \pm 6,16$ % і $37,02 \pm 2,43$ % відповідно, порівняно з $14,97 \pm 1,39$ % і $7,85 \pm 0,62$ % у контролі. Відсоток клітин 2 класу істотно не змінювався та становив $15,33 \pm 3,96$ %, що відповідало контрольним значенням.

За умов поєднання БСА і введення НЧС спостерігалось зменшення ступеня ушкодження ДНК клітин лімфатичних вузлів порівняно з групою БСА. Відсоток клітин 0–1 класів зростав до $61,45 \pm 5,26$ % порівняно з $6,65 \pm 0,39$ % за умов дії БСА, тоді як відсоток клітин 3-го та 4-го класів знижувався до $13,84 \pm 1,12$ % ($p < 0,05$) і $3,94 \pm 2,75$ % відповідно (проти $41,00 \pm 6,16$ % і $37,02 \pm 2,43$ % у групі БСА) (табл. 7.2).

Введення НЧС інтактним тваринам супроводжувалося збільшенням відсотка клітин 0–1 класів до $86,27 \pm 5,55$ % у порівнянні з $65,13 \pm 7,94$ % у контролі та зменшенням відсотка клітин 3 класу до $1,96 \pm 2,77$ %, а клітини 4 класу практично не виявлялися. Відсоток клітин 2-го класу залишався в межах контрольних значень і становила $11,76 \pm 2,77$ %.

Таблиця 7.2.

Зміни ступеня ушкодження ДНК клітин лімфатичних вузлів за умов БСА-індукованого імунотоксичного ушкодження та при введенні наночастинок срібла (НЧС).

Група тварин	0-1 клас (%)	2-клас (%)	3 клас (%)	4 клас (%)
Контроль	$65,13 \pm 7,94$	$12,05 \pm 1,12$	$14,97 \pm 1,39$	$7,85 \pm 0,62$
Імунізація БСА	$6,65 \pm 0,39^*$	$15,33 \pm 3,96$	$41,00 \pm 6,16^*$	$37,02 \pm 2,43^*$
БСА+НЧС	$61,45 \pm 5,26^\#$	$20,76 \pm 1,91$	$13,84 \pm 1,12^\#$	$3,94 \pm 2,75^\#$
НЧС	$86,27 \pm 5,55^*$	$11,76 \pm 2,77$	$1,96 \pm 2,77^*$	$0,00^*$

Примітка: $*p < 0,05$ - порівняно з контролем; $^\#p < 0,05$ - порівняно з групою БСА.

Крім генотоксичних змін, введення БСА супроводжувалося вираженим порушенням клітинного гомеостазу та посиленням процесів загибелі клітин. У тимусі відзначалося достовірне зниження життєздатності клітин тимуса, що проявлялося зменшенням відсотка живих клітин до $67,33 \pm 2,15$ % порівняно з $91,63 \pm 1,13$ % у контролі. Одночасно спостерігалось значне підвищення відсотка клітин з морфологічними ознаками апоптозу та некрозу відповідно до $22,42 \pm 1,07$ % і $10,25 \pm 0,90$ %, тоді як у контрольній групі ці показники становили $5,50 \pm 0,49$ % і $2,88 \pm 0,21$ % відповідно. Таким чином, БСА-індуковане імунокомплексне ушкодження супроводжувалося посиленням клітинної загибелі.

За умов поєднання введення БСА та НЧС спостерігалася часткова нормалізація показників клітинної життєздатності. Відсоток живих клітин зростав до $85,85 \pm 1,73$ %, що свідчить про зменшення пригнічення загальної кількості життєздатних клітин порівняно з групою БСА. Водночас відсоток клітин з ознаками апоптозу знижувався до $11,60 \pm 1,24$ %, а некрозу — до $2,55 \pm 1,26$ %, що вказує на більш виражений вплив НЧС на некротичну загибель (рис. 7.9 А). Важливо підкреслити, що введення НЧС інтактним тваринам не супроводжувалося достовірними змінами життєздатності клітин тимуса, що свідчить про відсутність власної цитотоксичної дії препарату в умовах фізіологічної норми.

Аналогічні закономірності встановлено у клітинах лімфатичних вузлів. Введення БСА призводило до суттєвого зниження відсотка живих клітин до $60,25 \pm 3,07$ % (проти $84,21 \pm 1,61$ % у контролі) та до зростання частки клітин з ознаками апоптозу і некрозу до $25,42 \pm 2,16$ % і $14,33 \pm 0,95$ % відповідно (у контролі $10,29 \pm 0,91$ % і $5,50 \pm 0,48$ %). На тлі введення НЧС при дії БСА відзначалося відновлення клітинної життєздатності лімфоцитів лімфатичних вузлів: відсоток живих клітин зростав до $82,72 \pm 4,58$ %, тоді як відсоток клітин

з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу зменшувався відповідно до $15,17 \pm 1,26 \%$ і $2,11 \pm 0,18 \%$ (рис. 7.9 Б).

Таким чином, введення БСА призводило до вираженого ушкодження ДНК ІКК. Відзначалося значне зростання відсотка клітин із 3–4 класами ушкодження, що відображає накопичення клітин із вираженими та тяжкими ушкодженнями ДНК (у 4,2–8,5 рази для тимуса та у 2,7–4,7 рази для лімфатичних вузлів), одночасно зі значним зменшенням кількості клітин 0-1 класів порівняно з контролем. За умов поєднання введення БСА та НЧС спостерігалось суттєве зниження відсотка клітин із вираженими та тяжкими ушкодженнями ДНК (3–4 класи) та збільшувався відсоток клітин з відсутніми, мінімальними та помірними ушкодженнями ДНК (0–2 класи). Це свідчить про зменшення генотоксичного стресу під впливом НЧС.

Введення НЧС інтактним тваринам сприяло збереженню інтегральної цілісності геному: збільшувалася частка клітин 0–1 класів та зменшувався відсоток клітин 3–4 класів, подекуди до повної їх відсутності. Поряд із генотоксичними змінами, введення БСА супроводжувалося зниженням життєздатності клітин тимуса та посиленням клітинної загибелі. Введення НЧС інтактним мишам не спричиняло достовірних змін цих показників. Отже, НЧС за умов імунокомплексного ушкодження чинять виражений протективний ефект, зменшуючи ступінь ушкодження ДНК та клітинну загибель, передусім некротичну, що в сукупності сприяє збереженню життєздатності імунокомпетентних клітин.

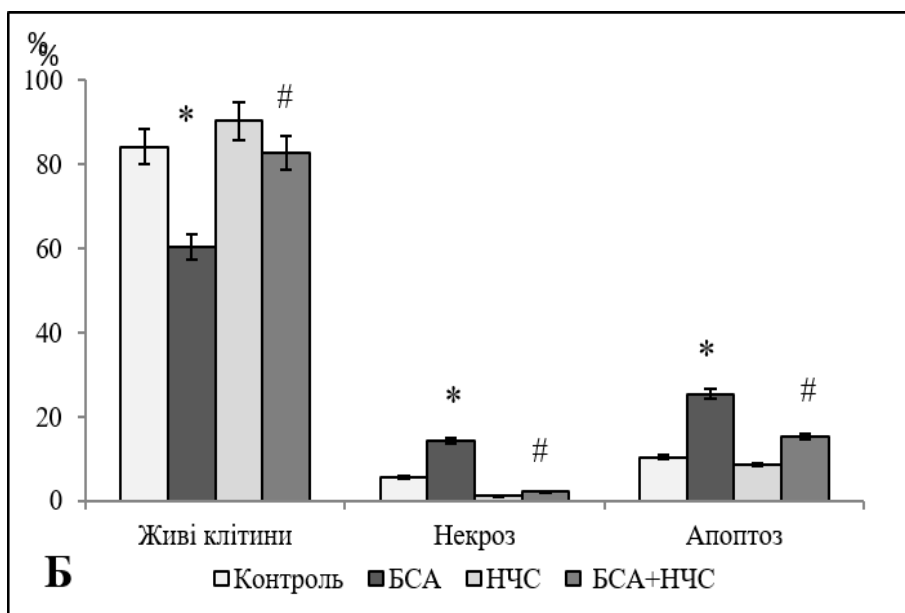
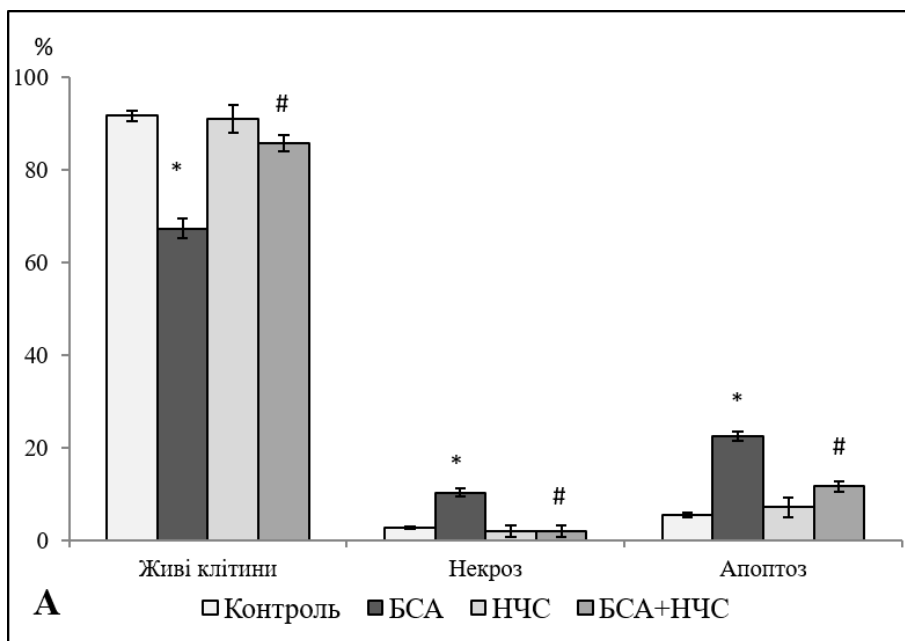


Рисунок 7.9. Вплив наночастинок срібла (НЧС) на життєздатність та шляхи загибелі клітин тимуса (А) і лімфатичних вузлів (Б) за умов експериментального імунотоксичного ушкодження.

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$ - порівняно з групою БСА.

7.4.2. Життєздатність та шляхи загибелі кумулюючих клітин за умов дії НЧС при імунокомплексному ушкодженні

За умов імунізації БСА відбувається посилення клітинної загибелі кумулюючих клітин: відсоток живих клітин зменшується до $70,92 \pm 1,06 \%$ у порівнянні з $91,25 \pm 1,04 \%$ у контролі; кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу збільшується до, відповідно, $21,25 \pm 1,75 \%$ і $7,83 \pm 0,60 \%$, у порівнянні з, відповідно, $7,00 \pm 0,71 \%$ і $1,75 \pm 0,52 \%$ в контролі. Введення НЧС не призводить до вірогідних змін в кількості живих клітин, клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу. Введення НЧС за умов імунізації БСА призводить до покращення параметрів життєздатності клітин фолікулярного оточення ооцитів, зокрема, відсоток живих клітин зростає до $87,13 \pm 1,43 \%$ у порівнянні з $70,92 \pm 1,06 \%$ за умов дії БСА, а відсоток клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу зменшується до відповідно $11,31 \pm 1,33 \%$ і $1,56 \pm 0,56 \%$ у порівнянні з величинами за умов імунізації БСА, $21,25 \pm 1,75 \%$ і $7,83 \pm 0,60 \%$ (рис. 7.10).

Отримані результати свідчать, що імунокомплексне ушкодження супроводжується зниженням життєздатності кумулюючих клітин, які відіграють важливу роль у забезпеченні нормального функціонування ооцита. Зниження життєздатності цих клітин може негативно впливати на мікрооточення ооцита та процеси його дозрівання. Разом з тим, введення НЧС сприяє зменшенню відсотка клітин з ознаками апоптозу та некрозу у кумулюючих клітинах, та підвищенню їх життєздатності, що може свідчити про цитопротективний вплив НЧС за умов імунокомплексного ушкодження.

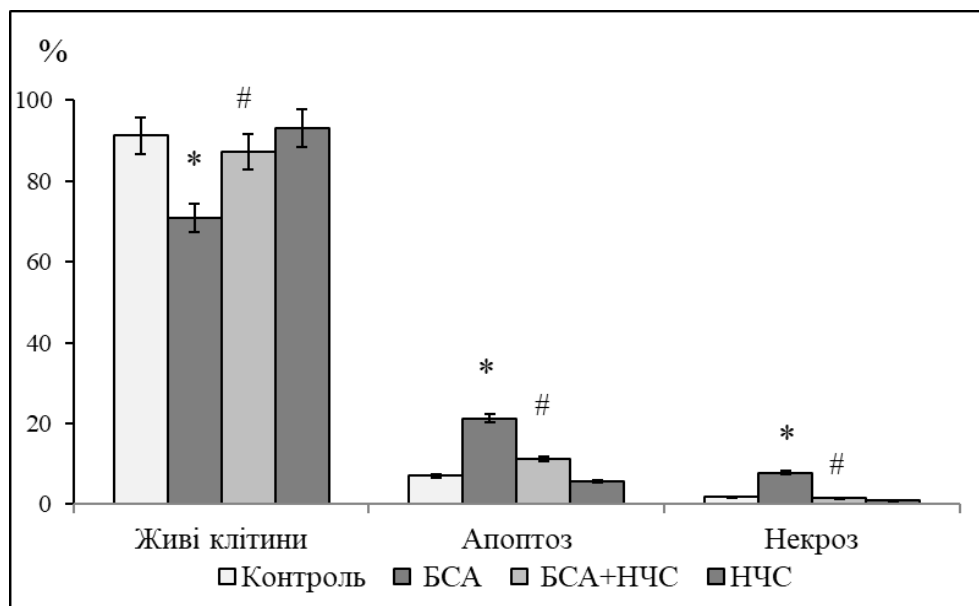


Рисунок 7.10. Вплив наночастинок срібла (НЧС) на життєздатність та шляхи загибелі кумулюсних клітин за умов експериментального імунотоксичного ушкодження.

Примітка: * $p < 0,05$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$ - порівняно з групою БСА.

Таким чином введення БСА призводить до зменшення відсотка живих кумулюсних клітин в 1,3 рази та до збільшення відсотка клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу - відповідно, 3 і 4,4 рази порівняно з контролем. Введення НЧС інтактним мишам не призводить до вірогідних змін в кількості живих клітин або клітин з морфологічними ознаками апоптозу і некрозу. За умов поєднаної дії БСА та введення НЧС спостерігається часткове відновлення життєздатності кумулюсних клітин: відсоток живих клітин зростає у 1,2 рази, тоді як відсоток клітин із ознаками некрозу та апоптозу зменшується відповідно у 5 та 1,9 раза порівняно з групою БСА.

7.4.3. Вплив НЧС на мейотичне дозрівання ооцитів та експресію генів у кумулюючих клітинах мишей

Досліджено вплив НЧС на мейотичне дозрівання ооцитів та рівень експресії генів гіалуронсинтази 2 (HAS2), циклооксигенази-2 (COX2) і гремліну 1 (GREM1) у кумулюючих клітинах в тормі та за умов експериментального системного імунотоксичного ушкодження у мишей, індукованого БСА.

При введенні БСА відзначалося пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів як на стадії відновлення мейозу (метафаза I), так і на стадії формування першого полярного тільца (метафаза II) порівняно з контролем. Зокрема, відсоток ооцитів, що досягли стадії метафази I, зменшувався до $31,25 \pm 1,66 \%$, а метафази II — до $52,63 \pm 2,17 \%$, тоді як у контрольній групі ці показники становили відповідно $64,29 \pm 0,96 \%$ і $81,25 \pm 2,13 \%$.

Встановлено, що шестикратне введення НЧС інтактним мишам не спричиняло достовірних змін показників мейотичного дозрівання ооцитів. За умов імунізації БСА введення НЧС супроводжувалося покращенням параметрів мейотичного дозрівання ооцитів як на стадії метафази I, так і на стадії метафази II у порівнянні з величинами у групі БСА. Так, відсоток ооцитів, що досягли метафази I, зростав до $47,37 \pm 1,30 \%$, а метафази II — до $81,33 \pm 4,28 \%$, що достовірно перевищувало значення в групі БСА ($31,25 \pm 1,66 \%$ і $52,63 \pm 2,17 \%$ відповідно). Результати щодо впливу введення НЧС за умов експериментального імунотоксичного ушкодження на ооцити представлено на рис. 7.11.

Таким чином, БСА-індуковане імунотоксичне ушкодження призводить до пригнічення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, тоді як введення НЧС на тлі імунізації має позитивний вплив на мейотичне дозрівання ооцитів як на стадії відновлення мейозу, так і на стадії формування

першого полярного тільця, підвищуючи відповідні показники приблизно у 1,5 раза на обох стадіях порівняно з групою БСА. Отримані результати свідчать, що за умов БСА-індукованого імунокомплексного ушкодження порушується здатність ооцитів до відновлення та завершення мейозу. Введення НЧС сприяє відновленню цих процесів, що супроводжується зростанням відсотка ооцитів на стадіях метафази I та II і свідчить про позитивний вплив НЧС на мейотичне дозрівання ооцитів.

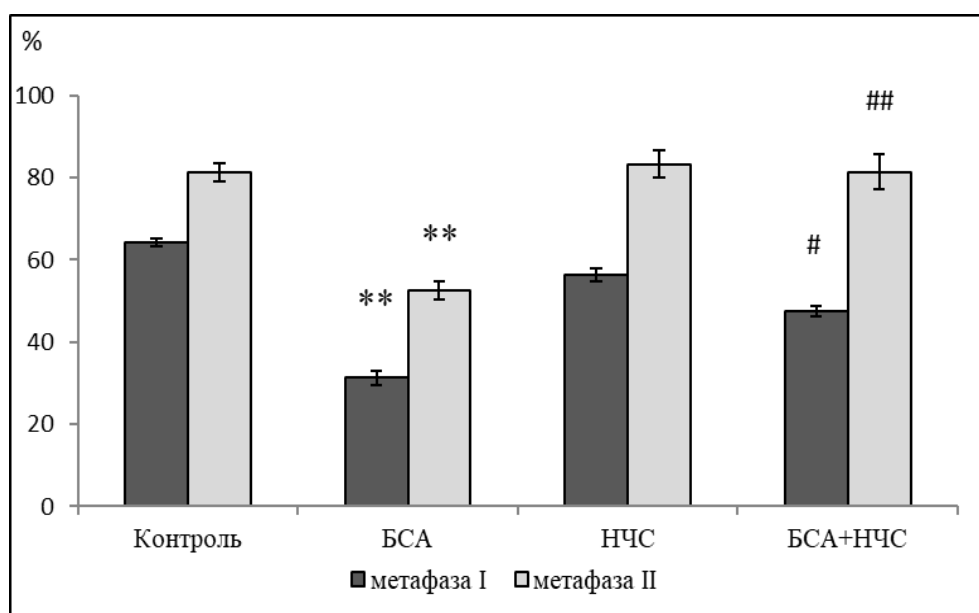


Рисунок 7.11. Вплив НЧС на мейотичне дозрівання ооцитів мишей за умов імунокомплексного ушкодження, індукованого БСА.

Примітка: ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$; ## $p < 0,01$ - порівняно з групою БСА.

У наступній серії експериментів досліджено вплив НЧС на рівень експресії генів GREM1, HAS2 і COX2 у кумулюючих клітинах мишей. БСА-індуковане ушкодження супроводжувалося пригніченням експресії цих генів, порівняно з показниками у контролі, що може призводити до порушення кумулюсного розширення та формування матриксу, і як наслідок порушення овуляції. Застосування НЧС за цих умов призводило до збільшення рівня експресії мРНК генів HAS2, COX2 і GREM1 в кумулюючих клітинах порівняно з показниками у імунізованих мишей БСА, а саме: експресія HAS2 мРНК збільшувалась в 1,65 разів, COX2 - в 1,24 рази, GREM1 - в 1,9 разів (рис.7.12).

Таким чином, введення НЧС на тлі імунокомплексного ушкодження сприяє зростанню рівнів експресії генів мРНК HAS2, COX2 і GREM1 в кумулюючих клітинах у мишей з експериментальним системним імунокомплексним ушкодженням.

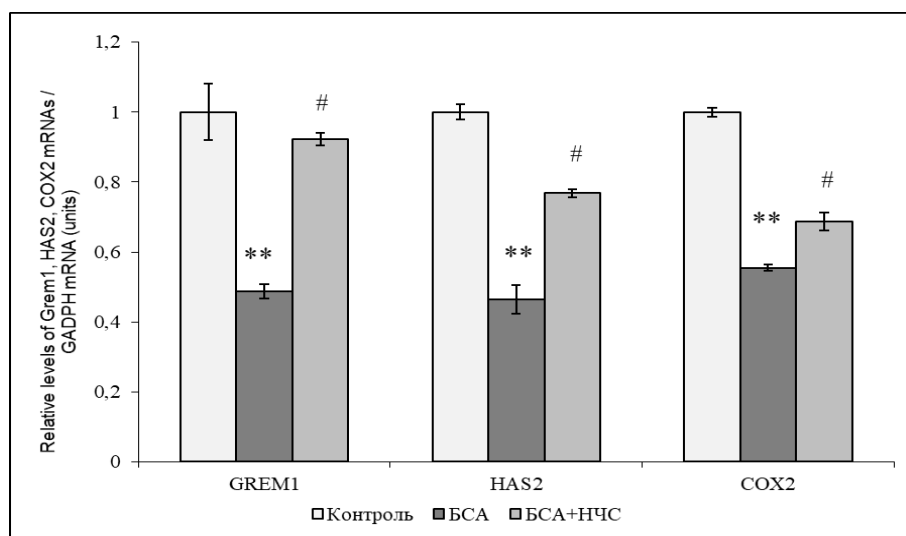


Рисунок 7.12. Вплив НЧС на рівень експресії генів HAS2, COX2 і GREM1 у кумулюючих клітинах мишей в умовах експериментального системного імунокомплексного ушкодження.

Примітка: ** $p < 0,01$ - порівняно з контролем; # $p < 0,05$ - порівняно з групою БСА.

Таким чином, результати, представлені у розділі 7, свідчать, що за умов імуноопосередкованого ушкодження застосування досліджуваних засобів, зокрема антиоксидантів і наноструктурованих матеріалів, супроводжується вираженими цитопротективними ефектами. Використання цих сполук супроводжується зменшенням ступеня ушкодження ДНК, зниженням інтенсивності некротичної загибелі клітин та нормалізацією функціонального стану клітин імунної та репродуктивної систем. Крім того, встановлено покращення функціональних показників репродуктивної системи, таких як мейотичне дозрівання ооцитів та рівень експресії генів, пов'язаних із функціональним станом кумулюючих клітин. Отримані нами результати свідчать, що застосування досліджуваних речовин сприяє збереженню структурно-функціональної цілісності клітин за умов надмірної імунної активації та може запобігати розвитку оксидативного і генотоксичного стресу. Це свідчить про перспективність використання цих сполук для корекції імуноопосередкованих порушень.

РОЗДІЛ 8

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ

На сьогодні доведено, що в основі більшості імуноопосередкованих захворювань лежать процеси порушення механізмів імунного гомеостазу, зокрема дисбаланс між проліферацією та елімінацією імунокомпетентних клітин. Початковий етап розвитку захисних реакцій організму характеризується інтенсивною проліферацією клітин, які здійснюють як неспецифічний, так і антигенспецифічний захист. При цьому паралельно посилюється елімінація аутореактивних клітин, що є необхідною умовою підтримання імунної толерантності. Завершення імунної відповіді потребує посиленої елімінації надлишкових активованих клітин-ефекторів запалення та імунної відповіді, що призводить до переважання процесів клітинної загибелі над клітинною проліферацією. Порушення цих регуляторних ланок (Treg-опосередкована толерантність, контроль апоптозу та функціональне виснаження Т-клітин) сприяють хронізації запалення та розвитку автоагресивних реакцій (Guerin et al., 2009; Bafor et al., 2022; Baessler & Vignali, 2024).

Хронічна імунна активація супроводжується виснаженням імунокомпетентних клітин, функціональною дисфункцією Т-лімфоцитів, порушенням балансу між ефекторними та регуляторними клітинами (зокрема, Treg) і втратою імунної толерантності (Baessler & Vignali, 2024; Bafor et al., 2022). Це асоціюється з порушенням оваріального гомеостазу: надлишок IL-1 β , TNF- α та АФК ушкоджує ДНК імунних та оваріальних клітин, посилює апоптоз/некроз, і пов'язується зі зниженням оваріального резерву, порушенням овуляції, імплантації та ефективності допоміжних

репродуктивних технологій (Naim et al., 2020; Haller-Kikkatalo et al., 2012; Shi et al., 2023).

Експериментальні моделі на тваринах, зокрема на мишах, є ключовими для вивчення клітинних і молекулярних механізмів функціонування імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов імунної активації та репродуктивних дисфункцій. Використання моделей із різними механізмами ініціації імунної відповіді дає змогу порівняти спільні та специфічні зміни функціонального стану досліджуваних клітин. Відтворені нами моделі дозволяють оцінити ефективність і безпеку терапевтичних засобів перед клінічними випробуваннями, проте більшість досліджень характеризують гострі часові параметри і рідше, пролонговані тривалі наслідки, що ускладнює аналіз хронічних імунозапальних процесів і довготривалої дії препаратів (Rafiyan et al., 2023; Hu et al., 2025). Тривала імуноактивація викликає первинні або вторинні репродуктивні порушення, підтримуючи замкнене коло запалення, що потребує поглибленого вивчення її впливу на оваріальну тканину. Зокрема, реакції гіперчутливості III типу (ІК-опосередковані) спричиняють системні васкуліти й мультиорганну дисфункцію (Sunderkötter et al., 2023). Системні автоімунні захворювання, зокрема системний червоний вовчак, також асоціюються з порушенням оваріальної функції та зниженням оваріального резерву (Han et al., 2024; Xu et al., 2024). Тому імунокомплексні моделі доцільно використати для оцінки мейотичного дозрівання ооцитів та цілісності ДНК клітин фолікулярного оточення.

Імуноопосередковані захворювання (хронічні хвороби дихальних шляхів, ревматоїдний артрит, вовчаковий нефрит) асоціюються з геномною нестабільністю, підвищеним оксидативним стресом та апоптозом (Mateen et al., 2016; Souliotis & Sfikakis, 2015; Yan et al., 2023; Rodríguez-Pérez et al., 2025). У ряді робіт показано, що вплив ЛПС або Кон А супроводжується дисбалансом імунної регуляції, змінами у функціонуванні лімфоїдних

органів і, опосередковано, впливає на оваріальну функцію. Ліпополісахарид здатний індукувати ушкодження ДНК, що супроводжується подальшою активацією NF-κB у різних типах клітин (Qiao et al., 2019). Використаний нами метод ДНК-комет (comet assay) є надійним інструментом для кількісної оцінки ДНК-ушкоджень, а його сучасні варіанти (лужний, нейтральний, із ферментами Fpg, Endo III, платформи CometChip/Comet-FISH) підвищують аналітичну специфічність і відтворюваність (Langie et al., 2015; Collins et al., 2023). Важливо, що гіперфрагментовані комети відображають крайній ступінь виходу ДНК у «хвіст» комети і не є синонімом клітинної загибелі, тому потребують підтвердження за допомогою тестів на їх життєздатність (Annexin V/PI, каспазні тести) (Lorenzo et al., 2013; Rieger et al., 2011).

Експериментальні моделі імунноопосередкованого ушкодження та їх характеристика.

Беручи до уваги наведені вище дані, першим етапом нашого дослідження було створення та характеристика експериментальних моделей, які імітують надмірну імунну активацію з репродуктивно значущими наслідками. У літературі з досліджуваної проблеми існують дані, що тривала імунна активація може викликати зміни клітинного складу імунних органів, порушувати експресію генів репарації ДНК та ініціювати низку клітинних і молекулярних механізмів, які сприяють розвитку оваріальної дисфункції (Bednarski & Sleckman, 2019; Christmann & Kaina, 2013; Bazzano et al., 2024; Shi et al., 2023).

Раніше нами було показано, що надмірна імунна активація супроводжується порушенням мейотичного дозрівання ооцитів і посиленням апоптозу фолікулярних клітин на тлі розвитку запальної відповіді (Voznesenskaya et al., 2007). Зокрема, в експериментальній моделі імунної оваріальної недостатності у мишей лінії CBA, індукованій введенням

ксеногенних антиоваріальних антитіл або імунізацією алогенними екстрактами яєчників, встановлено порушення мейозу ооцитів, підвищення апоптозу фолікулярних клітин та ознаки системної імунної активації, що проявлялися збільшенням регіонарних лімфовузлів, посиленням апоптозу лімфоцитів і змінами лейкоцитарної формули. Таким чином, імунна відповідь у моделі імунної оваріальної недостатності не обмежувалася локальними змінами в яєчнику, а супроводжувалася системними змінами з боку імунної системи. Отримані дані свідчать про важливу роль гуморальних імунних механізмів у розвитку репродуктивних порушень.

В цьому дослідженні нами були обрані і відтворені три експериментальні моделі імуноопосередкованого ушкодження, які відрізняються механізмами активації імунної відповіді: 1) системну імунокомплексну патологію у мишей лінії СВА (патент № 93351), індуковану довготривалою імунізацією зростаючими дозами білка БСА, що призводить до утворення та накопичення імунних комплексів в організмі; 2) Т-клітинний аутоімунний гепатит, індукований поліклональним активатором конканаваліном А, який є гострою Т-клітинозалежною моделлю з вираженою цитокінемією; 3) системну ендотоксемию, індуковану введенням ЛПС, що характеризується активацією вродженого імунітету та розвитком гострої запальної відповіді. Крім того, для моделювання оксидативного стресу *in vitro* використовували перекис водню та гіпохлорит натрію.

У відтворених нами моделях встановлено розвиток системної імунної активації, що проявлялася зсувом лейкоцитарної формули вліво, підвищенням індексу активації нейтрофілів, посиленням функціонально-метаболічної активності клітин вродженого імунітету (НСТ-тест, вміст катіонних білків). Сукупність цих змін свідчила про залучення ефекторних механізмів вродженого імунітету до розвитку імуноопосередкованого ушкодження. Крім того, відзначено активацію імунокомпетентних клітин,

утворення та відкладання імунних комплексів і фіксацією імуноглобулінів у тканинах печінки, лімфатичних вузлів та кровоносних судин (Павлович та ін., 2014, 2016, 2021). Неферментативні лізосомні катіонні білки лізосом окрім бактерицидної дії, виконують роль медіаторів запалення та вторинної альтерації, що супроводжується підвищенням судинної проникності, індукцією хемотаксису та активацією лейкоцитів (Pechous et al., 2017).

З метою отримання морфологічно підтверджених змін системних патологічних ушкоджень у мишей, імунізованих БСА, проводили гістологічні дослідження печінки, селезінки та аорти. Загальною патологічною особливістю гістоструктури всіх досліджуваних органів було ушкодження судин різного діаметра. Відмічено помірне порушення мікроциркуляції з розширенням навколосинусоїдальних просторів, набряком паренхіми органів, виходом лейкоцитів через пошкоджену та розрихлену судинну стінку та формуванням інфільтратів. Викликані зміни відповідають морфологічним ознакам васкуліту. Як ушкодження судин, так і фіксація ІК були виражені в подібній мірі в різних органах, з дещо більшими проявами в печінці та селезінці, тобто там, де в значній кількості наявні клітини вродженої (неспецифічної) резистентності моноцитарно-макрофагального ряду (Павлович та ін., 2014, 2016, 2021). Таким чином, виявлені морфологічні зміни підтверджують системний характер ІК-ушкодження та залучення судинного компонента до його розвитку.

Інтенсифікація утворення АФК є характерною особливістю ІК-ушкодження і відіграє важливу роль у розвитку тканинного ушкодження поруч із цитокін-опосередкованою альтерацією, у реалізації якої важливе значення має активація Fcγ-рецепторів імунними комплексами (Bosques & Manning, 2016). Це узгоджується з даними літератури про зв'язок хронічного запалення з оксидативним стресом і геномною нестабільністю в різних патологічних станах (Bao et al., 2015; Mateen et al., 2016) і також нашими

даними, отриманими в експериментальній імунокомплексній моделі у мишей (Павлович та ін., 2014).

За умов дії КонА спостерігається підвищення рівня МДА як маркера оксидативного стресу, що відображає інтенсифікацію процесів ПОЛ. Дисбаланс між інтенсивністю пероксидного окиснення ліпідів і антиоксидантною системою сприяє подальшому ушкодженню тканин (Мартинова та ін., 2012). Підвищення рівня малонового діальдегіду (МДА) при імунній активації свідчить про посилення процесів ПОЛ і розвиток оксидативного стресу в печінці при дії ЛПС (Грушка Н. та співавт., 2019). Оскільки окиснені ліпіди набувають антигенних властивостей, вони можуть запускати або підсилювати автоімунні реакції. Подібний процес посилення утворення АФК спостерігався при моделюванні хронічного гіперімунокомплексного синдрому у щурів, а також при дослідженні впливу ІК на лейкоцити крові за умов бронхопневмонії у ссавців (Чоп'як та ін., 2007; Buac et al., 2016). Посилена активність клітин-ефекторів запалення із збільшенням продукції біологічно активних речовин, поруч з АФК, є одним з важливих механізмів ушкодження різних тканин за умов імунокомплексного ураження, зокрема при системному червоному вовчаку, де оксидативний стрес сприяє запаленню та клітинним ушкодженням (Mahajan et al., 2016; Yan et al., 2023).

За допомогою методу «ДНК-комет» нами вперше показано ушкодження ДНК у клітинах тимусу та лімфовузлів за умов застосування БСА, ЛПС, Кон А. Отриманими результатами встановлено, що відсоток клітин 3-4 класів значно збільшувався у всіх досліджуваних моделях, що свідчить про посилення генотоксичного ушкодження. Однак за дії Кон А збільшення клітин 4-го класу було менш вираженим, що може свідчити про меншу тяжкість генотоксичного пошкодження або переважання ранніх етапів програмованої клітинної загибелі (Грушка., 2025). Слід зазначити, що тяжкі ("hedgehog")

комети не є однозначним маркером апоптозу або некрозу, а їх інтерпретація потребує обережності та підтвердження незалежними тестами клітинної загибелі, зокрема з оцінкою життєздатності клітин (Lorenzo et al., 2013; Collins et al., 2023; Møller et al., 2023). Гетерогенний спектр ушкоджень ДНК при дії Кон А (на відміну від більш зміщених у важкі класи змін при БСА та ЛПС), імовірно, зумовлений механізмом дії Кон А - поліклональною активацією Т-клітин через CD3/MHC-зв'язування, масивним вивільненням цитокінів і АФК (AboElnazar et al., 2020; Lawrence, 2009; Nao et al., 2022). Це веде до ураження як зрілих, так і незрілих Т-клітин у тимусі та на периферії, які відрізняються чутливістю до оксидативного стресу та активації каспаз, що відображається у ширшому розподілі класів комет (0–4).

При ушкодженні ДНК клітина може або запускати механізм репарації ДНК, або вступати в апоптоз чи некроз залежно від ступеня ушкодження, енергетичних ресурсів та дії прозапальних факторів. Довжина сформованого «хвоста ДНК» корелює зі ступенем фрагментації генетичного матеріалу, тоді як інтегральний індекс ДНК-комет характеризує сумарний рівень ушкодження ДНК у досліджуваних клітинах, враховуючи розподіл комет за класами ушкодження. За тяжких форм ушкоджень можливі обидва типи клітинної загибелі, як апоптоз, так і некроз. Клітини з максимальними пошкодженнями часто демонструють поєднання апоптотичних і некротичних ознак. Після опромінення зазвичай зростає відсоток комет 4-го класу, що відображає накопичення клітин із масивною фрагментацією ДНК та тяжким ступенем ушкодження, яке часто асоціюється з подальшою клітинною загибеллю. Водночас розглядати ці зміни виключно як прояв некрозу некоректно, оскільки некроз може бути самостійним шляхом клітинної загибелі, що відбувається паралельно з апоптозом, або виникати вторинно як завершальна стадія апоптозу (постапоптотичний некроз). Сучасні літературні дані свідчать, що різні механізми клітинної загибелі та пов'язані з ними процеси (апоптоз,

некроптоз, піроптоз, фероптоз, аутофагія, мітофагія) тісно взаємодіють через спільні молекулярні механізми регуляції (наприклад, каспаза-8, RIPK1/RIPK3, ROS, p53, мітохондріальні DAMPs), що призводить до перемикання шляхів клітинної загибелі, змішаних форм або компенсації одного механізму іншим залежно від ушкодження та енергетичних ресурсів клітини (Eskander et al., 2025; Kari et al., 2022).

При визначенні життєздатності клітин, нами встановлено, що в усіх досліджуваних моделях у мишей спостерігалось вірогідне зростання загибелі клітин тимуса та лімфовузлів порівняно з контролем. За умов ІК-ураження (БСА) та ЛПС переважає некротична загибель, тоді як Кон А більшою мірою індукує розвиток апоптотичної загибелі клітин, особливо у тимоцитах (Грушка, 2017, 2025). Це узгоджується з тим, що тимус є органом активної селекції Т-клітин, для якого характерний високий рівень фізіологічного апоптозу. Отримані дані також свідчать, що характер клітинної загибелі залежить від механізму ініціації імунної відповіді в застосованій експериментальній моделі.

Оскільки БСА-індуковане ІК-ураження супроводжувалося утворенням та відкладанням імунних комплексів у печінці, нирках, селезінці, аорті, матці та суглобах і формуванням васкулітоподібних змін (Павлович та ін., 2014; Radic et al., 2013), цю модель було нами обрано для вивчення порушень функціонування репродуктивної системи. Відомо, що системні васкуліти, характерні для гіперімунокомплексемії, можуть призводити до мультиорганної патології, включаючи ураження органів репродуктивної системи внаслідок ушкодження судинного русла. На цьому тлі ми виявили пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів, збільшення ушкодження ДНК та зниження життєздатності оваріальних клітин. Також встановлено зниження експресії генів HAS2, COX2 та GREM1 у кумулюючих клітинах. За сучасними уявленнями, рівень експресії окремих генів у фолікулярних

(зокрема кумулюючих) клітинах є важливим молекулярним маркером для оцінки якості ооцитів, що відіграє важливу роль у відборі якісного матеріалу з метою екстракорпорального запліднення (Шепель та ін., 2015; Turathum et al., 2021). Отримані результати доповнюють та розширюють раніше опубліковані дані, отримані у нашому відділі (Литвиненко А.П.), зокрема щодо впливу ІК-ушкодження на скоротливість гладенької мускулатури (Литвиненко, 2015), а також узгоджуються з даними про прогностичну цінність експресії цих генів у фолікулах людини (Faizal et al., 2024).

Отже, застосовані та розроблені моделі адекватно відтворюють основні механізми ушкодження клітин за умов надмірної активації імунної відповіді та дають змогу встановити взаємозв'язок між порушенням інтегральної цілісності геному, загибеллю клітин та змінами репродуктивної функції. Модель ІК-ушкодження є найбільш фізіологічно обґрунтованою для вивчення генотоксичних змін в оваріальних клітинах та порушення їх функціональної активності, оскільки в ній задіяні судинно-імунні механізми, які безпосередньо впливають на стан яєчника. Водночас використання Кон А і ЛПС дозволяє порівняти ефекти запальних стимулів із різними механізмами імунної активації. Сукупність отриманих результатів у використаних моделях створює основу для передклінічного тестування нових терапевтичних підходів, спрямованих на корекцію надмірної імунної активації та пов'язаних із нею порушень репродуктивної функції.

З'ясування ролі ПАРП-1 у розвитку експериментального імуноопосередкованого ушкодження за різних механізмів імунної активації.

Збереження інтегральної цілісності геному відіграє ключову роль у підтриманні життєздатності та нормального функціонального стану імунних та оваріальних клітин, тоді як тривале пошкодження ДНК, зокрема одониткові розриви (ОНР), викликані оксидативним/нітрозативним стресом

(АФК/АФН) у моделях імуноопосередкованого ушкодження (БСА, ЛПС, Кон А), сприяє розвитку мутагенезу, хромосомних перебудов та клітинної загибелі, що асоціюється з розвитком імунних та репродуктивних дисфункцій (Shi et al., 2023; Gao et al., 2023; Liang et al., 2023; Caldecott, 2024; Bednarski & Sleckman, 2019). Одним із ключових сенсорів таких ушкоджень є фермент ПАРП-1, який розпізнає ОНР, синтезуючи полі(АДФ-рибозу) з НАД⁺, модифікуючи гістонові та негістонові білки, чим регулює важливі внутрішньоклітинні процеси репарації ДНК, ремоделювання хроматину та транскрипційну активність клітин (Bai et al., 2015). Крім того, ПАРП-1 виступає коактиватором прозапальних транскрипційних факторів (NF-κB, AP-1), підсилюючи тим самим експресію генів, залучених до формування та підтримання імунної відповіді та запалення (Boesten et al., 2013). Саме подвійна роль ферменту ПАРП-1, як учасника репарації ДНК і як регулятора запальної відповіді, визначає його важливу роль у регуляції клітинних процесів за умов імуноопосередкованого ушкодження.

На першому етапі дослідження було проведено оцінку дозозалежної дії інгібітора ПАРП-1 - 4-ГК у дозах 50, 100 та 150 мг/кг за умов імуноопосередкованого ушкодження печінки мишей. Застосування декількох доз інгібітора дало змогу порівняти вираженість його ефектів та визначити найбільш ефективну дозу для подальших експериментальних досліджень. Вибір діапазону доз зумовлений тим, що ефективність інгібіторів ПАРП може істотно варіювати залежно від типу патології, ступеня ушкодження тканин та рівня імунореактивності експериментальної моделі (Curtin & Szabo, 2020; Berger et al., 2018). Отримані результати показали, що максимальний цитопротективний ефект 4-ГК спостерігався при застосуванні менших із досліджених доз, 50 та 100 мг/кг. За цих умов відзначалося суттєве зниження рівня малонового діальдегіду (МДА) у тканині печінки, який є загальноприйнятим маркером інтенсивності ПОЛ та оксидативного стресу.

Зменшення вмісту МДА свідчить про зниження інтенсивності пероксидного ушкодження фосфоліпідів клітинних мембран. Під час оцінки життєздатності та загибелі імунокомпетентних клітин встановлено, що застосування інгібітора 4-ГК у досліджених дозах (50, 100 та 150 мг/кг) сприяло нормалізації показників некротичної загибелі клітин. Зокрема, відсоток некротичних ІКК у тварин, яким вводили 4-ГК на фоні дії КонА, практично не відрізнявся від відповідного показника у контрольній групі. Разом з тим, відсоток клітин із ознаками апоптозу залишався вищим за контрольні значення, що може свідчити про зсув механізмів клітинної загибелі у бік програмованих форм. Такі зміни розглядаються як більш фізіологічний шлях елімінації ушкоджених клітин порівняно з некрозом. Максимальна досліджена доза 4-ГК (150 мг/кг) не супроводжувалася зниженням рівня МДА у тканині печінки, що може свідчити про відсутність додаткового антиоксидантного ефекту при подальшому підвищенні дози інгібітора. Подібний характер дозової залежності може бути пов'язаний із багатофункціональною роллю ПАРП-1 у клітині. Цей фермент бере участь не лише у репарації ДНК, але й у регуляції експресії генів, клітинної проліферації, диференціації, організації хроматину та цитоскелету (Curtin & Szabo, 2020; Berger et al., 2018). Тому використання високих доз інгібіторів ПАРП-1 може надмірно пригнічувати активність цього ферменту та порушувати нормальні регуляторні процеси клітини, що частково знижує цитопротективний ефект. Не можна також виключати певний токсичний вплив високих доз 4-ГК.

Таким чином, отримані результати свідчать, що оптимальний цитопротективний ефект інгібітора ПАРП-1 у досліджених експериментальних умовах досягається за умов помірного зниження його активності, тоді як надмірне блокування може супроводжуватися зменшенням вираженості протективного ефекту. Подібний характер відповіді узгоджується з описаною у літературі U-подібною дозовою залежністю, притаманною

деяким регуляторним ферментним системам, коли як недостатній, так і надмірний рівень інгібування може знижувати вираженість протективного ефекту (Maynard, 2011).

За умов надмірного оксидативного стресу гіперактивація ПАРП-1 призводить до виснаження внутрішньоклітинних запасів НАД⁺ та АТФ, індуюючи клітинну загибель за прозапальним імуногенним некротичним типом та посилюючи клітинне ушкодження. Саме цей тип клітинної загибелі переважав у наших експериментальних моделях імуноопосередкованого ушкодження (БСА, ЛПС). На сьогодні цей процес часто асоціюють із партанатозом - формою регульованої некротичної клітинної загибелі, яка супроводжується транслокацією AIF із мітохондрій до ядра та посиленням запальної відповіді (Kang et al., 2022; Moura et al., 2024). Паралельно ПАРП-1 залучений до регуляції сигнальних шляхів NF-κB та AP-1, підтримуючи тривалість активації клітин вродженого й адаптивного імунітету (Pazzaglia & Pioli 2019; Lu et al., 2024). Фармакологічне чи генетичне інгібування ПАРП-1 зменшує вираженість запальних процесів і некрозу у моделях імуноопосередкованих патологій, таких як експериментальний аутоімунний енцефаломієліт, ревматоїдний артрит, аутоімунний нефрит, прееклампія, цукровий діабет 1 типу, септичний шок, хвороба Крона, системний червоний вовчак, нейродегенеративні захворювання, серцева недостатність та порушення репродуктивної функції (Wang et al., 2022; Ahmad et al., 2014; Walsh et al., 2012; Alves-Lopes et al., 2025; Pazzaglia & Pioli, 2019). Однак роль ПАРП-1 у моделях імунокомплексного ушкодження (БСА), ЛПС-ендотоксемії та Кон А-гепатиту, а також його вплив на репродуктивну функцію залишаються недостатньо вивченими. Поодинокі експериментальні дані свідчать, що інгібітори ПАРП-1 зменшують вираженість запалення та некротичного ушкодження у Кон А- та ЛПС-моделях (Wardi et al., 2018; Xue et al., 2021), проте їхній вплив на ДНК-ушкодження, процеси репарації, типи

клітинної загибелі та функціональний стан імунокомпетентних та оваріальних клітин потребує подальшого уточнення.

В дослідях *in vivo* ми дослідили вплив інгібіторів ПАРП-1 різної специфічності (4-ГК та 3-АБА) на ушкодження ДНК і життєздатність клітин тимусу та лімфовузлів у моделях БСА, Кон А і ЛПС. У всіх використаних моделях застосування інгібіторів ПАРП-1 показало односпрямовану цитопротективну дію, що проявлялося зниженням індексу ДНК-комет та відсотка клітин із тяжкими ДНК-ушкодженнями, підтверджуючи їх ефективність у корекції генотоксичного стресу. Слід відзначити, що застосування 4-ГК демонструвало вищу цитопротективну ефективність порівняно з 3-АБА, вірогідно, завдяки більшій селективності щодо ПАРП-1. Важливо акцентувати, що пригнічення ПАРП-1 сприяло зменшенню відсотка клітин із надмірним ушкодженням ДНК, яке асоціюється з низькою репаративною спроможністю та підвищеною імовірністю некротичного шляху клітинної загибелі (Грушка та ін., 2014; Grushka et al., 2019; Грушка, 2025). Загальновідомо, що ПАРП-1 визначає подальший шлях клітини при ушкодженні ДНК, або виживання (через репарацію) або загибель (апоптоз, некроз чи інші форми клітинної смерті). За умов помірного генотоксичного стресу активація ПАРП-1 сприяє репараційним процесам, тоді як при інтенсивному ушкодженні ДНК гіперактивація цього ферменту призводить до виснаження енергетичних ресурсів клітини (НАД⁺ і АТФ), порушення процесів репарації та зміщення механізмів клітинної загибелі у бік прозапального некротичного типу (Jog & Caricchio, 2013; Bai et al., 2015; Moura et al., 2024). Відповідно, інгібування ПАРП-1 може зменшувати некротичну загибель клітин, що було показано у всіх досліджених нами експериментальних моделях імуноопосередкованого ушкодження *in vivo*. Інгібітори 4-ГК та 3-АБА проявляли виражену цитопротективну дію, зменшуючи відсоток некротично загиблих клітин, як в імунокомпетентних

клітин (тимуса, лімфовузлів), так і в клітинах ушкоджених органів, що підкреслює їх роль у запобіганні імуногенній некротичній загибелі. Відсоток апоптозу при цьому вірогідно не змінювався, що є важливим для елімінації активованих імуноцитів та фізіологічного завершення запальної реакції (Макогон та ін., 2015; Грушка, 2017; Grushka et al., 2019). Ми вважаємо, що зменшення імуногенної прозапальної некротичної загибелі при інгібуванні ПАРП-1 можна розглядати як один із ключових механізмів протективної дії інгібіторів цього ферменту за умов імуноопосередкованого ушкодження. Це має важливе значення з точки зору перспективи терапевтичного застосування інгібіторів ПАРП-1, оскільки апоптоз клітин вродженого та адаптивного імунітету є гомеостатичним процесом, спрямованим на обмеження імунних і запальних реакцій шляхом елімінації активованих імуноцитів, і має підтримуватися на адекватному рівні, тоді як некротична загибель клітин розглядається як один із провідних механізмів посилення та хронізації запальних і аутоімунних захворювань. Крім того, антинекротична дія інгібіторів ПАРП-1 становить особливий інтерес, оскільки, за результатами наших досліджень, посилення некротичної загибелі імунокомпетентних та оваріальних клітин є одним з важливих механізмів розвитку імуноопосередкованих захворювань. Поряд із прозапальною дією некрозу, вивільнення через ушкоджену плазматичну мембрану внутрішньоклітинних антигенів, до яких імунна система не має толерантності, у поєднанні з підвищеним синтезом цитокінів активованими імуноцитами може призводити до надмірної імунної відповіді та хронізації патологічного процесу.

Вплив інгібіторів ПАРП-1 на ушкодження ДНК і загибель лімфоцитів за умов оксидативного стресу in vitro.

Щоб оцінити безпосередній цитопротективний ефект інгібіторів ПАРП-1, ми змоделювали оксидативне ушкодження лімфоцитів in vitro шляхом

впливу H_2O_2 та гіпохлорит-іону (HOCl/OCl^-). У нашому дослідженні використовували лімфоцити, оскільки їх функціональний стан і загибель істотно впливають на перебіг і результати імунопосередкованих захворювань. Крім того, ці клітини активно інфільтрують зону запалення та зазнають дії високих концентрацій оксидантів. H_2O_2 та HOCl фізіологічно утворюються в процесі киснезалежного метаболізму активованих клітин вродженого імунітету за участю NADPH-оксидази та мієлопероксидази, забезпечуючи бактерицидну дію, однак їх надлишкова продукція призводить до ушкодження клітин та може сприяти розвитку імунозапальних процесів (Muralidharan & Mandrekar, 2013; Davies & Hawkins, 2020). Попередні *in vitro* дослідження показали, що інгібітори ПАРП-1 чинять цитопротективну дію переважно в моделях H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу, тоді як дані щодо дії HOCl залишаються обмеженими. У моделях H_2O_2 -індукованого оксидативного стресу насамперед показано зниження клітинної загибелі, тоді як вплив на рівень ушкоджень ДНК може відрізнятися залежно від експериментальної моделі та часу інкубації (Erdélyi et al., 2013; Smith et al., 2016; Cheong et al., 2024).

Як показано методом ДНК-комет, інкубація лімфоцитів в середовищі з H_2O_2 або OCl^- призводила до підвищення індексу ДНК-комет та до значного збільшення кількості клітин з високим рівнем розривів ДНК, що свідчить про виражений генотоксичний стрес клітин. За даних експериментальних умов спостерігалось зниження життєздатності лімфоцитів, зумовлене підвищенням рівня як апоптозу, так і некрозу. Преінкубація клітин з інгібіторами ПАРП-1 3-АБА або 4-ГК супроводжувалася вираженим цитопротективним ефектом, який проявлявся зменшенням індукованої оксидантами некротичної загибелі без суттєвого впливу на рівень апоптозу. Обидва інгібітори, 3-АБА і 4-ГК, достовірно зменшували індекс ушкодження ДНК та відсоток клітин з вираженим ушкодженням ДНК. Таким чином інгібування ПАРП-1 сприяло

вираженому зменшенню рівня генотоксичного стресу, індукованого впливом на клітини H_2O_2 або OCl^- (Грушка та ін., 2015). Наші дані, отримані *in vitro*, свідчать, що інгібітори ПАРП-1 чинять безпосередній цитопротективний вплив на лімфоцити, і їх позитивні ефекти при запальних хворобах можуть бути опосередковані не тільки зменшенням продукції прозапальних медіаторів та послабленням активації імунних клітин *in vivo*, але й прямим захистом клітин від вираженого оксидативного ушкодження ДНК і подальшої некротичної загибелі.

Отримані результати узгоджуються з літературними даними щодо участі ПАРП-1 у механізмах оксидативно індукованої клітинної загибелі за умов дії H_2O_2 (Smith et al., 2016; Martín-Guerrero et al., 2017; Cheong et al., 2024). Водночас відомо, що вплив HOCl та утворених за його участю модифікованих біомолекул також супроводжується вираженням клітинним ушкодженням (Liu et al., 2018). Однак у більшості зазначених досліджень не аналізувалися особливості ушкодження ДНК та типи клітинної загибелі саме в лімфоцитах, зокрема співвідношення апоптозу і некрозу за умов інгібування ПАРП-1, що свідчить про недостатнє дослідження цього питання. Крім того, потрібно враховувати, що при інгібуванні ПАРП-1 у деяких експериментальних моделях може підвищуватися рівень розривів ДНК, визначених комет-тестом, тоді як клітинна загибель одночасно зменшується (Shekh et al., 2014; Smith et al., 2016). Таке розходження показників може бути пов'язане з участю ПАРП-1 у процесах репарації ДНК і свідчить про те, що рівень розривів ДНК та життєздатність клітин не завжди змінюються односпрямовано. Це не суперечить загальному цитопротективному ефекту інгібіторів ПАРП-1, але потребує обережної інтерпретації результатів тесту ДНК-комет.

Вплив інгібування ПАРП-1 на функціональну активність клітин вродженого імунітету.

Відомо, що інгібітори ПАРП знижують інтенсивність ПОЛ, активацію клітин-ефекторів запалення, їх інфільтрацію в ушкоджені тканини, а також генерацію АФК/АФН (Radovits et al., 2007; Erdélyi et al., 2013; Wardi et al., 2018; Yu et al., 2024). З огляду на вищу ефективність і селективність 4-ГК щодо ПАРП-1, нами було обрано цей інгібітор для подальшого аналізу його впливу на функціональну активність клітин вродженого імунітету за умов різних механізмів активації імунної відповіді. У наших експериментальних моделях імуноопосередкованого ушкодження застосування 4-ГК супроводжувалося зниженням функціонально-метаболічної активності нейтрофілів і макрофагів (ЛКТ, НСТ-тест), а також зменшенням рівня продуктів ПОЛ та утворенням АФК, що може пояснювати виявлену нами виражену цитопротективну дію цього інгібітора. Отримані результати свідчать, що цитопротективна дія 4-ГК *in vivo* реалізується через поєднання двох основних механізмів. По-перше, це безпосереднє зменшення генотоксичного та оксидативного стресу на клітинному рівні, ймовірно, за рахунок послаблення виснаження енергетичних ресурсів клітин при інгібуванні ПАРП-1. По-друге, це системна протизапальна дія 4-ГК на рівні організму, зумовлена зниженням активації клітин імунної системи та генерації прозапальних чинників, що може бути опосередковано пригніченням активації NF-κB.

Оскільки в наших дослідженнях ПАРП-1 виявився ключовим ферментом у клітинній відповіді на ушкодження ДНК, наступним етапом роботи стала оцінка його активації методом імуноцитохімії, а також аналіз фіксації імунних комплексів у крові та тканинах. З урахуванням того, що протективна дія 4-ГК була більш вираженою при його застосуванні в моделі БСА, саме цю модель було використано для подальшого аналізу ролі ПАРП-1 у розвитку імуноопосередкованого ушкодження. Методом імуноцитохімії

нами вперше показано підвищення активності ПАРП-1 у клітинах тимуса, лімфатичних вузлів та фолікулярних клітинах яєчника в моделі БСА, що проявлялося підвищенням СЦК полі(АДФ-рибози) у тимусі у 4,1 раза та у лімфатичних вузлах у 1,7 раза ($p < 0,001$). Інгібування ПАРП-1 за допомогою 4-ГК супроводжувалося зниженням його активності, зменшенням фіксації імунних комплексів у тканинах та нормалізацією показників лейкограми, що свідчить про важливу роль цього ферменту у розвитку імуноопосередкованого ушкодження.

Вплив інгібування ПАРП-1 на функціональний стан репродуктивної системи.

З огляду на те, що раніше було показано здатність імунних комплексів викликати порушення репродуктивної функції, особливий інтерес становило вивчення впливу інгібування ПАРП-1 на функціональний стан клітин яєчника за умов експериментального імунокомплексного ушкодження. У зв'язку з цим ми дослідили ефекти інгібітора 4-ГК на мейотичне дозрівання ооцитів, життєздатність та загибель кумулюсних клітин, а також експресію генів HAS2, COX2 і GREM1 у кумулюсних клітинах. Це дозволило комплексно оцінити вплив інгібування ПАРП-1 на ключові показники функціональної активності оваріальних клітин.

Встановлено, що застосування 4-ГК супроводжувалося підвищенням відсотка ооцитів у метафазі I-II та відновленням експресії генів HAS2, COX2 і GREM1 у кумулюсних клітинах, які є маркерами функціональної компетентності ооцитів (Shepel E et al., 2016). Це узгоджується з сучасними літературними даними, які розглядають експресію цих генів як молекулярні індикатори мейотичної зрілості та якості ембріонального розвитку (Faizal et al., 2024; Ahmad et al., 2025). Отримані результати свідчать про відновлення мейотичної зрілості ооцитів та підтверджують протективний вплив

інгібування ПАРП-1 щодо репродуктивної функції в умовах імунокомплексної патології. Ймовірно, одним із механізмів такого ефекту є зменшення генотоксичного стресу та клітинної загибелі, що підтверджується отриманими нами даними про зниження рівня ушкодження ДНК і некротичної загибелі клітин за умов інгібування ПАРП-1 у моделі БСА.

Крім того, у дослідженнях, виконаних у нашому відділі, показано, що за умов впливу БСА підвищується вміст полі(АДФ-рибози) у матці у 3,43 раза ($p < 0,001$), а також посилюється фіксація Ig у оваріальних і цервікальних відділах матки. Введення 4-ГК мало протективну дію: знижувало сумарний цитохімічний коефіцієнт (СЦК) полі(АДФ-рибози) у міометрії, зменшувало відкладання Ig в цих відділах, послаблюючи запальну відповідь (Литвиненко, 2015). Отже, інгібування ПАРП-1 зменшує генотоксичні та цитотоксичні ефекти і сприяє нормалізації показників репродуктивної системи в умовах імуноопосередкованого ушкодження, що в перспективі може підвищити ефективність допоміжних репродуктивних технологій, зокрема шляхом покращення якості ооцитів та відновлення мейотичного дозрівання, та розглядатися, як перспективний напрям фармакологічної корекції імуноопосередкованих порушень репродуктивної функції.

Отримані нами результати доповнюють та уточнюють наявні літературні дані про те, що вплив інгібіторів ПАРП на функцію яєчників залежить від умов ушкодження. У наших дослідженнях виражений протективний ефект інгібування ПАРП-1 спостерігався за умов імунокомплексного ушкодження, яке супроводжується підвищенням ушкодженням ДНК, запальними реакціями та імунними процесами. У подібних експериментальних моделях інгібітори ПАРП демонструють цитопротективні ефекти щодо оваріальної тканини, що в літературі пов'язують з антиоксидантними, протизапальними та антиапоптотичними механізмами (Li et al., 2023; Liu et al., 2024).

Особливе значення має подальше розуміння молекулярних механізмів ПАРП-1-опосередкованого ушкодження клітин, насамперед шляхів, пов'язаних з некротичною загибеллю та імунозапальними реакціями. Оскільки ПАРП-1-опосередкована некротична загибель клітин супроводжується вивільненням алармінів, зокрема HMGB1 (амфотерину), а ПАРП-1 також залучений до регуляції сигнального шляху NF-κB, цей напрям досліджень є особливо актуальним (Ditsworth et al., 2007; Fehr et al., 2020). У зв'язку з цим дослідження ролі HMGB1 у посиленні імунозапальних реакцій є важливим для розуміння механізмів імуноопосередкованого ушкодження та розробки комплексних терапевтичних стратегій.

Дослідження ролі аларміну (HMGB1) у розвитку імуноопосередкованого ушкодження.

На відміну від апоптозу, некротичний тип клітинної загибелі, який супроводжується порушенням цілісності плазматичних мембран, відіграє суттєву патогенетичну роль у розвитку імуноопосередкованих захворювань (Jog & Caricchio, 2013). Така форма загибелі клітин характеризується вираженим прозапальним ефектом, зумовленим вивільненням внутрішньоклітинного вмісту, зокрема молекул-алармінів із прозапальною активністю. Одним із ключових алармінів є HMGB1 (high mobility group box 1) який є хромосомним негістоновим білком, що у нормі виконує ядерні функції, а за умов клітинного ушкодження або некрозу діє як позаклітинний DAMP (damage-associated molecular pattern), активуючи запальну й імунну відповідь (Kang et al., 2014; Chen et al., 2022).

Інгібування HMGB1 (на рівні експресії, секреції або взаємодії з клітинними рецепторами) зменшує прозапальну активність і проявляє протективний ефект при різних патологічних станах (Bianchi et al., 2017; Liu et al., 2020; Mao et al., 2022; Ren et al., 2023).

Гліциризин, природний інгібітор HMGB1, чинить протизапальну та антиоксидантну дію і знижує тяжкість експериментальних запальних ушкоджень, що супроводжується зменшенням рівнів прозапальних цитокінів і вивільнення HMGB1 (Ren et al., 2023).

Показано, що гліциризин пригнічує активність HMGB1 та зменшує тяжкість запальних ушкоджень у експериментальних моделях системного запалення (Zhao et al., 2017). Однак, попри наявні дані про інгібування HMGB1, механізми його участі за умов надмірної імунної активації залишаються не повністю розкритими, особливо це стосується його участі в генотоксичному стресі, ушкодженні ДНК та співвідношенні апоптозу й некрозу в імунокомпетентних клітинах.

У наших дослідженнях на моделі ЛПС-індукованої ендотоксемії гліциризинат амонію (ГА) у дозах 50, 100 і 200 мг/кг знижував ушкодження ДНК лімфоцитів і тимоцитів, що проявлялося зменшенням індексу ДНК-комет і відсотка комет 3–4 класу, а також послаблював некротичну й апоптотичну загибель клітин, підвищуючи кількість життєздатних імунокомпетентних клітин (Кондрацька та ін., 2020). Ці ефекти можуть бути пов'язані з антиоксидантною дією ГА, зокрема зниженням перекисного окиснення ліпідів, рівня МДА та інтенсивності оксидативного стресу. Некротична загибель лімфоцитів сприяє вивільненню аутоантигенів, посилюючи запальні реакції, тоді як ГА обмежує ці процеси, що свідчить про його протективний потенціал у терапії захворювань, опосередкованих компонентами грам-негативних бактерій. Показано, що ПАРП-1-опосередкований некроз асоціюється з вивільненням HMGB1, тоді як позаклітинний HMGB1 здатний посилювати прозапальну сигналізацію через TLR4 та RAGE, формуючи замкнене коло імунозапального ушкодження (Kang et al., 2014; Vitali et al., 2023). Обидва чинники призводять до активації NF-κB та посилення експресії прозапальних цитокінів.

Активация NF-κB у модели Кон А-индуцированного иммуноопосредованного повреждения печени.

ПАРП-1 і HMGB1 здатні посилювати активацію транскрипційного фактора NF-κB, який є ключовим регулятором експресії прозапальних цитокінів, хемокінів, молекул адгезії та індукцйбельної NO-синтази. Показано, що інгібування ПАРП-1 супроводжується зниженням активації NF-κB та HMGB1 і зменшенням запальної відповіді (Lu et al., 2023; Vitali et al., 2023). Водночас участь цього сигнального шляху саме за умов Т-клітинного імуніопосередкованого ушкодження печінки залишається недостатньо з'ясованою.

У моделі Кон А-індукованого гепатиту встановлено, що введення Кон А спричиняє активацію NF-κB, що проявляється транслокацією p65-субодиниці з цитоплазми (де цей фактор перебуває в неактивному стані в комплексі з IκB) до ядер клітин печінки, тимусу, селезінки та лімфатичних вузлів. Наявність p65 у ядрі є прямим маркером активації NF-κB за умов Т-клітинного імуніопосередкованого ушкодження печінки.

Активацию та ядерну транслокацию p65 візуалізували та оцінювали напівкількісно методом імуноцитохімії з використанням специфічних антитіл до p65-субодиниці. Показано, що в клітинах паренхіми даного органа відбувається перехід NF-κB з цитоплазми в ядро: середній цитохімічний коефіцієнт (СЦК) забарвлення ядер гепатоцитів, викликаного фіксацією антитіл до p65-субодиниці NF-κB, підвищувався з $0,06 \pm 0,02$ в контролі до $0,42 \pm 0,09$ через 20 годин після введення Кон А, $P < 0,001$. Аналогічне зростання ядерної локалізації p65 в цей термін розвитку імунного ураження печінки виявлено також в імунокомпетентних клітинах центральних і периферичних органів імунітету.

Результати вестерн-блотингу ядерних екстрактів печінки підтвердили підвищення вмісту p65-субодиниці NF-κB у ядерній фракції клітин печінки. Аналіз часової динаміки (2, 6, 12, 20 та 48 год після введення Кон А) показав поступове зростання ядерної локалізації p65 з максимумом через 20 год після введення Кон А, що узгоджується з результатами імуноцитохімічних досліджень.

Порівняння цієї динаміки з іншими маркерами запалення (інфільтрацією нейтрофілами, підвищенням активності АЛТ, змінами лейкограми, загибеллю імунокомпетентних клітин (які починаються вже через 2–12 годин) показує, що активація NF-κB у тканині печінки відбувається пізніше і досягає піку саме на 20 год (Макогон та ін., 2012). Це дає підстави вважати, що в гепатоцитах (які становлять основну масу печінкової тканини) активація NF-κB є може бути переважно вторинною реакцією на ушкодження, а не первинним тригером запального процесу. Ймовірно, у гепатоцитах NF-κB у даному випадку може виконувати частково захисну функцію, підвищуючи їх виживання шляхом індукції антиапоптотичних генів (Kuklin et al., 2025).

Вплив інгібування ПАРП-1 на активацію NF-κB у моделі Кон А-індукованого гепатиту.

Нами досліджено вплив інгібування ПАРП-1 на активацію NF-κB у моделі Кон А індукованого гепатиту. Введення інгібітора ПАРП-1 4-ГК суттєво послаблювало Кон А-індуковану активацію NF-κB у клітинах печінки та імунокомпетентних органів. Це проявлялося зниженням ядерної локалізації p65-субодиниці за даними імуноцитохімії та її вмісту в ядерній фракції за даними вестерн-блотингу.

З огляду на відомий механізм дії ПАРП-1 як коактиватора NF-κB, таке послаблення активації цього транскрипційного фактора може призводити до зменшення експресії NF-κB-залежних прозапальних медіаторів (цитокінів,

хемокінів, iNOS, COX-2, ICAM-1) (Hassa et al., 2001; Hu et al., 2025). Це узгоджується з даними літератури про протизапальну дію інгібіторів ПАРП-1 у моделях імуноопосередкованого ушкодження печінки (Wardi et al., 2018).

Отримані нами результати на моделі Кон А-індукованого гепатиту підтверджують сучасні уявлення про ПАРП-1 та NF-κB-опосередковані механізми розвитку запалення (Hu et al., 2025). За даними сучасних досліджень, між активацією ПАРП-1 та NF-κB існує тісний функціональний зв'язок при запальних та імунних процесах. ПАРП-1 виступає як транскрипційний коактиватор NF-κB, посилюючи синтез прозапальних молекул, зокрема IL-1, IL-6, IL-8, TNF-α, IFN-γ, ICAM-1, селектини, MIP-1, MIP-2, iNOS та COX-2 (Hassa et al., 2001; Hu et al., 2025). Це створює позитивний зворотний зв'язок через NF-κB-опосередковану експресію iNOS, що сприяє посиленню оксидативного та нітрозативного стресу.

Вплив інгібіторів NF-κB (андрографоліду та куркуміну) на перебіг Кон А-індукованого гепатиту.

З огляду на роль ПАРП-1 як коактиватора NF-κB та його ключову участь у патогенезі імуноопосередкованих ушкоджень, підтверджену в нашій моделі, наступним етапом стало дослідження ефектів прямого інгібування NF-κB. Для цього було застосовано андрографолід - специфічний інгібітор NF-κB, а також куркумін, який чинить багатоспрямований протизапальний вплив, зокрема через модуляцію активності NF-κB та інших сигнальних шляхів.

Протективна дія інгібіторів активації NF-κB рослинного походження продемонстрована при різних імунозапальних та автоімунних патологіях, таких як множинний склероз, хвороба Крона, ревматоїдний артрит, хвороба Альцгеймера (Li et al., 2022; Elbini-Dhouib et al., 2022; Zeng et al., 2022). Однак даних відносно застосування цих засобів при імуноопосередкованих захворюваннях печінки на сьогодні недостатньо.

Отриманими результатами нашої групи встановлено, що введення АНД (100 мг/кг) на тлі КонА-індукованого гепатиту призводило до зменшення транслокації NF-κB в ядра клітин печінки. Під впливом використаного інгібітора спостерігалось суттєве зниження апоптозу і некрозу клітин тимусу. Отримані дані свідчать про участь NF-κB в формуванні запальної відповіді за умов імунного ушкодження печінки Т-клітинного генезу, а також про виражену протизапальну дію андрографоліду як інгібітора активації цього транскрипційного фактора (Макогон та ін., 2012). Застосування куркуміну як блокатора NF-κB також призводило до зниження КонА-індукованої загибелі ІКК. Це свідчить про те, що NF-κB бере участь у механізмах підсилення клітинної загибелі, зокрема некротичної, за умов розвитку Кон А-індукованого імунозапального процесу (Макогон та ін., 2009).

Куркумін і АНД пригнічують активацію NF-κB різними молекулярними механізмами. Зокрема, куркумін блокує деградацію IκBa (інгібітора, зв'язаного з NF-κB в цитоплазмі клітини), що перешкоджає транслокації NF-κB у ядро (ELBini-Dhouib et al., 2022). Натомість АНД ковалентно модифікує відновлений цистеїн субодиниці p50 NF-κB, унаслідок чого блокується зв'язування цього транскрипційного фактора з ДНК (Li et al., 2022). Таким чином, пригнічення NF-κB різними за механізмом дії сполуками супроводжувалося односпрямованим зменшенням вираженості імунозапального ушкодження за умов КонА-індукованого Т-клітинного запального процесу.

Аналіз наших даних, отриманих при застосуванні двох інгібіторів активації NF-κB, що відрізняються за механізмом дії, свідчить, що в посиленні як апоптотичної, так і некротичної загибелі ІКК за умов розвитку КонА-індукованого запального процесу в печінці задіяні NF-κB-опосередковані механізми. Отримані результати не лише підтверджують ключову роль NF-κB у регуляції клітинної загибелі при імуніопосередкованому ушкодженні, але й

доповнюють сучасні літературні дані, розширюючи уявлення про участь цього транскрипційного фактора саме в механізмах Т-клітинного ураження печінки в моделі КонА-індукованого автоімунного гепатиту (Liu et al., 2022, Zhao et al., 2024).

Застосування інгібіторів ПАРП-1 (4-ГК) та NF-κB (андрографолід, куркумін) у моделі Кон А-гепатиту підтвердило головну роль NF-κB-опосередкованих процесів у розвитку некротичної й апоптотичної загибелі імунокомпетентних клітин, а також продемонструвало виражену протизапальну дію використаних сполук. Зокрема, андрографолід зменшував розвиток некротичної загибелі клітин, клітинну інфільтрацію та інтенсивність запального процесу, тоді як куркумін переважно послаблював NF-κB-залежну прозапальну відповідь і знижував загибель гепатоцитів, чинячи виражений цитопротективний ефект. Отримані результати щодо захисної дії куркуміну та андрографоліду при імунному ушкодженні печінки свідчать про перспективність їх використання при аутоімунному гепатиті та інших формах імуноопосередкованого ушкодження печінки.

Оскільки нами було показано, що надмірна активація ПАРП-1 посилює запальні процеси через активацію NF-κB, а його фармакологічне інгібування призводить до зниження ядерної локалізації p65-субодиниці та послаблення NF-κB-залежних патологічних ефектів, це супроводжується зменшенням ушкодження клітин та вираженості імуноопосередкованої клітинної загибелі. З огляду на те, що оксидативний стрес є одним із провідних факторів клітинного ушкодження при імуноопосередкованих ушкодженнях, перспективним напрямом може бути вивчення природних антиоксидантів, синтетичних сполук та біоміметичних наноматеріалів, здатних модулювати окисно-відновний баланс і сигнальні шляхи запалення.

Вплив імуномодуляторів: антиоксидантних речовин та наноструктурованих сполук на функціональний стан імунокомпетентних клітин та оваріальних клітин за умов моделювання імуноопосередкованого ушкодження.

Оксидативний стрес залучений у розвитку репродуктивних розладів у жінок. За фізіологічних умов баланс між генерацією АФК та системами антиоксидантного захисту забезпечує належне функціонування репродуктивної системи. Надмірна генерація АФК призводить до порушення окисно-відновного балансу, ушкодження клітинних структур (ДНК, ліпідів, білків) в ооцитах, гранульозних клітинах, ендометрії та плаценті, що, у свою чергу, порушує процеси овуляції, імплантації та розвитку плода, а також сприяє розвитку системного запалення й ендотеліальної дисфункції (Begum, 2025, Daraghmeh et al., 2025).

З огляду на це, дослідження механізмів оксидативного стресу та пошук ефективних антиоксидантних стратегій залишається одним із перспективних напрямів профілактики та корекції цих репродуктивних ускладнень. Антиоксиданти здатні захищати клітини від продуктів ПОЛ, зберігаючи структурно-функціональну цілісність мембран та обмежуючи ступінь ушкодження, що робить їх перспективними засобами терапії імуноопосередкованих захворювань (Agarwal et al., 2012; Shang et al., 2024; Begum, 2025, Daraghmeh et al., 2025, Huang et al., 2025).

ДНК усіх живих організмів постійно зазнає ушкоджень під впливом ендогенних реактивних молекул, переважно продуктів мітохондріального дихання, а також екзогенних факторів фізичної, хімічної та біологічної природи, зокрема ультрафіолетового та іонізуючого випромінювання, важких металів, атмосферних забруднювачів, хіміотерапевтичних препаратів і імуноопосередкованих запальних реакцій. Накопичення стійких ушкоджень ДНК може призводити до мутагенезу та грубих хромосомних перебудов, а

нестабільність геному сприяє процесам старіння й розвитку вікових захворювань. Крім того, ушкодження ДНК активує клітинні сигнальні та стрес-відповіді, які можуть бути залучені до розвитку імуноопосередкованих процесів, зокрема хронічного системного запалення (Срібна та ін., 2016, Liu N et al., 2024, Ayna et al., 2025).

У наших дослідженнях застосування антиоксидантів та наноструктурованих сполук, таких як нанометали, продемонструвало виражений цитопротективний ефект. Використані препарати в різних експериментальних моделях зменшують рівень оксидативного стресу та ушкодження ДНК імунокомпетентних та оваріальних клітин (Срібна., 2016), що узгоджується з сучасними даними про антиоксидантні властивості наноструктурованих сполук, які розглядають як окремий напрям розвитку антиоксидантної терапії, зокрема так зване «четверте покоління» антиоксидантів для захисту організму (Shah et al., 2022). Отримані результати вказують на перспективність подальших досліджень антиоксидантних та наноструктурованих сполук як потенційних засобів корекції порушень функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов імуноопосередкованого ушкодження. (Xu L et al., 2020; Eker et al., 2025).

Етилметилгідроксипіридин сукцинат (ГС) і кверцетин є антиоксидантами з мембранопротекторними властивостями. ГС активує енергетичний обмін у мітохондріях, підвищує активність антиоксидантних ферментів, інгібує синтез тромбоксану A_2 та лейкотрієнів і посилює синтез простагліну, що зумовлює його нейропротекторну, антигіпоксичну та антистресорну дію. Крім того, ГС модулює систему оксиду азоту, впливаючи на Ca^{2+} -транспортувальні системи клітинних мембран, саркоплазматичного ретикулуму і мітохондрій, підвищуючи проникність сарколеми для Ca^{2+} і активуючи Na^+ , K^+ -АТФ-азу (Gupta et al., 2022; Belenichev et al., 2025).

Кверцетин є одним із найбільш вивчених представників флавоноїдів - низькомолекулярних поліфенольних сполук природного походження з вираженими антиоксидантними властивостями. Він здатний нейтралізувати АФК, модулювати сигнальні шляхи відповіді на ушкодження ДНК і впливати на системи її репарації, сприяючи збереженню структурної цілісності геному. Оскільки підтримання цілісності ДНК є критично важливим для клітинного гомеостазу, кверцетин розглядається як перспективний засіб профілактики генотоксичних ушкоджень. Крім того, кверцетин знижує рівень оксидативного стресу шляхом інгібування продукції АФК, прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-6) та індукцйбельної NO-синтази (iNOS), а також чинить протективний вплив на шляхи клітинної загибелі за умов запального процесу (Li et al., 2016; Aggarwal et al., 2025). Попри значну кількість експериментальних даних щодо антиоксидантних і цитопротективних властивостей ГС і кверцетину, їх вплив на збереження структурної цілісності ДНК *in vivo*, зокрема у клітинах імунної системи, залишається недостатньо з'ясованим. Зокрема, здатність цих сполук запобігати ушкодженню ДНК у клітинах тимуса та лімфатичних вузлів за умов системної ендотоксемії потребує подальшого дослідження.

В нашій роботі нами вперше показано, що введення ГС у контрольних умовах, без надмірної активації імунної відповіді, не призводить до ушкодження ДНК імунокомпетентних клітин та не чинить пошкоджувального впливу на оваріальні клітини. Водночас у клітинах репродуктивної системи та тимуса відзначалося підвищення відсотка клітин із 2-м класом ушкодження відповідно у 2,0 та 1,7 раза, що свідчить про помірні структурні зміни без розвитку вираженого генотоксичного ефекту.

За умов імунізації БСА введення ГС супроводжувалося зменшенням ступеня ушкодження ДНК в усіх досліджуваних тканинах. Зокрема, відсоток клітин 4-го класу з максимальним ушкодженням ДНК в оваріальних клітинах,

клітинах тимуса та лімфатичних вузлів зменшувався відповідно у 3,6; 2,6 та 1,7 рази. Одночасно зростав відсоток клітин 0–1-го класу, що характеризуються відсутністю або мінімальним ушкодженням ДНК, відповідно у 2,0; 7,0 та 2,2 рази (Срібна та ін., 2016). Крім того, в моделі імунотоксичного ушкодження введення ГС сприяло підвищенню відсотка клітин, здатних до відновлення мейозу на стадії метафази I ($p < 0,05$) та формування першого полярного тільца на стадії метафази II ($p < 0,05$). Одночасно зростав відсоток життєздатних кумулюючих клітин і зменшувався відсоток клітин з ознаками некрозу, тоді як достовірного впливу на рівень апоптозу не виявлено. Також відзначено підвищення експресії мРНК генів COX2 та Grem1.

Отже, встановлено, що введення ГС в умовах системного імунотоксичного ушкодження сприяє нормалізації процесів оогенезу та значному підвищенню життєздатності кумулюючих клітин, що проявляється зменшенням некротичної загибелі. Ми припускаємо, що виявлений позитивний ефект препарату може бути пов'язаний із його стимулюючим впливом на комплекс II дихального ланцюга мітохондрій, що супроводжується активацією їх енергетичного метаболізму. За даними літератури, одним із можливих механізмів протективної дії ГС є NO-залежна регуляція кальцієвого гомеостазу, що узгоджується з його антиоксидантними та цитопротективними властивостями, де мітохондрії відіграють центральну роль у регуляції активних форм кисню та кальцієвого балансу, визначаючи їх участь у запобіганні клітинному ушкодженню та загибелі клітин (Belenichev et al., 2025). Наші результати доповнюють і розширюють дані про цитопротективний ефект ГС у клітинах імунних та репродуктивних органів за умов імунотоксичного ушкодження.

В наших дослідженнях вперше показано, що кверцетин запобігає порушенню інтегральної цілісності геному. Після введення ЛПС відзначали

значне підвищення рівня одноланцюгових ушкоджень ДНК у клітинах лімфатичних вузлів та тимуса, тоді як застосування кверцетину за цих умов запобігало розвитку цих ушкоджень. Так, у клітинах лімфовузлів відсоток неушкоджених клітин (0-1 класу) зростав в 1,7 рази, тоді як відсоток клітин із тяжкими ушкодженнями (3 та 4 класу) відповідно зменшувалася в 3,8 та 4 рази. Вплив кверцетину на тимоцити характеризувався більш вираженим позитивним ефектом: відсоток неушкоджених клітин (0-1 класу) також збільшувався в 1,7 рази, тоді як відсоток клітин із тяжкими ушкодженнями (3-го та 4-го класів) зменшувався відповідно у 10 та 6,6 рази. Крім того, профілактичне введення кверцетину запобігало загибелі клітин лімфатичних вузлів, що проявлялося зниженням рівнів як апоптозу, так і некрозу. Подібна тенденція спостерігалася і в тимоцитах за умов ендотоксемії, індукованої ЛПС, де застосування антиоксиданту супроводжувалося зменшенням як загибелі за апоптотичним шляхом, так і за некротичним (Грушка та ін., 2026). Одним із можливих механізмів цитопротективної дії кверцетину є його здатність пригнічувати запальні сигнальні шляхи. Встановлено, що при дії кверцетину, у макрофагах зменшується експресія індукцйбельної синтази оксиду азоту (iNOS) та циклооксигенази-2 в умовах запалення, індукованого ЛПС (Endale et al., 2013).

Необхідно відзначити, що у групі тварин, які отримували кверцетин у профілактичному режимі без введення ЛПС (та сама доза, що й у групі з ЛПС), спостерігалось незначне підвищення рівнів клітинної загибелі: апоптозу на 1,26 %, некротичних змін на 3,88 % порівняно з групою контролю з введенням фізіологічного розчину. Ця різниця є статистично незначущою та не впливає на інтерпретацію основних результатів експерименту. Водночас, вона узгоджується з відомими даними про подвійну природу кверцетину. Кверцетин і його метаболіти здатні проявляти як антиоксидантні, так і прооксидантні властивості. При високих концентраціях або в умовах

підвищеної генерації АФК він може проявляти прооксидантну дію через автокаталітичне окиснення до о-семіхінону та о-хінону з подальшою генерацією АФК та порушенням функції мітохондрій (Metodiewa et al., 1999; Li et al., 2025). Це пояснює можливе незначне підвищення загибелі клітин навіть у відсутності додаткового стресового фактора (ЛПС).

Таким чином нами вперше показано, що профілактичне введення кверцетину ефективно знижує рівень ендотоксин-індукованих ушкоджень ДНК у клітинах тимуса та лімфатичних вузлів, сприяє збереженню геномної стабільності, а також достовірно зменшує апоптоз і некроз імунокомпетентних клітин за умов ушкодження, викликаного ЛПС. Отримані результати узгоджуються з даними інших досліджень, які демонструють, що кверцетин захищає лімфоцити від окисного пошкодження ДНК через активацію Nrf2/HO-1 шляху та інгібує прозапальні сигнальні шляхи в моделях ЛПС-індукованого запалення (Cheng et al., 2024; Xu J. et al., 2024; Li et al., 2025). Також встановлено, що кверцетин ефективно модулює прозапальні шляхи (TLR4/NF- κ B/NLRP3), зменшуючи інтенсивність запальної відповіді та покращуючи функціональний стан тканин у моделях ЛПС-індукованого ушкодження (Zhang et al., 2022). Оскільки ІКК мають високу чутливість до дії АФК, наші результати підкреслюють важливість збереження структурної цілісності ДНК як одного з основних механізмів підтримки імунного гомеостазу в умовах запалення. Отже, кверцетин може розглядатися як ефективний засіб профілактики та корекції імуноопосередкованих ушкоджень, асоційованих з ендотоксемією та системним запаленням.

Сучасні фармакологічні розробки у галузі нанотехнологій спрямовані на створення покращених лікарських форм для біомедичного застосування, з урахуванням їх універсальних фізико-хімічних властивостей. Досягнення нанобіотехнологій істотно вплинули на медицину та ветеринарію, де наноматеріали вже застосовують для діагностики й лікування захворювань

різної етіології. У нанофармакології нанопрепарати розглядають як нові лікарські засоби, переносники діючих речовин або як компоненти комбінованих терапевтичних систем, що можуть утворювати комплекси з традиційними ліками та забезпечувати краще проникнення і тривалішу дію (Mieszawska et al., 2013; Pondman et al., 2022).

Серед різних наноматеріалів особливо перспективними вважають наночастинки металів, зокрема НЧС, які мають широке біомедичне застосування завдяки антимікробним, протизапальним та терапевтичним властивостям (Abbas et al., 2024, Eker et al., 2024). НЧС зазвичай мають розмір від 1 до 100 нм, і саме розмір є одним із основних параметрів, який визначає їх біологічну активність та ефективність у біомедичних застосуваннях. Менші частинки (приблизно 13–40 нм) проявляють виражену антимікробну дію завдяки більшій питомій поверхні та інтенсивнішій взаємодії з клітинними мембранами. Більші частинки (понад 50–100 нм) можуть демонструвати нижчу антимікробну активність, при цьому їх біологічні властивості значною мірою залежать від фізико-хімічних характеристик і способу стабілізації. Таким чином, правильний підбір розміру НЧС має важливе значення для їх ефективного використання в конкретних біомедичних цілях, зокрема при створенні антимікробних покриттів, протизапальних засобів і систем доставки ліків (Eker et al., 2024; Abbas et al., 2024). НЧС можуть модулювати продукцію цитокінів, зокрема впливати на рівні TNF- α , IL-12 та IL-2. Такий ефект пов'язують із впливом НЧС на внутрішньоклітинні сигнальні шляхи, залучені до регуляції запальної та імунної відповіді, а також з активацією окисно-відновних процесів у клітині (Ninan et al., 2020). Виходячи з цього НЧС розглядають як перспективний засіб для корекції запальних і імунозалежних захворювань. Однак останніми роками дедалі більше уваги приділяють потенційній генотоксичності наночастинок, пов'язаній з АФК-

опосередкованим ушкодженням ДНК, особливо щодо клітин імунної та репродуктивної систем.

У літературі наведено дані про здатність наночастинок індукувати окисне ушкодження шляхом надмірної генерації АФК, змінювати активність антиоксидантних ферментів, впливати на експресію генів, пов'язаних із регуляцією клітинної життєздатності, та порушувати структуру і функцію клітин. Зокрема, показано ушкодження ДНК та зміни життєздатності імунних клітин (лімфоцитів та мононуклеарних клітин периферичної крові) (Babonaité et al., 2024), а також фолікулярну атрезію, порушення клітинної життєздатності та гормональні зміни в жіночій репродуктивній системі (Mohamed et al., 2022; Aloisi et al., 2022; Samrot et al., 2023). Однак молекулярні механізми впливу НЧ залишаються недостатньо з'ясованими, особливо в імунній та репродуктивній системах. Унікальні фізико-хімічні властивості НЧС (малий розмір, висока хімічна активність і стабільність) зумовлюють як їх біомедичну ефективність, так і потенційні ризики. Їх біологічна дія може включати розвиток окисного стресу, генотоксичні ефекти та порушення клітинного гомеостазу, причому її вираженість значною мірою залежить від дози, режиму введення, клітинного мікросередовища та патологічного стану організму. Незважаючи на багатообіцяючий потенціал НЧС у біології та медицині, їх вплив на функціональний стан імунокомпетентних і оваріальних клітин залишається недостатньо вивченим.

Нашими попередніми дослідженнями показано, що багаторазове введення наночастинок срібла (НЧС) у дозах 2 та 4 мг/кг має дозо- та режим-залежний негативний вплив на репродуктивні показники у здорових мишей. Зокрема, десятиразове введення НЧС призводило до пригнічення мейотичного дозрівання ооцитів, тоді як одно- та п'ятиразове введення супроводжувалося змінами життєздатності клітин фолікулярного оточення, зокрема збільшенням частки клітин з ознаками апоптозу. При багаторазовому введенні також

спостерігалися зміни співвідношення живих, апоптотичних і некротичних клітин фолікулярного оточення ооцитів та підвищення індексу скоротливості матки. Водночас достовірних змін показників ембріональної смертності не виявлено (Lytvynenko et al., 2017).

В той же час, на моделі експериментального гломерулонефриту, внутрішньовенне введення НЧС (2 мг/кг) сприяло зменшенню ушкодження ДНК у клітинах тимусу, лімфатичних вузлів та клітин фолікулярного оточення ооцитів за рахунок зниження відсотка клітин з високим ступенем пошкодження ДНК (3-го та 4-го класів) і збільшення відсотка клітин без ушкоджень або з їх низьким рівнем (Вознесенська et al., 2018). Крім того, у цій моделі НЧС сприяли збільшенню кількості ооцитів, що відновлювали мейоз *in vitro*, що свідчить про модулюючий ефект НЧС, залежний від функціонального стану організму та характеру патологічного процесу (Blashkiv et al., 2018).

Беручи до уваги отримані раніше результати, нами на моделі системного імунотоксичного ушкодження, індукованого БСА, досліджено вплив НЧС на морфотоксичні особливості імунотоксичних і оваріальних клітин у самиць мишей. Встановлено, що в умовах моделювання системного імунотоксичного ушкодження (БСА) введення НЧС сприяло збільшенню кількості ооцитів, що відновлювали мейоз (стадія метафази I) та формували перше полярне тільце (стадія метафази II), а також покращенням показників життєздатності клітин фолікулярного оточення. Одночасно спостерігалось підвищення рівня експресії мРНК генів HAS2, COX2 та GREM1 у кумулюючих клітинах, а саме: експресія HAS2 мРНК збільшувалась в 1,65 раза, COX2 - в 1,24 раза, GREM1 - в 1,9 раза (Срібна та ін., 2018). Аналіз ДНК-комет у клітинах тимусу та лімфатичних вузлів показав, що введення НЧС зменшувало ступінь ушкодження ДНК, що проявлялося збільшенням відсотка клітин із мінімальними ушкодженнями (0–1 класи) та зменшенням кількості клітин із

вираженими ушкодженнями (3–4 класи). Крім того, відзначалося зниження рівня клітинної загибелі в імунних органах. Отже, вперше показано, що за умов експериментального імунного ушкодження введення НЧС сприяє покращенню функціонального стану оваріальних клітин та зменшенню ушкодження ДНК імунокомпетентних клітин. Отримані результати свідчать, що біологічні ефекти НЧС є контекст-залежними і визначаються їх фізико-хімічними характеристиками, дозою та режимом введення, а також функціональним станом організму.

Ще одним перспективним засобом, який активно досліджуються на даний час, є органічні сполуки германію, що характеризуються широким спектром біологічної дії та потенційними протективними й імуномодулюючими властивостями (Федорук та ін., 2016; Aizawa et al., 2025). Германій (ГЕ) як мікроелемент поширений у навколишньому середовищі у вигляді металевого германію або його сполук і розглядається як біологічно активний компонент, залучений до регуляції фізіологічних процесів у тваринництві та підтриманні здоров'я (Li et al., 2017).

За даними літератури, органічні сполуки германію проявляють імуномодулюючі, протизапальні та антиоксидантні властивості. Їх біологічну дію пов'язують, зокрема, з модуляцією функціональної активності макрофагів і НК-клітин, продукції інтерферону та регуляцією окисно-відновних процесів. У зв'язку з цим органічні сполуки германію досліджуються як потенційні засоби корекції запальних та інших патологічних процесів (Luo et al., 2023; Azumi et al., 2023). Нами був використаний вітчизняний препарат - цитрат германію (Ge), отриманий методом електроімпульсної нанотехнології (Косінов та ін., 2006), який характеризується екологічною безпекою, високою чистотою та біодоступністю. Показано, що тривале застосування (випоювання) цитратом германію у різних дозах не чинить негативного впливу на ріст, розвиток і репродуктивну функцію самиць щурів, а також не

знижує життєздатність приплоду (Федорук та ін., 2016). Також встановлено, що застосування препарату сприяє покращенню імунобіологічних показників організму, що проявлялося нормалізацією показників імунної реактивності, підвищенням адаптаційних можливостей організму, а також позитивним впливом на репродуктивну функцію, зокрема покращенням фертильності та молочної продуктивності самиць (Федорук та ін., 2016, 2017; Dolauchuk et al., 2015).

Сполуки германію здатні модулювати імунну відповідь організму, зокрема шляхом впливу на функціональну активність клітин вродженого та адаптивного імунітету. Більшість експериментальних даних свідчить про виражений антиоксидантний потенціал, який пов'язують із здатністю знижувати рівень перекису водню та обмежувати розвиток окислювального ушкодження клітин. Крім того, описано участь сполук германію в регуляції синтезу інтерферону, активації природних кілерних клітин і макрофагів, що зумовлює їх імуномодуючі властивості (Luo et al., 2023).

Узагальнюючі літературні дані Li L та співавт. акцентують увагу на тому, що біологічні ефекти германію значною мірою залежать від дози, хімічної форми та експериментальної моделі. Зокрема, при використанні органічних сполук германію спостерігали збільшення маси тимуса і селезінки та стимуляцію фагоцитозу, тоді як за інших доз або форм сполук германію вплив був нейтральним або відсутнім (Li L et al., 2017). Окремі клінічні дослідження також підтверджують, що добавки біо-германію здатні стимулювати імунну функцію, підвищуючи цитотоксичну активність НК-клітин, активацію В-клітин, індукцію синтезу імуноглобулінів та ФНП-α (Cho et al., 2020). Автори вважають, що біо-германій є перспективним терапевтичним засобом для імунотерапії, однак потребує подальшого дослідження. Таким чином, попри наявні дані щодо імуностимулюючих та

антиоксидантних властивостей германію, його вплив на функціональний стан імунної системи, зокрема на ступінь ушкодження ДНК, не був досліджений.

В наших дослідженнях було показано, що цитрат германію чинить виражений протективний вплив на ІКК в умовах ендотоксемії, індукованої ЛПС. Зокрема, попереднє введення цитрату германію призводило до значного зменшення ушкодження ДНК у клітинах лімфоїдних органів, що оцінювалося методом кометного аналізу. У разі введення розчину цитрату германію зменшувався ІДК тимоцитів та клітин лімфовузлів. Крім того, суттєво знижувалася кількість імуніцитів із сильним ушкодженням ДНК в тимусі та лімфовузлах. Отримані дані свідчать про наявність цитопротективного та антиоксидантного ефекту досліджуваного нанопрепарату щодо імунікомпетентних клітин в умовах ендотоксемії. Водночас значний рівень ушкодження ДНК супроводжувався зниженням життєздатності клітин досліджуваних органів. Відомо, що активація імуніцитів може індукувати активаційно-зумовлений апоптоз, який виконує роль гомеостатичного механізму, спрямованого на обмеження розвитку імунізапальних процесів. Паралельно застосування цитрату германію значно покращувало життєздатність імуніцитів, зменшуючи апоптотичну та некротичну клітинну загибель, причому антинекротичний ефект був більш вираженим, що вказує на протизапальні властивості досліджуваного нанопрепарату.

Крім того, за даними наших попередніх досліджень, цитрат германію проявляє виражений протективний ефект за умов ендотоксемії у старіючих тварин. Введення ЛПС супроводжувалося зниженням життєздатності гранульозних клітин яєчників, посиленням некрозу та оксидативного стресу, тоді як попереднє застосування цитрату германію частково нормалізувало ці показники, зменшувало вираженість ушкоджень і пригнічувало активацію нейтрофілів. Отримані результати свідчать про його антиоксидантні,

протизапальні та цитопротективні властивості (Kondratska et al., 2024) та узгоджуються з нашими даними щодо імунокомпетентних клітин.

Таким чином, профілактичне введення ЦГ чинить протективний вплив на клітини тимуса та лімфатичних вузлів, зменшуючи ушкодження їх ДНК і рівень клітинної загибелі, що може бути опосередковано нормалізацією функціональної активності нейтрофілів, виявленою нами раніше (Грушка та ін, 2019). Отримані дані свідчать про перспективність застосування препаратів цитрату германію для профілактики та терапії ендотоксин-опосередкованих захворювань.

Таким чином, результати наших досліджень із застосуванням антиоксидантів і наноматеріалів узагальнюють вплив імуномодулювальних агентів з антиоксидантними властивостями на функціональну активність імунокомпетентних клітин в умовах надмірної активації імунної відповіді. Встановлено, що застосування таких сполук сприяє зниженню цитотоксичної активності нейтрофілів, пригніченню синтезу медіаторів вторинної альтерації, нормалізації клітинного метаболізму, а також збереженню структурної цілісності клітин імунної системи. Отримані дані підтверджують перспективність використання антиоксидантних і наноструктурованих імуномодуляторів як ефективних засобів корекції імунного гомеостазу при імуноопосередкованих ушкодженнях.

Розробка протективних засобів, спрямованих на збереження функцій імунної та репродуктивної систем, є актуальним завданням сучасної біомедицини. Подальші дослідження механізмів дії, оптимальних доз та можливих комбінацій застосування антиоксидантів і наночастинок металів дозволять оптимізувати профілактичні та терапевтичні підходи, враховуючи потенційні ризики, зокрема прооксидантного ефекту та можливої генотоксичності.

На основі наших досліджень, проведених на трьох моделях імуноопосередкованих ушкоджень (Кон А-індукований автоімунний гепатит, системне імунокомплексне ушкодження, ЛПС-індукована ендотоксемія) встановлено, що різні шляхи клітинної загибелі відіграють ключову роль у патогенезі викликаних станів. Ушкодження органів супроводжується посиленням некротичної загибелі клітин імунної та репродуктивної систем. Порушення цілісності плазматичної мембрани внаслідок первинної альтерації і вихід клітинного вмісту у позаклітинний простір чинить виражений прозапальний та імуногенний ефект, що призводить до подальшого посилення розвитку захворювання та збільшення його тривалості, з тенденцією до хронізації.

Надмірна активація ПАРП-1 у відповідь на ушкодження ДНК є центральним механізмом патогенезу запальних процесів. Цей механізм реалізується через активацію NF- κ B із подальшим синтезом прозапальних чинників (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α , IFN- γ , ICAM-1, P-селектин, E-селектин, MIP-1, MIP-2, iNOS, COX-2), а також через індукцію некротичної загибелі клітин внаслідок виснаження НАД⁺ і АТФ. Це призводить до порушення цілісності плазматичних мембран і вивільнення алармінів, зокрема HMGB1, які чинять активуючий вплив на імунну відповідь, і тим самим підсилюють запальний каскад. Отже, некроз, що розвивається за цих умов, виступає ключовим прозапальним та імуногенним чинником, який підтримує і потенціює перебіг патологічного процесу.

Обидва встановлені механізми спричиняють активацію клітин-ефекторів запалення із синтезом прозапальних чинників. Останні, особливо АФК та реактивні форми азоту, спричиняють оксидативний та нітрозативний стрес клітин, виражене ушкодження ДНК та активацію ПАРП-1, що замикає позитивний зворотний зв'язок і формує порочне коло запалення, яке характерне для багатьох хронічних імуноопосередкованих захворювань.

Запропоновані нами профілактичні та терапевтичні підходи були спрямовані на переривання цього кола самопідсилення імунітопосередкованого запалення, обумовленого некрозом. Застосування модуляторів клітинної загибелі, таких як інгібітори PARP-1 (4-ГК та 3-АБА), модулятори NF- κ B (андрографолід, куркумін), інгібітор HMGB1 (гліциризинат амонію), антиоксиданти (ГС, кверцетин), а також наночастинки срібла і цитрат германію, продемонструвало виражений протективний ефект у моделях імунітопосередкованого ушкодження, що проявлялося зменшенням некротичної загибелі, оксидативного стресу та ушкодження ДНК, і, відповідно, перериванням кола самопідсилення запалення.

На моделях імунітопосередкованих ушкоджень застосування інгібітора PARP-1 4-ГК покращувало гістоструктуру печінки, зменшувало інфільтрацію нейтрофілів та їх функціональну активність за НСТ-тестом і рівень ПОЛ. При моделюванні імунітокомплексного ушкодження ГС зменшував ушкодження ДНК в імунітокомпетентних та оваріальних клітинах і сприяв покращенню мейотичного дозрівання ооцитів, тоді як за умов ендотоксемії кверцетин зменшував ушкодження ДНК імунітокомпетентних клітин. НЧС на моделі імунітокомплексного ушкодження підвищували життєздатність оваріальних клітин і зменшували ушкодження ДНК в імунітокомпетентних клітинах. Цитрат германію за умов ендотоксемії також проявляв виражений протективний ефект щодо клітин імунної системи.

Отримані нами дані свідчать про односпрямовані та співставні за величиною зміни параметрів ушкодження ДНК, оцінених методом ДНК-комет, в фолікулярних клітинах яєчників та клітинах імунної системи. Встановлено взаємопов'язаність механізмів імунітопосередкованого ушкодження імунної та репродуктивної систем, зокрема показано подібний характер ушкодження ДНК в імунітокомпетентних клітинах та клітинах оваріальної тканини. Це дає підґрунтя для використання лімфоцитів (які

можуть бути отримані мінімально інвазивним методом з крові) як неінвазивного біомаркера для оцінки стану оваріальних клітин, зокрема наявності в них генотоксичного стресу або ступеня його розвитку, з метою оцінки профілактичних та терапевтичних підходів за умов імуноопосередкованих захворювань, а також прогнозування результативності допоміжних репродуктивних технологій.

Отримані дані свідчать про участь генотоксичного стресу, активації запальних сигнальних шляхів та клітинної загибелі у формуванні порушень репродуктивної функції за умов надмірної імунної активації. Фармакологічне інгібування активності ПАРП-1, NF- κ B, HMGB1, а також використання антиоксидантів і наноматеріалів є ефективним підходом до зменшення імуноопосередкованого ушкодження та збереження функціональної цілісності імунної та репродуктивної систем, оскільки застосування цих модуляторів спрямоване на переривання порочного кола самопідсилення запалення.

Таким чином, подальше порівняльне вивчення ефектів ПАРП-інгібіторів, антиоксидантів (ГС, кверцетин), нанометалів срібла та цитрату германію у моделях імуноопосередкованих ушкоджень та пов'язаних із ними порушень функціонування репродуктивної системи відкриває перспективи для розробки нових терапевтичних стратегій, спрямованих на контроль запалення, генотоксичного стресу та аутоімунних процесів.

ЗАКЛЮЧЕННЯ

Отримані в дисертаційній роботі експериментальні дані та їх аналіз підтверджують, що надмірна активація імунної відповіді, яка супроводжується підвищенням рівня прозапальних цитокінів, генерацією АФК та залученням медіаторів запалення, може відігравати ключову роль у формуванні системних ушкоджень як в імунній, так і в репродуктивній системах. Результати проведених досліджень свідчать, що імуноопосередковане ушкодження супроводжується порушенням функціонального стану імунокомпетентних клітин (клітин тимусу та лімфовузлів), а також оваріальних клітин. Одним з основних механізмів розвитку цих порушень є посилення оксидативного стресу. Встановлено, що показники життєздатності клітин і рівня ушкодження ДНК є надійними маркерами для оцінки інтенсивності імуноопосередкованого ушкодження, а також ефективності протективних терапевтичних втручань.

Односпрямовані зміни у ступені ушкодження ДНК та у зниженні життєздатності досліджуваних клітин свідчать про спільність молекулярних механізмів, що лежать в основі надмірної імунної активації, що реалізуються як на рівні центральних та периферичних органів імунної системи, так і в оваріальній тканині. Це дозволяє оцінювати ушкодження клітин репродуктивної системи за показниками функціонального стану імунокомпетентних клітин, які можуть бути отримані мінімально інвазивним шляхом з метою виявлення генотоксичного стресу, а також для прогнозування ефективності терапевтичних втручань, зокрема при застосуванні допоміжних репродуктивних технологій.

Основними механізмами порушення функціонування імунних та оваріальних клітин при активації імунної відповіді є посилення оксидативного стресу, ушкодження ДНК, зокрема формування одноланцюгових розривів,

активація ядерного ферменту ПАРП-1, транскрипційного фактору NF-κB та залучення HMGB1, а також індукція клітинної загибелі.

Незалежно від природи первинного ураження, ПАРП-1 активується у відповідь на ушкодження ДНК. За умов розвитку помірного стресу цей фермент бере участь у репарації ДНК і підтриманні клітинного гомеостазу. Однак надмірна його активація спричиняє прогресуюче посилення запального процесу через два основні механізми: активацію NF-κB із подальшим синтезом прозапальних цитокінів та індукцію некротичної клітинної загибелі, що супроводжується вивільненням DAMP-молекул (зокрема HMGB1), які посилюють імунну відповідь. Обидва механізми спричиняють активацію клітин-ефекторів запалення, продукцію активних форм кисню, що призводить до розвитку оксидативного стресу, ще більше ушкоджує ДНК і посилює активацію ПАРП-1. Це формує порочне коло самопідсилення запалення, яке лежить в основі хронічного імуніопосередкованого ушкодження. Обмежена ефективність існуючих засобів регуляції цього запального процесу ускладнює терапію запальних та аутоімунних захворювань, що обґрунтовує актуальність пошуку нових терапевтичних підходів, зокрема із застосуванням інгібіторів ПАРП-1, антиоксидантів, наноматеріалів та природних сполук, таких як флавоноїди.

Проведеними дослідженнями встановлено, що застосування інгібіторів ПАРП-1 (3-амінобензаміду, 4-гідроксиквіназоліну), антиоксидантів (кверцетину, етилметилгідроксипіридину сукцинату) і наноструктурованих сполук (цитрату германію та наночастинок срібла) сприяє зменшенню імуніопосередкованого ушкодження. При цьому відбувається зниження рівня ушкоджень ДНК, зменшення частоти розвитку некрозу і апоптозу, пригнічення активності NF-κB та зниження рівня HMGB1, зменшення продукції АФК, а також підвищення життєздатності клітин. Застосовані сполуки покращують морфофункціональний стан оваріальних клітин,

сприяють мейотичному дозріванню ооцитів та можуть бути використані для профілактики репродуктивних порушень, зумовлених хронічною активацією імунної системи. Таким чином, отримані результати експериментально обґрунтовують нові підходи для діагностики, профілактики та корекції патологічних станів, асоційованих із надмірною імунною активацією та генотоксичним стресом, зокрема репродуктивних порушень, і можуть стати підґрунтям для розробки ефективних терапевтичних стратегій.

Одержані результати досліджень, проведених на трьох експериментальних моделях імуноопосередкованого ушкодження (БСА, Кон А, ЛПС), а також аналіз літератури, присвячений досліджуваній проблемі, стали основою для запропонованої нами узагальнюючої схеми. Запропонована схема дозволяє пояснити особливості функціонування імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов надмірної активації імунної відповіді, а також обґрунтовує доцільність застосування модуляторів клітинної загибелі та антиоксидантів як засобів цілеспрямованого впливу для корекції імуноопосередкованого ушкодження. Вона може слугувати концептуальною основою для подальших досліджень функціонування клітин імунної та репродуктивної систем за умов надмірної імунної активації, а також для розробки нових підходів до цільової терапії імунозапальних і репродуктивних порушень.

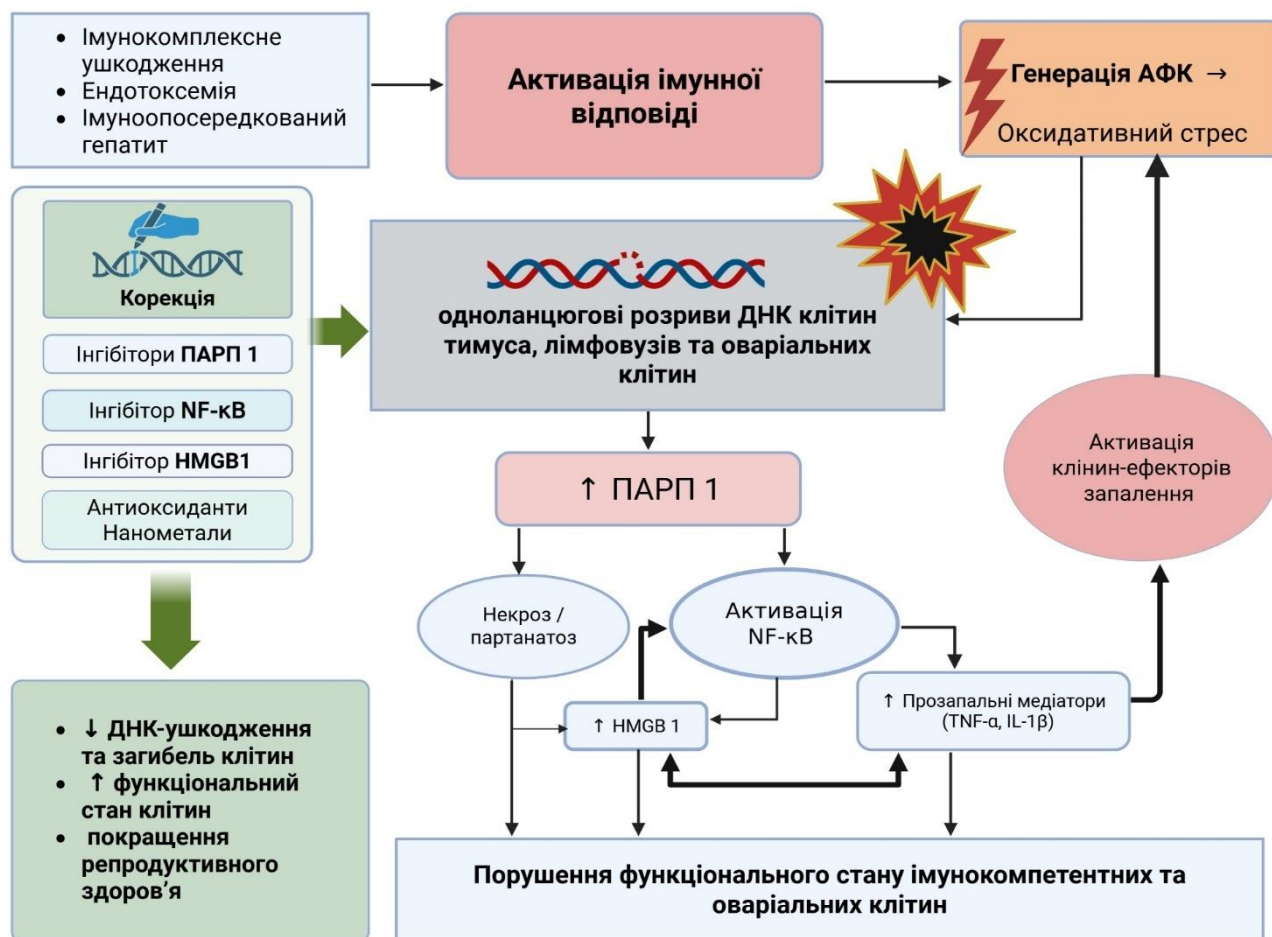


Рисунок 8.1. Молекулярні механізми самопідсилення імуноопосередкованого запалення за умов надмірної імунної відповіді із залученням сигнальної осі ПАРП-1/HMGB1/NF-κB.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі з використанням розроблених нами моделей імуноопосередкованого ушкодження у самиць мишей вирішено актуальну наукову проблему, що стосується з'ясування механізмів функціонування імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов надмірної активації імунної відповіді. Відповідно до поставленої мети та завдань дослідження встановлено роль основних медіаторів запалення: полі(АДФ-рибозо)полімерази-1 (ПАРП-1), NF-κB та білка високої рухливості групи бокс 1 (HMGB1, відомий як амфотерин), у порушенні інтегральної цілісності ДНК та зміні функціонального стану імунокомпетентних клітин за цих умов. Запропоновано методи оцінки генотоксичного стресу та вираженості клітинного ушкодження, які можуть бути використані для характеристики функціонального стану імунокомпетентних та оваріальних клітин у моделях надмірної імунної активації. Проведено аналіз ефективності захисних впливів із використанням модуляторів клітинної загибелі як потенційних засобів корекції порушень імунної функції та оваріальної активності в умовах імуноопосередкованого ушкодження, пов'язаного з хронічною активацією імунної відповіді.

1. Відтворені та адаптовані експериментальні моделі імуноопосередкованого ушкодження (БСА, КонА, ЛПС) забезпечили комплексну активацію вродженої, клітинної та гуморальної ланок імунної відповіді та адекватно відтворили характерні зміни, притаманні запальним процесам. За цих умов встановлено розвиток оксидативного та генотоксичного стресу, що проявлявся вираженим порушенням інтегральної цілісності ДНК, накопиченням клітин із тяжкими ушкодженнями ДНК,

зниженням життєздатності клітин переважно за некротичним шляхом загибелі, а також вираженими морфофункціональними змінами в органах імунної та репродуктивної систем. Показано, що зазначені зміни супроводжувалися надмірною функціонально-метаболічною активацією клітин вродженого імунітету, активацією ПАРП-1 і NF-κB та вивільненням алармінів, що сприяло формуванню порочного кола самопідсилення запалення, подальшому прогресуванню генотоксичних порушень і посиленню клітинної загибелі.

2. За умов моделювання імунокомплексного ушкодження встановлено активацію ядерного ферменту ПАРП-1 в імунокомпетентних клітинах тимуса й лімфатичних вузлів, а також у кумулюючих клітинах яєчника. Надмірна активація ПАРП-1 у цих клітинах супроводжувалася накопиченням ушкоджень ДНК, переважання імуногенного некрозу як основного типу загибелі та значного посилення запальної відповіді. Застосування інгібіторів ПАРП-1 (4-гідроксиквіназоліну та 3-амінобензаміду) призводило до зниження рівня ушкодження ДНК (зменшення відсотка клітин із вираженим пошкодженням), а також зменшення відсотка клітинної загибелі. Введення 4-гідроксиквіназоліну на тлі дії БСА запобігало утворенню та фіксації імунних комплексів у тканинах, що супроводжувалося зменшенням запалення та підтверджувало ключову роль ПАРП-1 у розвитку імунокомплексних захворювань. Крім того, інгібітор ПАРП-1 - 4-гідроксиквіназолін сприяв нормалізації експресії генів HAS2, COX2 та GREM1 у кумулюючих клітинах, що супроводжувалося збільшенням відсотка ооцитів, які відновили мейоз і досягли стадії метафази II. За умов дії Кон А та ЛПС також встановлено виражену цитопротективну дію інгібування ПАРП-1, яка проявлялася зменшенням ушкодження ДНК, пригніченням активації прозапальних медіаторів та запобіганням розвитку некротичної клітинної загибелі, перериваючи формування порочного кола самопідсилення запалення.

3. Встановлено, що за умов розвитку оксидативного стресу *in vitro*, індукованого перекисом водню та гіпохлорит-аніоном, клітини тимуса та лімфатичних вузлів зазнавали значного ушкодження ДНК та втрати їх життєздатності переважно шляхом некрозу. Інгібітори ПАРП-1 (3-амінобензамід і 4-гідроксиквіназолін) виявляли цитопротективну дію, достовірно зменшуючи рівень некрозу та генотоксичного ушкодження без істотного впливу на апоптоз. Це свідчить про їх прямий антигенотоксичний та антинекротичний ефект, не опосередкований системною запальною відповіддю, і підтверджує потенціал інгібіторів ПАРП-1 як засобів клітинного захисту від оксидант-індукованого ушкодження *in vitro*.

4. Експериментальне імуніопосередковане ушкодження супроводжувалося достовірним підвищенням рівня ТБК-реактивних продуктів у печінці мишей, що свідчило про активацію пероксидного окислення ліпідів та посилення оксидативного стресу. Застосування інгібітора ПАРП-1 4-гідроксиквіназоліну сприяло нормалізації прооксидантно-антиоксидантного гомеостазу, що підтверджувалося зменшенням інтенсивності перекисного окислення ліпідів у тканинах. Протективна дія 4-гідроксиквіназоліну також проявлялася у зниженні функціональної активності клітин-ефекторів запалення, насамперед нейтрофілів. Зниження їх киснезалежного метаболізму виявляли за допомогою НСТ-тесту, що відображає зниження генерації активних форм кисню. Водночас спостерігалось зниження рівня кисненезалежної активності, зокрема вивільнення катіонних білків, залучених до ушкодження тканин. Сукупність отриманих даних свідчить про послаблення ефекторної активності нейтрофілів, що є одним із ключових механізмів протизапальної дії інгібування ПАРП-1.

5. Встановлено, що амфотерин (HMGB1), виступаючи як сигнальний та ядерний білок, сприяє розвитку генотоксичного стресу та некротичної загибелі імунікомпетентних клітин у моделі ендотоксин-індукованого

запалення. Інгібування HMGB1 за допомогою гліциризинату амонію призводило до достовірного зниження рівня ушкодження ДНК, зменшення відсотка клітин із тяжкими формами ушкодження та пригнічення некротичної загибелі, що супроводжувалося підвищенням життєздатності цих клітин. Отримані дані підтверджують активну участь амфотерину у розвитку імуноопосередкованих ушкоджень, зокрема у підтриманні запальної відповіді та посиленні генотоксичного стресу.

6. На моделі КонА-індукованого Т-клітинного ушкодження печінки встановлено виражену активацію ядерного транскрипційного фактора NF-κB в клітинах імунної системи, що підтверджує його ключову роль у розвитку імуноопосередкованого запального ушкодження печінки. Інгібування ПАРП-1 за допомогою 4-гідроксиквіназоліну призводило до зниження рівня активації NF-κB, індукованої Кон А, що супроводжувалося вираженням протизапальним ефектом. Таким чином, активація NF-κB є одним із ключових механізмів імуноопосередкованого ушкодження печінки, який ефективно пригнічується інгібуванням ПАРП-1.

7. Доведено, що імуномодулятори, зокрема антиоксиданти та наноструктуровані сполуки, чинять позитивний вплив на функціональний стан імунокомпетентних та оваріальних клітин за умов імунокомплексного ушкодження. Їх застосування сприяло зниженню відсотка клітин із максимальним ушкодженням ДНК та збільшенню відсотка клітин без первинних ушкоджень генетичного матеріалу. Антиоксиданти забезпечували збереження життєздатності клітин тимуса, лімфатичних вузлів і оваріальних клітин, зменшуючи відсоток клітин з морфологічними ознаками некрозу й апоптозу за умов профілактичного введення. Крім того, достовірно встановлено покращення параметрів мейотичного дозрівання ооцитів, зокрема підвищення відсотка ооцитів на стадіях метафази I та метафази II, а також

підвищення рівнів експресії мРНК генів HAS2, COX2 і GREM1 у кумулюючих клітинах.

Зважаючи на взаємозв'язок імунних та репродуктивних регуляторних механізмів, встановлено, що надмірна активація імунної відповіді за умов модельованого хронічного запалення може призводити до зниження якості ооцитів, порушення процесів запліднення та розвитку ембріона. При імуноопосередкованому ушкодженні ключовими механізмами є розвиток генотоксичного й оксидативного стресу, порушення структурно-функціональної цілісності ДНК та зниження життєздатності клітин. Важлива роль у формуванні запального ушкодження клітин імунної та оваріальної тканин належить ПАРП-1, NF-κB та HMGB1 (амфотерину). Показано, що застосування інгібіторів ПАРП-1, антиоксидантів і наноструктурованих сполук знижує рівень ушкодження ДНК, апоптозу і некрозу, сприяючи збереженню функціональної активності клітин і нормалізації процесів дозрівання ооцитів. Імунокомпетентні клітини виявилися чутливим індикатором для оцінки ступеня ушкодження та ефективності фармакологічної корекції завдяки їх швидкій реакції на запальні стимули, що підтверджено у моделях БСА, Кон А та ЛПС. Ці моделі відображають зміни інтенсивності оксидативного стресу та перебігу прозапальних процесів. Отримані результати створюють основу для розробки нових підходів до профілактики та корекції імунозапальних та репродуктивних порушень, асоційованих із хронічною надмірною імунною активацією, шляхом цілеспрямованої модуляції сигнальних шляхів ПАРП-1, NF-κB і HMGB1 з метою збереження фертильності та репродуктивного здоров'я жінок.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Вознесенська ТЮ, Блашків ТВ, Шепель ОА, Янчій РІ. Експериментальні аспекти порушення репродуктивної функції. Київ: Меланік; 2010. 184 с.
2. Вознесенська ТЮ, Ступчук МС, Грушка НГ, Кондрацька ОА, Блашків ТВ. Вплив внутрішньовенного введення наночастинок срібла на ДНК ядер клітин тимуса, лімфатичних вузлів і фолікулярного оточення ооцита за умов експериментального системного аутоімунного розладу. Вісник проблем біології та медицини. 2018;(1, ч.2):327-331.
3. Грушка НГ. Вплив інгібітора полі(АДФ-рибоз)полімерази 4-гідроксихіназоліну на загибель імунних клітин при пошкодженні імунними комплексами у мишей. Фізіол журн. 2017;63(1):43–50. doi:10.15407/fz63.01.043.
4. Грушка НГ. Вплив 4-гідроксихіназоліну та 3-амінобензаміду на ступінь ушкодження ДНК в імунокомпетентних клітинах за умов гепатиту, індукованого конканаваліном А. Фізіол журн. 2025;71(5):66-71.
5. Грушка Н.Г., Янчій Р.І., Павлович С.І., Макогон Н.В. Захисний ефект інгібіторів полі(АДФ-рибозо)полімерази при ушкодженні ДНК та загибелі лімфоцитів мишей за умов дії оксидантів *in vitro*. PaReAd Pathology, Rehabilitation, Adaptation (колишній «Медична реабілітація, бальнеологія, фізіотерапія»). 2017;15(1):23–33.
6. Грушка НГ, Павлович СІ, Кондрацька ОА, Андрійчук ІІ, Янчій РІ. Вплив кверцетину на інтегральну цілісність ДНК та життєздатність імунокомпетентних клітин за умов ендотоксемії у мишей. Фізіологічний журнал. 2026;72(3):у друці.
7. Грушка НГ, Кондрацька ОА, Павлович СІ, Пількевич НО, Янчій РІ. Інгібування полі(АДФ-рибозо)полімерази сприяє зменшенню

- оксидативного стресу в печінці мишей за умов експериментальної ендотоксемії. Патологія. 2019;16(3):323–327.
8. Грушка НГ, Павлович СІ, Бризгіна ТМ, Сухіна ВС, Макогон НВ, Янчій РІ. Генотоксичний стрес і шляхи загибелі клітин тимуса та лімфовузлів мишей за умов системної імунокомплексної патології. Фізіол журн. 2015;61(1):28–34.
 9. Грушка НГ, Павлович СІ, Кондрацька ОА, Пількевич НО, Янчій РІ. Протективна дія цитрату германію на функціональний стан імунокомпетентних клітин та активність нейтрофілів при запаленні, індукованому ліпополісахаридом. Фізіол журн. 2019;65(6):43–50.
 10. Грушка НГ, Павлович СІ, Кондрацька ОА, Андрійчук ІІ, Янчій РІ. Вплив кверцетину на інтегральну цілісність ДНК та життєздатність імунокомпетентних клітин за умов ендотоксемії у мишей. Фізіологічний журнал. 2026;(3). (у друці).
 11. Грушка НГ, Янчій РІ, Павлович СІ, Макогон НВ. Захисний ефект інгібітора полі(АДФ-рибозо)полімерази при ушкодженні ДНК та загибелі лімфоцитів мишей за умов дії оксидантів *in vitro*. Патологія, реабілітація, адаптація. 2017;15(1):23–32.
 12. Дорошенко АМ. Дослідження гострої токсичності наночастинок заліза при внутрішньошлунковому та внутрішньовенному шляхах введення. Фармакологія та лікарська токсикологія. 2014;(1):48-57.
 13. Кондрацька ОА, Грушка НГ, Павлович СІ, Янчій РІ. Коригуючий вплив цитрату германію на репродуктивну функцію самиць зрілих мишей. Фізіол журн. 2023;69(2):37–43.
 14. Кондрацька ОА, Грушка НГ, Павлович СІ, Стовбун ЮР, Плинка ОІ, Янчій РІ. Гліцирризинат амонію чинить протективний вплив на оогенез та послаблює генотоксичний стрес і загибель імунних клітин в умовах

- ендотоксемії, індукованої введенням ліпополісахариду. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2020;3–4(91):5–11.
15. Косінов МВ, Каплуненко ВГ. Спосіб отримання карбоксилатів металів. Патент України №38391. 2009.
16. Литвиненко АП. Скоротливість міометрія матки при експериментальній імунокомплексній та залізодефіцитній анемії у мишей [дисертація]. Київ; 2015.
17. Литвиненко АП, Срібна ВО, Грушка НГ, Вознесенська ТЮ, Блашків ТВ. Мейотичне дозрівання ооцитів і життєздатність клітин їх фолікулярного оточення. Одеський медичний журнал. 2016;(1):13-17.
18. Макогон НВ, Бризгіна ТМ, Павлович СІ, Мартинова ТВ, Сухіна ВС, Грушка НГ, та ін. Вплив інгібітора активації NF-κB андрографоліду на запальні процеси за умов експериментального імунного ушкодження печінки. Таврійський медико-біологічний вісник. 2012;15(3 ч. 1):199-202.
19. Макогон Н.В., Вознесенська Т.Ю., Павлович С.І., Грушка Н.Г. та ін. Спосіб моделювання імунокомплексного ушкодження у мишей: патент України на корисну модель №93351; заявл. 25.09.2014; опубл. Бюл. №18. С. 4.
20. Макогон НВ, Грушка НГ, Срібна ВО, Бризгіна ТМ, Мартинова ТВ, Павлович СІ, та ін. Цитопротективна дія блокатора полі(АДФ-рибозо)полімерази 4-гідроксиквіназоліну при експериментальному імунному гепатиті: дозозалежність, механізми та перспективи терапевтичного застосування. Медична гідрологія та реабілітація. 2015;13(1–3):15–23.
21. Макогон НВ, Грушка НГ, Янчій РІ, Павлович СІ. Захисний ефект інгібіторів полі(АДФ-рибозо) полімерази при ушкодженні ДНК та

- загибелі лімфоцитів мишей за умов дії оксидантів *in vitro*. Патологія, реабілітація, адаптація. 2017;2(1–2).
- 22.Макогон Н, Бризгіна Т, Павлович С, Алексюк Л, Мартинова Т, Сухіна В, та ін. Вивчення дії інгібітора активації ядерного транскрипційного фактора NF- κ B куркуміну при імунному ушкодженні печінки. Вісник фармакології та фармації. 2009;(1):48-52.
- 23.Мартинова ТВ, Макогон НВ, Бризгіна ТМ, Павлович СІ, Сухіна ВС, Грушка НГ, та ін. Розвиток оксидативного стресу в печінці мишей при експериментальному імунному гепатиті Т-клітинного генезу. Таврический медико-биологический вестник. 2012;15(3):211-215.
- 24.Остапченко ЛІ, Компанець ІВ, Синельник ТБ. Біологічні мембрани і внутрішньоклітинна сигналізація: методи дослідження: навчальний посібник. Київ: ВПЦ "Київський університет"; 2017. 447 с.
- 25.Павлович СІ, Грушка НГ, Кондрацька ОА, Красуцька НО, Антонюк ВМ, Мешко ВВ, та ін. Гістоструктурні зміни в імунокомпетентних органах, печінці та легенях за умов експериментальної ендотоксемії, індукованої ліпополісахаридом. Фізіол. журн. 2024;70(5):66–71.
- 26.Павлович СІ, Макогон НВ, Грушка НГ, Бризгіна ТМ, Янчій РІ. Морфологічні зміни у печінці мишей за умов конканавалін А-індукованого гепатиту. Фізіол журн. 2016;62(1):83–91.
- 27.Павлович СІ, Литвиненко АП, Макогон НВ та ін. Імуноморфологічна характеристика моделі системної патології імунокомплексного генезу у мишей. Вісник морфології. 2014;20(2):496-500.
- 28.Павлович СІ, Грушка НГ, Кондрацька ОА, Красуцька НО, Янчій РІ. Стан клітин імунної системи за умов експериментального імуноопосередкованого запалення. Medical Science of Ukraine. 2021;17(2):20-26.

- 29.Срібна ВО. Розлад оваріальної функції в умовах експериментального імунокомплексного ушкодження [дисертація]. Київ; 2018.
- 30.Срібна ВО, Грушка НГ, Мартинова ТВ, Макогон НВ. Функціональна активність клітин уродженого імунітету при інгібуванні полі(АДФ-рибозо)полімерази за умов експериментальної імунокомплексної патології. Експериментальна і клінічна медицина. 2016;2(71):189–193.
- 31.Срібна ВО, Грушка НГ, Янчій РІ. Однониткові розриви ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів, тимуса і лімфатичних вузлів за умов експериментального імунокомплексного ушкодження та застосування антиоксиданта. Вісник проблем біології і медицини. 2016;2(3):195–199.
- 32.Срібна ВО, Грушка НГ, Шепель ОА, Вознесенська ТЮ, Блашків ТВ. Зміни параметрів мейотичного дозрівання ооцитів і життєздатності клітин їх фолікулярного оточення за умов експериментального імунного ушкодження. Експериментальна і клінічна медицина. 2016;70(1):63–67.
- 33.Срібна ВО, Шепель ОА, Грушка НГ, Ступчук МС, Пількевич НО, Блашків ТВ, та ін. Функціональний стан яєчника за умов експериментального імунокомплексного ушкодження та введення субстанції наночастинок срібла. Патологія, реабілітація, адаптація. 2018;16(1–2):26–32.
- 34.Ступчук МС. Вплив модуляторів сиртуїнів та наночастинок срібла на функціонування клітин яєчника миші [дисертація]. Київ; 2019.
- 35.Трахтенберг ІМ. Наночастинки металів, методи отримання, сфери застосування, фізико-хімічні та токсичні властивості. Український журнал з проблем медицини праці. 2013; (4): 62–74.
36. Федорук РС, Храбко МІ, Цап ММ, Марцинько ОЄ. Ріст, розвиток і репродуктивна функція самиць щурів та життєздатність їх приплоду за вживання різних доз цитрату германію. Animal Biology. 2016;18(3):97–106.

37. Федорук РС, Тесарівська УІ, Храбко МІ. Гематологічні і біохімічні показники організму щурів F2 у період тривалого вживання нано Ge цитрату. Біологія тварин. 2017;19(3):115-121.
38. Чоп'як ВВ, Вальчук ІВ, Гайдучок ІГ, та ін. Гіперімунокомплексний синдром в експерименті та клініці. Вісник наукових досліджень. 2007;(1):5–8.
39. Чоп'як ВВ. Системні васкуліти. Львів; 2014. 319 с.
40. Шепель ОА, Блашків ТВ, Вознесенська ТЮ, Грушка НГ, Янчій РІ. Гени, пов'язані з передчасним виснаженням яєчників Вісник проблем біології і медицини. 2015;2(118):58-62.
41. AboElnazar SY, Ghoneim HE, Ghazy AA, El-Shamandy MI, Kazem AH, Rashwan EK. Concanavalin-A as a Model for Induction of Murine Autoimmune Hepatitis: Role of TNF- α and NF- κ B During The Acute Phase. Egypt J Immunol. 2020 Jun;27(2):19-30.
42. Abbas R, Luo J, Qi X, Naz A, Khan IA, Liu H, et al. Silver Nanoparticles: Synthesis, Structure, Properties and Applications. Nanomaterials (Basel). 2024 Aug 31;14(17):1425. doi: 10.3390/nano14171425.
43. Adeoye O, Olawumi J, Opeyemi A, Christiania O. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility. JBRA Assist Reprod. 2018 Mar 1;22(1):61-66. doi: 10.5935/1518-0557.20180003.
44. Afanasieva K, Zazhytska M, Sivolob A. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments . Electrophoresis. 2010; 31: 512-19.
45. Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. Reprod Biol Endocrinol. 2012 Jun 29;10:49. doi: 10.1186/1477-7827-10-49.
46. Ageeva T, Rizvanov A, Mukhamedshina Y. NF- κ B and JAK/STAT Signaling Pathways as Crucial Regulators of Neuroinflammation and Astrocyte

- Modulation in Spinal Cord Injury. *Cells*. 2024 Mar 26;13(7):581. doi: 10.3390/cells13070581.
47. Aggarwal D, Chaudhary M, Mandotra SK, Tuli HS, Chauhan R, Joshi NC, et al. Anti-inflammatory potential of quercetin: From chemistry and mechanistic insight to nanoformulations. *Curr Res Pharmacol Drug Discov*. 2025 Mar 18;8:100217. doi: 10.1016/j.crphar.2025.100217.
 48. Ahmad SF, Attia SM, Zoheir KM, Ashour AE, Bakheet SA. Attenuation of the progression of adjuvant-induced arthritis by 3-aminobenzamide treatment. *Int Immunopharmacol*. 2014 Mar;19(1):52-9. doi: 10.1016/j.intimp.2014.01.005.
 49. Ahmad MF, Elias MH, Jin NM, Abu MA, Syafruddin SE, Zainuddin AA, et al. A Comparative Analysis of Gremlin-1 (GREM1), Hyaluronic Acid Synthetase-2 (HAS2), and Prostaglandin-Endoperoxide Synthase-2 (PTGS2) Expression in Cumulus Cells Among Women with Diminished Ovarian Reserve Following Rescue In Vitro Maturation (r-IVM). *Life (Basel)*. 2025 Oct 16;15(10):1609. doi: 10.3390/life15101609.
 50. Ahmed M, Riaz U, Lv H, Yang L. A Molecular Perspective and Role of NAD⁺ in Ovarian Aging. *Int J Mol Sci*. 2024 Apr 25;25(9):4680. doi: 10.3390/ijms25094680.
 51. Aizawa K, Nakamura T, Shimada Y, Takeda T, Azumi J, Shore AC. Organogermanium: Potential beneficial effects on the cardiovascular system. *Physiol Rep*. 2025 Feb;13(3):e70234. doi: 10.14814/phy2.70234.
 52. Aloisi M, Rossi G, Colafarina S, Guido M, Cecconi S, Poma AMG. The Impact of Metal Nanoparticles on Female Reproductive System: Risks and Opportunities. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Oct 22;19(21):13748. doi: 10.3390/ijerph192113748.
 53. Alves-Lopes R, Neves KB, Mary S, Graham D, Montezano AC, Delles C, et al. Salt-Induced Vascular Damage in Hypertension Involves Redox

- Activation of PARP/TRPM2 Signaling and Inflammasome Assembly. *Am J Hypertens*. 2025 Sep 16;38(10):788-796. doi: 10.1093/ajh/hpaf071.
54. Alharbi HOA, Alshebremi M, Babiker AY, Rahmani AH. The Role of Quercetin, a Flavonoid in the Management of Pathogenesis Through Regulation of Oxidative Stress, Inflammation, and Biological Activities. *Biomolecules*. 2025 Jan 20;15(1):151. doi: 10.3390/biom15010151.
 55. Ameho S, Klutstein M. The effect of chronic inflammation on female fertility. *Reproduction*. 2025 Mar 3;169(4):e240197. doi: 10.1530/REP-24-0197.
 56. Andersson U, Yang H, Harris H. Extracellular HMGB1 as a therapeutic target in inflammatory diseases. *Expert Opin Ther Targets*. 2018 Mar;22(3):263-277. doi: 10.1080/14728222.2018.1439924.
 57. Andersson U, Yang H, Harris H. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells. *Semin Immunol*. 2018 Aug;38:40-48. doi: 10.1016/j.smim.2018.02.011.
 58. Andreasen AS, Krabbe KS, Krogh-Madsen R, Taudorf S, Pedersen BK, Møller K. Human endotoxemia as a model of systemic inflammation. *Curr Med Chem*. 2008;15(17):1697-705. doi: 10.2174/092986708784872393.
 59. Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N. Mechanism of activation-induced cell death of T cells and regulation of FasL expression. *Crit Rev Immunol*. 2014;34(4):301-14. doi: 10.1615/critrevimmunol.2014009988.
 60. Arneth B. Molecular Mechanisms of Immune Regulation: A Review. *Cells*. 2025 Feb 14;14(4):283. doi: 10.3390/cells14040283.
 61. Arunraj TR, Gupta DR, Kumar P, Dwivedi PSR, Shastry CS, Narayanan AV. Selection of potential natural compounds for poly-ADP-ribose polymerase (PARP) inhibition in glioblastoma therapy by in silico screening methods. *Saudi J Biol Sci*. 2023 Jul;30(7):103698. doi: 10.1016/j.sjbs.2023.103698.

- 62.Asiabi P, Dolmans MM, Ambroise J, Camboni A, Amorim CA. In vitro differentiation of theca cells from ovarian cells isolated from postmenopausal women. *Hum Reprod.* 2020 Dec 1;35(12):2793-2807. doi: 10.1093/humrep/deaa246.
- 63.Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438. doi: 10.1155/2014/360438. Epub 2014 May 8.
- 64.Azumi J, Takeda T, Shimada Y, Zhuang T, Tokuji Y, Sakamoto N, et al. Organogermanium THGP Induces Differentiation into M1 Macrophages and Suppresses the Proliferation of Melanoma Cells via Phagocytosis. *Int J Mol Sci.* 2023 Jan 18;24(3):1885. doi: 10.3390/ijms24031885.
- 65.Ayna A, Caglayan C, Taysi S. Cellular and Molecular Mechanisms of Oxidative DNA Damage and Repair. *Medicina (Kaunas).* 2025 Nov 11;61(11):2013. doi: 10.3390/medicina61112013.
- 66.Babonaitė M, Striogaitė E, Grigorianaitė G, Lazutka JR. In Vitro Evaluation of DNA Damage Induction by Silver (Ag), Gold (Au), Silica (SiO₂), and Aluminum Oxide (Al₂O₃) Nanoparticles in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Curr Issues Mol Biol.* 2024 Jul 4;46(7):6986-7000. doi: 10.3390/cimb46070417.
- 67.Bafor EE, Valencia JC, Young HA. Double Negative T Regulatory Cells: An Emerging Paradigm Shift in Reproductive Immune Tolerance? *Front Immunol.* 2022 Jul 1;13:886645. doi: 10.3389/fimmu.2022.886645.
- 68.Bai P. Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance. *Mol Cell.* 2015 Jun 18;58(6):947-58. doi: 10.1016/j.molcel.2015.01.034.

69. Baessler A, Vignali DAA. T Cell Exhaustion. *Annu Rev Immunol*. 2024 Jun;42(1):179-206. doi: 10.1146/annurev-immunol-090222-110914. Epub 2024 Jun 14.
70. Balcerowska M, Kwaśnik P. The multifaceted impact of stress on immune function. *Mol Biol Rep*. 2025 Oct 10;52(1):1008. doi: 10.1007/s11033-025-11134-6.
71. Banasik M, Stedeford T, Strosznajder RP. Natural inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Mol Neurobiol*. 2012 Aug;46(1):55-63. doi: 10.1007/s12035-012-8257-x.
72. Banerjee S, Jaimes FL, Mohamed MA, Zettel A, Graupe NG, Cooney LG, et al. High-dimensional immune profiling of follicular fluid and systemic circulation reveals distinct immune signatures in women with polycystic ovary syndrome. *Front Immunol*. 2025 Aug 11;16:1628031. doi: 10.3389/fimmu.2025.1628031.
73. Bangert A, Andrassy M, Müller AM, Bockstahler M, Fischer A, Volz CH, et al. Critical role of RAGE and HMGB1 in inflammatory heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Jan 12;113(2):E155-64. doi: 10.1073/pnas.1522288113.
74. Bao Z, Xiong J, Li W, Chen Z, Shen H, Ying S. Genomic instability in chronic airway inflammatory diseases. *Biomed J*. 2015 Mar-Apr;38(2):117-24. doi: 10.4103/2319-4170.143478.
75. Barnabei L, Laplantine E, Mbongo W, Rieux-Laucat F, Weil R. NF- κ B: At the Borders of Autoimmunity and Inflammation. *Front Immunol*. 2021 Aug 9;12:716469. doi: 10.3389/fimmu.2021.716469.
76. Bazzano MV, Köninger A, Solano ME. Beyond defence: Immune architects of ovarian health and disease. *Semin Immunopathol*. 2024 Aug 12;46(3-4):11. doi: 10.1007/s00281-024-01021-w.

- 77.Bednarski JJ, Sleckman BP. At the intersection of DNA damage and immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2019 Apr;19(4):231-242. doi: 10.1038/s41577-019-0135-6.
- 78.Begum IA. Oxidative stress: Oocyte quality and infertility. *Reprod Toxicol*. 2025 Oct;137:109011. doi: 10.1016/j.reprotox.2025.109011.
- 79.Belenichev I, Popazova O, Bukhtiyarova N, Ryzhenko V, Pavlov S, Suprun E, et al. Targeting Mitochondrial Dysfunction in Cerebral Ischemia: Advances in Pharmacological Interventions. *Antioxidants (Basel)*. 2025 Jan 18;14(1):108. doi: 10.3390/antiox14010108.
- 80.Berger NA, Besson VC, Boulares AH, Bürkle A, Chiarugi A, Clark RS, et al. Opportunities for the repurposing of PARP inhibitors for the therapy of non-oncological diseases. *Br J Pharmacol*. 2018 Jan;175(2):192-222. doi: 10.1111/bph.13748.
- 81.Bhachoo JS, Garvin AJ. SUMO and the DNA damage response. *Biochem Soc Trans*. 2024 Apr 24;52(2):773-792. doi: 10.1042/BST20230862.
- 82.Bialik S, Dasari SK, Kimchi A. Autophagy-dependent cell death - where, how and why a cell eats itself to death. *J Cell Sci*. 2018 Sep 20;131(18):jcs215152. doi: 10.1242/jcs.215152.
- 83.Bianchi ME, Crippa MP, Manfredi AA, Mezzapelle R, Rovere Querini P, Venereau E. High-mobility group box 1 protein orchestrates responses to tissue damage via inflammation, innate and adaptive immunity, and tissue repair. *Immunol Rev*. 2017 Nov;280(1):74-82. doi: 10.1111/imr.12601.
- 84.Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response. *Mol Cell*. 2017 Jun 15;66(6):801-817. doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.015.
- 85.Blashkiv TV, Stupchuk MS, Sribna VA, Kalesnykova OM, Grushka NG, Voznesenska TY. Resumption of meiotic maturation of oocytes, pre- and post-implantational embryonic mortality under conditions of experimental

- glomerulonephritis and treatment of silver nanoparticles. *Nano Biomed Eng.* 2018;10(4):355-361. doi:10.5101/nbe.v10i4.p355-361.
86. Blasi-Brugué C, Martínez-Flórez I, Baxarias M, Del Rio-Velasco J, Solano-Gallego L. Exploring the Relationship between Neutrophil Activation and Different States of Canine L. Infantum Infection: Nitroblue Tetrazolium Test and IFN- γ . *Vet Sci.* 2023 Sep 13;10(9):572. doi: 10.3390/vetsci10090572.
87. Boesten DM, de Vos-Houben JM, Timmermans L, den Hartog GJ, Bast A, Hageman GJ. Accelerated aging during chronic oxidative stress: a role for PARP-1. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:680414. doi: 10.1155/2013/680414.
88. Borgoni S, Kudryashova KS, Burka K, de Magalhães JP. Targeting immune dysfunction in aging. *Ageing Res Rev.* 2021 Sep;70:101410. doi: 10.1016/j.arr.2021.101410.
89. Borza DB, Zhang JJ, Beck LH Jr, Meyer-Schwesinger C, Luo W. Mouse models of membranous nephropathy: the road less travelled by. *Am J Clin Exp Immunol.* 2013 Jun 15;2(2):135-45.
90. Bosques CJ, Manning AM. Fc-gamma receptors: Attractive targets for autoimmune drug discovery searching for intelligent therapeutic designs. *Autoimmun Rev.* 2016 Nov;15(11):1081-1088. doi: 10.1016/j.autrev.2016.07.035.
91. Bozward AG, Davies SP, Morris SM, Kayani K, Oo YH. Cellular interactions in self-directed immune-mediated liver diseases. *J Hepatol.* 2025 Jun;82(6):1110-1124. doi: 10.1016/j.jhep.2025.01.002.
92. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.
93. Buač M, Mojsilović S, Mišić D, Vuković D, Savić O, Valčić O, et al. Circulating immune complexes of calves with bronchopneumonia modulate

- the function of peripheral blood leukocytes: In vitro evaluation. *Res Vet Sci*. 2016 Jun;106:135-42. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.04.002.
94. Bukulmez O, Arici A. Leukocytes in ovarian function. *Hum Reprod Update*. 2000 Jan-Feb;6(1):1-15. doi: 10.1093/humupd/6.1.1.
 95. Burduşel AC, Gherasim O, Grumezescu AM, Mogoantă L, Fikai A, Andronescu E. Biomedical Applications of Silver Nanoparticles: An Up-to-Date Overview. *Nanomaterials (Basel)*. 2018 Aug 31;8(9):681. doi: 10.3390/nano8090681.
 96. Cacciottola L, Camboni A, Dolmans MM. Immune system regulation of physiological and pathological aspects of the ovarian follicle pool throughout the female reproductive lifespan. *Hum Reprod*. 2025 Jan 1;40(1):12-22. doi: 10.1093/humrep/deae254.
 97. Caldecott KW. Causes and consequences of DNA single-strand breaks. *Trends Biochem Sci*. 2024 Jan;49(1):68-78. doi: 10.1016/j.tibs.2023.11.001.
 98. Caldecott KW. DNA single-strand break repair and human genetic disease. *Trends Cell Biol*. 2022 Sep;32(9):733-745. doi: 10.1016/j.tcb.2022.04.010.
 99. Cardoso R, Dusinska M, Collins A, Manjanatha M, Pfuhler S, Registre M, et al. In vivo Mammalian Alkaline Comet Assay: Method Adapted for Genotoxicity Assessment of Nanomaterials. *Front Toxicol*. 2022 May 30;4:903896. doi: 10.3389/ftox.2022.903896.
 100. Carroll J, Marangos P. The DNA damage response in mammalian oocytes. *Front Genet*. 2013 Jun 24;4:117. doi: 10.3389/fgene.2013.00117.
 101. Carusillo A, Mussolino C. DNA Damage: From Threat to Treatment. *Cells*. 2020 Jul 10;9(7):1665. doi: 10.3390/cells9071665.
 102. Casals E, Zeng M, Parra-Robert M, Fernández-Varo G, Morales-Ruiz M, Jiménez W, et al. Cerium Oxide Nanoparticles: Advances in Biodistribution, Toxicity, and Preclinical Exploration. *Small*. 2020 May;16(20):e1907322. doi: 10.1002/smll.201907322.

103. Chai R, Li Y, Shui L, Ni L, Zhang A. The role of pyroptosis in inflammatory diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2023 May 12;11:1173235. doi: 10.3389/fcell.2023.1173235.
104. Chakraborty S, Choudhuri A, Mishra A, Bhattacharyya C, Billiar TR, Stoyanovsky DA, et al. Nitric oxide and thioredoxin modulate the activity of caspase 9 in HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* 2023 Nov;1867(11):130452. doi: 10.1016/j.bbagen.2023.130452.
105. Chandimali N, Bak SG, Park EH, Lim HJ, Won YS, Kim EK, et al. Free radicals and their impact on health and antioxidant defenses: a review. *Cell Death Discov.* 2025 Jan 24;11(1):19. doi: 10.1038/s41420-024-02278-8.
106. Chauvin S, Cohen-Tannoudji J, Guigon CJ. Estradiol Signaling at the Heart of Folliculogenesis: Its Potential Deregulation in Human Ovarian Pathologies. *Int J Mol Sci.* 2022 Jan 3;23(1):512. doi: 10.3390/ijms23010512.
107. Cheong KJH, Huang DY, Sekar P, Chen RJ, Cheng IH, Chan CM, et al.. CASK Mediates Oxidative Stress-Induced Microglial Apoptosis-Inducing Factor-Independent Parthanatos Cell Death via Promoting PARP-1 Hyperactivation and Mitochondrial Dysfunction. *Antioxidants (Basel).* 2024 Mar 13;13(3):343. doi: 10.3390/antiox13030343.
108. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol.* 2013 Apr;13(4):227-42. doi: 10.1038/nri3405. Epub 2013 Mar 8. Erratum in: *Nat Rev Immunol.* 2013 Jul;13(7):542.
109. Chen R, Kang R, Tang D. The mechanism of HMGB1 secretion and release. *Exp Mol Med.* 2022 Feb;54(2):91-102. doi: 10.1038/s12276-022-00736-w. Epub 2022 Feb 25.
110. Chen S, Li Q, Zhang C, Liu X, Zhang J, Zong S, et al. Recent research about the immune cells in the ovary. *Int J Clin Exp Med Res.* 2024;8(2):314-324. doi:10.26855/ijcemr.2024.04.024.

111. Chen, S., Zhu, H. & Jounaidi, Y. Comprehensive snapshots of natural killer cells functions, signaling, molecular mechanisms and clinical utilization. *Sig Transduct Target Ther* 9, 302 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-02005-w>
112. Cheng M, Yuan C, Ju Y, Liu Y, Shi B, Yang Y, et al. Quercetin Attenuates Oxidative Stress and Apoptosis in Brain Tissue of APP/PS1 Double Transgenic AD Mice by Regulating Keap1/Nrf2/HO-1 Pathway to Improve Cognitive Impairment. *Behav Neurol*. 2024 Aug 28;2024:5698119. doi: 10.1155/2024/5698119.
113. Chernii TV, Cherniy VI, Svitlytska DV. Latest research in nootropic therapy of patients with chronic cerebral circulation insufficiency. *Wiad Lek*. 2024;77(5):1063-1068. doi: 10.36740/WLek202405128.
114. Cho JM, Chae J, Jeong SR, Moon MJ, Shin DY, Lee JH. Immune activation of Bio-Germanium in a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial with 130 human subjects: Therapeutic opportunities from new insights. *PLoS One*. 2020 Oct 19;15(10):e0240358. doi: 10.1371/journal.pone.0240358.
115. Christmann M, Kaina B. Transcriptional regulation of human DNA repair genes following genotoxic stress: trigger mechanisms, inducible responses and genotoxic adaptation. *Nucleic Acids Res*. 2013 Oct;41(18):8403-20. doi: 10.1093/nar/gkt635.
116. Collia M, Møller P, Langie SAS, Vettorazzi A, Azqueta A. Further development of CometChip technology to measure DNA damage in vitro and in vivo: Comparison with the 2 gels/slide format of the standard and enzyme-modified comet assay. *Toxicology*. 2024 Jan;501:153690. doi: 10.1016/j.tox.2023.153690.
117. Collins A, Møller P, Gajski G, Vodenková S, Abdulwahed A, Anderson D, et al. Measuring DNA modifications with the comet assay: a compendium of

- protocols. *Nat Protoc.* 2023 Mar;18(3):929-989. doi: 10.1038/s41596-022-00754-y.
118. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004 Mar;26(3):249-61. doi: 10.1385/MB:26:3:249.
119. Conti M, Hsieh M, Zamah AM, Oh JS. Novel signaling mechanisms in the ovary during oocyte maturation and ovulation. *Mol Cell Endocrinol.* 2012 Jun 5;356(1-2):65-73. doi: 10.1016/j.mce.2011.11.002.
120. Cosway EJ, Lucas B, James KD, Parnell SM, Carvalho-Gaspar M, White AJ, et al. Redefining thymus medulla specialization for central tolerance. *J Exp Med.* 2017 Nov 6;214(11):3183-3195. doi: 10.1084/jem.20171000.
121. Cox E, Takov V. Embryology, Ovarian Follicle Development. 2025 Aug 3. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan.
122. Crowley LC, Marfell BJ, Waterhouse NJ. Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harb Protoc.* 2016 Sep 1;2016(9). doi: 10.1101/pdb.prot087205.
123. Crotty S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity.* 2019 May 21;50(5):1132-1148. doi: 10.1016/j.immuni.2019.04.011.
124. Curtin NJ, Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov.* 2020 Oct;19(10):711-736. doi: 10.1038/s41573-020-0076-6. Epub 2020 Sep 3.
125. Dai M, Xu Y, Gong G, Zhang Y. Roles of immune microenvironment in the female reproductive maintenance and regulation: novel insights into the crosstalk of immune cells. *Front Immunol.* 2023 Dec 28;14:1109122. doi: 10.3389/fimmu.2023.1109122.

126. Dai Y, Chen SR, Chai L, Zhao J, Wang Y, Wang Y. Overview of pharmacological activities of *Andrographis paniculata* and its major compound andrographolide. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019;59(sup1):S17-S29. doi: 10.1080/10408398.2018.1501657.
127. Daraghmeh DN, Salameh S, Zahdeh M, Ghanem R, Karaman R. Exploring the Effects of Oxidative Stress on Female Reproductive Function: The Role of Antioxidant Supplementation. *Curr Drug Metab*. 2025 Jun 16. doi: 10.2174/0113892002357565250604075932
128. Davies MJ, Hawkins CL. The Role of Myeloperoxidase in Biomolecule Modification, Chronic Inflammation, and Disease. *Antioxid Redox Signal*. 2020 May 1;32(13):957-981. doi: 10.1089/ars.2020.8030.
129. Deligianni E, Papanikolaou C, Terpos E, Souliotis VL. Elucidating DNA Damage-Dependent Immune System Activation. *Int J Mol Sci*. 2025 Jun 18;26(12):5849. doi: 10.3390/ijms26125849.
130. Devasagayam TP, Boloor KK, Ramasarma T. Methods for estimating lipid peroxidation: an analysis of merits and demerits. *Indian J Biochem Biophys*. 2003 Oct;40(5):300-8.
131. Dho SH, Cho M, Woo W, Jeong S, Kim LK. Caspases as master regulators of programmed cell death: apoptosis, pyroptosis and beyond. *Exp Mol Med*. 2025 Jun;57(6):1121-1132. doi: 10.1038/s12276-025-01470-9.
132. Dhuriya YK, Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death. *J Neuroinflammation*. 2018 Jul 6;15(1):199. doi: 10.1186/s12974-018-1235-0.
133. Ditsworth D, Zong WX, Thompson CB. Activation of poly(ADP)-ribose polymerase (PARP-1) induces release of the pro-inflammatory mediator HMGB1 from the nucleus. *J Biol Chem*. 2007 Jun 15;282(24):17845-54. doi: 10.1074/jbc.M701465200.

134. Dolaychuk OP, Fedoruk RS, Kropyvka SJ. Physiological reactivity and antioxidant defense system of the animal organism induced by germanium, chromium, and selenium “nanoaquacitrates.” *Agric Sci Pract*. 2015;2:50–55. doi:10.15407/agrisp2.02.050.
135. Dompe C, Kulus M, Stefańska K, Kranc W, Chermuła B, Bryl R, et al. Human Granulosa Cells-Stemness Properties, Molecular Cross-Talk and Follicular Angiogenesis. *Cells*. 2021 Jun 5;10(6):1396. doi: 10.3390/cells10061396.
136. Eker F, Duman H, Akdaşçı E, Witkowska AM, Bechelany M, Karav S. Silver Nanoparticles in Therapeutics and Beyond: A Review of Mechanism Insights and Applications. *Nanomaterials (Basel)*. 2024 Oct 10;14(20):1618. doi: 10.3390/nano14201618.
137. ELBini-Dhouib I, Manai M, Neili NE, Marzouki S, Sahraoui G, Ben Achour W, et al. Dual Mechanism of Action of Curcumin in Experimental Models of Multiple Sclerosis. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 4;23(15):8658. doi: 10.3390/ijms23158658.
138. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*. 2009 May;229(1):152-72. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x.
139. Ema M, Okuda H, Gamo M, Honda K. A review of reproductive and developmental toxicity of silver nanoparticles in laboratory animals. *Reprod Toxicol*. 2017 Jan;67:149-164. doi: 10.1016/j.reprotox.2017.01.005.
140. Endale M, Park SC, Kim S, Kim SH, Yang Y, Cho JY, et al. Quercetin disrupts tyrosine-phosphorylated phosphatidylinositol 3-kinase and myeloid differentiation factor-88 association, and inhibits MAPK/AP-1 and IKK/NF- κ B-induced inflammatory mediators production in RAW 264.7 cells. *Immunobiology*. 2013 Dec;218(12):1452-67. doi: 10.1016/j.imbio.2013.04.019.

141. Erener S, Pétrilli V, Kassner I, Minotti R, Castillo R, Santoro R, et al. Inflammasome-activated caspase 7 cleaves PARP1 to enhance the expression of a subset of NF- κ B target genes. *Mol Cell*. 2012 Apr 27;46(2):200-11. doi: 10.1016/j.molcel.2012.02.016.
142. Erdélyi K, Pacher P, Virág L, Szabó C. Role of poly(ADP-ribosyl)ation in a 'two-hit' model of hypoxia and oxidative stress in human A549 epithelial cells in vitro. *Int J Mol Med*. 2013 Aug;32(2):339-46. doi: 10.3892/ijmm.2013.1397.
143. Eskander G, Abdelhamid SG, Wahdan SA, Radwan SM. Insights on the crosstalk among different cell death mechanisms. *Cell Death Discov*. 2025 Feb 10;11(1):56. doi: 10.1038/s41420-025-02328-9.
144. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR. Sex differences in autoimmune disease from a pathological perspective. *Am J Pathol*. 2008 Sep;173(3):600-9. doi: 10.2353/ajpath.2008.071008.
145. Faizal AM, Elias MH, Jin NM, Abu MA, Syafruddin SE, Zainuddin AA, et al. Unravelling the role of HAS2, GREM1, and PTGS2 gene expression in cumulus cells: implications for human oocyte development competency - a systematic review and integrated bioinformatic analysis. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024 Mar 8;15:1274376. doi: 10.3389/fendo.2024.1274376.
146. Fehr AR, Singh SA, Kerr CM, Mukai S, Higashi H, Aikawa M. The impact of PARPs and ADP-ribosylation on inflammation and host-pathogen interactions. *Genes Dev*. 2020 Mar 1;34(5-6):341-359. doi: 10.1101/gad.334425.119.
147. Forrester SJ, Kikuchi DS, Hernandez MS, Xu Q, Griendling KK. Reactive Oxygen Species in Metabolic and Inflammatory Signaling. *Circ Res*. 2018 Mar 16;122(6):877-902. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311401.
148. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature

- Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 2018 Mar;25(3):486-541. doi: 10.1038/s41418-017-0012-4.
149. Gallyas F Jr, Sumegi B. Mitochondrial Protection by PARP Inhibition. *Int J Mol Sci.* 2020 Apr 16;21(8):2767. doi: 10.3390/ijms21082767.
 150. Gao Y, Zou Y, Wu G, Zheng L. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction of granulosa cells in polycystic ovarian syndrome. *Front Med (Lausanne).* 2023 Jun 28;10:1193749. doi: 10.3389/fmed.2023.1193749.
 151. García S, Conde C. The Role of Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 in Rheumatoid Arthritis. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:837250. doi: 10.1155/2015/837250.
 152. García-Sánchez A, Miranda-Díaz AG, Cardona-Muñoz EG. The Role of Oxidative Stress in Physiopathology and Pharmacological Treatment with Pro- and Antioxidant Properties in Chronic Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2020 Jul 23;2020:2082145. doi: 10.1155/2020/2082145.
 153. Gherasim O, Puiu RA, Bîrcă AC, Burduşel AC, Grumezescu AM. An Updated Review on Silver Nanoparticles in Biomedicine. *Nanomaterials (Basel).* 2020 Nov 23;10(11):2318. doi: 10.3390/nano10112318.
 154. Gonde DP, Bhole BK, Kakad KS. Andrographolide, diterpenoid constituent of *Andrographis paniculata*: Review on botany, phytochemistry, molecular docking analysis, and pharmacology. *Ann Pharm Fr.* 2024 Jan;82(1):15-43. doi: 10.1016/j.pharma.2023.10.001.
 155. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta.* 1991 Feb 15;196(2-3):143-51. doi: 10.1016/0009-8981(91)90067-m. PMID: 2029780.
 156. Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update.* 2009 Sep-Oct;15(5):517-35. doi: 10.1093/humupd/dmp004.

157. Guldenpfennig C, Teixeira E, Daniels M. NF- κ B's contribution to B cell fate decisions. *Front Immunol.* 2023 Jul 18;14:1214095. doi: 10.3389/fimmu.2023.1214095.
158. Gunasekarana V, Raj GV, Chand P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. *J Clin Diagn Res.* 2015 Mar;9(3):GE01-5. doi: 10.7860/JCDR/2015/12062.5622.
159. Guo C, Cai P, Jin L, Sha Q, Yu Q, Zhang W, et al. Single-cell profiling of the human decidual immune microenvironment in patients with recurrent pregnancy loss. *Cell Discov.* 2021 Jan 4;7(1):1. doi: 10.1038/s41421-020-00236-z.
160. Guo Q, Jin Y, Chen X, Ye X, Shen X, Lin M, et al. NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. *Signal Transduct Target Ther.* 2024 Mar 4;9(1):53. doi: 10.1038/s41392-024-01757-9.
161. Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic roles of curcumin: lessons learned from clinical trials. *AAPS J.* 2013 Jan;15(1):195-218. doi: 10.1208/s12248-012-9432-8.
162. Gupta DS, Bagwe Parab S, Kaur G. Promising effects of emoxypine and its succinate derivative in the management of various diseases-with insights on recent patent applications. *Curr Res Pharmacol Drug Discov.* 2022 Aug 1;3:100121. doi: 10.1016/j.crphar.2022.100121.
163. Grushka N, Makogon N, Pavlovych S, Bryzgina T, Martynova T, Sukhina V, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-hydroxyquinazoline exerts a protective effect against concanavalin A-induced hepatitis in mice. *J Health Sci.* 2014;3(11):463-468.
164. Grushka N, Pavlovych S, Kondratska O, Pilkevich N, Yanchii R. Effect of poly (ADP-ribose) polymerase inhibition on morpho-functional state of

- immunocytes under the condition of experimental endotoxemia in mice. *World J Pharm Pharm Sci.* 2019;8(8):161–173.
165. Haller-Kikkatalo K, Salumets A, Uibo R. Review on autoimmune reactions in female infertility: antibodies to follicle stimulating hormone. *Clin Dev Immunol.* 2012;2012:762541. doi: 10.1155/2012/762541.
 166. Han YF, Yan Y, Wang HY, Chu MY, Sun K, Feng ZW, et al. Effect of systemic lupus erythematosus on the ovarian reserve: A systematic review and meta-analysis. *Joint Bone Spine.* 2024 Jul;91(4):105728. doi: 10.1016/j.jbspin.2024.105728.
 167. Hao J, Sun W, Xu H. Pathogenesis of Concanavalin A induced autoimmune hepatitis in mice. *Int. Immunopharmacol.* 2022 Jan;102:108411. doi: 10.1016/j.intimp.2021.108411.
 168. Hareendran S, Ramakrishna B, Jayandharan GR. Synergistic inhibition of PARP-1 and NF- κ B signaling downregulates immune response against recombinant AAV2 vectors during hepatic gene therapy. *Eur J Immunol.* 2016 Jan;46(1):154-66. doi: 10.1002/eji.201545867.
 169. Hewlings SJ, Kalman DS. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. *Foods.* 2017 Oct 22;6(10):92. doi: 10.3390/foods6100092.
 170. Heymann F, Hamesch K, Weiskirchen R, Tacke F. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. *Lab Anim.* 2015 Apr;49(1 Suppl):12-20. doi: 10.1177/0023677215572841.
 171. Heymann F, Tacke F. Immunology in the liver--from homeostasis to disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2016 Feb;13(2):88-110. doi: 10.1038/nrgastro.2015.200.
 172. Hoeijmakers JH. DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med.* 2009 Oct 8;361(15):1475-85. doi: 10.1056/NEJMra0804615.

173. Hövelmeyer N, Schmidt-Supprian M, Ohnmacht C. NF- κ B in control of regulatory T cell development, identity, and function. *J Mol Med (Berl)*. 2022 Jul;100(7):985-995. doi: 10.1007/s00109-022-02215-1.
174. Hong Y, Boiti A, Vallone D, Foulkes NS. Reactive Oxygen Species Signaling and Oxidative Stress: Transcriptional Regulation and Evolution. *Antioxidants (Basel)*. 2024 Mar 1;13(3):312. doi: 10.3390/antiox13030312.
175. Hou Z, Yu T, Yi Q, Du Y, Zhou L, Zhao Y, et al. High-complexity of DNA double-strand breaks is key for alternative end-joining choice. *Commun Biol*. 2024 Aug 3;7(1):936. doi: 10.1038/s42003-024-06640-5.
176. Hu A, Mu Y, Huang G, Zhao S. Comparison of animal models for immune premature ovarian insufficiency. *PeerJ*. 2025 Oct 7;13:e20091. doi: 10.7717/peerj.20091.
177. Hu K, Tian H, Chen S, Liu Y, Wei R, Chen B, et al. PARP-1 in liver diseases: Molecular mechanisms, therapeutic potential and emerging clinical applications. *Mol Med Rep*. 2025 Dec;32(6):324. doi: 10.3892/mmr.2025.13689.
178. Hu T, Liu CH, Lei M, Zeng Q, Li L, Tang H. et al. Metabolic regulation of the immune system in health and diseases: mechanisms and interventions. *Sig Transduct Target Ther* 9, 268 (2024). <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01954-6>
179. Huang P, Chen G, Jin W, Mao K, Wan H, He Y. Molecular Mechanisms of Parthanatos and Its Role in Diverse Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022 Jun 30;23(13):7292. doi: 10.3390/ijms23137292.
180. Huang Y, Ren J, Qu X. Nanozymes: Classification, Catalytic Mechanisms, Activity Regulation, and Applications. *Chem Rev*. 2019 Mar 27;119(6):4357-4412. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00672.

181. Huang L, Shi L, Li M, Yin X, Ji X. Oxidative stress in endometriosis: Sources, mechanisms and therapeutic potential of antioxidants. *Int J Mol Med*. 2025 May;55(5):72. doi: 10.3892/ijmm.2025.5513.
182. Huang Y, Liu Z, Geng Y, Li F, Hu R, Song Y, et al. The risk factors, pathogenesis and treatment of premature ovarian insufficiency. *J Ovarian Res*. 2025 Jun 18;18(1):134. doi: 10.1186/s13048-025-01714-2.
183. Huang S, Liu K, Cheng A, Wang M, Cui M, Huang J, et al. SOCS Proteins Participate in the Regulation of Innate Immune Response Caused by Viruses. *Front Immunol*. 2020 Sep 25;11:558341. doi: 10.3389/fimmu.2020.558341.
184. Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BC. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev*. 2015 Feb;36(1):1-24. doi: 10.1210/er.2014-1020. Epub 2014 Sep 9.
185. Immediata V, Ronchetti C, Spadaro D, Cirillo F, Levi-Setti PE. Oxidative Stress and Human Ovarian Response-From Somatic Ovarian Cells to Oocytes Damage: A Clinical Comprehensive Narrative Review. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jul 6;11(7):1335. doi: 10.3390/antiox11071335.
186. Isola JVV, Hense JD, Osório CAP, Biswas S, Alberola-Ila J, Ocañas SR, et al. Reproductive Ageing: Inflammation, immune cells, and cellular senescence in the aging ovary. *Reproduction*. 2024 Jun 21;168(2):e230499. doi: 10.1530/REP-23-0499.
187. Iwata H. Age-associated changes in granulosa cells and follicular fluid in cows. *J Reprod Dev*. 2017 Aug 19;63(4):339-345. doi: 10.1262/jrd.2017-048.
188. Jin QH, Hu XJ, Zhao HY. Curcumin activates autophagy and attenuates high glucose-induced apoptosis in HUVECs through the ROS/NF- κ B signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2022;24(3):596. doi:10.3892/etm.2022.11533.
189. Jog NR, Caricchio R. Differential regulation of cell death programs in males and females by Poly (ADP-Ribose) Polymerase-1 and 17 β estradiol. *Cell Death Dis*. 2013 Aug 8;4(8):e758. doi: 10.1038/cddis.2013.251.

190. Kang H, Park HJ, Kang J, Hwang Y, Lee YJ, Park SU, et al. Advances in DNA damage detection: current progress, challenges, and future directions. *TrAC Trends Anal Chem.* 2025 Aug;189:118246. doi:10.1016/j.trac.2025.118246.
191. Kang M, Park S, Park SH, Lee HG, Park JH. A Double-Edged Sword: The Two Faces of PARylation. *Int J Mol Sci.* 2022 Aug 29;23(17):9826. doi: 10.3390/ijms23179826.
192. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, et al. HMGB1 in health and disease. *Mol Aspects Med.* 2014 Dec;40:1-116. doi: 10.1016/j.mam.2014.05.001.
193. Kari S, Subramanian K, Altomonte IA, Murugesan A, Yli-Harja O, Kandhavelu M. Programmed cell death detection methods: a systematic review and a categorical comparison. *Apoptosis.* 2022 Aug;27(7-8):482-508. doi: 10.1007/s10495-022-01735-y.
194. Kany S, Vollrath JT, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 28;20(23):6008. doi: 10.3390/ijms20236008.
195. Kaya M, Akdaşçi E, Eker F, Bechelany M, Karav S. Recent Advances of Silver Nanoparticles in Wound Healing: Evaluation of In Vivo and In Vitro Studies. *Int J Mol Sci.* 2025 Oct 11;26(20):9889. doi: 10.3390/ijms26209889.
196. Ke Y, Wang C, Zhang J, Zhong X, Wang R, Zeng X, et al. The Role of PARPs in Inflammation-and Metabolic-Related Diseases: Molecular Mechanisms and Beyond. *Cells.* 2019 Sep 6;8(9):1047. doi: 10.3390/cells8091047.
197. Khamineh Y, Ghiasvand M, Panahi-Alanagh S, Rastegarmand P, Zolghadri S, Stanek A. A Narrative Review of Quercetin's Role as a Bioactive Compound in Female Reproductive Disorders. *Nutrients.* 2025 Mar 24;17(7):1118. doi: 10.3390/nu17071118.

198. Kiers D, Koch RM, Hamers L, Gerretsen J, Thijs EJM, van Ede L, et al. Characterization of a model of systemic inflammation in humans in vivo elicited by continuous infusion of endotoxin. *Sci Rep*. 2017;7:40149. doi:10.1038/srep40149
199. Kirkland JB. Poly ADP-ribose polymerase-1 and health. *Exp Biol Med* (Maywood). 2010 May;235(5):561-8. doi: 10.1258/ebm.2010.009280.
200. Knapik LO, Paresh S, Nabi D, Brayboy LM. The Role of T Cells in Ovarian Physiology and Infertility. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Apr 26;10:713650. doi: 10.3389/fcell.2022.713650.
201. Kondratska OA, Grushka NG, Pavlovych SI, Meshko VV, Yanchii RI. Germanium citrate improves ovarian granulosa cells viability and antioxidant defense system in aging female mice during endotoxemia. *Fiziol Zh*. 2024;70(3):59–64. doi:10.15407/fz70.03.059.
202. Kossowska-Tomaszczuk K, De Geyter C, De Geyter M, Martin I, Holzgreve W, Scherberich A, et al. The multipotency of luteinizing granulosa cells collected from mature ovarian follicles. *Stem Cells*. 2009 Jan;27(1):210-9. doi: 10.1634/stemcells.2008-0233.
203. Kostallari E, Schwabe RF, Guillot A. Inflammation and immunity in liver homeostasis and disease: a nexus of hepatocytes, nonparenchymal cells and immune cells. *Cell Mol Immunol*. 2025;22:1205-1225. doi:10.1038/s41423-025-01313-7
204. Krych S, Gniewek J, Kolbowicz M, Adamczyk M, Hrapkiewicz T, Kowalczyk P. Oxidative Stress-Induced DNA Damage Response Pathways in Aortic Disease: Implications for Inflammation and Vascular Degeneration. *Int J Mol Sci*. 2026 Feb 14;27(4):1855. doi: 10.3390/ijms27041855.
205. Kuklin A, Slabber CF, Tortola L, Kwan CL, Liebisch G, Kondylis V, Mair F, Kopf M, Weber A, Werner S. An Nrf2-NF- κ B Crosstalk Controls Hepatocyte Proliferation in the Normal and Injured Liver. *Cell Mol*

- Gastroenterol Hepatol. 2025;19(7):101480. doi: 10.1016/j.jcmgh.2025.101480.
206. Kumar M, Yip L, Wang F, Marty SE, Fathman CG. Autoimmune disease: genetic susceptibility, environmental triggers, and immune dysregulation. Where can we develop therapies? *Front Immunol.* 2025 Aug 7;16:1626082. doi: 10.3389/fimmu.2025.1626082.
 207. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0.
 208. Langie SA, Azqueta A, Collins AR. The comet assay: past, present, and future. *Front Genet.* 2015 Aug 13;6:266. doi: 10.3389/fgene.2015.00266.
 209. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 Dec;1(6):a001651. doi: 10.1101/cshperspect.a001651. Epub 2009 Oct 7.
 210. Lee E, Song CH, Bae SJ, Ha KT, Karki R. Regulated cell death pathways and their roles in homeostasis, infection, inflammation, and tumorigenesis. *Exp Mol Med.* 2023;55:1632-43. doi:10.1038/s12276-023-01023-1.
 211. Li B, Ming H, Qin S, Nice EC, Dong J, Du Z, et al. Redox regulation: mechanisms, biology and therapeutic targets in diseases. *Signal Transduct Target Ther.* 2025 Mar 7;10(1):72. doi: 10.1038/s41392-024-02095-6.
 212. Li G, Xu J, Tian X, Xiao J, Long J, Chen Y, et al. Efferocytosis: the art of cellular clearance and novel perspectives in disease therapy. *Mol Cancer.* 2025 Oct 23;24(1):268. doi: 10.1186/s12943-025-02484-7.
 213. Li J, Li Q, Zhang L, Zhang S, Dai Y. Poly-ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors and ovarian function. *Biomed Pharmacother.* 2023 Jan;157:114028. doi: 10.1016/j.biopha.2022.114028.

214. Li J, Shi J, Sun Y, Zheng F. Glycyrrhizin, a Potential Drug for Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting High-Mobility Group Box 1. *DNA Cell Biol.* 2018 Dec;37(12):941-946. doi: 10.1089/dna.2018.4444.
215. Li L, Ruan T, Lyu Y, Wu B. Advances in effects of germanium or germanium compounds in animals. *J Biosci Med.* 2017;5(7):56-73. doi:10.4236/jbm.2017.57006.
216. Li L, Shi X, Shi Y, Wang Z. The Signaling Pathways Involved in Ovarian Follicle Development. *Front Physiol.* 2021 Sep 20;12:730196. doi: 10.3389/fphys.2021.730196.
217. Li N, Li Z, Fang F, Zhu C, Zhang W, Lu Y, et al. Two distinct resident macrophage populations coexist in the ovary. *Front Immunol.* 2022 Dec 20;13:1007711. doi: 10.3389/fimmu.2022.1007711.
218. Li Q, Qian W, Zhang Y, Hu L, Chen S, Xia Y. A new wave of innovations within the DNA damage response. *Signal Transduct Target Ther.* 2023 Sep 8;8(1):338. doi: 10.1038/s41392-023-01548-8.
219. Li R, Jia Z, Trush MA. Defining ROS in Biology and Medicine. *React Oxyg Species (Apex).* 2016;1(1):9-21. doi: 10.20455/ros.2016.803.
220. Li X, Yuan W, Wu J, Zhen J, Sun Q, Yu M. Andrographolide, a natural anti-inflammatory agent: An Update. *Front Pharmacol.* 2022 Sep 27;13:920435. doi: 10.3389/fphar.2022.920435
221. Li Y, Yao J, Han C, Yang J, Chaudhry MT, Wang S, et al. Quercetin, Inflammation and Immunity. *Nutrients.* 2016 Mar 15;8(3):167. doi: 10.3390/nu8030167.
222. Li Y, Wu J, Du F, Tang T, Lim JCW, Karuppiah T, et al. Neuroprotective Potential of Glycyrrhizic Acid in Ischemic Stroke: Mechanisms and Therapeutic Prospects. *Pharmaceuticals (Basel).* 2024 Nov 7;17(11):1493. doi: 10.3390/ph17111493.

223. Li Z, Li Y, Jiang T, Wang Y, Li C, He Z. Quercetin and Its Metabolites: Mechanistic Insights as the Basis of Their Therapeutic Potential in NAFLD and HCC. *Molecules*. 2025 Nov 17;30(22):4441. doi: 10.3390/molecules30224441.
224. Liang J, Gao Y, Feng Z, Zhang B, Na Z, Li D. Reactive oxygen species and ovarian diseases: Antioxidant strategies. *Redox Biol*. 2023 Jun;62:102659. doi: 10.1016/j.redox.2023.102659.
225. Liang Z, Xie H, Wu D. Immune mediated inflammatory diseases: moving from targeted biologic therapy, stem cell therapy to targeted cell therapy. *Front Immunol*. 2025 Apr 7;16:1520063. doi: 10.3389/fimmu.2025.1520063.
226. Libert C, Dejager L, Pinheiro I. The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nat Rev Immunol*. 2010 Aug;10(8):594-604. doi: 10.1038/nri2815.
227. Liao C, Li Y, Tjong SC. Bactericidal and Cytotoxic Properties of Silver Nanoparticles. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan 21;20(2):449. doi: 10.3390/ijms20020449.
228. Liao YR, Lin JY. Quercetin intraperitoneal administration ameliorates lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in mice. *Life Sci*. 2015 Sep 15;137:89-97. doi: 10.1016/j.lfs.2015.07.015.
229. Lin H, Xiong W, Fu L, Yi J, Yang J. Damage-associated molecular patterns (DAMPs) in diseases: implications for therapy. *Mol Biomed*. 2025 Aug 29;6(1):60. doi: 10.1186/s43556-025-00305-3.
230. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*. 1993 Apr 22;362(6422):709-15. doi: 10.1038/362709a0.
231. Liu J, Zhang X, Cheng Y, Cao X. Dendritic cell migration in inflammation and immunity. *Cell Mol Immunol*. 2021 Nov;18(11):2461-2471. doi: 10.1038/s41423-021-00726-4.

232. Liu N, Du J, Ge J, Liu SB. DNA damage-inducing endogenous and exogenous factors and research progress. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*. 2025;44(12):969-1001. doi: 10.1080/15257770.2024.2428436
233. Liu P, Li J, Li J, Li Y, Ji S, Tong W, et al. Poly-ADP-ribose polymerase (PARP) inhibitors and gonad function: a mini-review. *JSM Sex Med*. 2024;8(4):1143.. doi:10.47739/2578-3718/1143.
234. Liu S, Jia Y, Meng S, Luo Y, Yang Q, Pan Z. Mechanisms of and Potential Medications for Oxidative Stress in Ovarian Granulosa Cells: A Review. *Int J Mol Sci*. 2023 May 24;24(11):9205. doi: 10.3390/ijms24119205.
235. Liu T, Son M, Diamond B. HMGB1 in Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol*. 2020 May 27;11:1057. doi: 10.3389/fimmu.2020.01057.
236. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther*. 2017;2:17023–. doi: 10.1038/sigtrans.2017.23.
237. Liu T, Shang J, Chen Q. Superoxide Dismutases in Immune Regulation and Infectious Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2025 Jun 30;14(7):809. doi: 10.3390/antiox14070809.
238. Liu T, Huang Y, Lin H. Estrogen disorders: Interpreting the abnormal regulation of aromatase in granulosa cells (Review). *Int J Mol Med*. 2021 May;47(5):73. doi: 10.3892/ijmm.2021.4906.
239. Liu X, Domingues NP, Oveisi E, Coll-Satue C, Jansman MMT, Smit B, et al. Metal-organic framework-based oxygen carriers with antioxidant activity resulting from the incorporation of gold nanozymes. *Biomater Sci*. 2023 Mar 28;11(7):2551-2565. doi: 10.1039/d2bm01405j.
240. Liu Y, Hao H, Hou T. Concanavalin A-induced autoimmune hepatitis model in mice: Mechanisms and future outlook. *Open Life Sci*. 2022 Feb 28;17(1):91-101. doi: 10.1515/biol-2022-0013.

241. Liu ZR, Chen SQ, Zou YW, Wu XY, Li HY, Wang XQ, et al. Hypochlorite modified albumins promote cell death in the tubule interstitium in rats via mitochondrial damage in obstructive nephropathy and the protective effects of antioxidant peptides. *Free Radic Res*. 2018 May;52(5):616-628. doi: 10.1080/10715762.2018.1457789.
242. López-Collazo E, Del Fresno C. Endotoxin tolerance and trained immunity: breaking down immunological memory barriers. *Front Immunol*. 2024 Apr 29;15:1393283. doi: 10.3389/fimmu.2024.1393283.
243. Lorenzo Y, Costa S, Collins AR, Azqueta A. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*. 2013 Jul;28(4):427-32. doi: 10.1093/mutage/get018.
244. Lu H, Zhu ZG, Yao XX, Zhao R, Yan C, Zhang Y, Liu BY, Yin HR, Lin YZ. Hepatic preconditioning of doxorubicin in stop-flow chemotherapy: NF-kappaB/IkappaB-alpha pathway and expression of HSP72. *World J Gastroenterol*. 2005 Apr 14;11(14):2136-41. doi: 10.3748/wjg.v11.i14.2136.
245. Lu Y, Fu W, Xing W, Wu H, Zhang C, Xu D. Transcriptional regulation mechanism of PARP1 and its application in disease treatment. *Epigenetics Chromatin*. 2024 Aug 8;17(1):26. doi: 10.1186/s13072-024-00550-w.
246. Lu Q, Han W, Wen D, Guo P, Liu Y, Wu Z, et al. 18 β -Glycyrrhetic Acid Alleviates P. multocida-Induced Vascular Endothelial Inflammation by PARP1-Mediated NF- κ B and HMGB1 Signalling Suppression in PIEC Cells. *Infect Drug Resist*. 2023 Jun 29;16:4201-4212. doi: 10.2147/IDR.S413242.
247. Luo X, Sun J, Kong D, Lei Y, Gong F, Zhang T, et al. The role of germanium in diseases: exploring its important biological effects. *J Transl Med*. 2023 Nov 8;21(1):795. doi: 10.1186/s12967-023-04643-0.
248. Luo W, Mao P, Zhang L, Chen X, Yang Z. Assessment of ovarian reserve by serum anti-Müllerian hormone in patients with systemic lupus

- erythematosis: a meta-analysis. *Ann Palliat Med*. 2020 Mar;9(2):207-215. doi: 10.21037/apm.2020.02.11.
249. Luo R, Yao Y, Chen Z, Sun X. An examination of the LPS-TLR4 immune response through the analysis of molecular structures and protein-protein interactions. *Cell Commun Signal*. 2025 Mar 18;23(1):142. doi: 10.1186/s12964-025-02149-4.
250. Lytvynenko AP, Rieznichenko LS, Sribna VA, Stupchuk MI, Grushka NG, Shepel AA, et al. Functional status of reproductive system under treatment of silver nanoparticles in female mice. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol*. 2017. doi:10.18203/2320-1770.ijrcog20171930.
251. Mace EM. Human natural killer cells: Form, function, and development. *J Allergy Clin Immunol*. 2023 Feb;151(2):371-385. doi: 10.1016/j.jaci.2022.09.022.
252. Mahajan A, Herrmann M, Muñoz LE. Clearance Deficiency and Cell Death Pathways: A Model for the Pathogenesis of SLE. *Front Immunol*. 2016 Feb 8;7:35. doi: 10.3389/fimmu.2016.00035.
253. Maluchenko NV, Feofanov AV, Studitsky VM. PARP-1-Associated Pathological Processes: Inhibition by Natural Polyphenols. *Int J Mol Sci*. 2021 Oct 23;22(21):11441. doi: 10.3390/ijms222111441.
254. Manful CF, Fordjour E, Subramaniam D, Sey AA, Abbey L, Thomas R. Antioxidants and Reactive Oxygen Species: Shaping Human Health and Disease Outcomes. *Int J Mol Sci*. 2025 Aug 4;26(15):7520. doi: 10.3390/ijms26157520.
255. Mao D, Zheng Y, Xu F, Han X, Zhao H. HMGB1 in nervous system diseases: A common biomarker and potential therapeutic target. *Front Neurol*. 2022 Oct 31;13:1029891. doi: 10.3389/fneur.2022.1029891.
256. Martín-Guerrero SM, Muñoz-Gámez JA, Carrasco MC, Salmerón J, Martín-Estebané M, Cuadros MA, et al. Poly(ADP-ribose)polymerases

- inhibitors prevent early mitochondrial fragmentation and hepatocyte cell death induced by H₂O₂. *PLoS One*. 2017 Oct 26;12(10):e0187130. doi: 10.1371/journal.pone.0187130.
257. Mateen S, Moin S, Khan AQ, Zafar A, Fatima N. Increased Reactive Oxygen Species Formation and Oxidative Stress in Rheumatoid Arthritis. *PLoS One*. 2016 Apr 4;11(4):e0152925. doi: 10.1371/journal.pone.0152925.
 258. Mayadas TN, Tsokos GC, Tsuboi N. Mechanisms of immune complex-mediated neutrophil recruitment and tissue injury. *Circulation*. 2009 Nov 17;120(20):2012-24. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.771170.
 259. Mauri C, Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:221-41. doi: 10.1146/annurev-immunol-020711-074934.
 260. Maynard KI. Hormesis pervasiveness and its potential implications for pharmaceutical research and development. *Dose Response*. 2011;9(3):377-86. doi: 10.2203/dose-response.11-026.
 261. McInnes IB, Gravalles EM. Immune-mediated inflammatory disease therapeutics: past, present and future. *Nat Rev Immunol*. 2021 Oct;21(10):680-686. doi: 10.1038/s41577-021-00603-1.
 262. McShan D, Ray PC, Yu H. Molecular toxicity mechanism of nanosilver. *J Food Drug Anal*. 2014 Mar;22(1):116-127. doi: 10.1016/j.jfda.2014.01.010. Epub 2014 Feb 7.
 263. Meloun A, León B. Beyond CCR7: dendritic cell migration in type 2 inflammation. *Front Immunol*. 2025 Feb 28;16:1558228. doi: 10.3389/fimmu.2025.1558228.
 264. Mesin L, Ersching J, Victora GD. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity*. 2016 Sep 20;45(3):471-482. doi: 10.1016/j.immuni.2016.09.001.
 265. Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickancaité E, Segura-Aguilar J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to

- semiquinone and quinoidal product. *Free Radic Biol Med*. 1999 Jan;26(1-2):107-16. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00167-1.
266. Mieszawska AJ, Mulder WJ, Fayad ZA, Cormode DP. Multifunctional gold nanoparticles for diagnosis and therapy of disease. *Mol Pharm*. 2013 Mar 4;10(3):831-47. doi: 10.1021/mp3005885.
 267. Mildner A, Jung S. Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity*. 2014 May 15;40(5):642-56. doi: 10.1016/j.immuni.2014.04.016.
 268. Miller FW. The increasing prevalence of autoimmunity and autoimmune diseases: an urgent call to action for improved understanding, diagnosis, treatment, and prevention. *Curr Opin Immunol*. 2023 Feb;80:102266. doi: 10.1016/j.coi.2022.102266.
 269. Miles EA, Calder PC. Effects of Citrus Fruit Juices and Their Bioactive Components on Inflammation and Immunity: A Narrative Review. *Front Immunol*. 2021 Jun 24;12:712608. doi: 10.3389/fimmu.2021.712608.
 270. Milano L, Gautam A, Caldecott KW. DNA damage and transcription stress. *Mol Cell*. 2024 Jan 4;84(1):70-79. doi: 10.1016/j.molcel.2023.11.014.
 271. Modrich P. Mechanisms in *E. coli* and Human Mismatch Repair (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016 Jul 18;55(30):8490-501. doi: 10.1002/anie.201601412.
 272. Mohamed Y, El Ghareeb AW, Attaby F, Abd El-Rahman HA. Estimation of silver nanoparticles effect on the reproductive health of female Wistar rats. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*. 2022;9(1):340–358. doi:10.1080/2314808X.2022.2092821.
 273. Mollica L, De Marchis F, Spitaleri A, Dallacosta C, Pennacchini D, Zamai M, et al. Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chem Biol*. 2007 Apr;14(4):431-41. doi: 10.1016/j.chembiol.2007.03.007.

274. Monteleone G, Moscardelli A, Colella A, Marafini I, Salvatori S. Immune-mediated inflammatory diseases: Common and different pathogenic and clinical features. *Autoimmun Rev.* 2023 Oct;22(10):103410. doi: 10.1016/j.autrev.2023.103410.
275. Møller P, Azqueta A, Sanz-Serrano J, Bakuradze T, Richling E, Bankoglu EE, et al. Visual comet scoring revisited: a guide to scoring comet assay slides and obtaining reliable results. *Mutagenesis.* 2023;38(5):253–263. doi:10.1093/mutage/gead015.
276. Moura RD, Mattos PD, Valente PF, Hoch NC. Molecular mechanisms of cell death by parthanatos: More questions than answers. *Genet Mol Biol.* 2024 Aug 30;47Suppl 1(Suppl 1):e20230357. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2023-0357.
277. Muralidharan S, Mandrekar P. Cellular stress response and innate immune signaling: integrating pathways in host defense and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2013 Dec;94(6):1167-84. doi: 10.1189/jlb.0313153.
278. Murai J, Huang SY, Das BB, Renaud A, Zhang Y, Doroshov JH, et al. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors. *Cancer Res.* 2012 Nov 1;72(21):5588-99. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2753.
279. Mussbacher M, Derler M, Basílio J, Schmid JA. NF- κ B in monocytes and macrophages - an inflammatory master regulator in multitasked immune cells. *Front Immunol.* 2023 Feb 23;14:1134661. doi: 10.3389/fimmu.2023.1134661.
280. Nagalievska M, Sabadashka M, Hachkova H, Sybirna N. Galega officinalis extract regulate the diabetes mellitus related violations of proliferation, functions and apoptosis of leukocytes. *BMC Complement Altern Med.* 2018 Jan 8;18(1):4. doi: 10.1186/s12906-017-2079-3.
281. Naim N, Amrit FRG, McClendon TB, Yanowitz JL, Ghazi A. The molecular tug of war between immunity and fertility: Emergence of conserved

- signaling pathways and regulatory mechanisms. *Bioessays*. 2020 Dec;42(12):e2000103. doi: 10.1002/bies.202000103. Epub 2020 Nov 9.
282. Nakamura K, Takae S, Shiraishi E, Shinya K, Igualada AJ, Suzuki N. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor exposure reduces ovarian reserve followed by dysfunction in granulosa cells. *Sci Rep*. 2020 Oct 13;10(1):17058. doi: 10.1038/s41598-020-74087-9.
 283. Nastasi C, Mannarino L, D'Incalci M. DNA Damage Response and Immune Defense. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 12;21(20):7504. doi: 10.3390/ijms21207504.
 284. Nehme J, Mesilmany L, Varela-Eirin M, Brandenburg S, Altulea A, Lin Y, et al. Converting cell death into senescence by PARP1 inhibition improves recovery from acute oxidative injury. *Nat Aging*. 2024 Jun;4(6):771-782. doi: 10.1038/s43587-024-00627-x.
 285. Newton K, Strasser A, Kayagaki N, Dixit VM. Cell death. *Cell*. 2024 Jan 18;187(2):235-256. doi: 10.1016/j.cell.2023.11.044.
 286. Ninan N, Goswami N, Vasilev K. The Impact of Engineered Silver Nanomaterials on the Immune System. *Nanomaterials (Basel)*. 2020 May 18;10(5):967. doi: 10.3390/nano10050967.
 287. Norris RP, Ratzan WJ, Freudzon M, Mehlmann LM, Krall J, Movsesian MA, et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. *Development*. 2009 Jun;136(11):1869-78. doi: 10.1242/dev.035238.
 288. Ordaz DA, Gupta K, Bota DA. The role of Poly-ADP ribose polymerase (PARP) enzymes in chemotherapy-induced cognitive impairments - parallels with other neurodegenerative disorders. *Front Pharmacol*. 2025 Jun 9;16:1615843. doi: 10.3389/fphar.2025.1615843.
 289. Orisaka M, Mizutani T, Miyazaki Y, Shirafuji A, Tamamura C, Fujita M, et al. Chronic low-grade inflammation and ovarian dysfunction in women

- with polycystic ovarian syndrome, endometriosis, and aging. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Dec 13;14:1324429. doi: 10.3389/fendo.2023.1324429.
290. Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. *J Ovarian Res*. 2009 Jul 9;2(1):9. doi: 10.1186/1757-2215-2-9.
 291. Panier S, Wang S, Schumacher B. Genome Instability and DNA Repair in Somatic and Reproductive Aging. *Annu Rev Pathol*. 2024 Jan 24;19:261-290. doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-051122-093128.
 292. Patel PN, Shah RY, Ferguson JF, Reilly MP. Human experimental endotoxemia in modeling the pathophysiology, genomics, and therapeutics of innate immunity in complex cardiometabolic diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015 Mar;35(3):525-34. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304455.
 293. Patton T, Sarani H, Somuncuoglu N, Lawlor KE, Corbett AJ. Get with the program: regulation of T cell death. *Trends Immunol*. 2025 Nov 25:S1471-4906(25)00272-8. doi: 10.1016/j.it.2025.10.015.
 294. Pazzaglia S, Pioli C. Multifaceted Role of PARP-1 in DNA Repair and Inflammation: Pathological and Therapeutic Implications in Cancer and Non-Cancer Diseases. *Cells*. 2019 Dec 22;9(1):41. doi: 10.3390/cells9010041.
 295. Pechous RD. With Friends Like These: The Complex Role of Neutrophils in the Progression of Severe Pneumonia. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 May 1;7:160. doi: 10.3389/fcimb.2017.00160.
 296. Pesce B, Ribeiro CH, Larrondo M, Ramos V, Soto L, Catalán D, et al. TNF- α Affects Signature Cytokines of Th1 and Th17 T Cell Subsets through Differential Actions on TNFR1 and TNFR2. *Int J Mol Sci*. 2022 Aug 18;23(16):9306. doi: 10.3390/ijms23169306

297. Poole DH, Pate JL. Luteal microenvironment directs resident T lymphocyte function in cows. *Biol Reprod.* 2012;86(2):29, 1-10. doi: 10.1095/biolreprod.111.092296.
298. Pondman K, Le Gac S, Kishore U. Nanoparticle-induced immune response: Health risk versus treatment opportunity? *Immunobiology.* 2023 Mar;228(2):152317. doi: 10.1016/j.imbio.2022.152317.
299. Prabhu SB, Khalsa JK, Banerjee H, Das A, Srivastava S, Mattoo HR, et al. Role of apoptosis-inducing factor (Aif) in the T cell lineage. *Indian J Med Res.* 2013 Nov;138(5):577-90.
300. Qiao W, Huang Y, Bian Z, Sun X, Wang X, Gao Q, et al. Lipopolysaccharide-induced DNA damage response activates nuclear factor κ B signalling pathway via GATA4 in dental pulp cells. *Int Endod J.* 2019 Dec;52(12):1704-1715. doi: 10.1111/iej.13180.
301. Qin S, Kitty I, Hao Y, Zhao F, Kim W. Maintaining Genome Integrity: Protein Kinases and Phosphatases Orchestrate the Balancing Act of DNA Double-Strand Breaks Repair in Cancer. *Int J Mol Sci.* 2023 Jun 16;24(12):10212. doi: 10.3390/ijms241210212.
302. Qin X, Du J, He R, Li Y, Li H, Liang X. Potential mechanisms and therapeutic strategies for LPS-associated female fertility decline. *J Assist Reprod Genet.* 2024 Oct;41(10):2739-2758. doi: 10.1007/s10815-024-03226-2.
303. Qin Y, Li X, Shi L, Liu Y, Wang Z, Guan Y. The Expression of High Mobility Group Box-1 (HMG1) in the Peripheral Blood and Its Relation with Systemic Vasculitis Patients. *Iran J Public Health.* 2023 Nov;52(11):2390-2401. doi: 10.18502/ijph.v52i11.14038.
304. Radic M, Martinovic Kaliterna D, Radic J. Vascular manifestations of systemic lupus erythematosus. *Neth J Med.* 2013 Jan;71(1):10-6.

305. Radovits T, Zotkina J, Lin LN, Bömicke T, Arif R, Gerö D, et al. Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition improves endothelial dysfunction induced by hypochlorite. *Exp Biol Med* (Maywood). 2007 Oct;232(9):1204-12. doi: 10.3181/0701-RM-16.
306. Rafiyan M, Sadeghmousavi S, Akbarzadeh M, Rezaei N. Experimental animal models of chronic inflammation. *Curr Res Immunol*. 2023 Jun 11;4:100063. doi: 10.1016/j.crimmu.2023.100063.
307. Ray Chaudhuri A, Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2017 Oct;18(10):610-621. doi: 10.1038/nrm.2017.53.
308. Reau NS, Lammert CS, Weinberg EM. Autoimmune hepatitis: Current and future therapies. *Hepatol Commun*. 2024 Jun 5;8(6):e0458. doi: 10.1097/HC9.0000000000000458.
309. Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol*. 1957 Jul;28(1):56-63. doi: 10.1093/ajcp/28.1.56.
310. Ren W, Zhao L, Sun Y, Wang X, Shi X. HMGB1 and Toll-like receptors: potential therapeutic targets in autoimmune diseases. *Mol Med*. 2023 Sep 4;29(1):117. doi: 10.1186/s10020-023-00717-3.
311. Richani D, Dunning KR, Thompson JG, Gilchrist RB. Metabolic co-dependence of the oocyte and cumulus cells: essential role in determining oocyte developmental competence. *Hum Reprod Update*. 2021 Jan 4;27(1):27-47. doi: 10.1093/humupd/dmaa043.
312. Rieger AM, Nelson KL, Konowalchuk JD, Barreda DR. Modified annexin V/propidium iodide apoptosis assay for accurate assessment of cell death. *J Vis Exp*. 2011 Apr 24;(50):2597. doi: 10.3791/2597.

313. Roberti A, Chaffey LE, Greaves DR. NF- κ B Signaling and Inflammation-Drug Repurposing to Treat Inflammatory Disorders? *Biology* (Basel). 2022 Feb 26;11(3):372. doi: 10.3390/biology11030372.
314. Rock KL, Latz E, Ontiveros F, Kono H. The sterile inflammatory response. *Annu Rev Immunol*. 2010;28:321-42. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101311.
315. Rodríguez-Pérez J, Andreu-Martínez R, Daza R, Fernández-Arroyo L, Hernández-García A, Díaz-García E, et al. Oxidative Stress and Inflammation in Hypoxemic Respiratory Diseases and Their Comorbidities: Molecular Insights and Diagnostic Advances in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Sleep Apnea. *Antioxidants* (Basel). 2025 Jul 8;14(7):839. doi: 10.3390/antiox14070839.
316. Ropert B, Gallrein C, Schumacher B. DNA repair deficiencies and neurodegeneration. *DNA Repair* (Amst). 2024 Jun;138:103679. doi: 10.1016/j.dnarep.2024.103679.
317. Rosado MM, Bennici E, Novelli F, Pioli C. Beyond DNA repair, the immunological role of PARP-1 and its siblings. *Immunology*. 2013 Aug;139(4):428-37. doi: 10.1111/imm.12099.
318. Roszak K, Roy K, Sobocińska J, Spisz P, Jędrzejewski T, Wrotek S. Endotoxin's Impact on Organism: From Immune Activation to Tolerance and Beyond. *J Clin Med*. 2025 Sep 14;14(18):6478. doi: 10.3390/jcm14186478.
319. Rudolph J, Jung K, Luger K. Inhibitors of PARP: Number crunching and structure gazing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022 Mar 15;119(11):e2121979119. doi: 10.1073/pnas.2121979119.
320. Ruth KS, Day FR, Hussain J, Martínez-Marchal A, Aiken CE, Azad A, et al. Genetic insights into biological mechanisms governing human ovarian ageing. *Nature*. 2021 Aug;596(7872):393-397. doi: 10.1038/s41586-021-03779-7.

321. Saifi MA, Seal S, Godugu C. Nanoceria, the versatile nanoparticles: Promising biomedical applications. *J Control Release*. 2021 Oct 10;338:164-189. doi: 10.1016/j.jconrel.2021.08.033.
322. Sadeghpour Heravi, F. Gut Microbiota and Autoimmune Diseases: Mechanisms, Treatment, Challenges, and Future Recommendations. *Curr Clin Micro Rpt* **11**, 18–33 (2024). <https://doi.org/10.1007/s40588-023-00213-6>
323. Samrot AV, Noel Richard Prakash LX. Nanoparticles Induced Oxidative Damage in Reproductive System and Role of Antioxidants on the Induced Toxicity. *Life (Basel)*. 2023 Mar 13;13(3):767. doi: 10.3390/life13030767.
324. Sancar A. Mechanisms of DNA Repair by Photolyase and Excision Nuclease (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2016 Jul 18;55(30):8502-27. doi: 10.1002/anie.201601524
325. Sanfins A, Rodrigues P, Albertini DF. GDF-9 and BMP-15 direct the follicle symphony. *J Assist Reprod Genet*. 2018 Oct;35(10):1741-1750. doi: 10.1007/s10815-018-1268-4.
326. Sedger LM, McDermott MF. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014 Aug;25(4):453-72. doi: 10.1016/j.cytogfr.2014.07.016.
327. Seo J, Lee J, Kim S, Lee M, Yang H. Lipid Polysaccharides have a Detrimental Effect on the Function of the Ovaries and Uterus in Mice through Increased Pro-Inflammatory Cytokines. *Dev Reprod*. 2022 Dec;26(4):135-144. doi: 10.12717/DR.2022.26.4.135.
328. Shah B, Hussain M, Seth A. Homologous Recombination Deficiency in Ovarian and Breast Cancers: Biomarkers, Diagnosis, and Treatment. *Curr Issues Mol Biol*. 2025 Aug 8;47(8):638. doi: 10.3390/cimb47080638.

329. Shah ST, Chowdhury ZZ, Simarani K, Basirun WJ, Badruddin IA, Hussien M, et al. Nanoantioxidants: The Fourth Generation of Antioxidants—Recent Research Roadmap and Future Perspectives. *Coatings*. 2022;12(10):1568. doi:10.3390/coatings12101568.
330. Shang Y, Song N, He R, Wu M. Antioxidants and Fertility in Women with Ovarian Aging: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Adv Nutr*. 2024 Aug;15(8):100273. doi: 10.1016/j.advnut.2024.100273.
331. Shen S, Shao Y, Li C. Different types of cell death and their shift in shaping disease. *Cell Death Discov*. 2023 Aug 4;9(1):284. doi: 10.1038/s41420-023-01581-0.
332. Shekh K, Khan S, Jena G, Kansara BR, Kushwaha S. 3-Aminobenzamide--a PARP inhibitor enhances the sensitivity of peripheral blood micronucleus and comet assays in mice. *Toxicol Mech Methods*. 2014 Jun;24(5):332-41. doi: 10.3109/15376516.2014.898355.
333. Shepel E, Grushka N, Makogon N, Voznesenskaya T, Yanchii R. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) protects against experimental immune complex-induced ovarian failure in mice. *Int J Health Sci Res*. 2016;6(11):103–108.
334. Shepel E, Grushka N, Makogon N, Sribna V, Pavlovych S, Yanchii R. Changes in DNA integrity and gene expression in ovarian follicular cells of lipopolysaccharide-treated female mice. *Pharmacol Rep*. 2018 Dec;70(6):1146-1149. doi: 10.1016/j.pharep.2018.06.005.
335. Shi HW, Yang BC, Ren YQ, Xue Y. Applications of Antioxidant Nanoparticles in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2025 Sep 18;14(9):1128. doi: 10.3390/antiox14091128.
336. Shi YQ, Zhu XT, Zhang SN, Ma YF, Han YH, Jiang Y, Zhang YH. Premature ovarian insufficiency: a review on the role of oxidative stress and

- the application of antioxidants. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Aug 1;14:1172481. doi: 10.3389/fendo.2023.1172481.
337. Singh M, Thakur V, Kumar V, Raj M, Gupta S, Devi N, et al. Silver Nanoparticles and Its Mechanistic Insight for Chronic Wound Healing: Review on Recent Progress. *Molecules*. 2022 Aug 30;27(17):5587. doi: 10.3390/molecules27175587.
 338. Sitia G, Iannacone M, Müller S, Bianchi ME, Guidotti LG. Treatment with HMGB1 inhibitors diminishes CTL-induced liver disease in HBV transgenic mice. *J Leukoc Biol*. 2007 Jan;81(1):100-7. doi: 10.1189/jlb.0306173.
 339. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:591-619. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132706
 340. Smith AJ, Ball SS, Bowater RP, Wormstone IM. PARP-1 inhibition influences the oxidative stress response of the human lens. *Redox Biol*. 2016 Aug;8:354-62. doi: 10.1016/j.redox.2016.03.003.
 341. Sobczak M, Zyma M, Robaszkiewicz A. The Role of PARP1 in Monocyte and Macrophage Commitment and Specification: Future Perspectives and Limitations for the Treatment of Monocyte and Macrophage Relevant Diseases with PARP Inhibitors. *Cells*. 2020 Sep 6;9(9):2040. doi: 10.3390/cells9092040.
 342. Song ZF, Ji XP, Li XX, Wang SJ, Wang SH, Zhang Y. Inhibition of the activity of poly (ADP-ribose) polymerase reduces heart ischaemia/reperfusion injury via suppressing JNK-mediated AIF translocation. *J Cell Mol Med*. 2008 Aug;12(4):1220-8. doi: 10.1111/j.1582-4934.2008.00183.x.
 343. Song Y, Li J, Wu Y. Evolving understanding of autoimmune mechanisms and new therapeutic strategies of autoimmune disorders. *Signal*

- Transduct Target Ther. 2024 Oct 4;9(1):263. doi: 10.1038/s41392-024-01952-8. Erratum in: Signal Transduct Target Ther. 2025 Dec 24;10(1):426. doi: 10.1038/s41392-025-02525-z.
344. Souliotis VL, Sfrikakis PP. Increased DNA double-strand breaks and enhanced apoptosis in patients with lupus nephritis. *Lupus*. 2015 Jul;24(8):804-15. doi: 10.1177/0961203314565413.
 345. Sorochinska J, Mikhailenko V. Application of the comet assay for the DNA damage assessment caused by different environmental agents. *Oncology*. 2008; 10 (3): 303-8.
 346. Spiegel JO, Van Houten B, Durrant JD. PARP1: Structural insights and pharmacological targets for inhibition. *DNA Repair (Amst)*. 2021 Jul;103:103125. doi: 10.1016/j.dnarep.2021.103125.
 347. Spivak NY, Shepel EA, Zholobak NM, Shcherbakov AB, Antonovitch GV, Yanchiy RI, et al. Ceria nanoparticles boost activity of aged murine oocytes. *Nano Biomed Eng*. 2012;4(4):188-194. doi:10.5101/nbe.v4i4.p188-194.
 348. Stixová L, Tichý V, Bártová E. RNA-related DNA damage and repair: The role of N7-methylguanosine in the cell nucleus exposed to UV light. *Heliyon*. 2024 Feb 7;10(4):e25599. doi: 10.1016/j.heliyon.2024.e25599.
 349. Stringer JM, Alesi LR, Winship AL, Hutt KJ. Beyond apoptosis: evidence of other regulated cell death pathways in the ovary throughout development and life. *Hum Reprod Update*. 2023 Jul 5;29(4):434-456. doi: 10.1093/humupd/dmad005.
 350. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2001 May;Appendix 3:Appendix 3B. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.
 351. Su Z, Ding P, Su W, Li X, Li Y, Li X, et al. Association between oxidative balance score and female infertility from the national health and

- nutrition examination survey 2013-2018. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024 Jul 30;15:1386021. doi: 10.3389/fendo.2024.1386021.
352. Sun Y, Chen H, Dai J, Wan Z, Xiong P, Xu Y, et al. Glycyrrhizin Protects Mice Against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Inhibiting High-Mobility Group Box 1 (HMGB1) Expression and Neuronal HMGB1 Release. *Front Immunol*. 2018 Jul 2;9:1518. doi: 10.3389/fimmu.2018.01518.
353. Sunderkötter C, Golle L, Pillebout E, Michl C. Pathophysiology and clinical manifestations of immune complex vasculitides. *Front Med (Lausanne)*. 2023 Mar 3;10:1103065. doi: 10.3389/fmed.2023.1103065.
354. Takeda T, Azumi J, Masaki M, Nagasawa T, Shimada Y, Aso H, et al. Organogermanium, Ge-132, promotes the clearance of senescent red blood cells via macrophage-mediated phagocyte activation. *Heliyon*. 2023 Dec 3;10(1):e23296. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e23296.
355. Takeda T, Doiyama S, Azumi J, Shimada Y, Tokuji Y, Yamaguchi H, et al. Organogermanium suppresses cell death due to oxidative stress in normal human dermal fibroblasts. *Sci Rep*. 2019 Sep 20;9(1):13637. doi: 10.1038/s41598-019-49883-7.
356. Tanaka T, Kishimoto T. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunol Res*. 2014 Apr;2(4):288-94. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0022.
357. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014 Sep 4;6(10):a016295. doi: 10.1101/cshperspect.a016295.
358. Taniguchi K, Karin M. NF- κ B, inflammation, immunity and cancer: coming of age. *Nat Rev Immunol*. 2018 May;18(5):309-324. doi: 10.1038/nri.2017.142.

359. Tavoosi S, Baghsheikhi AH, Shetab-Boushehri SV, Navaei-Nigjeh M, Sarvestani NN, Karimi MY, et al. Cerium and Yttrium Oxide Nanoparticles and Nano-selenium Produce Protective Effects Against H₂O₂-induced Oxidative Stress in Pancreatic Beta Cells by Modulating Mitochondrial Dysfunction. *Pharm Nanotechnol.* 2020;8(1):63-75. doi: 10.2174/2211738507666191002154659.
360. Tang M, Zhao M, Shi Y. New insight into the role of macrophages in ovarian function and ovarian aging. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2023 Nov 6;14:1282658. doi: 10.3389/fendo.2023.1282658.
361. Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. *J Clin Invest.* 1992 Jul;90(1):196-203. doi: 10.1172/JCI115836.
362. Tóth-Zsámboki E, Horváth E, Vargova K, Pankotai E, Murthy K, Zsengeller Z, et al. Activation of poly(ADP-ribose) polymerase by myocardial ischemia and coronary reperfusion in human circulating leukocytes. *Mol Med.* 2006 Sep-Oct;12(9-10):221-8. doi: 10.2119/2006-00055.
363. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76(9):4350-4. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350.
364. Tubbs A, Nussenzweig A. Endogenous DNA Damage as a Source of Genomic Instability in Cancer. *Cell.* 2017 Feb 9;168(4):644-656. doi: 10.1016/j.cell.2017.01.002.
365. Turathum B, Gao EM, Chian RC. The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. *Cells.* 2021 Sep 2;10(9):2292. doi: 10.3390/cells10092292.

366. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Nov;1843(11):2563-2582. doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.05.014.
367. Trares K, Ackermann J, Koch I. The canonical and non-canonical NF- κ B pathways and their crosstalk: A comparative study based on Petri nets. *Biosystems*. 2022 Jan;211:104564. doi: 10.1016/j.biosystems.2021.104564.
368. Xiang Y, Zhang M, Jiang D, Su Q, Shi J. The role of inflammation in autoimmune disease: a therapeutic target. *Front Immunol*. 2023 Oct 4;14:1267091. doi: 10.3389/fimmu.2023.1267091.
369. Vaccari S, Horner K, Mehlmann LM, Conti M. Generation of mouse oocytes defective in cAMP synthesis and degradation: endogenous cyclic AMP is essential for meiotic arrest. *Dev Biol*. 2008 Apr 1;316(1):124-34. doi: 10.1016/j.ydbio.2008.01.018
370. van Lier D, Geven C, Leijte GP, Pickkers P. Experimental human endotoxemia as a model of systemic inflammation. *Biochimie*. 2019 Apr;159:99-106. doi: 10.1016/j.biochi.2018.06.014.
371. Veith S, Mangerich A. RecQ helicases and PARP1 team up in maintaining genome integrity. *Ageing Res Rev*. 2015 Sep;23(Pt A):12-28. doi: 10.1016/j.arr.2014.12.006.
372. Venereau E, Ceriotti C, Bianchi ME. DAMPs from Cell Death to New Life. *Front Immunol*. 2015 Aug 18;6:422. doi: 10.3389/fimmu.2015.00422.
373. Vitali R, Mancuso AB, Palone F, Pioli C, Cesi V, Negroni A, et al. PARP1 Activation Induces HMGB1 Secretion Promoting Intestinal Inflammation in Mice and Human Intestinal Organoids. *Int J Mol Sci*. 2023 Apr 12;24(8):7096. doi: 10.3390/ijms24087096.
374. Vladimirova D, Staneva S, Ugrinova I. Multifaceted role of HMGB1: From nuclear functions to cytoplasmic and extracellular signaling in

- inflammation and cancer-Review. *Adv Protein Chem Struct Biol.* 2025;143:271-300. doi: 10.1016/bs.apcsb.2024.09.014.
375. Vlieghe H, Leonel ECR, Asiabi P, Amorim CA. The characterization and therapeutic applications of ovarian theca cells: An update. *Life Sci.* 2023 Mar 15;317:121479. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121479.
376. Voros C, Chatzinikolaou F, Papadimas G, Polykalas S, Sapantzoglou I, Koulakmanidis AM, et al. Oxidative Stress-Telomere Axis in IVF: Molecular Mechanisms, Biomarkers, and Clinical Translation. *Int J Mol Sci.* 2025 Nov 24;26(23):11359. doi: 10.3390/ijms262311359.
377. Voznesenskaya T, Makogon N, Bryzgina T, Sukhina V, Grushka N, Alexeyeva I. Melatonin protects against experimental immune ovarian failure in mice. *Reprod Biol.* 2007 Nov;7(3):207-20.
378. Wallace WH, Kelsey TW. Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One.* 2010 Jan 27;5(1):e8772. doi: 10.1371/journal.pone.0008772.
379. Walsh SK, English FA, Crocker IP, Johns EJ, Kenny LC. Contribution of PARP to endothelial dysfunction and hypertension in a rat model of pre-eclampsia. *Br J Pharmacol.* 2012 Aug;166(7):2109-16. doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01906.x.
380. Wang F, Guo Z, Carr MJ, Shi W. PARPs and PARP inhibitors: molecular mechanisms and clinical applications. *Mol Biomed.* 2025 Dec 29;6(1):152. doi: 10.1186/s43556-025-00385-1.
381. Wang HX, Liu M, Weng SY, Li JJ, Xie C, He HL, et al. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol.* 2012 Jan 14;18(2):119-25. doi: 10.3748/wjg.v18.i2.119.
382. Wang J, Sadeghi CA, Le LV, Le Bouteiller M, Frock RL. ATM and 53BP1 regulate alternative end joining-mediated V(D)J recombination. *Sci Adv.* 2024 Aug 2;10(31):eadn4682. doi: 10.1126/sciadv.adn4682.

383. Wang T, Kuley R, Hermanson P, Chu P, Pohlmeier C, Ravichandar JD, et al. Immune complexes-mediated activation of neutrophils in systemic lupus erythematosus is dependent on RNA recognition by toll-like receptor 8. *Front Immunol.* 2024 Dec 24;15:1515469. doi: 10.3389/fimmu.2024.1515469.
384. Wang X, Pepling ME. Regulation of Meiotic Prophase One in Mammalian Oocytes. *Front Cell Dev Biol.* 2021 May 20;9:667306. doi: 10.3389/fcell.2021.667306.
385. Wang Y, Kim NS, Haince JF, Kang HC, David KK, Andrabi SA, et al. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Sci Signal.* 2011 Apr 5;4(167):ra20. doi: 10.1126/scisignal.2000902.
386. Wang Y, Pleasure D, Deng W, Guo F. Therapeutic Potentials of Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP1) Inhibition in Multiple Sclerosis and Animal Models: Concept Revisiting. *Adv Sci (Weinh).* 2022 Feb;9(5):e2102853. doi: 10.1002/advs.202102853. Epub 2021 Dec 21.
387. Wang Y, Su M, Chen Y, Huang X, Ruan L, Lv Q, et al. Research progress on the role and mechanism of DNA damage repair in germ cell development. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023 Jul 17;14:1234280. doi: 10.3389/fendo.2023.1234280.
388. Wang Y, Han Y, Xu DX. Developmental impacts and toxicological hallmarks of silver nanoparticles across diverse biological models. *Environ Sci Ecotechnol.* 2023 Oct 1;19:100325. doi: 10.1016/j.esse.2023.100325.
389. Wardi J, Ernst O, Lilja A, Aeed H, Katz S, Ben-Nachum I, et al. 3-Aminobenzamide Prevents Concanavalin A-Induced Acute Hepatitis by an Anti-inflammatory and Anti-oxidative Mechanism. *Dig Dis Sci.* 2018 Dec;63(12):3382-3397. doi: 10.1007/s10620-018-5267-1.

390. Wedemeyer SA, Griffith AV. Thymic B cells in aging and autoimmune disease. *Front Immunol.* 2025 Jun 23;16:1595805. doi: 10.3389/fimmu.2025.1595805.
391. Winterhager E, Kidder GM. Gap junction connexins in female reproductive organs: implications for women's reproductive health. *Hum Reprod Update.* 2015 May-Jun;21(3):340-52. doi: 10.1093/humupd/dmv007.
392. Wu H, Cui J, Huang J, Feng Y, Zhao J, Zhu Y, et al. Cell death signaling and immune regulation: new perspectives on targeted therapy for sepsis. *Cell Mol Biol Lett.* 2025 Aug 15;30(1):99. doi: 10.1186/s11658-025-00784-w.
393. Ueno E, Watanabe M, Kondo Y, Nakagata N, Takeo T, Nakao S, et al. 17 β -estradiol and estrogen receptor alpha protect mouse ovarian follicle development by repressing atresia. *iScience.* 2025 Jan 20;28(2):111846. doi: 10.1016/j.isci.2025.111846.
394. Xi H, Chen X, Wang X, Jiang F, Niu D. Role of programmed cell death in mammalian ovarian follicular atresia. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2025 Mar;247:106667. doi: 10.1016/j.jsbmb.2024.106667. Epub 2024 Dec 24.
395. Xie J, Wang H, Kang Y, Zhou L, Liu Z, Qin B, et al. Chinese Epidemiological Study of Sepsis (CHESS) Study Investigators. The Epidemiology of Sepsis in Chinese ICUs: A National Cross-Sectional Survey. *Crit Care Med.* 2020 Mar;48(3):e209-e218. doi: 10.1097/CCM.00000000000004155.
396. Xie J, Xu X, Liu S. Intercellular communication in the cumulus-oocyte complex during folliculogenesis: A review. *Front Cell Dev Biol.* 2023 Jan 19;11:1087612. doi: 10.3389/fcell.2023.1087612.
397. Xing J, Wang K, Xu YC, Pei ZJ, Yu QX, Liu XY, et al. Efferocytosis: Unveiling its potential in autoimmune disease and treatment strategies. *Autoimmun Rev.* 2024 Jun;23(6):103578. doi: 10.1016/j.autrev.2024.103578. Epub 2024 Jul 14.

398. Xu J, Li Y, Yang X, Li H, Xiao X, You J, et al. Quercetin inhibited LPS-induced cytokine storm by interacting with the AKT1-FoxO1 and Keap1-Nrf2 signaling pathway in macrophages. *Sci Rep*. 2024 Sep 8;14(1):20913. doi: 10.1038/s41598-024-71569-y. Erratum in: *Sci Rep*. 2024 Nov 12;14(1):27708. doi: 10.1038/s41598-024-78855-9.
399. Xu L, Wang YY, Huang J, Chen CY, Wang ZX, Xie H. Silver nanoparticles: Synthesis, medical applications and biosafety. *Theranostics*. 2020 Jul 11;10(20):8996-9031. doi: 10.7150/thno.45413.
400. Xu M, Tian LL, Li XL, Bao C, Zhang HW, Chen HW. Ovarian function in patients with systemic lupus erythematosus: Pathogenesis, drug application and prospective therapies. *World J Exp Med*. 2024 Jun 20;14(2):88867. doi: 10.5493/wjem.v14.i2.88867.
401. Xu X, Wang Z, Lv L, Liu C, Wang L, Sun YN, et al. Molecular regulation of DNA damage and repair in female infertility: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2024 Aug 14;22(1):103. doi: 10.1186/s12958-024-01273-z.
402. Xue Q, Liu X, Chen C, Zhang X, Xie P, Liu Y, et al. Erlotinib protects against LPS-induced parthanatos through inhibiting macrophage surface TLR4 expression. *Cell Death Discov*. 2021 Jul 16;7(1):181. doi: 10.1038/s41420-021-00571-4.
403. Yan Z, Chen Q, Xia Y. Oxidative Stress Contributes to Inflammatory and Cellular Damage in Systemic Lupus Erythematosus: Cellular Markers and Molecular Mechanism. *J Inflamm Res*. 2023 Feb 4;16:453-465. doi: 10.2147/JIR.S399284.
404. Yang H, Wang H, Andersson U. Targeting Inflammation Driven by HMGB1. *Front Immunol*. 2020 Mar 20;11:484. doi: 10.3389/fimmu.2020.00484.

405. Yang Y, Guo L, Wang Z, Liu P, Liu X, Ding J, et al. Targeted silver nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy via macrophage apoptosis and Re-polarization. *Biomaterials*. 2021 Jan;264:120390. doi: 10.1016/j.biomaterials.2020.120390. Epub 2020 Sep 19. Erratum in: *Biomaterials*. 2025 May;316:122994. doi: 10.1016/j.biomaterials.2024.122994.
406. Yang Z, Li L, Chen L, Yuan W, Dong L, Zhang Y, et al. PARP-1 mediates LPS-induced HMGB1 release by macrophages through regulation of HMGB1 acetylation. *J Immunol*. 2014 Dec 15;193(12):6114-23. doi: 10.4049/jimmunol.1400359.
407. Yu H, Lin L, Zhang Z, Zhang H, Hu H. Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study. *Signal Transduct Target Ther*. 2020 Sep 21;5(1):209. doi: 10.1038/s41392-020-00312-6.
408. Yu J, Qu H, Xu W, Fang Y, Wang N, Shi W. Mechanisms and therapeutic potential of glycyrrhizic acid: Insights into key signaling pathways and disease modulation. *Mol Med Rep*. 2026 May;33(5):126. doi: 10.3892/mmr.2026.13836.
409. Yu Y, Liu S, Yang L, Song P, Liu Z, Liu X, et al. Roles of reactive oxygen species in inflammation and cancer. *MedComm (2020)*. 2024 Apr 4;5(4):e519. doi: 10.1002/mco2.519.
410. Yu Y, Tang D, Kang R. Oxidative stress-mediated HMGB1 biology. *Front Physiol*. 2015 Apr 7;6:93. doi: 10.3389/fphys.2015.00093.
411. Yusoh NA, Ahmad H, Gill MR. Combining PARP Inhibition with Platinum, Ruthenium or Gold Complexes for Cancer Therapy. *ChemMedChem*. 2020 Nov 18;15(22):2121-2135. doi: 10.1002/cmdc.202000391.
412. Zafar A, Lahori D, Namit AF, Paxton Z, Ratna N, Thornton D, et al. Curcumin in inflammatory complications: therapeutic applications and

- clinical evidence. *Int J Mol Sci.* 2025;26(19):9366. doi:10.3390/ijms26199366.
413. Zeng L, Yang T, Yang K, Yu G, Li J, Xiang W, et al. Curcumin and Curcuma longa Extract in the Treatment of 10 Types of Autoimmune Diseases: A Systematic Review and Meta-Analysis of 31 Randomized Controlled Trials. *Front Immunol.* 2022 Aug 1;13:896476. doi: 10.3389/fimmu.2022.896476.
 414. Zhang G, Wang J, Zhao Z, Xin T, Fan X, Shen Q, et al. Regulated necrosis, a proinflammatory cell death, potentially counteracts pathogenic infections. *Cell Death Dis.* 2022 Jul 22;13(7):637. doi: 10.1038/s41419-022-05066-3.
 415. Zhang HX, Li YY, Liu ZJ, Wang JF. Quercetin effectively improves LPS-induced intestinal inflammation, pyroptosis, and disruption of the barrier function through the TLR4/NF- κ B/NLRP3 signaling pathway *in vivo* and *in vitro*. *Food Nutr Res.* 2022 Dec 30;66. doi: 10.29219/fnr.v66.8948.
 416. Zhang T, Lin M, Wang C, Zhou J. Mechanisms of follicular atresia: focus on apoptosis, autophagy, and ferroptosis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2025 Sep 23;16:1603467. doi: 10.3389/fendo.2025.1603467.
 417. Zhang T, Ma C, Zhang Z, Zhang H, Hu H. NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *MedComm (2020).* 2021 Dec 16;2(4):618-653. doi: 10.1002/mco2.104.
 418. Zhang X, Cui X, Ma F, Zhou Y, Song S, Li Y, et al. Molecular mechanisms and therapeutic potential of quercetin in ovarian functions. *Phytomedicine.* 2025 Aug;144:156945. doi: 10.1016/j.phymed.2025.156945.
 419. Zhang X, Tian X, Wang Y, Yan Y, Wang Y, Su M, et al. Application of lipopolysaccharide in establishing inflammatory models. *Int J Biol Macromol.* 2024 Nov;279 (Pt 4):135371. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.135371.

420. Zhang Z, Huang L, Brayboy L. Macrophages: an indispensable piece of ovarian health. *Biol Reprod.* 2021 Mar 11;104(3):527-538. doi: 10.1093/biolre/ioaa219.
421. Zhao F, Fang Y, Deng S, Li X, Zhou Y, Gong Y, et al. Glycyrrhizin Protects Rats from Sepsis by Blocking HMGB1 Signaling. *Biomed Res Int.* 2017;2017:9719647. doi: 10.1155/2017/9719647.
422. Zhao G, Qi H, Liu M, Zhou T, Chen L, Wu C, et al. Rhoifolin Attenuates Concanavalin A-Induced Autoimmune Hepatitis in Mice via JAKs/STATs Mediated Immune and Apoptotic Processes. *ACS Omega.* 2024 Oct 11;9(42):43233-43251. doi: 10.1021/acsomega.4c07915.
423. Zhao T, Jia H, Zhao X, Gu X, Yong C, Wang S, et al. Oxidative stress triggers porcine ovarian granulosa cell apoptosis through MAPK signaling. *Antioxidants (Basel).* 2025;14:978. doi: 10.3390/antiox14080978.
424. Zhou L, Zhao S, Luo J, Rao M, Yang S, Wang H, et al. Altered Immune Cell Profiles in the Follicular Fluid of Patients with Poor Ovarian Response According to the POSEIDON Criteria. *J Inflamm Res.* 2024 Dec 8;17:10663-10679. doi: 10.2147/JIR.S473068.
425. Zhu H, Tang YD, Zhan G, Su C, Zheng C. The Critical Role of PARPs in Regulating Innate Immune Responses. *Front Immunol.* 2021 Jul 22;12:712556. doi: 10.3389/fimmu.2021.712556. Erratum in: *Front Immunol.* 2023 Jul 18;14:1253094. doi: 10.3389/fimmu.2023.1253094.
426. Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol.* 2010;28:445-89. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212.
427. Zhu X, Zhu J. CD4 T Helper Cell Subsets and Related Human Immunological Disorders. *Int J Mol Sci.* 2020 Oct 28;21(21):8011. doi: 10.3390/ijms21218011.

428. Zinatizadeh MR, Schock B, Chalbatani GM, Zarandi PK, Jalali SA, Miri SR. The Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) signaling in cancer development and immune diseases. *Genes Dis.* 2020 Jul 18;8(3):287-297. doi: 10.1016/j.gendis.2020.06.005.
429. Zong W, Gong Y, Sun W, Li T, Wang ZQ. PARP1: Liaison of Chromatin Remodeling and Transcription. *Cancers (Basel).* 2022 Aug 27;14(17):4162. doi: 10.3390/cancers14174162.