



“ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ТА КЛІНІЧНА ФІЗІОЛОГІЯ І БІОХІМІЯ»
 “EXPERIMENTAL AND CLINICAL PHYSIOLOGY AND BIOCHEMISTRY”
 Науково-практичний журнал/Scientific-practical journal

Наукові статті / Research Articles
 ЕСПВ 2020, 3/4(91): 5–11.

УДК 576.385: 618.11: 616-092.9: 615.322

Гліцирризинат амонію чинить протективний вплив на оогенез та послаблює генотоксичний стрес і загибель імунних клітин в умовах ендотоксемії, індукованої введенням ліпополісахариду

*О.А. КОНДРАЦЬКА, Н.Г. ГРУШКА, С.І. ПАВЛОВИЧ, Ю.Р. СТОВБУН,
 О.І. ПЛИСКА, Р.І. ЯНЧІЙ*

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

E-mail: elena-shepel@ukr.net

Важливим фактором розвитку запалення є наявність ліпополісахариду (ЛПС) – компоненту стінки грамнегативних бактерій [1]. ЛПС належить до патоген-асоційованих молекулярних структур (pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)) [2], які є потужним активатором імунної системи. Бактеріальний токсин стимулює моноцити й макрофаги, викликає вивільнення прозапальних медіаторів і цитокінів, таких як фактор некрозу пухлин- α (ФНП- α), інтерлейкіни (ІЛ) -1,-6, хемокіни (ІЛ-8), а також індукують синтез NO синтаза (iNOs), які індукують запальний процес [1,3,4]. В активованих імунних клітинах iNOs відповідає за підвищення рівнів оксиду азоту (NO) у тканинах і, як наслідок, за розвиток окислювального пошкодження і нітрозативного стресу. Запальні клітини (зокрема, макрофаги й моноцити) є джерелом активних форм кисню (АФК). Останні відіграють важливу роль у підсиленні запальної реакції, оскільки їх надмірне утворення може безпосередньо активувати запальні шляхи, що призводять до локальної продукції прозапальних цитокінів [1]. Розвиток ЛПС-індукованих патологічних процесів може спричинитися до виникнення порушень репродуктивної функції у жінок [5]. Показано, що ступінь циркуляторної ендотоксемії позитивно корелює із запаленням яєчників [6]. ЛПС негативно впливає на стероїдогенез та фолікулогенез, що спричиняє оваріальну дисфункцію та безпліддя [7]. Дія бактерій або бактеріальних продуктів, таких як ЛПС, може призводити до невдач під час застосування допоміжних репродуктивних технологій, зокрема до ушкодження ооцитів, погіршення якості ембріонів, утруднення екстракорпорального запліднення та ускладнення вагітності [8,9]. Отже, пошук та виявлення нових фармакологічних стратегій для профілактики та лікування ендотоксин-індукованих патологічних розладів має надзвичайно важливе медико-соціальне значення.

Останнім часом значна увага приділяється дослідженню сполук рослинного походження, які виявляють антиоксидантні, протизапальні, протипухлинні та інші протективні властивості. Серед них природний тритерпеновий глікозид – гліцирризин – екстракт із кореневища солодки (*Glycyrrhiza glabra*), однієї з найпоширеніших лікарських рослин, яка застосовується у традиційній медицині. Виявлено широкий спектр його фармакологічних ефектів, серед яких протизапальний, антиканцерогенний, протимікробний, противірусний, антиоксидантний, гепатопротекторний, гіпоглікемічний, антикоагулянтний та деякі інші [10,11]. У нашій роботі

ми використали гліцирризинат амонію (ГА), який в основному складається із гліцирризину, гліцину та метіоніну [10]. Виявлено, що цей біологічно активний рослинний компонент знижує продукцію цитокінів і зменшує загибель тварин при ЛПС-індукованому токсичному шоці у мишей, а також чинить протизапальну дію, регулюючи баланс $\text{TNF-}\beta$ / IL-10 [12]. Нашими попередніми експериментальними дослідженнями встановлено, що введення ендотоксину викликає у мишей зміни морфофункціонального стану клітин імунної системи та спричиняє розлади репродуктивної функції [13]. Метою даної роботи було вивчення впливу різних доз ГА на зміни оогенезу, а також розвиток генотоксичного стресу, життєздатність та загибель клітин лімфатичних вузлів у самиць мишей за умов ЛПС-індукованої ендотоксемії.

Матеріали й методи дослідження. Дослідження проводили на статевозрілих самицях мишей лінії Альбіно (масою 18–22 г), які утримувалися в стандартних умовах віварію Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця НАНУ. Під час роботи дотримувались Міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), Директиви Ради ЄС від 22.09.2010 р. «Про захист тварин, що використовуються в наукових цілях» та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження № 3447-IV від 21.02.2006.

Системну ендотоксемию моделювали за допомогою внутрішньоочеревинного (в/о) введення ЛПС (*E. coli* 0111:B4, Sigma, США). Для вивчення ефекту ГА за умов ендотоксемії самиці були поділені на 6 груп, у кожній по 6 тварин: група 1 – миші, які отримали в/о ЛПС, 3 мг/кг маси тварини; групи 2–5 – групи мишей, які отримали в/о ін'єкції ГА (Sigma, США) у дозах відповідно 10, 50, 100 або 200 мг/кг за годину до введення ЛПС та через 4 год після введення ЛПС; група 6 – контрольні тварини, яким вводили фізіологічний розчин у відповідному об'ємі. Через 24 год тварин піддавали ефірному наркозу і вилучали матеріал для досліджень.

Клітини яєчників мишей виділяли неферментативно (механічно). Мейотичне дозрівання ооцитів досліджували при їх культивуванні в стерильних умовах у середовищі DME з 15 ммоль/л HEPES , при 37 °C. Через 2–4 год культивування підраховували ооцити, що перебували на стадії метафази I – розчинення зародкового пухирця, а після 20 год – на стадії метафази II – формування першого полярного тільця.

Клітини лімфовузлів виділяли за загальноприйнятою методикою м'якого механічного диспергування органів з наступним відмиванням шляхом центрифугування у забуференому фосфатами фізіологічному розчині. Відсоток живих та ушкоджених клітин в отриманих суспензіях визначали за забарвленням трипановим синім.

Ступінь ушкодження ДНК оцінювали методом лужного гел-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет) за [14], з модифікаціями, як описано раніше [15]. Аналіз не менш ніж 100 ДНК-комет на кожній електрофореграмі здійснювали візуально, використовуючи люмінесцентний мікроскоп «Люмам II-1» (водно-імерсійний об'єктив $\times 30$). Їх поділяли за загально визнаною класифікацією (залежно від співвідношення ДНК у «голові» та «хвості» комети) на 5 класів з числовим значенням від 0 (відсутня ушкодження ДНК-комети без «хвостів») до 4 (максимальне ушкодження – майже вся ДНК у «хвості») [16]. Ступінь ушкодження ДНК визначали як індекс ДНК-комет ($I_{\text{ДНК}}$): $I_{\text{ДНК}} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma$, де n_0 – n_4 – число ДНК-комет кожного типу; Σ – сума підрахованих комет.

Оцінку життєздатності та шляхів загибелі клітин проводили методом прижиттєвого подвійного забарвлення флуоресцентними барвниками нуклеїнових кислот Хехст 33342 і йодид пропідіума (Sigma-Aldrich, USA), як описано нами раніше [13]. Апоптоз оцінювали за вираженою конденсацією хроматину та його периферичним розташуванням, ущільненням і

фрагментацію ядер. Клітини з ушкодженими мембранами (із забарвленими йодидом пропідіума червоними ядрами) вважали некротичними. Клітини без ушкодження плазматичної мембрани та без апоптотичних змін ядер оцінювали як живі. Використовували відеосистему передавання зображення на комп'ютер з люмінесцентного мікроскопа «Люам І-1» (імерсійний об'єктив $\times 90$), аналізували не менш ніж 100 клітин.

Результати обробляли в програмі GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, USA). Перевірку на нормальність розподілу проводили за тестом Колмогорова–Смирнова. За нормального розподілу статистичний аналіз проводили з використанням one-way ANOVA з подальшим множинним порівнянням за тестом Ньюмена–Кейлса. Відмінності вважали статистично значущими при $P < 0,05$. Результати виражали як $M \pm m$ (середнє \pm стандартна похибка). Групи даних, які не мали нормального розподілу, аналізували із застосуванням непараметричного методу Краскела–Уолліса з подальшим апостеріорним порівнянням за критерієм Данна та виражали як середнє і розкид (мінімальне та максимальне значення). $P < 0,05$ вважали статистично вірогідним.

Результати дослідження та їх обговорення. Застосування ендотоксину грам-негативних мікроорганізмів є важливою й широковживаною моделлю імунозапальних процесів. Показано, що через 24 год після введення мишам ЛПС (*E. coli* 0111:B4) відбувалось посилення функціонально-метаболическої активності імуніцитів [17], спостерігалась активація клітин неспецифічної резистентності та посилювалася генерація АФК, що у свою чергу спричиняло генотоксичний стрес та ушкодження ДНК клітин лімфовузлів та тимуса, відбувалось посилення прозапальної та імуногенної некротичної загибелі клітин як первинного, так і вторинного органів імунітету. Таким чином, введення ендотоксину призводило до розвитку вираженої запальної реакції [13]. На тлі зазначених системних змін було виявлено порушення функцій органів репродуктивної системи. Зокрема, встановлено, що введення ЛПС пригнічувало оогенез та порушувало морфофункціональний стан клітин фолікулярного оточення ооцитів [5].

У даній роботі досліджено вплив ГА у дозах 10, 50, 100 та 200 мг/кг на мейотичне дозрівання ооцитів *in vitro* (табл. 1). Вибір дозування базувався на літературних джерелах [11,18–21] Встановлено, що ГА у концентрації 10 мг/кг не впливав на оогенез. Максимальний ефект препарату на обидві стадії мейозу (метафаза I та метафаза II) спостерігався при використанні 50 та 100 мг/кг. Однак зі збільшенням концентрації ГА до 200 мг/кг його протективна дія послаблялася: не було виявлено статистично значущих змін у відновленні мейотичного дозрівання, порівняно із групою тварин, що отримали ЛПС, хоча при цьому ГА все ж вірогідно поліпшував здатність ооцитів досягати стадії метафази II. Проте у більшості ооцитів були виявлені аномалії, які виявлялися у зміні кольору цитоплазми на світліший, що за даними літератури, вказує на низьку щільність органел та слабкий потенціал для розвитку [22], а також у появі надмірної зернистості цитоплазми. У деяких ооцитів спостерігалися збільшення перивітелінового простору, фрагментація першого полярного тільца або значне збільшення його розміру.

Таблиця 1

Вплив введення ЛПС та ГА самицям мишей на мейотичне дозрівання ооцитів (відсоток ооцитів, що досягли метафази I та метафази II)

Вплив	Метафаза I	Метафаза II
Контроль	90,68 \pm 0,9	56,52 \pm 3,1
ЛПС	72,63 \pm 6,8*	22,45 \pm 4,5***
ЛПС+ ГА10 мг/кг	74,17 \pm 3,4*	30,52 \pm 3,4***

Вплив	Метафаза I	Метафаза II
ЛПС+ ГА50 мг/кг	90,93±2,3#	49,23±2,9###
ЛПС+ ГА100 мг/кг	89,16±3,3#	59,28±5,2###
ЛПС+ ГА200 мг/кг	85,55±4,0	40,38±5,2*#

* – $P < 0,05$; *** – $P < 0,001$ – щодо контролю – введення фізіологічного розчину; # – $P < 0,05$, ## – $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ – щодо дії ЛПС.

Використання ГА чинило протизапальну та цитопротективну дію на клітини лімфовузлів, що проявлялося у послабленні генотоксичного стресу та зниженні їхньої некротичної та апоптотичної загибелі. Позитивний ефект ГА на морфофункціональний стан лімфоцитів залежав від дози препарату. При застосуванні найменшої із досліджених доз, 10 мг/кг, не було виявлено статистично значущих змін у ступені ушкодження ДНК та загибелі клітин лімфовузлів.

За даними методу ДНК-комет уведення ЛПС мишам збільшувало Іднк (загальноприйнятій інтегральний показник, який враховує зміни кількості всіх типів комет із різним ступенем ушкодження ДНК) клітин лімфовузлів – у 3,8 разу. В ендотоксемічних мишей спостерігалось значне підвищення кількості клітин лімфовузлів із високим ступенем розривів ДНК (комети 3 і 4 типу) (табл. 2). Застосування ГА сприяло послабленню індукованого ЛПС ушкодження ДНК, на що вказує зменшення Іднк в лімфоцитах, відповідно у 1,6, 2,6 та 4 рази (дози 50, 100 та 200 мг/кг). Відбувалося значне зменшення кількості лімфоцитів із сильним ушкодження ДНК (табл. 2). Таким чином, застосування ГА значно послаблює генотоксичний стрес клітин лімфовузлів, індукований ендотоксемією.

Таблиця 2

**Вплив уведення ЛПС та ГА
на ступінь ушкодження ДНК лімфатичних клітин**

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#

* – $P < 0,05$; *** – $P < 0,001$ – щодо контролю – введення фізіологічного розчину; # – $P < 0,05$, ## – $P < 0,01$; ### $P < 0,001$ – щодо дії ЛПС.

Раніше [5] за допомогою методу прижиттєвого подвійного забарвлення, який дає можливість диференціювати живі, некротичні та апоптотичні клітини, нами показано, що ушкодження ДНК, індуковане ЛПС, призводить до загибелі клітин. Оскільки розвиток імунного запалення тісно пов'язаний із клітинною загибеллю, у представленій роботі ми дослідили зміни життєздатності клітин при застосуванні ГА за умов ендотоксемії. Було встановлено, що ведення ГА в дозах 50, 100 та 200 мг/кг поліпшувало життєздатність імуніцитів: зростала кількість живих лімфатичних клітин за рахунок зменшення некротичної та апоптотичної загибелі.

При множинному порівнянні між групами за тестом Ньюмена–Кейлса було встановлено статистично значущу різницю між впливом ГА у дозах 50, 100 та 200 мг/кг ($P < 0,05$) на ступінь ушкодження ДНК та життєздатність й загибель клітин лімфовузлів. Однак максимальна доза препарату –

200 мг/кг – мала менш сприятливий вплив на оогенез, тому для подальших досліджень нами будуть використані концентрації ГА 50 та 100 мг/кг.

Таблиця 3

Вплив уведення ЛПС та ГА на життєздатність та загибель лімфатичних клітин

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***

* – $P < 0,05$; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ – щодо контролю – введення фізіологічного розчину; # – $P < 0,05$, ## – $P < 0,01$; ### – $P < 0,001$ – щодо дії ЛПС.

Встановлені у роботі антиапоптотичний і антинекротичний ефекти ГА можуть бути пов'язані з антиоксидантними властивостями даного препарату. Для ГА було виявлено здатність пригнічувати оксидативний стрес, впливаючи на активацію сигнального шляху ERK, пов'язаного з білками родини MAPK [18, 19]. Відомо, що за нормальних фізіологічних умов АФК продукуються у невеликих кількостях і задіяні у регуляцію проліферації, диференціювання й апоптозу клітин шляхом модуляції малонового діальдегіду (MDA) та супероксиддисмутази (SOD) [18]. Однак надмірне виділення клітинами вродженого імунітету АФК, що відбувається, зокрема, при дії ЛПС [17,23], викликає перекисне окиснення ліпідів та розвиток сильного оксидативного стресу, який спричиняє пошкодження ДНК. Останнє у свою чергу може прискорити продукцію прозапальних факторів, що призводить до активації JNK, яка сприяє прогресуванню апоптозу. Однак застосування ГА викликає пригнічення експресії білків p-JNK, p-ERK та p-38, внаслідок чого зменшується апоптоз клітин [18]. На моделі експериментальної ендотоксемії нами встановлено, що надмірне ушкодження ДНК також сприяє розвитку генотоксичного стресу та загибелі клітин за прозапальним й імуногенним некротичним шляхом [13]. Некротична загибель лімфоцитів ініціює вихід у тканини клітинного вмісту (зокрема, аутоантигенів, до яких не толерантна імунна система) і, таким чином, здатна провокувати та посилювати імунні й запальні процеси. Отже, пригнічення апоптотичної та некротичної загибелі при застосуванні ГА за умов ЛПС-індукованого запалення можна було б пояснити його антиоксидантним ефектом, який призводить до зменшення перекисного окиснення ліпідів та окислювального стресу. Однак потрібні подальші дослідження, спрямовані на з'ясування механізмів дії ГА.

Таким чином, у роботі показано стимулюючий вплив ГА на мейотичне дозрівання ооцитів за умов експериментальної ендотоксемії. Використання ГА чинило виражену протизапальну та цитопротективну дію на клітини лімфовузлів, що проявлялося у послабленні генотоксичного стресу та зниженні некротичної та апоптотичної загибелі лімфоцитів. Отримані дані можуть бути корисними для розробки терапевтичних підходів для лікування захворювань, опосередкованих наявністю в організмі компонентів грам-негативних бактерій.

Рекомендовано до друку комісією з біоетики

ПОСИЛАННЯ

1. Xie C, Li X, Zhu J, Wu J, Geng S, Zhong C. Magnesium isoglycyrrhizinate suppresses LPS-induced inflammation and oxidative stress through inhibiting NF- κ B and MAPK pathways in RAW264.7 cells. Bioorg Med Chem. 2019;27(3):516–24. Doi: 10.1016/j.bmc.2018.12.033.

2. 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.
3. Fu Y, Zhou E, Wei Z, Song X, Liu Z, Wang T *et al.* Glycyrrhizin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response by reducing TLR4 recruitment into lipid rafts in RAW264.7 cells. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(6):1755–64. Doi: 10.1016/j.bbagen.2014.01.024.
4. Kim YM, Kim HJ, Chang KC. Glycyrrhizin reduces HMGB1 secretion in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells and endotoxemic mice by p38/Nrf2-dependent induction of HO-1. *Int Immunopharmacol.* 2015;26(1):112–8. Doi: 10.1016/j.intimp.2015.03.014.
5. Shepel E, Grushka N, Makogon N, Sribna V, Yanchii R. Changes in DNA integrity and gene expression in ovarian follicular cells of lipopolysaccharide-treated female mice. *Pharmacol Rep.* 2018;70(6):1146–9. Doi: 10.1016/j.pharep.2018.06.005.
6. Tremellen K, Syedi N, Tan S, Pearce K. Metabolic endotoxaemia – a potential novel link between ovarian inflammation and impaired progesterone production. *Gynecol Endocrinol.* 2015;31(4):309–12.
7. Shimizu T. Molecular and cellular mechanisms for the regulation of ovarian follicular function in cows. *J Reprod Dev.* 2016;62(4):323–9.
8. Koga K, Mor G. Toll-like receptors at the maternal-fetal interface in normal pregnancy and pregnancy disorders. *Am J Reprod Immunol.* 2010;63(6):587–600.
9. Magata F, Shimizu T. Effect of lipopolysaccharide on developmental competence of oocytes. *Reprod Toxicol.* 2017;71:1–7.
10. Yu Z, Wu F, Tian J, Guo X, An R, Guo Y. Ammonium glycyrrhizin counteracts liver injury caused by lipopolysaccharide/amoxicillin-clavulanate potassium. *Oncotarget.* 2017; 8(57): 96837–51. Doi:10.18632/oncotarget.18291.
11. Garg M, Singhal T, Sharma H. Cardioprotective effect of ammonium glycyrrhizinate against doxorubicin-induced cardiomyopathy in experimental animals. *Indian J Pharmacol.* 2014; 46(5): 527–30.
12. Huang X, Tang J, Cai H, Pan Y, He Y, Dai C *et al.* Anti-inflammatory effects of monoammonium glycyrrhizinate on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice through regulating nuclear factor-kappa b signaling pathway. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:272474. Doi: 10.1155/2015/272474.
13. 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):161–73.
14. Afanasieva K, Zazhytska M, Sivolob A. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: loops and fragments. *Electrophoresis.* 2010;31(3):512–9.
15. Kondratskaya E, Grushka N, Voznesenskaya T, Yanchii R. The Effect of ethylmethylhydroxypyridine succinate (Mexidol) on oocyte meiotic maturation, genome integrity, and the change in gene expression in mouse cumulus cells under the conditions of systemic immune complex damage. *Russ J Dev Biol.* Ammonium glycyrrhizinate has a protective effect on oogenesis and reduces genotoxic stress and immune cell death in LPS-induced endotoxemia 2020;51(3):183–8.
16. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 2004;26(3):249–61.
17. Грушка НГ, Павлович СІ, Кондрацька ОА, Пількевич НО, Янчій РІ. Інгібування полі(АДФ-рибозо) полімерази сприяє зменшенню оксидативного стресу в печінці мишей за умов експериментальної ендотоксемії. *Pathologia.* 2019;16(3):323–7 (Grushka NG, Pavlovych SI, Kondratska OA, Pilkevich NO, Yanchii RI. *Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase contributes to the reduction of oxidative stress in murine liver under the conditions of experimental endotoxemia. Pathologia, 2019;16(3):323–7 (in Urk.)*).
18. Tian X, Liu Y, Liu X, Gao S, Sun X. Glycyrrhizic acid ammonium salt alleviates Concanavalin A-induced immunological liver injury in mice through the regulation of the balance of immune cells and the inhibition of hepatocyte apoptosis. *Biomed Pharmacother.* 2019;120:109481.
19. Zhao H, Liu Z, Shen H, Jin S, Zhang S. Glycyrrhizic acid pretreatment prevents sepsis-induced acute kidney injury via suppressing inflammation, apoptosis and oxidative stress. *Eur J Pharmacol.* 2016;781:92–9. Doi: 10.1016/j.ejphar.2016.04.006.
20. Fu Y, Zhou E, Wei Z, Liang D, Wang W, Wang T, *et al.* Glycyrrhizin inhibits the inflammatory response in mouse mammary epithelial cells and a mouse mastitis model. *FEBS J.* 2014;281(11):2543–57. Doi: 10.1111/febs.12801.
21. Kim YM, Kim HJ, Chang KC. Glycyrrhizin reduces HMGB1 secretion in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells and endotoxemic mice by p38/Nrf2-dependent induction of HO-1. *Int Immunopharmacol.* 2015;26(1):112–8. Doi: 10.1016/j.intimp.2015.03.014.
22. Lasienė K, Vitkus A, Valančiūtė A, Lasys V. Morphological criteria of oocyte quality. *Medicina.* 2009; 45(7):509–15.
23. Грушка НГ, Павлович СІ, Кондрацька ОА, Пількевич НО, Янчій РІ. Вплив цитрату германію на ушкодження ДНК і загибель імункомпетентних клітин, а також функціональну активність нейтрофілів при запаленні, індукованому ліпополісахаридом. *Фізіол. журн.*

2019;65(6):43–50 (Grushka NG, Pavlovyh SI, Kondratska OA, Pilkevich NO, Yanchii RI. Effect of germanium citrate on DNA damage and death of immune cells as well as functional activity of neutrophils under the condition of lipopolysaccharide induced inflammation. *Fiziolohichniy zhurnal*. 2019;65(6):43–50) (in Urk.).

Стаття надійшла до редколегії 21.09.2020

RESEARCH ARTICLE

Ammonium glycyrrhizinate has a protective effect on oogenesis and reduces genotoxic stress and death of immune cell in lipopolysaccharide-induced endotoxemia

O.A. KONDRATSKA, N.G. GRUSHKA, S.I. PAVLOVYCH, YU.R. STOV BUN,
O.I. PLYSKA, R.I. YANCHII

Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kiev, Ukraine

E-mail: elena-shepel@ukr.net

An important factor in the development of inflammation is the presence in the body of lipopolysaccharide (LPS) – a component of the wall of gram-negative bacteria. LPS refers to pathogen-associated molecular patterns, which are a powerful activator of the immune system. The development of LPS-induced pathological processes can lead to reproductive dysfunction in women. Therefore, the search for and detection of new pharmacological strategies for the prevention and treatment of endotoxin-induced pathological disorders is extremely important.

The aim of the present study was to investigate the effect of ammonium glycyrrhizinate (GA) on changes in oogenesis, as well as the development of genotoxic stress, viability and death of lymph node cells under LPS-induced endotoxemia in female mice.

For determination of oocyte meiotic maturation the number of oocytes with germinal vesicle breakdown (metaphase I) was counted after 4 hours, while the number of oocytes forming the first polar body (metaphase II) was estimated by light microscopy after 20 hours of culture. The percentage of viable, apoptotic and necrotic lymph node cells was determined by their vital staining with fluorescent dyes Hoechst 33342 and propidium iodide. The degree of DNA damage was estimated by the method of alkaline single-cell gel electrophoresis (also known as Comet assay).

The administration of GA caused an improvement of oocyte meiotic maturation, impaired by LPS treatment: the number of oocytes at metaphase I and metaphase II increased significantly compared to that of endotoxemic mice. The intraperitoneal application of LPS in mice increased significantly an amount of lymph node cells with high degree of DNA damage (comet 3 and type 4). The use of GA contributed to the reducing of LPS-induced DNA damage and weakening of genotoxic stress in the cells. Our data also demonstrated an improvement in the viability of lymphocytes, when GA was applied, that was occurred due to the weakening of their apoptotic and necrotic death.

Thus, our study showed that the introduction of GA had a pronounced anti-inflammatory and cytoprotective effect on lymph node cells which was manifested in the reduction of genotoxic stress and decrease in necrotic and apoptotic death of lymphocytes, as well as GA treatment exerted the stimulating effect on oocyte meiotic maturation under the conditions of experimental endotoxemia.

Key words: oocyte, lymph node cells, meiotic maturation, genotoxic stress, necrosis, apoptosis.