

Сиртуїни та пошкодження ДНК нейронів при експериментальній хронічній церебральній гіперперфузії

О. Ю. Гарматіна^{*A-E}, Т. Ю. Вознесенська^E, Н. Г. Грушка^B, О. А. Кондрацька^B,
А. Г. Портниченко^{E,F}

Інститут фізіології імені О. О. Богомольця НАН України, м. Київ

A – концепція та дизайн дослідження; B – збір даних; C – аналіз та інтерпретація даних; D – написання статті; E – редагування статті;
F – остаточне затвердження статті

Ключові слова:
церебральна гіперперфузія, оклюзія загальної сонної артерії, сиртуїни.

Патологія. – 2019. – Т. 16, № 2(46). – С. 188–194

DOI:
10.14739/2310-1237.2019.2.177121

***E-mail:**
harmatina@ukr.net

Хронічна гіперперфузія головного мозку – фактор ризику розвитку таких захворювань нервової системи, як хронічна ішемія головного мозку, дегенеративні патології тощо. Це зумовлює актуальність вивчення її патофізіологічних механізмів.

Мета роботи – дослідити зв'язок експресії та активності SIRT1/SIRT3 із пошкодженням ДНК нейронів за умов хронічної церебральної гіперперфузії в мишей.

Матеріали та методи. Дослідження виконали на мишах лінії C57Bl (6 тижнів, вага – 18–20 г), яким перев'язували ліву загальну сонну артерію для моделювання хронічної гіперперфузії головного мозку (ХГГМ). На тлі ХГГМ застосовували нікотинамід (NAM, блокатор SIRT1, 200 мг/кг, 10 діб, і.р.) і ресвератрол (RV, активатор SIRT1, 10 мг/кг, 10 діб, і.р.). Усі маніпуляції виконували на анестезованих кетаміном (60 мг/кг, і.р.) тваринах. Через 8 тижнів у мозку тварин вивчали особливості ушкодження ДНК нейронів методом ДНК-комет і рівні експресії генів Sirt1/Sirt3 методом RT-PCR у реальному часі.

Результати. Показано, що моделювання ХГГМ викликало з унілатерального боку зростання індексу ушкодження ДНК нейронів шляхом збільшення комет класів 3–4 у 6,9 раза та різке зниження рівнів експресії генів SIRT1 та SIRT3 у 9,3 та 20,2 раза щодо контрольної групи відповідно ($p < 0,05$). Застосування NAM і RV зменшувало індекс ушкодження ДНК на 89,6 % та 92,4 % відповідно щодо контролю ($p < 0,05$) та збільшувало рівні експресії SIRT1 в 1,7 та 3,5 раза, SIRT3 у 2,9 та 5,2 раза відповідно, порівнюючи з групою ХГГМ ($p < 0,05$).

Висновки. Модифікація активності SIRT1 має сприятливий ефект на ураження мозку, що викликане ХГГМ, зменшуючи ушкодження ДНК нейронів, яке супроводжується стимуляцією SIRT-опосередкованої регуляції.

Ключевые слова:
церебральная гиперперфузия, окклюзия общей сонной артерии, сиртуины.

Патология. – 2019. – Т. 16, № 2(46). – С. 188–194

Сиртуины и повреждение ДНК нейронов при экспериментальной хронической церебральной гиперперфузии

О. Ю. Гарматина, Т. Ю. Вознесенская, Н. Г. Грушка, Е. А. Кондрацкая, А. Г. Портниченко

Хроническая гиперперфузия головного мозга – фактор риска развития таких заболеваний нервной системы, как хроническая ишемия головного мозга, дегенеративные патологии и др. Это обуславливает актуальность изучения ее патофизиологических механизмов.

Цель работы – исследовать связь экспрессии и активности SIRT1/SIRT3 и повреждения ДНК нейронов в условиях хронической церебральной гиперперфузии у мышей.

Материалы и методы. Исследования выполнены на мышах линии C57Bl (6 недель, вес – 18–20 г), которым перевязывали левую общую сонную артерию для моделирования хронической гиперперфузии головного мозга (ХГГМ). На фоне ХГГМ применяли никотинамид (NAM, блокатор SIRT1, 200 мг/кг, 10 дней, и.р.) и ресвератрол (RV, активатор SIRT1, 10 мг/кг, 10 дней, и.р.). Все манипуляции выполняли на анестезированных кетаминем (60 мг/кг, и.р.) животных. Через 8 недель в мозге животных изучали особенности повреждения ДНК нейронов методом ДНК-комет и уровни экспрессии генов SIRT1/SIRT3 методом RT-PCR в реальном времени.

Результаты. Показано, что моделирование ХГГМ вызывало с унілатеральной стороны рост индекса повреждения ДНК нейронов за счет увеличения комет классов 3–4 в 6,9 раза и резкое снижение уровней экспрессии генов SIRT1 и SIRT3 в 9,3 и 20,2 раза относительно контрольной группы соответственно ($p < 0,05$). Применение NAM та RV уменьшало индекс повреждения ДНК на 89,6 % и 92,4 % соответственно относительно контроля ($p < 0,05$) и увеличивало уровни экспрессии SIRT1 в 1,7 и 3,5 раза, SIRT3 в 2,9 и 5,2 раза соответственно по сравнению с группой ХГГМ ($p < 0,05$).

Выводы. Модификация активности SIRT1 имеет благоприятный эффект на поражение мозга, вызванное ХГГМ, уменьшая повреждение ДНК нейронов, что сопровождается стимуляцией SIRT-опосредованной регуляции.

Sirtuins and neuronal DNA damage under experimental chronic cerebral hyperperfusion

O. Yu. Harmatina, T. Yu. Voznesenska, N. H. Hrushka, O. A. Kondratska, A. H. Portnychenko

Chronic brain hyperperfusion (ChCH) is a risk factor for central nervous system (CNS) diseases, such as chronic brain ischemia, degenerative diseases, and others, in this connection, the study of its pathophysiological mechanisms is an actual problem.

Objective. To investigate the relationship between SIRT1/SIRT3 expression and activity and damage of neuronal DNA in conditions of chronic cerebral hypoperfusion in mice.

Materials and methods. The experiments were carried out on male C57Bl mice (6 weeks old, weight 18–20 g), which underwent occlusion of left common carotid artery to model ChCH. On the background of ChCH nicotinamide (NAM, 200 mg/kg, 10 d, i.p.) and resveratrol (RV, 10 mg/kg, 10 d, i.p.) were used. All manipulations were carried out in anesthetized with ketamine (60 mg/kg, i.p.) mice. In 8 weeks, in mice brain tissues the features of neuronal DNA damage were studied by DNA comet assay and SIRT1/SIRT3 gene expression levels by real-time RT-PCR.

Results. ChCH modeling was accompanied on the unilateral side by an increase of DNA damage (comets within classes 3 and 4) index of neurons by 6.9 times, and by a decrease of SIRT1 and SIRT3 gene expression by 9.3 and 20.2 times, respectively, compared to control ($P < 0.05$). Using of NAM and RV treatment resulted in reduction of DNA damage index by 89.6 % and by 92.4 %, respectively, compared to control ($P < 0.05$), and in the increase of the levels of SIRT1 by 1.7 and 3.5 times, and SIRT3 – by 2.9 and 5.2 times, respectively, in comparison with the ChCH group ($P < 0.05$).

Conclusion. Taken together, these data indicate that modification of SIRT1 activity caused positive effect on ChCH-induced brain injury by attenuating DNA breaks, which was accompanied with up-regulation of SIRT-mediated regulatory pathways.

Key words: cerebrovascular perfusion, stenosis common carotid artery, sirtuins.

Pathologia
2019; 16 (2), 188–194

Хронічна гіперперфузія головного мозку (ХГГМ) – відомий механізм і фактор ризику розвитку таких захворювань центральної нервової системи (ЦНС), як хронічна ішемія головного мозку (ГМ), дегенеративні патології тощо [1]. Однією з причин ХГГМ є стено-оклюзивна патологія сонних артерій (зокрема атеросклеротичного ґенезу), що зумовлює метаболічні порушення, судинний когнітивний дефіцит, збільшує ризик інсульту та посідає важливе місце серед причин захворюваності та смертності у світі.

Показано, що ушкодження ДНК залучається в розвиток механізмів ішемічного ураження ГМ і дегенеративних процесів ЦНС. Оксидативний стрес в ішемізованій тканині ГМ впливає на цілісність геному нейронів, викликає пошкодження ДНК, загибель нейронів, гліальних і судинних клітин [2].

Сиртуїни (Sirtuins, Silent Information Regulator 2 proteins, SIR2) – клас білків, які мають властивості гістонової деацетилази та монорибозилтрансферази, вперше відкриті у *Saccharomyces cerevisiae*. Ідентифікували 7 тваринних гомологів сиртуїнів (SIRT1-7), які локалізовані в ядрі (SIRT1, SIRT6, SIRT7), мітохондріях (SIRT3, SIRT4, SIRT5), цитоплазмі (SIRT2). Сиртуїни деацетилюють будь-які субстрати, як-от фактори транскрипції, метаболічні ферменти, гістони, і в такий спосіб здійснюють епігенетичний контроль багатьох біологічних процесів: метаболізму, росту клітин, апоптозу, аутофагії, старіння. Порівняно з іншими органами високі рівні SIRT1 експресуються у ГМ і локалізуються в ядрі, в невеликій кількості – в мітохондріях. SIRT3 передусім локалізується в мітохондріях [3]. Сиртуїни можуть мати позитивні й негативні властивості. Однак мало відомо про їхню експресію у тканині ГМ в умовах патологічних процесів, зокрема при ХГГМ. Молекулярно-генетичні механізми пошкодження мозку при хронічних захворюваннях ЦНС та участь у них сиртуїнів потребує детального вивчення.

Мета роботи

Вивчити ланки механізмів ХГГМ, що пов'язані з системою сиртуїнів, зокрема дослідити зв'язок експресії та активності SIRT1/SIRT3 із пошкодженням ДНК нейронів за умов хронічної церебральної гіперперфузії в мишей.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження виконали на самцях мишей лінії C57Bl (6 тижнів, $n = 15–18$ г на момент початку експерименту). Тварини перебували на стандартному раціоні виварію Інституту фізіології імені О. О. Богомольця при стандартному світловому режимі (12 годин – день, 12 годин – ніч). Дослідження здійснили згідно з міжнародними конвенціями щодо захисту тварин, яких застосовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1985), а також згідно з положеннями комітету з біоетики Інституту фізіології імені О. О. Богомольця НАН України.

Тварин поділили на 4 групи: 1 – контрольна, несправжньооперовані (sham-operated) тварини ($n = 10$), 2 – тварини, яким моделювали хронічну гіперперфузію ГМ шляхом створення хронічної оклюзії загальної сонної артерії (ХОЗСА) ($n = 10$), 3 – тварини, яким на тлі ХОЗСА вводили і.р. нікотинамід (NAM) (200 мг/кг) протягом 10 днів, перше введення через 1 годину після оклюзії ЗСА ($n = 10$); 4 – тварини, яким на тлі ХОЗСА вводили і.р. ресвератрол (RV) (10 мг/кг) протягом 10 днів (7 днів до та 3 днів після оклюзії ЗСА) ($n = 10$). При моделюванні ХОЗСА мишам під кетаміновим наркозом (1 мл/300 г) перев'язували ліву ЗСА на рівні середньої третини судини двома лігатурами, після чого рану ушивали. У контрольній групі проводили аналогічні дії без перев'язки артерії.

Через 8 тижнів після накладання лігатури у тварин вивчали особливості пошкодження ДНК в обох півкулях ГМ (ліва – ЛП, права – ПП). Після декапітації ГМ швидко видаляли, тричі промивали охолодженим розчином PBS (PBS: NaCl 8,0 г, KCl 0,2 г, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2,8 г, KH_2PO_4 0,2 г, рН 7,4, 4°C). Частину тканини ГМ швидко заморожували для дальшого вивчення експресії SIRT1 і SIRT3 (RT-PCR) у півкулях ГМ, а частину подрібнювали стальними ножицями та гомогенізували в попередньо охолоджену розчин PBS (рН 7,4, 4°C) у скляному гомогенізаторі при температурі 0–4°C. Пошкодження клітин під час виділення перевіряли шляхом їх забарвлення трипановим синім. Виявляли світіння нейронів (зеленого кольору) під люмінесцентним мікроскопом і підраховували їхню кількість, 90% із них виявлені живими. Оцінювали не менше ніж 200 клітин за допомогою люмінесцентного мікроскопа «Люмам І-1» (ЛОМО, Рф) із водно-імерсійним об'єктивом і комп'ютерною візуалізацією зображення. Клітини

ресуспендували з розрахунку 10^6 на мл у PBS і негайно використовували в аналізі ДНК-комет.

Для встановлення ушкодження ДНК в ядрах нейронів обох півкуль ГМ використовували метод лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет – «DNA comet assay») за Afanasieva et al. [4] з модифікаціями. Суть методу полягає в тому, що при електрофорезі клітин в агарозному гелі петлі та фрагменти ушкодженої ДНК в електричному полі витягуються в напрямі до анода, що надає їм вигляд комет. Розміри «хвоста» ДНК-комети позитивно корелюють зі ступенем ушкодження ДНК. Електрофорез препаратів (після стабілізації протягом 20 хв у лужному електрофоретичному буфері) здійснювали за допомогою приладу Multiphor II («ЛКВ», Швеція). Аналіз ДНК-комет на електрофореграмах, забарвлених Hoechst 33342 (700 мкмоль/л) протягом 15 хв, здійснювали візуально, використовуючи люмінесцентний мікроскоп (ЛЮМАМ И-1, РФ) з водно-імерсійним об'єктивом ($\times 30$). Застосовували напівкількісний метод оцінювання інтенсивності забарвлення та довжини «хвостів» комет, на кожному мікропрепараті аналізували не менше ніж 100 окремо розташованих ДНК-комет. За співвідношенням ДНК у «голові» та «хвості» комети поділяли за загально визнаною класифікацією на 5 класів із числовим значенням від 0 до 4 [5]. Ступінь ушкодження ДНК визначали як індекс «ДНК-комет» ($I_{\text{ДНК}}$), котрий обчислювали за формулою: $I_{\text{ДНК}} = (0 \times n_0 + 1 \times n_1 + 2 \times n_2 + 3 \times n_3 + 4 \times n_4) / \sum$, де $n_0 - n_4$ – кількість ДНК-комет кожного типу, \sum – сума підрахованих ДНК комет [6].

Загальну РНК виділяли з тканини головного мозку за допомогою набору «Trizol RNA-prep» («Isogen», РФ). Концентрацію РНК визначали за допомогою спектрофотометра «NanoDrop ND 1000» («NanoDrop Technologies Inc.», США). Зворотну транскрипцію виконали з використанням First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва), застосовуючи 1,2–1,5 мкг загальної РНК і гексамерний праймер. Одноланцюгову ДНК використовували для кількісного оцінювання експресії генів за допомогою полімеразної ланцюгової реакції в реальному часі.

Полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі здійснили в термоциклері 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) в об'ємі 10 мкл реакційної суміші SYBR Green PCR Master Mix, яка містила по 30 пмоль праймерів для відповідних генів: mouse SIRT1, forward: 5'-TCG TCG TCG TCG AAG TCG TCA GC-3', reverse: 5'-GTA AGC GGC TTG AGG G-3'; mouse SIRT3, forward: 5'-TCA CAA CCC CAA GCC CTT TT-3', reverse: 5'-GTG GGC TTC AAC CAG CTT TG-3'. Об'єм зразків доведено до 20 мкл деіонізованою водою. Результати проаналізували за допомогою 7500 Fast Real-time PCR Software. Показники експресії генів нормалізували до експресії мРНК U6 (внутрішній контроль), яку умовно взяли як одиницю.

Статистичне опрацювання результатів виконали загальноприйнятими методами варіаційної статистики за допомогою програми GraphPad Prism version 8.1.0.325 for Windows (GraphPad Software, США, ліцензійний №GPS-1461670-TEQH-6AC22), використовуючи однофакторний дисперсійний аналіз (One-Way ANOVA) та post hoc аналіз за Бонферроні. Вірогідність різниці показників між півкулями оцінювали за допомогою критерію t Стьюдента. Різницю вважали статистично вірогідною при $p < 0,05$.

Результати

Вплив ХГГМ на пошкодження ДНК нейронів. Показано, що в контрольній групі ступінь ушкодження ДНК нейронів (комети 3 та 4 класу) був низьким в обох півкулях (ЛП – 2,5%; ПП – 1,5%, $p < 0,05$). Моделюючи ХГГМ в обох півкулях ГМ, реєстрували збільшення відсотка комет 3–4 класу та вірогідне зменшення відсотка комет 0 та 1 класів порівняно з показниками контрольної групи. З унілатерального боку індекс ушкодження ДНК нейронів збільшувався у 6,9 раза щодо контролю та в 5,7 раза порівняно з контралатеральним боком ($p < 0,05$; рис. 1). Дані вказують на ушкодження нейронів обох півкуль ГМ при ХГГМ.

Вплив NAM і RV на ушкодження ДНК при ХГГМ. Введення NAM і RV на тлі ХГГМ призводило до змен-

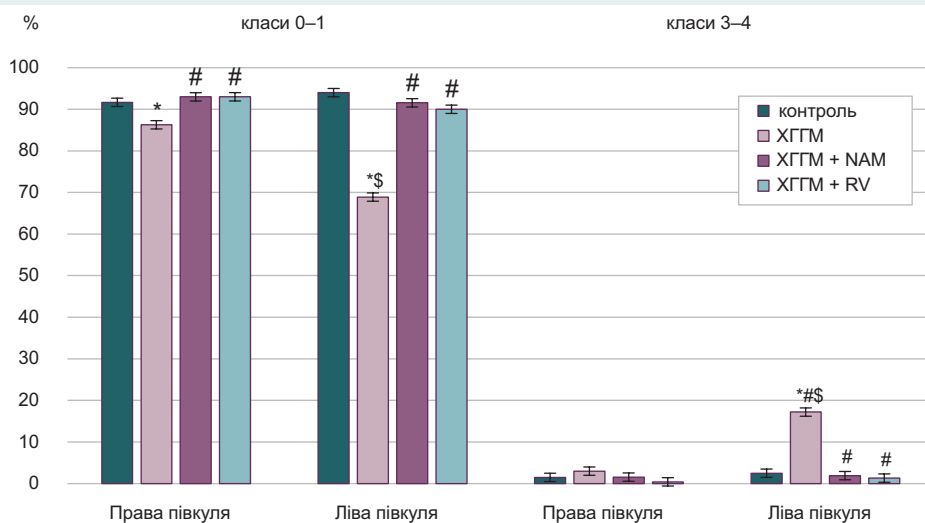


Рис. 1. Розподіл ДНК-комет ядер нейронів у півкулях головного мозку мишей при моделюванні хронічної церебральної гіперфузії.

*: $p < 0,05$ порівняно з контролем;
#: $p < 0,05$ порівняно з ХГГМ;
\$: $p < 0,05$ порівняно з середніми значеннями у контралатеральній півкулі.

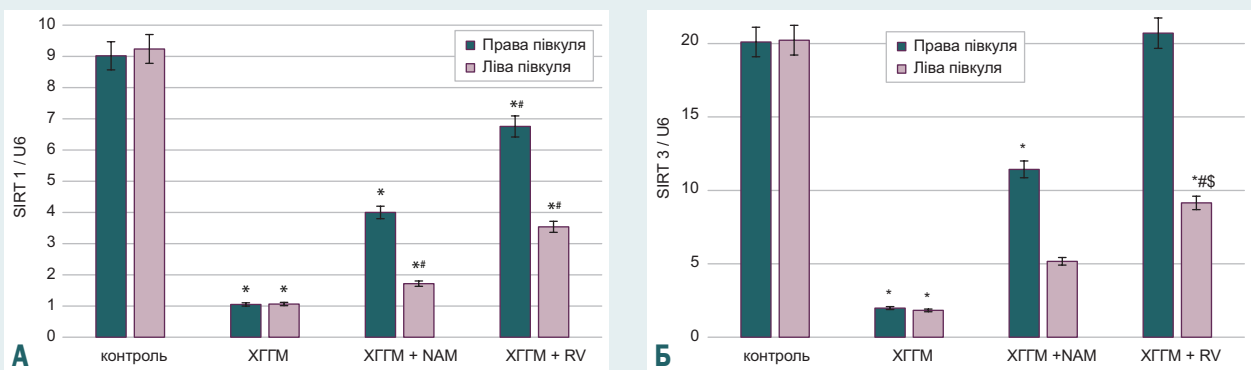


Рис. 2. Зміни експресії сиртуїнів (А – SIRT1, Б – SIRT3) у півкулях головного мозку мишей при моделюванні хронічної церебральної гіперперфузії. Експресія SIRTs нормалізована до U6 у тканині головного мозку.

*: $p < 0,05$ порівняно з контролем; #: $p < 0,05$ порівняно з ХГГМ; \$: $p < 0,05$ порівняно з величинами середніх значень у контралатеральній півкулі.

шення пошкодження ДНК нейронів мишей (ДНК-комет класів 3–4): відзначали збільшення кількості клітин із незначним пошкодженням ДНК (відсоток комет 0 та 1 класів), особливо з унілатерального боку (рис. 1). Ступінь ушкодження ДНК нейронів з унілатерального боку зменшився при введенні NAM на 89 %, а при введенні RV – на 92 % порівняно з контролем ($p < 0,05$). Результати аналізу показника ушкодження ДНК нейронів при ХГГМ методом ДНК-комет вказують на нейропротекторний вплив NAM і RV.

Вплив ХГГМ на рівні SIRT1 і SIRT3. Встановили, що обидва типи сиртуїнів (SIRT1 і SIRT3) експресуються в достатній кількості в обох півкулях ГМ, а в контролі експресія SIRT3 була вищою за SIRT1 удвічі (рис. 2). ХГГМ викликала подібні зміни SIRT1 і SIRT3 – різке падіння їхньої експресії в обох півкулях. Рівень SIRT1 знижувався в 9 разів, а рівень SIRT3 – у 20 разів в обох півкулях ГМ порівняно з контролем ($p < 0,05$, рис. 2). Дані, що одержали, свідчать про гальмівний вплив змін кровообігу на експресію генів SIRT1 і SIRT3 в обох півкулях ГМ.

Вплив NAM і RV на рівні SIRT1 та SIRT3 при ХГГМ. Модуляція синтезу сиртуїнів за допомогою NAM, неспецифічного блокатора SIRT1, та RV, специфічного активатора SIRT1, показала їхній односпрямований стимуляторний вплив на експресію SIRT1 і SIRT3 при ХГГМ. Так, блокада SIRT1 NAM збільшувала рівні експресії SIRT1 у 3,8 раза у ЛП і в 1,7 раза у ЛП порівняно з впливом ХГГМ ($p < 0,05$; рис. 2А). Рівні SIRT3 збільшувалися у 2,9 раза у ЛП і в 5,7 раза у ЛП ($p < 0,05$; рис. 2Б). Активація SIRT1 RV призводила до збільшення рівнів SIRT1 у 3,5 раза у ЛП та в 6,7 раза у ЛП порівняно з ХГГМ ($p < 0,05$). Рівні SIRT3 збільшувалися у 5 разів у ЛП та в 10,4 раза у ЛП щодо групи з ХГГМ, відновлюючи показник у контралатеральній півкулі до контрольного рівня ($p < 0,05$; рис. 2А, Б).

Обговорення

Фрагментація ДНК при ХГГМ у здійсненому дослідженні вказує на те, що патологічні процеси у ЦНС, які мають хронічний перебіг, тобто при поступовому розвитку захворювання супроводжуються загибеллю

клітин. Однотитковий розрив ДНК нейронів свідчить про загибель клітин шляхом апоптозу при ХГГМ. В умовах критичних стенозів та оклюзії брахіоцефальних артерій зниження рівня живих нейронів з контралатерального боку при ХГГМ, імовірно, пов'язане з перерозподілом крові при гіперперфузії, яка призводить до зниження кровопостачання обох півкуль, особливо з унілатерального боку, викликаючи порушення гомеостазу, зміни метаболізму, оксидативний стрес. Останній відіграє ключову роль у загибелі нейронів та окислювальному ушкодженні ДНК, а отже зумовлює розвиток порушень при цереброваскулярних захворюваннях. Тому активація антиоксидантного захисту є важливим напрямом в умовах порушення метаболізму та гіпоксії ГМ.

Одним із механізмів, які підтримують протекцію нейронів при патологічних станах, є епігенетична регуляція за участю сиртуїнів. Сиртуїни впливають на клітинний метаболізм, залучаються у механізми репарації ДНК, регуляції стабільності генома, запалення, апоптозу, клітинного циклу, функції мітохондрій. Вивчення змін експресії SIRT у нашому дослідженні при ХГГМ показало її різке зниження в обох півкулях ГМ. Відомо, що сиртуїни є НАД⁺-залежними білками, а тому зниження кількості НАД⁺ впливатиме на їхню функцію. Інтенсивний оксидативний стрес при гіпоксії призводить до зниження рівнів НАД⁺, що пригнічує SIRT1 [7] і зменшує рівень SIRT3 [8].

У наших дослідженнях в умовах ХГГМ під впливом RV знижувався ступінь пошкодження ДНК нейронів ГМ, що може вказувати на залучення SIRT1 у механізми запобігання ушкодженню ДНК нейронів або її репарації. Однак в умовах різкого зниження експресії сиртуїнів при ХГГМ активація функції SIRT1 була б малоефективною. Індукція експресії як ядерних, так і мітохондріальних сиртуїнів при дії активатора SIRT1 необхідна для посилення протекторної відповіді при пошкодженні ДНК нейронів.

Односпрямовані з цими ефекти в умовах дії блокатора SIRT1 NAM на перший погляд видаються суперечливими. Однак детальний аналіз механізмів клітинної відповіді дає можливість пояснити цю «невідповідність». Блокада SIRT1 поглиблювала нестачу

функції сиртуїнів при ХГГМ та її патогенний вплив на нейрони. Як наслідок, відбувалася індукція експресії ядерних і мітохондріальних сиртуїнів, що сприяло компенсаторному відновленню їхньої функції, особливо в неушкодженій півкулі головного мозку. Отже, обидва різноспрямовані впливи на SIRT, порушуючи баланс системи епігенетичної регуляції, призводили до однакової компенсаторної відповіді – індукції експресії ядерних і мітохондріальних сиртуїнів в клітинах головного мозку, що сприяло нейропротекції.

Нейропротекторну дію SIRT можуть здійснювати через регуляцію утворення активних форм кисню (АФК), впливаючи на функцію мітохондрій (МХ). Так, виявлений протекторний ефект щодо ушкодження ДНК нейронів при ХГГМ, пов'язаний зі збільшенням експресії генів SIRT1, SIRT3 під дією NAM і RV, може реалізуватися через сиртуїн-опосередковану індукцію генів, які відповідальні за окиснювальне фосфорилювання та біогенез МХ, зокрема через збільшення активності PGC-1 α [9]. PGC-1 α є важливим елементом стійкості до окисного стресу, регулятором біогенезу МХ та енергетичного обміну. SIRT3 відомий як важливий медіатор PGC-1 α -залежної індукції SOD2 та глутатіонпероксидази-1, впливає на біогенез МХ, сприяючи зниженню утворення АФК [10].

Участі SIRT1 і SIRT3 у зменшенні ушкодження тканини ГМ може бути пов'язана також з активацією та підвищенням активності FOXO3 і Parkin мітохондріями, злиттям МХ та активації мітофагії [11]. Збільшена експресія SIRT3 супроводжується підвищенням вмісту мтДНК, що також призводить до зменшення утворення АФК [10], бо буде запобігати та сприяти зменшенню пошкодження ДНК. SIRT3 і SIRT1 виявляють захисні ефекти, що пов'язані з загальною стійкістю до стресів, стабілізуючи електронний транспортний ланцюг МХ і знижуючи окислювальний стрес через активацію PGC-1 α та збільшення аутофагії [10, 12].

Репаративний вплив на ДНК сиртуїни чинять також через взаємодію з полі(ADP-рібозил)полімеразами (PARP), поширеним класом НАД⁺-залежних посттрансляційних модифікаторів білка [13].

Описана нейропротекторна дія RV реалізується завдяки антизапальному та нейропротекторному його ефектам, що пов'язані з модуляцією експресії деяких мікроРНК (miRNome), активацією апуринової/апіримідинової ендонуклеази-1, яка являє собою багатфункціональний фермент, що сприяє видаленню окисленої ДНК і відновленню редокс-активованих транскрипційних факторів, відповідальних за виживання нейронів при гіпоксично-ішемічному пошкодженні ГМ [14, 15]. При патологічних станах зниження рівня PGC-1 α та TFAM супроводжується втратою мтДНК. RV повністю відновлює ці параметри, поліпшуючи експресію генів електронного транспортного ланцюга МХ шляхом активації деацетилази [9]. Показано також, що нейропротекторна дія RV може реалізуватися через посилення активності cAMP-зв'язувального білка (CREB), експресії молекулярного нейротрофічного фактора мозку (BDNF) і за допомогою регуляції експресії CREB/BDNF через SIRT1/miR-134 сигнальний шлях [16]. Встановили, що BDNF сприяє виживанню, росту й захисту церебральних нейронів від ушкоджен-

ня ДНК при окислювальному стресі, впливаючи на механізми репарації ДНК. BDNF стимулює відновлення ДНК шляхом активації CREB, який індукує експресію апуринової / апіримідинової ендонуклеази 1 (APE1), ключового ферменту в механізмах відновлення початкової ділянки репарації ДНК, що проявляється в запобіганні апоптозу нейронів [17].

Функціонування NAM як цитопротектора також може здійснюватися на кількох рівнях. Зокрема, NAM виявляє свій ефект через збільшення рівнів НАД⁺, що позитивно впливає на функцію МХ [9], підтримує потенціал мембран мітохондрій і запобігає вивільненню ними цитохрому с, а також через індукцію каспаз-1, 3 та 8, які пов'язані з ферментом репарації ДНК полі(ADP-рибозил)полімеразою. NAM активує експресію нейротрофічного фактора BDNF [17, 18], чим також можна пояснити нейропротекторний вплив NAM на ушкоджену ДНК.

Висновки

1. Під час моделювання хронічної гіперперфузії головного мозку, що викликана односторонньою оклюзією загальної сонної артерії, відбувається пошкодження ДНК нейронів обох півкуль головного мозку з вираженими показниками з унілатерального боку, що супроводжується різким зниженням рівнів експресії SIRT1 і SIRT3.

2. Модифікація функції SIRT1/SIRT3 при моделюванні хронічної гіперперфузії головного мозку сприяє зменшенню ушкодження ДНК, а отже систему сиртуїнів можна розглядати як терапевтичну мішень при захворюваннях ЦНС, які супроводжуються гіперперфузією головного мозку.

Перспективи подальших досліджень полягають у конкретизації участі сиртуїнів у запобіганні пошкодження нейронів головного мозку при хронічних розладах його кровопостачання.

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

Надійшла до редакції / Received: 20.11.2018

Після доопрацювання / Revised: 18.02.2019

Прийнято до друку / Accepted: 11.04.2019

Відомості про авторів:

Гарматіна О. Ю., канд. мед. наук, старший науковий співробітник відділу з вивчення гіпоксичних станів, Інститут фізіології імені академіка О. О. Богомольця НАН України, м. Київ.

ORCID ID: 0000-0002-1443-4411

Вознесенська Т. Ю., д-р біол. наук, провідний науковий співробітник відділу імунофізіології, Інститут фізіології імені академіка О. О. Богомольця НАН України, м. Київ.

ORCID ID: 0000-0002-5959-4152

Грушка Н. Г., канд. біол. наук, старший науковий співробітник відділу імунофізіології, Інститут фізіології імені академіка О. О. Богомольця НАН України, м. Київ.

ORCID ID: 0000-0001-9182-0108

Кондрацька О. А., канд. біол. наук, старший науковий співробітник відділу імунофізіології, Інститут фізіології імені академіка О. О. Богомольця НАН України, м. Київ.

ORCID ID: 0000-0002-3496-0603

Портниченко А. Г., д-р мед. наук, зав. відділу з вивчення гіпоксичних станів, Інститут фізіології імені академіка О. О. Богомольця НАН України, м. Київ.
ORCID ID: 0000-0003-2509-101X

Сведения об авторах:

Гарматина О. Ю., канд. мед. наук, старший научный сотрудник отдела по изучению гипоксических состояний, Институт физиологии имени академика А. А. Богомольца НАН Украины, г. Киев.

Вознесенская Т. Ю., д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунофизиологии, Институт физиологии имени академика А. А. Богомольца НАН Украины, г. Киев.

Грушка Н. Г., канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела иммунофизиологии, Институт физиологии имени академика А. А. Богомольца НАН Украины, г. Киев.
Кондрацкая Е. А., канд. биол. наук, старший научный сотрудник отдела иммунофизиологии, Институт физиологии имени академика А. А. Богомольца НАН Украины, г. Киев.
Портниченко А. Г., д-р мед. наук, зав. отделом по изучению гипоксических состояний, Институт физиологии имени академика А. А. Богомольца НАН Украины, г. Киев.

Information about authors:

Harmatina O. Yu., MD, PhD, Senior Researcher of the Department of Hypoxic States Investigation, Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv.

Voznesenska T. Yu., PhD, DSc (Biol), Leading Researcher of the Department of Immunophysiology, Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv.

Hrushka N. H., PhD (Biol), Senior Researcher of the Department of Immunophysiology, Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv.

Kondratska O. A., PhD (Biol), Senior Researcher of the Department of Immunophysiology, Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv.

Portnychenko A. H., MD, PhD, DSc, Head of the Department of Hypoxic States Investigation, Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv.

Список літератури

- [1] Daulatzai M. A. Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: Key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 2017. Vol. 95. Issue 4. P. 943–972. doi: 10.1002/jnr.23777
- [2] Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery / P. Li et al. *Neuropharmacology*. 2017. – Vol. 134 (Pt B). – P. 208–217. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.11.011
- [3] Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins / E. Michishita et al. *Mol. Biol. Cell.* 2005. Vol. 16. Issue 10. P. 4623–4635. doi: 10.1091/mbc.E05-01-0033
- [4] Afanasieva K., Zazhytska M., Sivolob A. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments. *Electrophoresis*. 2010. Vol. 31. Issue 3. P. 512–519. doi: 10.1002/elps.200900421
- [5] Collins A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.* 2004. Vol. 26. Issue 3. P. 249–261. doi: 10.1385/MB:26:3:249
- [6] Sorochinska J., Mikhailenko V. Application of the comet assay for the DNA damage assessment caused by different environmental agents. *Oncology*. 2008. Vol. 10. Issue 3. P. 303–308.
- [7] Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha / J. H. Lim et al. *Mol. Cell.* 2010. Vol. 38. Issue 6. P. 864–878. doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.023
- [8] Decreased SIRT3 in aged human mesenchymal stromal/stem cells increases cellular susceptibility to oxidative stress / X-Q. Wang et al. *J. Cell. Mol. Med.* 2014. Vol. 18. Issue 11. P. 2298–2310. doi: 10.1111/jcmm.12395
- [9] Comparative Mitochondrial-Based Protective Effects of Resveratrol and Nicotinamide in Huntington's Disease Models / L. Naia et al. *Mol. Neurobiol.* 2017. Vol. 54. Issue 7. P. 5385–5399. doi: 10.1007/s12035-016-0048-3
- [10] Sirtuin 3, a new target of PGC-1alpha, plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis / X. Kong et al. *PLoS ONE*. 2010. Vol. 5. Issue 7. P. e11707. doi: 10.1371/journal.pone.0011707

- [11] Antiaging properties of a grape-derived antioxidant are regulated by mitochondrial balance of fusion and fission leading to mitophagy triggered by a signaling network of Sirt1-Sirt3-Foxo3-PINK1-PARKIN / S. Das et al. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014. Vol. 2014. P. 345105. doi: 10.1155/2014/345105
- [12] Koo J.H., Cho J. Y. Treadmill Exercise Attenuates α -Synuclein Levels by Promoting Mitochondrial Function and Autophagy Possibly via SIRT1 in the Chronic MPTP/IP-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neurotox. Res.* 2017. Vol. 32. Issue 3. P. 473–486. doi: 10.1007/s12640-017-9770-5
- [13] Ješko H., Strosznajder R. P. Sirtuins and their interactions with transcription factors and poly(ADP-ribose) polymerases. *Folia Neuropathol.* 2016. Vol. 54. Issue 3. P. 212–233.
- [14] Resveratrol Acts Anti-Inflammatory and Neuroprotective in an Infant Rat Model of Pneumococcal Meningitis by Modulating the Hippocampal miRNome / K. B. de Queiroz, et al. *Mol. Neurobiol.* 2018. Vol. 55. Issue 12. P. 8869–8884. doi: 10.1007/s12035-018-1037-5
- [15] Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) contributes to resveratrol induced neuroprotection against oxygen glucose deprivation and reoxygenation injury in HT22 cells: Involvement in reducing oxidative DNA damage / J. Y. Jia. *Mol. Med. Rep.* 2017. Vol. 16. Issue 6. P. 9786–9794. doi: 10.3892/mmr.2017.7799
- [16] Resveratrol prevents cognitive deficits induced by chronic unpredictable mild stress: Sirt1/miR-134 signalling pathway regulates CREB/BDNF expression in hippocampus in vivo and in vitro / J. Shen et al. *Behav. Brain. Res.* 2018. Vol. 349. P. 1–7. doi: 10.1016/j.bbr.2018.04.050
- [17] BDNF and exercise enhance neuronal DNA repair by stimulating CREB-mediated production of apurinic/aprimidinic endonuclease 1 / J. L. Yang et al. *Neuromolecular. Med.* 2014. Vol. 16. Issue 1. P. 161–174. doi: 10.1007/s12017-013-8270-x
- [18] Chong Z. Z., Lin S. H., Maiese K. Nicotinamide modulates mitochondrial membrane potential and cysteine protease activity during cerebral vascular endothelial cell injury. *J. Vasc. Res.* 2002. Vol. 39. Issue 2. P. 131–47. doi: 10.1159/000057762

References

- [1] Daulatzai, M. A. (2017). Cerebral hypoperfusion and glucose hypometabolism: Key pathophysiological modulators promote neurodegeneration, cognitive impairment, and Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.*, 95(4), 943–972. doi: 10.1002/jnr.23777
- [2] Li, P., Stetler, R. A., Leak, R. K., Shi, Y., Li, Y., Yu, W., et al. (2017). Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery. *Neuropharmacology*, 134 (Pt B), 208–217. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.11.011
- [3] Michishita, E., Park, J. Y., Burneskis, J. M., Barrett, J. C., & Horikawa, I. (2005). Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol. Biol. Cell.*, 16(10), 4623–35. doi: 10.1091/mbc.E05-01-0033
- [4] Afanasieva, K., Zazhytska, M., & Sivolob, A. (2010). Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments. *Electrophoresis*, 31(3), 512–519. doi: 10.1002/elps.200900421
- [5] Collins, A. R. (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol. Biotechnol.*, 26(3), 249–261. doi: 10.1385/MB:26:3:249
- [6] Sorochinska J., & Mikhailenko V. (2008) Application of the comet assay for the DNA damage assessment caused by different environmental agents. *Oncology*, 10(3), 303–308.
- [7] Lim, J. H., Lee, Y. M., Chun, Y. S., Chen, J., Kim, J. E., & Park, J. W. (2010). Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol. Cell.*, 38(6), 864–878. doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.023
- [8] Wang, X-Q., Shao, Y., Ma, C-Y., Chen, W., Sun, L., Liu, W., et al. (2014). Decreased SIRT3 in aged human mesenchymal stromal/stem cells increases cellular susceptibility to oxidative stress. *J. Cell. Mol. Med.*, 18(11), 2298–2310. doi: 10.1111/jcmm.12395
- [9] Naia, L., Rosenstock, T. R., Oliveira, A. M., Oliveira-Sousa, S. I., Caldeira, G. L., Carmo, C., et al. (2017). Comparative Mitochondrial-Based Protective Effects of Resveratrol and Nicotinamide in Huntington's Disease Models. *Mol. Neurobiol.*, 54(7), 5385–5399. doi: 10.1007/s12035-016-0048-3
- [10] Kong, X., Wang, R., Xue, Y., Liu, X., Zhang, H., Chen, Y., et al. (2010). Sirtuin 3, a new target of PGC-1alpha, plays an important role in the suppression of ROS and mitochondrial biogenesis. *PLoS ONE*, 5(7), e11707. doi: 10.1371/journal.pone.0011707
- [11] Das, S., Mitrovsky, G., Vasanthi, H. R., & Das, D. K. (2014). Antiaging properties of a grape-derived antioxidant are regulated by mitochondrial balance of fusion and fission leading to mitophagy triggered by a signaling network of Sirt1-Sirt3-Foxo3-PINK1-PARKIN. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2014, 345105. doi: 10.1155/2014/345105

- [12] Koo, J. H., & Cho, J. Y. (2017). Treadmill Exercise Attenuates α -Synuclein Levels by Promoting Mitochondrial Function and Autophagy Possibly via SIRT1 in the Chronic MPTP/P-Induced Mouse Model of Parkinson's Disease. *Neurotox. Res.*, 32(3), 473–486. doi: 10.1007/s12640-017-9770-5
- [13] Ješko, H., & Strosznajder, R. P. (2016). Sirtuins and their interactions with transcription factors and poly(ADP-ribose) polymerases. *Folia Neuropathol.*, 54(3), 212–233.
- [14] de Queiroz, K. B., Dos Santos Fontes Pereira, T., Araújo, M. S. S., Gomez, R. S., & Coimbra, R. S. (2018). Resveratrol Acts Anti-Inflammatory and Neuroprotective in an Infant Rat Model of Pneumococcal Meningitis by Modulating the Hippocampal miRNome. *Mol Neurobiol.*, 55(12), 8869–8884. doi: 10.1007/s12035-018-1037-5
- [15] Jia, J. Y., Tan, Z. G., Liu, M., & Jiang, Y. G. (2017). Apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) contributes to resveratrol induced neuroprotection against oxygen glucose deprivation and re oxygenation injury in HT22 cells: Involvement in reducing oxidative DNA damage. *Mol. Med. Rep.*, 16(6), 9786–9794. doi: 10.3892/mmr.2017.7799
- [16] Shen, J., Xu, L., Qu, C., Sun, H., & Zhang, J. (2018). Resveratrol prevents cognitive deficits induced by chronic unpredictable mild stress: Sirt1/miR-134 signalling pathway regulates CREB/BDNF expression in hippocampus in vivo and in vitro. *Behav. Brain Res.*, 349, 1–7. doi: 10.1016/j.bbr.2018.04.050
- [17] Yang, J. L., Lin, Y. T., Chuang, P. C., Bohr, V. A., & Mattson, M. P. (2014). BDNF and exercise enhance neuronal DNA repair by stimulating CREB-mediated production of apurinic/aprimidinic endonuclease 1. *Neuromolecular. Med. Mar.*, 16(1), 161–174. doi: 10.1007/s12017-013-8270-x
- [18] Chong, Z. Z., Lin, S. H., & Maiese, K. (2002). Nicotinamide modulates mitochondrial membrane potential and cysteine protease activity during cerebral vascular endothelial cell injury. *J. Vasc. Res.*, 39(2), 131–147. doi: 10.1159/000057762