

ІНТЕГРАТИВНІ МЕХАНІЗМИ ПАТОЛОГІЧНИХ ПРОЦЕСІВ: ВІД ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ ДО КЛІНІЧНОЇ ПРАКТИКИ*

УДК 612.8-092:616.005:615.03

Гарматіна О.Ю., Вознесенська Т.Ю., Грушка Н.Г.,
Лапікова-Бригінська Т.Ю., Красільников Р.Г.

УШКОДЖЕННЯ ДНК НЕЙРОНІВ ПРИ ДІЇ РЕСВЕРАТРОЛА ЗА УМОВ МОДЕЛЮВАННЯ ХРОНІЧНОЇ СУДИННОЇ ПАТОЛОГІЇ ГОЛОВНОГО МОЗКУ У МИШЕЙ

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

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України», м. Київ

Національний військовий медичний клінічний центр «Головний військовий клінічний госпіталь», м. Київ

Метою цієї роботи було вивчення змін фрагментації ДНК ядер нейронів в обох півкулях головного мозку мишей за умов моделювання хронічної унілатеральної оклюзії загальної сонної артерії при дії ресвератролу. Методи. Дослідження проводили на мишах лінії С57 в контрольній групі, при моделюванні хронічної унілатеральної оклюзії загальної сонної артерії, при введенні ресвератролу (10 мг/кг, і. р., 7 днів до та 3 доби після оклюзії) на фоні хронічної унілатеральної оклюзії загальної сонної артерії. Хронічна унілатеральна оклюзія загальної сонної артерії викликала переїзкою лівої загальної сонної артерії. Через 8 тижнів у наркотизованих тварин вилучали мозок та вивчали пошкодження ДНК ядер нейронів методом ДНК-комет в обох півкулях головного мозку. Результати. В умовах моделювання хронічної унілатеральної оклюзії загальної сонної артерії зменшується рівень живих клітин (класи 0-1 ДНК-комет) в обох півкулях головного мозку за рахунок збільшення пошкоджених нейронів (класи 3-4 ДНК-комет) переважно з унілатеральної сторони до $17,20 \pm 0,29\%$ ($p < 0,05$). Введення ресвератролу при моделюванні хронічної унілатеральної оклюзії загальної сонної артерії збільшує кількість живих клітин (класи 0-1 ДНК-комет) особливо з симптомної сторони до $90 \pm 0,37\%$ за рахунок зменшення рівня ушкоджених клітин до $1,33 \pm 0,09\%$, відновлюючи показники фрагментації ДНК до контрольної групи ($p < 0,05$). Висновок. Хронічна оклюзія загальної сонної артерії супроводжується фрагментацією ДНК нейронів обох півкуль головного мозку переважно з унілатеральної сторони. Введення ресвератролу зменшує пошкодження ДНК, що свідчить про його нейропротекторний вплив за даних патологічних умов.

Ключові слова: хронічна оклюзія загальної сонної артерії, метод ДНК-комет, ресвератрол

Хронічна гіперперфузія головного мозку (ГМ) є патогенетичним механізмом та фактором ризику розвитку захворювань центральної нервової системи (ЦНС). Встановлення механізмів ушкодження ГМ при хронічній судинній патології та можливість впливу на неї є актуальною проблемою. Оклюзійно-стенотична патологія брахіоцефальних артерій, зокрема, атеросклеротичного характеру, є важливою причиною гіперперфузії ГМ. Механізми ушкодження ГМ при хронічних його захворюваннях на молекулярно-генетичному рівні остаточно не встановлені. Існують дані, які вказують на ушкодження ДНК нейронів у механізмах ішемічного інсульту та дегенеративних процесів ГМ. В цих умовах тканина ГМ піддається оксидативному стресу, що викликає пошкодження ДНК, геному нейронів, їх заги-

бель. При цьому, ступінь пошкодження та регенерації ДНК корелює зі ступенем нейрогенезу та функціонального відновлення при ураженні нервово-судинної системи [7].

Ресвератрол (РВ) (відомий природний поліфенол) має нейропротекторну дію при ішемічному інсульті, субарахноїдальному крововиливі, черепно-мозковій травмі [4]. Показані протизапальні та антиоксидантні властивості РВ, які пов'язані з індукцією антиоксидантних ферментів [8]. Молекулярно-генетичні механізми дії РВ в умовах хронічної патології ЦНС висвітлені в літературі недостатньо. Тому, метою нашої роботи було встановити ступінь ушкодження ДНК нейронів мишей та вплив на нього нейромодулятора РВ в умовах експериментальної хронічної оклюзії загальної сонної артерії (ХОЗСА).

* Матеріали надані оргкомітетом VII Пленуму Українського наукового товариства патофізіологів та науково-практичної конференції «Інтегративні механізми патологічних процесів: від експериментальних досліджень до клінічної практики», присвяченої 110-річчю з дня народження члена-кореспондента АМН СРСР, професора М.Н. Зайка (м. Полтава 11-12 жовтня 2018 р.)

Матеріали і методи

Дослідження були проведені на самцях мишей лінії C57Bl (m=15-18), які знаходились на стандартному раціоні віварію Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця при стандартному світловому режимі (12 годин – день, 12 годин – ніч), згідно міжнародним конвенціям по захисту тварин, яких застосовують у експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1985), та положенням Комітету по біоетиці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця.

Тварини були розподілені на 3 групи: 1 – контрольна (n=10), 2 – тварини, яким моделювали створення ХОЗСА (n=10), 3 – тварини, яким на фоні ХОЗСА вводили і.р. ресвератрол (10 мг/кг) на протязі 10 днів (7 діб до та 3 після створення оклюзії ЗСА) (n=10). При моделюванні ХОЗСА мишам під кетаміновим наркозом (1 мл / 300 г) здійснювали перев'язку лівої ЗСА, після чого рану ушивали.

Через 8 тижнів після накладення лігатури у тварин вивчали особливості пошкодження ДНК в обох півкулях ГМ. Після декапітації ГМ промивали охолодженим розчином, подрібнювали та гомогенізували у розчині PBS (рН 7.4, 4°C). Пошкодження клітин при виділенні перевіряли шляхом їх забарвлення трипановим синім. Оцінювали близько 200 клітин за допомогою люмінесцентного мікроскопа «Люмам І-1» (ЛОМО, Росія). Клітини ресуспендіювали у PBS і використовували у аналізі ДНК-комет.

Для встановлення ушкодження ДНК у ядрах нейронів обох півкуль ГМ мишей використовували метод лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет – «DNA-comet assay») за Afanasieva та співавт. [1] з модифікаціями, за яким розміри хвоста ДНК-комети позитивно корелюють зі ступенем ушкодження ДНК [2]. Електрофорез препаратів проводили за допомогою приладу Multiphor II («LKB», Швеція). Аналіз ДНК-комет на електрофореграмах, забарвлених флуоресцентним барвником DAPI, здійснювали візуально, використовуючи люмінесце-

нтний мікроскоп «Люмам І-1» (ЛОМО, Росія). Застосовували напівкількісний метод оцінки інтенсивності забарвлення та довжини хвостів комет, на кожному мікропрепараті аналізували не менше ніж 100 окремо розташованих ДНК-комет. За співвідношенням ДНК у «голіві» та «хвості» комети поділяли за загально визнаною класифікацією на 5 класів з числовим значенням від 0 до 4 [2].

Статистичну обробку результатів проводили з використанням t-критерію Стьюдента за допомогою програми GraphPad Prism version 5.00 for Windows (GraphPad Software, США); p<0,05 вважали статистично вірогідним.

Результати та їх обговорення

В умовах моделювання ХОЗСА в обох півкулях ГМ відмічалась фрагментація ДНК нейронів ГМ, при цьому відбувалось достовірне зменшення живих клітин (класи 0-1 ДНК-комет) за рахунок збільшення пошкоджених нейронів (класи 3-4 ДНК-комет). Найбільші відмінності рівнів фрагментації ДНК нейронів ГМ реєстрували в симптомній гемісфері (Рис.1).

Отримані нами дані про фрагментацію ДНК нейронів ГМ при ХОЗСА свідчать про патологічні зміни в ЦНС, для яких характерна загибель клітин. Застосування РВ як нейропротектора з метою профілактики та лікування захворювань ЦНС матиме важливе медичне значення. Тому нами була досліджена дія РВ на тканину ГМ мишей в умовах ХОЗСА, а саме на ДНК нейронів ГМ.

Проведені нами дослідження показали, що дія РВ в умовах моделювання ХОЗСА відновлює показники ушкодження ДНК нейронів до показників контрольної групи. Особливо важливими ці результати є з унілатеральної сторони, що вказує на захисні властивості РВ, який зменшує ушкодження ДНК нейронів (за рахунок збільшення класів 0-1 ДНК-комет) в обох півкулях ГМ. Зміни рівнів фрагментації ДНК нейронів при дії РВ статистично не відрізнялись від контрольних значень (Рис. 1).

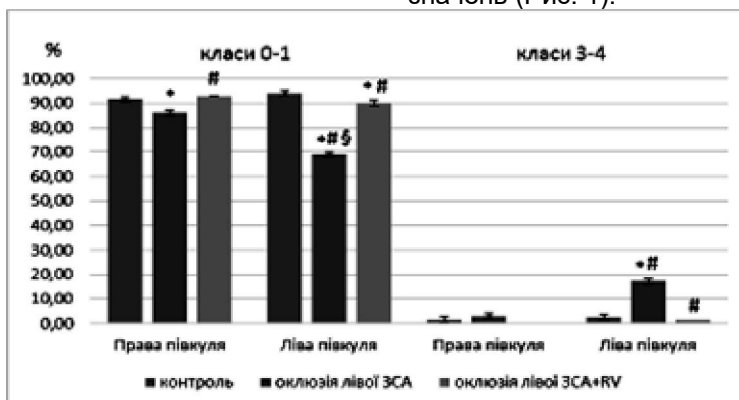


Рис.1. Розподіл ДНК-комет ядер нейронів мишей при моделюванні ХОЗСА та при введенні ресвератрола.

Примітки: ЗСА – загальна сонна артерія; RV – ресвератрол. * - p<0,01 – вірогідність відмінностей величин середніх значень щодо показників у контрольних тварин; # - p<0,05 – вірогідність відмінностей величин середніх значень щодо показників у тварин за умов моделювання ХОЗСА; § - p<0,05 вірогідність відмінностей величин середніх значень щодо показників контрлатеральної сторони.

Даних про вплив РВ на пошкодження ГМ на молекулярно-генетичному рівні майже не зустрічається. Можливо, описана нами дія РВ реалізується завдяки антизапальному та нейропротекторному його ефектам через модуляцію експресії деяких мікроРНК (miRNome), через активацію апуринової / апіримідинової ендонуклеази 1, яка представляє собою багатофункціональний фермент, сприяючий відновленню основ видаленням окисної ДНК та редокс-активації транскрипційних факторів, пов'язаних з виживанням нейронів при гіпоксично-ішемічному пошкодженні ГМ, а також через активацію SIRT1 [3;5;6].

Таким чином, введення ресвератролу за умов ХОЗСА у мишей призводить до зменшення ушкодження ДНК нейронів обох півкуль ГМ, що вказує на його нейропротекторний вплив за даних патологічних умов.

Література

1. Afanasieva K. Kinetics of comet formation in single-cell gel electrophoresis: Loops and fragments / K. Afanasieva, M. Zazhytska, A. Sivolob // Electrophoresis. – 2010. – Т.31. – С.512-519.

2. Collins A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations / A.R. Collins // Mol. Biotechnol. – 2004. – Vol. 26, №3. – P.249-261.

3. de Queiroz K.B. Resveratrol Acts anti-inflammatory and neuroprotective in an infant rat model of pneumococcal meningitis by modulating the hippocampal miRNome / K.B. de Queiroz, T. Dos Santos Fontes Pereira, M.S.S. Araújo [et al.] // Mol. Neurobiol. – 2018. – Vol. 55, №4. – P.4037-4045.

4. Girbovan C. Repeated resveratrol administration confers lasting protection against neuronal damage but induces dose-related alterations of behavioral impairments after global ischemia / C. Girbovan, L. Morin, H. Plamondon // Behav. Pharmacol. – 2012. – Vol. 23. – P.1-13.

5. Jia J.Y. 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 / J.Y. Jia, Z.G. Tan, M. Liu // Mol. Med. Rep. – 2017. – Vol. 16, №6. – P.9786-9794.

6. Koronowski K.B. Resveratrol preconditioning induces a novel extended window of ischemic tolerance in the mouse brain / K.B. Koronowski, K.R. Dave, I. Saul [et al.] // Stroke. – 2015. – Vol. 46. – P.2293-2298.

7. Li P. Oxidative stress and DNA damage after cerebral ischemia: Potential therapeutic targets to repair the genome and improve stroke recovery / P. Li, R.A. Stetler, R.K. Leak [et al.] // Neuropharmacol. – 2017. – pii: S0028-3908(17). – P.30520-30528.

8. Sinha K. Protective effect of resveratrol against oxidative stress in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats / K. Sinha, G. Chaudhary, Y.K. Gupta [et al.] // Life Sci. – 2002. – Vol. 71. – P.655-665.

Реферат

ПОВРЕЖДЕНИЕ ДНК НЕЙРОНОВ ПРИ ДЕЙСТВИИ РЕСВЕРАТРОЛА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ХРОНИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ СОСУДОВ ГОЛОВНОГО МОЗГА У МЫШЕЙ

Гарматина О.Ю., Вознесенская Т.Ю., Грушка Н.Г., Лапикова-Брыгинская Т.Ю., Красильников Р.Г.

Ключевые слова: хроническая окклюзия общей сонной артерии, метод ДНК-комет, ресвератрол

Целью данной работы было изучение изменений фрагментации ДНК ядер нейронов обоих полушарий головного мозга мышей в условиях моделирования хронической унилатеральной окклюзии общей сонной артерии при действии ресвератрола. Методы. Исследования проводили на мышах линии С57 в контрольной группе, при моделировании хронической унилатеральной окклюзии общей сонной артерии, при введении ресвератрола (10 мг/кг, i. p., 7 дней до и 3 дня после окклюзии) на фоне хронической унилатеральной окклюзии общей сонной артерии. Хроническая унилатеральная окклюзия общей сонной артерии вызывалась перевязкой левой общей сонной артерии. Через 8 недель у наркотизированных животных выделяли мозг и изучали повреждение ДНК ядер нейронов методом ДНК-комет в обоих полушариях головного мозга. Результаты. В условиях моделирования хронической унилатеральной окклюзии общей сонной артерии уменьшается уровень живых клеток (классы 0-1 ДНК-комет) в обоих полушариях головного мозга за счет увеличения повреждения нейронов (классы 3-4 ДНК-комет) преимущественно с унилатеральной стороны до $17,20 \pm 0,29\%$ ($p < 0.05$). Введение ресвератрола при моделировании хронической унилатеральной окклюзии общей сонной артерии увеличивало количество живых клеток (классы 0-1 ДНК-комет) особенно с симптомной стороны до $90 \pm 0,37\%$ за счет уменьшения уровня поврежденных клеток до $1,33 \pm 0,09\%$, восстанавливая показатели фрагментации ДНК до контрольной группы ($p < 0.05$). Выводы. Хроническая окклюзия общей сонной артерии сопровождается фрагментацией ДНК нейронов обоих полушарий головного мозга преимущественно с унилатеральной стороны. Введение ресвератрола уменьшает повреждение ДНК, что свидетельствует о его нейропротекторном действии в данных патологических условиях.

Summary

SEVERITY OF NEURONAL DNA DAMAGE UNDER THE ACTION OF RESVERATROL IN MODELLED CHRONIC CEREBROVASCULAR PATHOLOGY OF MICE

Harmatina O.Yu., Voznesenskaya T.Yu., Grushka N.G., Lapikova-Bryhinskaya T.Yu., Krasilnikov R.G.

Key words: chronic occlusion of common carotid artery, DNA-comet assay, resveratrol

The purpose of this work was to investigate changes in DNA fragmentation of neuron nuclei in both cerebral hemispheres of mice subjected to chronic unilateral occlusion of common carotid artery under action of resveratrol. Methods. The study covered 3 groups of C57 male mice: control group; mice subjected to modelled chronic unilateral occlusion of common carotid artery; mice subjected to modelled chronic unilateral occlusion of common carotid artery under resveratrol action (10 mg/kg, intraperitoneally, 7 days before and 3 day after the modelled occlusion). Chronic unilateral occlusion of common carotid artery was performed by applying left common carotid artery ligation. In 8 weeks, brain tissues samples were taken from left and right hemispheres of narcotized animals and neuron nuclear DNA damages were investigated by DNA-comet assay. Results. Under conditions of chronic unilateral occlusion of the common carotid artery modelling, the level of living cells (classes 0-1 of DNA-comet) in both cerebral hemispheres lowered due to an increase in

damaged neurons (classes 3-4 DNA-comet), mainly on the unilateral side up to $17.20 \pm 0.29\%$ ($p < 0.05$). The administration of resveratrol during the modelled chronic unilateral occlusion of the common carotid artery increased the number of living cells (classes 0-1 of the DNA-comet), especially from the symptomatic side to $90 \pm 0.37\%$, by reducing the level of damaged cells to $1.33 \pm 0.09\%$ and restoring the DNA fragmentation parameters to the relevant findings of the control group ($p < 0.05$). Conclusion. Chronic occlusion of the common carotid artery was accompanied by DNA fragmentation of the neurons in both cerebral hemispheres mainly from the unilateral side. The introduction of resveratrol reduces the DNA damage that indicates its neuroprotective effect in these pathological conditions.

УДК 616.314.17+611.018.2:599.323.4

Єлінська А.М., Костенко В.О.

ВПЛИВ ІНГІБІТОРА ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦІЇ AP-1 НА ДЕПОЛІМЕРИЗАЦІЮ БІЛКІВ СПОЛУЧНОЇ ТКАНИНИ ПАРОДОНТА ЩУРІВ ЗА УМОВ СИСТЕМНОЇ ЗАПАЛЬНОЇ ВІДПОВІДІ

ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

*В експерименті на 30 білих щурах досліджено вплив інгібітора фактора транскрипції AP-1 (activator protein 1) SR 11302 на колагеноліз і деполімеризацію протеогліканів та глікопротеїнів екстрацелюлярного матриксу пародонта за умов ліпополісахарид-індукованої системної запальної відповіді. Останню моделювали шляхом внутрішньочеревного введення пірогеналу (ліпополісахариду *Salmonella typhi*) у дозі 0,4 мкг/кг маси протягом 1-го тижня 3 рази, протягом наступних 7-ми тижнів – 1 раз у тиждень. SR 11302 ((E,E,Z,E)-3-methyl-7-(4-methylphenyl)-9-(2,6,6-trimethyl-1-cyclohexen-1-yl)-2,4,6,8-nonatetraenoic acid, виробництво “Tocris Bioscience”) призначали внутрішньоочеревинно в дозі 1 мг/кг 3 рази на тиждень, починаючи з 30-ї доби експерименту з застосуванням пірогеналу. Колагеноліз оцінювали за концентрацією вільного оксипроліну, рівень деполімеризації протеогліканів і глікопротеїнів – за вмістом їхніх компонентів – глікозаміногліканів та N-ацетилнейрамінової кислоти, відповідно. Зроблено висновок, що застосування SR 11302 за умов експерименту суттєво зменшує у м'яких і кістковій тканинах пародонта деполімеризацію колагену, протеогліканів та сіалоглікопротеїнів, обмежує резорбцію альвеолярного відростка щелеп.*

Ключові слова: активаторний білок 1, системна запальна відповідь, сполучна тканини, колагеноліз, протеоглікани, глікопротеїни, пародонт.

Робота є фрагментом НДР «Роль активних форм кисню, системи оксиду азоту та транскрипційних факторів у механізмах патологічного системогенезу» (№ держреєстрації 0114U004941).

Відомо, що екстрацелюлярний матрикс (ЕЦМ) сполучної тканини (СТ) відіграє одну з провідних ролей у функціонуванні пародонта. Він забезпечує стабілізацію та цементування волокнистих структур, між- та внутрішньоклітинну взаємодію та регуляцію водно-сольового метаболізму, антимікробну резистентність тканин [14-16].

Основним структуроутворюючим елементом строми пародонта є фібробласти, найважливішою функцією яких є продукція ЕЦМ, особливо синтез колагену, з яким пов'язана, насамперед, міцність тканин. ЕЦМ альвеолярної кістки складається на 90% з колагену I типу та до 5% колагену інших типів. Іншими молекулами ЕЦМ пародонта є глікопротеїни (ГП), протеоглікани (ПГ) і гіалуронова кислота, що зв'язують воду і надають тканинам пружність [2, 5, 16].

ПГ – це високомолекулярні сполуки, які складаються з генетично різних стрижневих білків, що містять олігосахариди, приєднані N- і O-глікозидними зв'язками, і ковалентно зв'язані бокові ланцюги глікозамінгліканів (ГАГ) [2]. Сульфатування частини ланцюга останніх забезпечує зв'язування багатьох активних біомолекул таких, наприклад, як фактори росту [5].

Ураження тканин ясен, окістя та кістки альве-

олярного відростка щелеп як етап патогенезу хронічного пародонти у значній мірі пов'язано з деструкцією ЕЦМ продуктами життєдіяльності мікробіоти ротової порожнини (первинна альтерація) та власне медіаторами запалення (вторинна альтерація). Так, пародонтопатогенні мікроорганізми виробляють низку гістолітичних ферментів (гіалуронідазу, хондроїтинсульфатазу, протеази, гліукуронідазу, колагеназу) та екзотоксини, що викликають деполімеризацію колагену, ПГ і ГП [20]. Медіаторні системи тканин пародонта, що забезпечують таку дію, представлені прозапальними цитокінами та ефекторними сполуками – матриксними металопротеїназами (ММП), плазміном, сериновими протеїназами поліморфоядерних лейкоцитів, активними формами кисню та азоту [16, 20]. Саме вони забезпечують деструкцію СТ пародонта при дії місцевих неінфекційних чинників при загальних метаболічних порушеннях в організмі [12, 16].

До транскрипційних факторів, які регулюють синтез матричної РНК гістолітичних ферментів, відносять активаторні білки (activator proteins – AP) 1 і 2, ядерний чинник κВ (NF-κB) та деякі інші (C / EBP-β, Sp-1, HIF, PEA3, STAT, ER). Вони являють собою кінцеві ланки шляхів сигнальної трансдукції Ras-MAPK / ERK, JAK-STAT, Wnt / β-