

DOI: 10.26693/jmbs05.04.117

УДК 617.51-089:616.82:599.323.4

Яетушенко І. В., Костенко В. О.

ВПЛИВ ІНДУКТОРІВ ТРАНСКРИПЦІЙНОГО ЧИННИКА NRF2 НА РОЗВИТОК ОКИСНО-НІТРОЗАТИВНОГО СТРЕСУ В ТКАНІНІ ВЕЛИКИХ ПІВКУЛЬ ГОЛОВНОГО МОЗКУ ЩУРІВ ПІСЛЯ МОДЕЛЮВАННЯ ЧЕРЕПНО-МОЗКОВОЇ ТРАВМИ

Українська медична стоматологічна академія, Полтава

patofiziolog@umsa.edu.ua

Досліджено вплив індукторів активації сигнальної системи Nrf2 – антиоксидант-респонсивний елемент (ARE) на показники розвитку окисно-нітрозативного стресу в тканині великих півкуль головного мозку щурів після відтворення черепно-мозкової травми. Досліди були проведені на 28 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-220 г, розподілених на 4 групи по 7 тварин: 1-ша (хибнотравмовані тварини) – після виконання таких же маніпуляцій (проведення ефірного наркозу, фіксація), що і в експериментальних серіях, за винятком нанесення черепно-мозкової травми; 2-га – після моделювання експериментальної черепно-мозкової травми; 3-тя та 4-та – тваринам після відтворення черепно-мозкової травми протягом 7-днів внутрішньоочеревинно вводили індуктори системи Nrf2-ARE: диметилфумарат (DMF) в дозі 15 мг/кг у 10% розчині диметилсульфоксиду та епігалокатехін-3-галат (EGCG) в дозі 1 мг/кг відповідно.

При застосуванні DMF за умов експерименту у гомогенаті великих півкуль головного мозку достовірно знижувалася продукція супероксидного аніон-радикала (O_2^-) NADPH- і NADH-залежними електронно-транспортними ланцюгами та NADPH-оксидазою лейкоцитів, активність NO-синтази (NOS, загальна та її індукцибельної ізоформи), вміст пероксинітриду, концентрація вторинних продуктів пероксидного окиснення ліпідів (ТБК-активних сполук) та їх приріст за час інкубації у прооксидантному залізоаскорбатному буферному розчині порівняно з даними 2-ї групи. При цьому збільшувалася активність конститутивної ізоформи NOS та індекс її спряження, активність супероксиддисмутази та каталази.

При введенні EGCG після моделювання черепно-мозкової травми зменшувалася вироблення O_2^- NADPH- і NADH залежними електронно-транспортними ланцюгами та NADPH-оксидазою лейкоцитів, активність NOS (загальна, індукцибельної та конститутивної ізоформ), вміст пероксинітри-

ту, концентрація ТБК-активних сполук та їх приріст за час інкубації у прооксидантному буферному розчині при збільшенні активності супероксиддисмутази та каталази.

Зроблено висновок, що застосування електрофільних індукторів системи Nrf2 – ARE (DMF та EGCG) суттєво обмежує в тканині великих півкуль головного мозку щурів на 7 добу після моделювання черепно-мозкової травми середнього ступеня тяжкості ознаки окисно-нітрозативного стресу: зменшує вироблення активних форм кисню та азоту, знижує пероксидне окиснення ліпідів, підвищує антиоксидантний потенціал.

Ключові слова: транскрипційний чинник Nrf2, диметилфумарат, епігалокатехін-3-галат, черепно-мозкова травма, окисно-нітрозативний стрес, головний мозок.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота є фрагментом НДР «Роль транскрипційних факторів, системи циркадіанного осцилятора та метаболічних розладів в утворенні та функціонуванні патологічних систем», № держ. реєстрації 0119U103898.

Вступ. Черепно-мозкова травма (ЧМТ) є важливою проблемою для охорони здоров'я, яка є однією з провідних причин смерті та втрати працездатності щорічно по всьому світу [1].

Вважається, що у патогенезі ЧМТ важлива роль належить вторинній альтерації тканини мозку протягом запально-токсичної стадії, дебют якої припадає на 2-гу добу (за умов ЧМТ середнього ступеню тяжкості) після передуючої їй реактивно-метаболічної стадії. При цьому виснаження компенсаторно-приспосувальних механізмів супроводжується розвитком системної запальної відповіді (СЗВ) та поліорганної недостатності [2].

Механізми, що лежать в основі вторинного пошкодження є складними та взаємопов'язаними. Попередні дослідження, зосереджені на одному з цих механізмів, виявились неефективними в клінічній

практиці. Отже, терапевтичною стратегією при лікуванні ЧМТ може бути усунення декількох провідних ланок патогенезу, що призводять до розвитку тяжких ускладнень [1].

Важливим механізмом розвитку СЗВ є збільшення продукції активних форм кисню та азоту (АФК / АФА). Цей процес регулюється активністю редоксчутливих транскрипційних факторів (NF-κB, AP-1, Nrf2 та ін.) [3]. Нещодавно нами показано роль чинників NF-κB, AP-1 у розвитку окисно-нітрозативного стресу після відтворення експериментальної ЧМТ. Так, застосування інгібіторів чинників NF-κB (піролідидитіокарбамат амонію) та AP-1 (SR 11302) істотно обмежує в тканині великих півкуль головного мозку щурів на 7 добу після моделювання ЧМТ утворення АФК та активність NO-синтази (загальної та індукцибельної), покращує спряженість її конститутивної ізоформи, обмежує концентрацію пероксинітриду, підвищує антиоксидантний потенціал [4].

Нині відомо, що в експерименті на мишах через 24 год після ЧМТ збільшується експресія генів гемоксигенази-1 та NAD(P)H:хінооксидоредуктази-1, що регулюються транскрипційним фактором Nrf2 (англ. Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2) [5]. Ці результати підтверджувалися даними імуногістохімічного дослідження, які виявили збільшення рівня ядерного Nrf2 після відтворення ЧМТ. У подальшому був встановлений піковий час активації сигнального шляху Nrf2 – антиоксидант-респонсивний елемент (ARE) в тканині мозку, який у лобовій частці може становити 3 дні після ЧМТ [6].

Припускається здатність системи Nrf2-ARE проявляти захисний ефект після ЧМТ [7]. Застосування індуктора Nrf2 диметилфумарату після відтворення щурам внутрішньомозкового крововиливу покращувало розрішення гематоми, зменшувало набряк мозку та, в кінцевому рахунку, посилювало неврологічне одужання тварин дикого типу, але не тих, що мали нокаут за Nrf2 [8]. Проте закономірності нейропротективної індукції Nrf2 залишаються недостатньо з'ясованими.

Метою роботи було вивчення впливу індукторів активації сигнальної системи Nrf2-ARE на показники розвитку окисно-нітрозативного стресу в тканині великих півкуль головного мозку щурів після відтворення ЧМТ.

Матеріал та методи дослідження. Дослідження були проведені на 28 білих щурах-самцях лінії Вістар масою 180-220 г, розподілених на 4 групи по 7 тварин: 1-ша (хибнотравмовані тварини) – після виконання таких же маніпуляцій (проведення ефірного наркозу, фіксація), що і в експериментальних серіях, за винятком нанесення ЧМТ; 2-га – після моделювання експериментальної ЧМТ; 3-тя та

4-та – тваринам після відтворення ЧМТ протягом 7-діб внутрішньоочеревинно вводили індуктори системи Nrf2-ARE: диметилфумарат (dimethyl fumarate – DMF, "Sigma-Aldrich, Inc.", США) в дозі 15 мг/кг у 10% розчині диметилсульфоксиду [8] та епігалокатехін-3-галат (epigallocatechin-3-gallate – EGCG, "Tocris Bioscience", Велика Британія) в дозі 1 мг/кг [9] відповідно.

Відтворювали модель ЧМТ середнього ступеня тяжкості [10]. Для цього під ефірним наркозом здійснювали фіксацію тварин, голови яких поміщали під металеві трубки, через які забезпечували вільне падіння вантажу масою 66.7 г з висоти 65 см, площа удару становила 0.5 см², що дозволяло отримувати удар з енергією 0.425 Дж. Тварин декапітували на 7-му добу після травмування під ефірним наркозом.

Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005), Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006, ст. 26), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених П'ятим національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

У гомогенаті великих півкуль головного мозку оцінювали утворення супероксидного аніон-радикала ($\cdot\text{O}_2^-$) при проведенні тесту з нітросинім тетразолієм з використанням спектрофотометру Ulab та індукторів: нікотинамідаденіндинуклеотиду відновленого (NADH) для оцінки продукції $\cdot\text{O}_2^-$ мітохондріальним електронно-транспортним ланцюгом (ЕТЛ), нікотинамідаденіндинуклеотид-фосфату відновленого (NADPH) – ендоплазматичним ретикулозом і NO-синтазою (NOS), пірогена-лу – NADPH-оксидазою лейкоцитів [11].

Загальну активність NO-синтази (NOS) визначали за різницею концентрації нітрит-іонів до та після інкубації гомогенату великих півкуль головного мозку в середовищі, що містить L-аргінін та NADPH [12]. Для визначення активності конститутивних ізоферментів (cNOS) додавали 1% розчин аміногуанідину гідрохлориду (98%, "Sigma-Aldrich, Inc.", США) [13]. Активність індукцибельної ізоформи (iNOS) розраховували шляхом віднімання активності cNOS від загальної активності NOS. Розраховували індекс спряження cNOS як відношення активності cNOS до величини продукції $\cdot\text{O}$ NADPH-залежними ЕТЛ. Концентрацію пероксинітридів лужних та лужно-земельних металів у гомогенаті великих півкуль головного мозку визначали спектрофотометрично [12].

Рівень пероксидного окиснення ліпідів (ПОЛ) у гомогенаті оцінювали за утворенням у реакції тіобарбітурової кислоти (ТБК) з ТБК-активними продуктами забарвленого триметинового комплексу. Стан антиоксидантної системи оцінювали за приростом концентрації ТБК-активних сполук за час інкубації гомогенату в прооксидантному залізоаскорбатному буферному розчині, а також за активністю антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази (СОД) та каталази [14].

Статистичні розрахунки проводили з використанням програми "StatisticSoft 6.0". Для перевірки розподілу на нормальність було застосовано розрахунок критерію Шапіро-Вілка. Якщо дані відповідали нормальному розподілу, то для їх порівняння використовували критерій t Стьюдента для незалежних вибірок. У разі, коли ряди результатів не підлягали нормальному розподілу, статистичну обробку здійснювали, використовуючи непараметричний метод – тест Манна-Вітні.

Результати дослідження та їх обговорення.

Про зміни продукції $\cdot\text{O}_2^-$ різними джерелами у гомогенаті великих півкуль головного мозку через 7 діб після моделювання експериментальної ЧМТ при дослідженні ми повідомляли у попередній роботі [4]. Було виявлено збільшення генерації O_2^- NADPH- і NADH-залежними ЕТЛ та його вироблення NADPH-оксидазою лейкоцитів.

При застосуванні DMF за умов експерименту у гомогенаті великих півкуль головного мозку достовірно знижувалася продукція $\cdot\text{O}_2^-$ NADPH- і NADH залежними ЕТЛ (табл. 1) – на 34.4 та 38.9 % відповідно порівняно з результатом 2-ї групи. Вироблення цього радикала NADPH-оксидазою лейкоцитів

Таблиця 1 – Вплив індукторів транскрипційного чинника NRF2 на генерацію супероксидного аніон-радикала у гомогенаті великих півкуль головного мозку після відтворення експериментальної черепно-мозкової травми, нмоль/с-г ($M \pm m$)

| Групи | Індуктори вироблення O_2^- | | |
|---|-------------------------------------|---------------------|--------------------|
| | NADPH | NADH | Пірогенал |
| Хибнотравмовані тварини | 11.31±0.40 | 13.57±0.47 | 1.25±0.04 |
| Моделювання ЧМТ | 21.08± ±0.40 * | 27.19± ±1.54 * | 2.67± ±0.18 ** |
| Застосування DMF після моделювання ЧМТ | 13.83± ±0.18 ** | 16.61± ±0.21 ** | 1.52± ±0.02 ** |
| Застосування EGCG після моделювання ЧМТ | 16.66± ±0.68 **, ** | 19.98± ±0.82 *** | 1.83± ±0.08 *** |

Примітки: * – $p < 0.05$ порівняно з результатами 1-ї групи, ** – $p < 0.05$ порівняно з результатами 2-ї групи.

вірогідно поступалася (на 43.1%) значенню 2-ї групи.

При введенні EGCG після моделювання експериментальної ЧМТ також зменшувалося вироблення $\cdot\text{O}_2^-$ NADPH- і NADH залежними ЕТЛ – на 21.0 та 26.5% відповідно порівняно з результатом 2-ї групи. Продукція $\cdot\text{O}_2^-$ NADPH-оксидазою лейкоцитів зменшувалася за цих умов на 31.5 % порівняно з результатом 2-ї групи.

Раніше нами показано, що через 7 діб після відтворення ЧМТ при дослідженні гомогенату великих півкуль головного мозку суттєво збільшувалася активність NOS – загальна та її індукцибельної ізоформи [4]. При цьому активність cNOS та індекс спряження cNOS істотно зменшувалися, що вказує на неспряжений стан cNOS, коли цей ізофермент виявляє ознаки потужного генератора $\cdot\text{O}_2^-$ та може активувати інші джерела утворення АФК. За цих умов у тканині головного мозку закономірно збільшувалася концентрація пероксинітриту.

При застосуванні DMF за умов відтворення ЧМТ вірогідно знижувалася у гомогенаті великих півкуль головного мозку активність NOS (табл. 2) – загальна та її індукцибельної ізоформи – на 61.2 та 71.6% відповідно порівняно з результатом 2-ї групи. Активність cNOS за цих умов збільшувалася на 67.4%, а індекс її спряження – у 2.5 раза порівняно з результатом 2-ї групи. Вміст пероксинітриту поступався на 37.3% значенню 2-ї групи.

При введенні EGCG після моделювання ЧМТ у гомогенаті великих півкуль головного мозку активність NOS та iNOS зменшувалася на 35.4 та 34.6% відповідно порівняно з результатами 2-ї групи. Проте активність cNOS також зменшувалася – на 45.3%, а індекс її спряження – на 29.3% порівняно з даними 2-ї групи. Вміст пероксинітриту поступався на 13.7% значенню 2-ї групи.

Звертає на себе увагу зменшення при застосуванні EGCG активності cNOS. Такі зміни, за даними літератури, можуть бути пов'язаними зі зниженням під дією препарату активності нейрональної NOS, що раніше було виявлено у нервовій тканині (мотонейронах) щурів [15] та гомогенаті головного мозку мишей [16]. Саме цей ізофермент відіграє першочергову патогенну роль при ішемії головного мозку [17]. У той же час EGCG виявляє нейропротекторну дію при відтворенні моделі ушкодження головного мозку щурів за умов оклюзії середньої мозкової артерії шляхом посилення сигнального шляху фосфатиділінозитол-3-кіназа / протеїнкіназа B (Akt) / ендотеліальна NOS [18].

Як показано в нашій попередній публікації [4], надмірне утворення АФК / АФА на 7 добу після

Таблиця 2 – Вплив індукторів транскрипційного чинника NRF2 на показники нітрозативного стресу в гомогенаті великих півкуль головного мозку після відтворення експериментальної черепно-мозкової травми (M±m)

| Групи | Активність NOS, мкмоль NO ₂ ⁻ /г.хв. | | | Індекс спряження cNOS | Концентрація пероксинітритів, мкмоль/г |
|---|--|----------------|--------------|-----------------------|--|
| | Сумарна | cNOS | iNOS | | |
| Хибнотравмовані тварини | 7.26±0.77 | 1.60±0.13 | 5.65±0.75 | 0.141±0.010 | 1.55±0.07 |
| Моделювання ЧМТ | 11.49±1.27 * | 0.86±0.06 * | 10.62±1.26 * | 0.041±0.003 * | 2.41±0.11 * |
| Застосування DMF після моделювання ЧМТ | 4.46±0.51 *** | 1.4±0.07 ** | 3.0±0.49 *** | 0.104±0.005 ** | 1.51±0.05 ** |
| Застосування EGCG після моделювання ЧМТ | 7.42±0.27 ** | 0.47±0.06 *,** | 6.95±0.28 ** | 0.029±0.004 *** | 2.08±0.13 * |

Примітки: * – p<0.05 порівняно з результатами 1-ї групи, ** – p<0.05 порівняно з результатами 2-ї групи.

відтворення ЧМТ супроводжується розвитком декомпенсованого ПОЛ у тканині великих півкуль головного мозку: суттєво збільшується концентрація ТБК-активних сполук та їхній приріст за час інкубації у прооксидантному залізоаскорбатному буферному розчині, зменшується активність СОД і каталази.

При застосуванні DMF за умов експерименту достовірно знижувалася у гомогенаті великих півкуль головного мозку концентрація ТБК-активних сполук (**табл. 3**) до та після інкубації у прооксидантному буферному розчині – на 25.2 та 31.3% відповідно порівняно з результатом 2-ї групи. Приріст концентрації ТБК-активних сполук зменшувався на 52.7%, активність СОД і каталази збільшувалася в 2.4 та 2.2 раза відповідно порівняно з даними 2-ї групи.

При введенні EGCG після моделювання ЧМТ у гомогенаті великих півкуль головного мозку зменшувалася концентрація ТБК-активних сполук до та після інкубації у прооксидантному буферному розчині – на 17.2 та 18.4% відповідно порівняно з результатом 2-ї групи. Приріст концентрації ТБК-активних сполук знижувався на 22.5%, активність СОД і каталази збільшувалася на 85.7% та 72.2% відповідно порівняно з результатами 2-ї групи.

Одержані результати підтверджують здатність індукторів сигнальної системи Nrf2-ARE запобігати розвитку окисно-нітрозативного стресу у тканині мозку як механізму вторинної альтерації при ЧМТ.

Транскрипційний фактор Nrf2 нині розглядається як чинник стійкості клітин до дії прооксидантів, який через елементи антиоксидантної відповіді в межах регуляторної області багатьох (понад 500) генів-мішеней (ARE) координує процеси антиоксидантної дії та детоксикації, дозволяючи всім типам клітин нервової системи адаптуватися до патологічних змін, викликаних внутрішньоклітинними або позаклітинними подразниками [19].

Враховуючи центральну роль, яку відіграє Nrf2 у протидії окисному пошкодженню, раніше була запропонована модуляція цього фактора транскрипції як нейропротектора при різних неврологічних захворюваннях, зокрема, хворобі Альцгеймера, хворобі Паркінсона, розсіяному склерозі та церебральній ішемії [19, 20].

На сьогоднішній день найбільшу ефективність як індуктори Nrf2 виявляють електрофільні сполуки, які ковалентно модифікують (шляхом окислення або алкілування) залишки цистеїну, присутні у багатому на тіоли інгібіторному білку Keap1. До цієї групи, зокрема, належить DMF, який виявився

Таблиця 3 – Вплив індукторів транскрипційного чинника NRF2 на показники пероксидного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту в гомогенаті великих півкуль головного мозку після відтворення експериментальної черепно-мозкової травми (M±m)

| Групи | ТБК-активні сполуки, мкмоль/кг | | | Активність антиоксидантних ферментів | |
|---|--------------------------------|-----------------|--------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| | До інкубації | Після інкубації | Приріст за час інкубації | СОД, од. акт. | Каталаза, мккат/г |
| Хибнотравмовані тварини | 36.61±01.22 | 45.30±1.03 | 8.69±0.48 | 0.34±0.01 | 0.40±0.01 |
| Моделювання ЧМТ | 52.64±0.94* | 67.72±1.20* | 15.08±0.50* | 0.14±0.01* | 0.18±0.01* |
| Застосування DMF після моделювання ЧМТ | 39.39±1.03 *** | 46.53±1.06 *** | 7.14±0.48 ** | 0.33±0.02 ** | 0.40±0.02 ** |
| Застосування EGCG після моделювання ЧМТ | 43.58±1.62 *** | 55.25±1.53 *** | 11.68±0.80 *,** | 0.26±0.02 *** | 0.31±0.03 *** |

Примітки: * – p<0.05 порівняно з результатами 1-ї групи, ** – p<0.05 порівняно з результатами 2-ї групи.

перспективним засобом лікування розсіяного склерозу [21]. Індукована DMF активація Nrf2 в центральній нервовій системі, яка корелює з поліпшенням клінічного перебігу, збереженням аксонів та посиленням активації астроцитів, показана також на моделі енцефаломієліту у мишей [22].

Нещодавно деякі природні сполуки були ідентифіковані як електрофільні індуктори Nrf2, зокрема, сульфорафан, куркумін, ресвератрол, кверцетин, геністеїн, андрографолід [21]. Показано, що механізм антиоксидантної, протизапальної, протиракової дії поліфенолу EGCG, що є компонентом зеленого чаю, реалізується шляхом активації Nrf2 через протеоліз Keap1 [23]. Доведена здатність EGCG полегшувати пошкодження нейронів при відтворенні ішемії мозку в експерименті на щурах [24].

Виявлене нами обмеження проявів окисно-нітрозативного стресу у тканині мозку при застосуванні DMF та EGCG може бути пов'язано як з безпосередньою активацією системи Nrf2 / ARE, так і з

пригніченням нею антагоністичних NF-κB- і AP-1-асоційованих сигнальних шляхів [3].

Висновки. Застосування електрофільних індукторів системи Nrf2 – ARE диметилфумарату та епігалокатехін-3-галату суттєво обмежує в тканині великих півкуль головного мозку щурів на 7 добу після моделювання ЧМТ середнього ступеня тяжкості ознаки окисно-нітрозативного стресу: зменшує вироблення активних форм кисню та азоту, знижує пероксидне окиснення ліпідів, підвищує антиоксидантний потенціал.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати доводять доцільність подальших експериментальних і клінічних досліджень щодо ефективності корекції метаболічних та неврологічних наслідків вторинної альтерації тканини головного мозку електрофільними індукторами системи Nrf2 – ARE.

Інформація про конфлікт інтересів. Конфлікт інтересів не заявлений.

References

- Laskowitz D, Grant G, Eds. *Translational Research in Traumatic Brain Injury*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor and Francis Group; 2016.
- Ziablitshev SV, Yuzkiv YaS. Mekhanizmy zapal'nykh ta avtoimunnykh reaktsiy pry cherepno-mozkoviy travmi [Inflammatory and autoimmunity mechanisms of brain injuries]. *Zdobutky klinichnoyi i eksperymental'noyi medytsyny*. 2016; 3: 34-8. [Ukrainian]
- Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol*. 2015; 6: 183-97.
- Yavtushenko IV, Kostenko VO. Pryhnychennya transkryptsyinykh chynnykiv NF kappa B ta AP-1 obmezhuje rozvytok okysno-nitrozatyvnoho stresu v tkanyni velykykh pivkul' holovnoho mozku shchuriv pislya vidtvorennya [Inhibition of transcription factors NF kappa B and AP-1 limits the progression of oxidative-nitrosative stress in the tissue of cerebral hemispheres in rats after modelled traumatic brain injury]. *Aktual'ni problemy suchasnoyi medytsyny: Visn Ukr med stomatol akad*. 2020; 20(1): 80-5. [Ukrainian]
- Yan W, Wang HD, Hu ZG, Wang QF, Yin HX. Activation of Nrf2-ARE pathway in brain after traumatic brain injury. *Neurosci Lett*. 2008 Jan 31; 431(2): 150-4.
- Zhou Y, Tian M, Wang HD, Gao CC, Zhu L, Lin YX, et al. Activation of the Nrf2-ARE signal pathway after blast induced traumatic brain injury in mice. *Int J Neurosci*. 2019 Aug; 129(8): 801-7.
- Ratliff WA, Qubty D, Delic V, Pick CG, Citron BA. Repetitive Mild Traumatic Brain Injury and Transcription Factor Modulation. *J Neurotrauma*. 2020 Apr 15. doi: 10.1089/neu.2020.7005
- Zhao X, Sun G, Zhang J, Ting SM, Gonzales N, Aronowski J. Dimethyl Fumarate Protects Brain From Damage Produced by Intracerebral Hemorrhage by Mechanism Involving Nrf2. *Stroke*. 2015 Jul; 46(7): 1923-8.
- Yelins'ka AM, Shvaykovs'ka OO, Kostenko VO. Epigallocatechin-3-gallate prevents disruption of connective tissue in periodontium and salivary glands of rats during systemic inflammation. *Wiad Lek*. 2018; 71(4): 869-73.
- Yelsky VN, Zyablitshev SV. *Modelirovaniye cherepno-mozgovoy travmy* [Modeling of a craniocerebral injury]. Donetsk; 2008. 140 p. [Russian]
- Kostenko VO, Tsebrzhins'kii OI. Produktsiya superoksydnoho anion-radykala ta oksydu azotu u tkanyni nyrok pislya khirurgichnoho vtruchannya [Production of superoxide anion radical and nitric oxide in renal tissues sutured with different surgical suture material]. *Fiziol Zh*. 2000; 46(5): 56-62. [Ukrainian]
- Akimov OYe, Kostenko VO. Functioning of nitric oxide cycle in gastric mucosa of rats under excessive combined intake of sodium nitrate and fluoride. *Ukr Biochem J*. 2016; 88(6): 70-5.
- Yelins'ka AM, Akimov OYe, Kostenko VO. Role of AP-1 transcriptional factor in development of oxidative and nitrosative stress in periodontal tissues during systemic inflammatory response. *Ukr Biochim J*. 2019; 91(1): 80-5.
- Kaydashev IP, Ed. *Metody klinichnykh ta eksperymental'nykh doslidzhen' v medytsyni* [Methods of clinical and experimental research in medicine]. Poltava; 2003. 320 p. [Ukrainian]
- Wei IH, Tu HC, Huang CC, Tsai MH, Tseng CY, Shieh JY. (-)-Epigallocatechin gallate attenuates NADPH-d/nNOS expression in motor neurons of rats following peripheral nerve injury. *BMC Neurosci*. 2011 Jun 1; 12: 52.

16. Ding L, Gao X, Hu J, Yu S. Epigallocatechin-3-gallate attenuates anesthesia-induced memory deficit in young mice via modulation of nitric oxide expression. *Mol Med Rep.* 2018; 18(6): 4813-20.
17. Zhang CZ, Dong L, Mu FH, Yang XH, Sun W. Progress in the studies on neuronal nitric oxide synthase inhibitors. *Yao Xue Xue Bao.* 2014 Jun; 49(6): 781-8.
18. Nan W, Zhonghang X, Keyan C, Tongtong L, Wanshu G, Zhongxin X. Epigallocatechin-3-Gallate Reduces Neuronal Apoptosis in Rats after Middle Cerebral Artery Occlusion Injury via PI3K/AKT/eNOS Signaling Pathway. *Biomed Res Int.* 2018 Mar 25; 2018: 6473580.
19. Vasconcelos AR, Dos Santos NB, Scavone C, Munhoz CD. Nrf2/ARE Pathway Modulation by Dietary Energy Regulation in Neurological Disorders. *Front Pharmacol.* 2019; 10: 33.
20. Paladino S, Conte A, Caggiano R, Pierantoni GM, Faraonio R. Nrf2 Pathway in Age-Related Neurological Disorders: Insights into MicroRNAs. *Cell Physiol Biochem.* 2018; 47(5): 1951-76.
21. Robledinos-Antón N, Fernández-Ginés R, Manda G, Cuadrado A. Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development. *Oxid Med Cell Longev.* 2019 Jul 14; 2019: 9372182.
22. Pålsson-McDermott EM, O'Neill LAJ. Targeting immunometabolism as an anti-inflammatory strategy. *Cell Res.* 2020; 30(4): 300-14.
23. Kanlaya R, Khamchun S, Kapincharanon C, Thongboonkerd V. Protective effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) via Nrf2 pathway against oxalate-induced epithelial mesenchymal transition (EMT) of renal tubular cells. *Sci Rep.* 2016 Jul 25; 6:30233.
24. Park DJ, Kang JB, Koh PO. Epigallocatechin gallate (EGCG) alleviates neuronal cell damage against focal cerebral ischemia in rats. *J Vet Med Sci.* 2020 Mar 30. doi: 10.1292/jvms.19-0703

УДК 617.51-089:616.82:599.323.4

ВЛИЯНИЕ ИНДУКТОРОВ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NRF2 НА РАЗВИТИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНО-НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА В ТКАНИ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ПОСЛЕ МОДЕЛИРОВАНИЯ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМЫ

Явтушенко И. В., Костенко В. А.

Резюме. Исследовано влияние индукторов активации сигнальной системы Nrf2 – антиоксидант-респонсивный элемент (ARE) на показатели развития окислительно-нитрозативного стресса в ткани больших полушарий головного мозга крыс после воспроизведения черепно-мозговой травмы. Опыты были проведены на 28 белых крысах-самцах линии Вистар массой 180-220 г, разделенных на 4 группы по 7 животных: 1-я (ложнотравмированные животные) – после выполнения таких же манипуляций (проведение эфирного наркоза, фиксация), что и в экспериментальных сериях, за исключением нанесения ЧМТ; 2-я – после моделирования экспериментальной ЧМТ, 3-я и 4-я – животным после воспроизведения ЧМТ в течение 7-суток внутрибрюшинно вводили индукторы системы Nrf2-ARE: диметилфумарат (DMF) в дозе 15 мг/кг в 10% растворе диметилсульфоксида и эпигаллокатехин-3-галлат (EGCG) в дозе 1 мг/кг соответственно.

При применении DMF в условиях эксперимента в гомогенате больших полушарий головного мозга достоверно снижалась продукция супероксидного анион-радикала ($\cdot\text{O}_2^-$) NADPH- и NADH-зависимыми электронно-транспортными цепями и NADPH-оксидазой лейкоцитов, активность NO-синтазы (NOS, общей и ее индуцибельной изоформ), содержание пероксинитрита, концентрация вторичных продуктов пероксидного окисления липидов (ТБК-активных соединений) и их прирост за время инкубации в прооксидантном железоаскорбатном буферном растворе по сравнению с данными 2-й группы. При этом увеличивалась активность конститутивной изоформы NOS и индекс ее сопряжения, активность супероксид-дисмутазы и каталазы.

При введении EGCG после моделирования черепно-мозговой травмы уменьшалась выработка $\cdot\text{O}_2^-$ NADPH- и NADH зависимыми электронно-транспортными цепями и NADPH-оксидазой лейкоцитов, активность NOS (общая, индуцибельной и конститутивной изоформ), содержание пероксинитрита, концентрация ТБК-активных соединений и их прирост за время инкубации в прооксидантном буферном растворе при увеличении активности супероксиддисмутазы и каталазы.

Сделан вывод, что применение электрофильных индукторов системы Nrf2 - ARE (DMF и EGCG) существенно ограничивает в тканях больших полушарий головного мозга крыс на 7 сутки после моделирования черепно-мозговой травмы средней степени тяжести признаки окислительно-нитрозативного стресса: уменьшает выработку активных форм кислорода и азота, снижает пероксидное окисление липидов, повышает антиоксидантный потенциал.

Ключевые слова: транскрипционный фактор Nrf2, диметилфумарат, эпигаллокатехин-3-галлат, черепно-мозговая травма, окислительно-нитрозативный стресс, головной мозг.

UDC 617.51-089:616.82:599.323.4

**Influence of Nrf2 Transcription Factor Inducers
on the Development of Oxidative-Nitrosative Stress
in the Tissue of Cerebral Hemispheres in Rats after Modeled Traumatic Brain Injury
Yavtushenko I. V., Kostenko V. O.**

Abstract. *The purpose of the study was to investigate the effects produced by inducers of the Nrf2 - antioxidant-responsive element (ARE) signaling system on the indices of oxidative-nitrosative stress development in cerebral hemispheres of rats following experimental traumatic brain injury.*

Material and methods. The study included 28 Wistar white male rats weighing 180-220 g, divided into 4 groups of 7 animals each: the 1st group included pseudo-injured animals subjected to the same manipulations (ether anesthesia, fixation) as the animals in the experimental groups, except for traumatic brain injury modeling; the 2nd group included the animals exposed to modeled traumatic brain injury, the 3rd and 4th groups involved the rats who received Nrf2-ARE system inductors intraperitoneally: dimethyl fumarate (DMF) in 10% dimethyl sulfoxide solution in a dose of 15 mg/kg and epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in a dose of 1 mg/kg, for 7 days following the traumatic brain injury modeling.

Results and discussion. Analysis of cerebral tissue homogenates demonstrated that, when applying DMF, the production of superoxide anion radical (O_2^-) by NADPH and NADH-dependent electron transport chains and leukocyte NADPH-oxidase significantly decreases; the activity of NO synthase (NOS, total and its inducible isoforms) reduces, peroxynitrite content, concentration of secondary products of lipid peroxidation (TBA-active compounds) and their increase during incubation in a pro-oxidant iron-ascorbate buffer solution go down compared to the findings in the 2nd group. At the same time, the activity of the NOS constitutive isoform and NOS coupling index, as well as the activity of superoxide dismutase and catalase increase.

The administration of EGCG following the traumatic brain injury modeling resulted in the decrease in production of O_2^- by NADPH and NADH dependent electron transport chains and by leukocyte NADPH oxidase, NOS activity (total, inducible and constitutive isoforms), peroxynitrite content, concentration of TBA-active compounds and their increase during incubation in pro-oxidant buffer solution with growing activity of superoxide dismutase and catalase.

Conclusion. The study showed that the use of electrophilic inductors of the Nrf2 - ARE system (DMF and EGCG) significantly alleviated the signs of oxidative-nitrosative stress in the cerebral tissue of rats on the 7th day after the modeling of moderate traumatic brain injury: it reduced the production of reactive oxygen and nitrogen species, reduced peroxide lipid oxidation, and increased antioxidant potential.

Keywords: transcription factor Nrf2, dimethyl fumarate, epigallocatechin-3-gallate, traumatic brain injury, oxidative-nitrosative stress, brain.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 29.04.2020 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування