УДК 616. 092.18

Активація сиртуїну 1 – перспективна стратегія зменшення пошкодження ДНК клітин фолікулярного оточення ооцитів мишей

В.С. Срібна[1], О.Т. Блашків[1], Ю.В. Перепелиця[2], Т.Ю. Вознесенська[1]

[1]Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;
[2]Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ; e-mail: voz@biph.kiev.ua

Актуальними є дослідження, спрямовані на розуміння механізмів репарації ДНК, що відбувається в уражених і в нормальних клітинах. Мета нашої роботи – дослідити як активація сиртуїну 1 змінює розподіл одноніткових розривів ДНК клітин фолікулярного оточення ооцитів мишей. Використано лужний метод ДНК-комет, суть якого полягає в тому, що при електрофорезі лізованих клітин в агарозному гелі петлі і фрагменти пошкодженої ДНК витягуються в електричному полі в напрямку до анода, що надає їм вигляд комет. Розміри хвоста ДНК-комети позитивно корелюють зі ступенем ушкодження ДНК (класи пошкодження ядер від 0 до 4). Було показано, що за умов оксидативного стресу кількість ядер 3-го та 4-го класів збільшується відповідно у 2,6 і 7,8 раза, а 0/1-го та 2-го зменшується у 18,6 і 2,3 раза відповідно порівняно з контрольними клітинами; таким чином відбувається перерозподіл одноніткових розривів ДНК фолікулярних клітин. Встановлено, що ресвератрол (активатор сиртуїну 1) сприяє репарації розривів ДНК: збільшується кількість клітин з ядрами 0/1-го класу та зменшується з ядрами 3-го і 4-го класів. Отримані результати дають підстави стверджувати, що активація сиртуїну 1 – перспективна стратегія зменшення пошкодження ДНК клітин фолікулярного оточення ооцитів.
Ключові слова: клітини фолікулярного оточення ооцитів; одноніткові розриви ДНК; окисний стрес; сиртуїн 1.

ВСТУП

Пошкодження ДНК клітин пов›язане з етіологією багатьох типів розладів і різних захворювань у людини. ДНК-діагностика вже має широкий спектр застосувань. Все частіше оцінка його пошкодження відіграє вирішальну роль для прийняття діагностичних заключень та терапевтичних рішень для конкретного пацієнта [1]. Значна частина сучасних досліджень ДНК присвячена виясненню механізмів та біологічних наслідків їх пошкоджень [2]. Актуальними є експерименти, спрямовані на оцінку та розуміння механізмів репарації ДНК, що відбувається як в уражених, так і в нормальних клітинах. Відомо декілька методів кометного аналізу ДНК [3]. Полі(АДФ-рибоза) полімераза (ПАРП) – це НАД$^+$-залежні ферменти, які були ідентифіковані як білки репарації ДНК. ПАРП-1 – фермент із родини білків ПАРП, який здатен взаємодіяти з різноманітними пошкодженими структурами ДНК. За наявності одноніткового розриву ДНК фермент ПАРП-1 активується [4]. Сиртуїни (1-7) – НАД$^+$-залежні деацетилазні ферменти [5], що беруть участь у тих самих біологічних процесах, що й ПАРП. Виникло питання, чи можуть ферменти ПАРП та сиртуїни взаємодіяти один з одним за фізіологічних та патофізіологічних умов [4, 6].

Метою нашої роботи було дослідити розподіл одноніткових розривів ДНК ядер клітин фолікулярного оточення ооцитів (ФОО) при активації сиртуїну 1 **за** умов окисного стресу *in vitro*.

© Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, 2026

МЕТОДИКА

Досліди проводили з використанням статевозрілих самиць мишей лінії СВА (масою 18–22 г) з дотриманням вимог Міжнародної Європейської конвенції (Страсбург, 1986), директиви Європейського Парламенту та Ради 2010/63/ EU про захист тварин, які використовуються в наукових цілях (від 22 вересня 2010 р.), та схвалені Комітетом з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України (протокол № 3/26 від 08.04.2026 р.).

Клітини ФОО виділяли з фолікулів яєчників мишей та культивували протягом 4 год при 37°С в окремих камерах з 400 мкл культурального середовища (DME – модифіковане середовище Дульбекко). Після виділення проводили їх морфологічну оцінку рутинним методом виключення барвника – трипанового синього. Живі та мертві клітини підраховували в камері Горяєва. Встановлено середню кількість 15,6% неживих і 81,6% живих клітин ФОО. Окисний стрес моделювали з використанням H_2O_2. Показано зменшення кількості живих клітин ФОО за умов як збільшення концентрації H_2O_2, так і тривалості інкубування. Для всіх подальших дослідів використовували H_2O_2 у середовищі культивування (250 ммоль/л, 5 хв при 37°С). Згідно з методикою за позитивний контроль використовували клітини ФОО, які після терміну культивування (4 год) піддавали впливу H_2O_2. Негативний контроль – культивовані клітини ФОО протягом 4 год. У дослідах використовували вплив активатора сиртуїну 1 – ресвератрол (2,0 мкмоль/л); блокатора ПАРП-1-4-гідроксиквіназолін (1,0 ммоль/л); **субстрату** NO-синтезу (NOS) – L-аргініну гідрохлорид (0,04 ммоль/л) і специфічного блокатора індуцибельної NOS (iNOS) – аміногуанідин (0,02 ммоль/л).

Для виявлення одноніткових розривів ДНК ядер клітин ФОО застосовували метод лужного гель-електрофорезу ізольованих клітин (метод ДНК-комет – «DNA-comet assay»). Електрофорез препаратів проводили за допомогою приладу Multiphor II («LKB», Швеція) при напрузі 24 В та силі струму 100 мА протягом 30 хв. ДНК-кометb на електрофореграмах, забарвлених Хехст 33342 (700 мкмоль/л) протягом 15 хв, аналізували візуально, використовуючи люмінесцентний мікроскоп ЛЮМАМ при застосуванні водноімерсійного об'єктиву (збільшення у 30 разів). На кожному мікропрепараті вивчали від 100 до 400 окремо розташованих ДНК-комет. За співвідношенням ДНК у – голові та – у хвості комети поділяли на класи (0/1, 2, 3, 4) [7, 8].

Результати обробляли статистично в програмі Graph Pad Prism (version 5.00 for Windows; «GraphPad Software» США). Після перевірки на нормальність їх розподілу використовували однофакторний - аналіз ANOVA з подальшим порівнянням середніх значень між групами тестом Ньюмена-Кейлса. Результати виражали як $M \pm SD$, $P < 0,05$ вважали статистично вірогідним.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати про вплив ресвератролу, 4-гідроксиквіназоліну, L-аргініну гідрохлориду і аміногуанідину на розподіл одноніткових розривів ДНК ядер клітин ФОО представлено в таблиці. Встановлено, що за умов впливу H_2O_2 відбувається перерозподіл одноніткових розривів ДНК ядер фолікулярних клітин: збільшення в 2,61 і 7,84 раза порівняно зі значенням у контролі (негативний контроль) клітин з ядрами 3- і 4-го класу відповідно; і зменшення у 18,62 і 2,31 раза з ядрами 0/1-го і 2-го класу. Отже, при окисному стресі посилюється пошкодження ДНК клітин ФОО на що вказує перерозподіл одноніткових розривів.

Встановлено, що як L-аргініну гідрохлорид, так і ресвератрол не впливають на розподіл одноніткових розривів ДНК ядер клітин ФОО. Так, частка ядер 0/1, 2, 3, 4-го класів знаходиться в межах негативного

контролю. За умов впливу 4-гідроксиквіназоліну збільшується пошкодження ДНК клітин ФОО: частки ядер 3-го і 4-го класів зростають у 1,85 і 6,42 раза відповідно, а 0/1-го класу зменшується у 3,67 раза. При дії аміногуанідину також збільшується пошкодження ДНК ядер фолікулярних клітин: частки ядер 3-го і 4-го класів зростають у 1,77 і 5,76 раза відповідно, а 0/1-го класу зменшується у 2,94 раза. Сумісний вплив 4-гідроксиквіназоліну та аміногуанідину збільшує пошкодження ДНК клітин: частки ядер 3-го і 4-го класів зростають у 1,92 і 5,48 раза відповідно, а 0/1-го класу зменшується у 3,54 раза. Отримані результати про перерозподіл одноніткових розривів ДНК ядер клітин ФОО дають підстави стверджувати, що для 4-гідроксиквіназоліну та аміногуанідину (як разом, так і окремо) є пошкоджуючою і може частково відображати зміни, характерні для оксидативно-нітрозативного стресу клітин ФОО. У разі впливу як L-аргініну гідрохлориду, так і ресвератролу не встановлено змін у розподілі одноніткових розривів ДНК ядер клітин ФОО. Також показано їх перерозподіл при сумісної дії L-аргініну гідрохлориду та 4-гідроксиквіназоліну: пригнічується пошкодження ДНК клітин ФОО – частка ядер 4-го класу зменшується у 4,03 раза, а 0/1-го та 2-го класу збільшується у 2,59 і 1,67 раза відповідно порівняно з такими величинами за умов впливу 4-гідроксиквіназоліну. У разі сумісної дії 4-гідроксиквіназоліну та ресвератролу зменшується пошкодження ДНК клітин ФОО: частки ядер 3-го і 4-го класів зменшуються у 1,44 і 3,09 раза відповідно, а 0/1-го та 2-го класу збільшуються у 2,85 і 1,42 раза відповідно порівняно зі впливом 4-гідроксиквіназоліну. Показано зменшення

Розподіл одноніткових розривів ДНК клітин фолікулярного оточення ооцитів (M ± m; n = 4)

Клітини фолікулярного оточення ооцитів	Розподіл комет за класами, %			
	0/1	2	3	4
Негативний контроль	53,63±2,20	26,00±1,51	14,13±1,13	6,25±2,05
Позитивний контроль	2,88±1,25*	11,25±1,67*	36,88±1,81*	49,00±2,62*
4-Гідроксиквіназолін	14,63±2,33*	19,13±1,55	26,13±1,25*	40,13±1,64*
Аміногуанідин	18,25±2,81*	20,75±1,49	25,00±1,07*	36,00±1,31*
L-аргінін гідрохлорид	45,13±1,36	24,88±1,13	20,13±1,81	9,88±1,25
Ресвератрол	60,00±1,69	17,88±0,99	17,13±1,46	4,00±1,41
4-Гідроксиквіназолін і аміногуанідину	15,13±3,00*	23,50±1,77	27,13±1,55*	34,25±2,05*
4-Гідроксиквіназолін і L-аргініну гідрохлорид	37,88±2,95*,**,***	31,88±1,96**	20,25±1,67	10,00±1,31**
4-Гідроксиквіназолін та ресвератрол	41,75±2,43*,**,***	27,13±1,13**	18,13±1,46**,***	13,00±1,78**,***
4-Гідроксиквіназолін, аміногуанідин і L-аргініну гідрохлорид	19,43±2,71*,***	22,87±1,83	22,47±1,46*	35,23±1,74*,***
4-Гідроксиквіназолін, аміногуанідин і ресвератрол	30,63±1,69*,***	26,38±1,19	27,13±1,25*	15,88±1,25*,***

*P < 0,05 відносно контролю; **P < 0,05 відносно значень при впливі 4-гідроксиквіназоліну; ***P < 0,05 – при впливі аміногуанідину.

пошкодження ДНК ядер клітин ФОО при дії L-аргініну гідрохлориду та 4-гідроксиквіназоліну **й** аміногуанідину: частка ядер 4-го класу зменшується у 3,52 раза, а 0/1-го класу збільшується у 1,95 раза. За умов впливу 4-гідроксиквіназоліну, аміногуанідину та ресвератролу пригнічується пошкодження ДНК фолікулярних клітин: частка ядер 4-го класу зменшується у 2,16 раза, 0/1-го та 2-го класу збільшується у 2,59 і 2,02 раза відповідно.

Таким чином, застосування субстрату NOS, активатора сиртуїну 1 та впливу блокатора ПАРП 1 і блокатора iNOS зумовлювало зміни у розподілі одноніткових розривів ДНК ядер клітин ФОО і зменшення реакції цих клітин на стрес. Водночас розуміння про пошкодження та репарацію ДНК клітин дають підстави стверджувати, що активація сиртуїну 1 це перспективна стратегія зменшення пошкодження ДНК клітин фолікулярного оточення ооцитів.

Опубліковано дані численних досліджень, які демонструють зв'язок між окисним стресом, станом здоров›я і захворюваннями у людей [9–11]. Значний інтерес викликала ідея про участь оксидативно-нітрозативного стресу в етіології багатьох захворювань людини [12]. У наших дослідах за умов впливу блокатора ПАРП 1 і блокатора iNOS спостерігається перерозподіл одноніткових розривів ДНК клітин ФОО у бік збільшення пошкодження, що характерно для оксидативно-нітрозативного стресу цих клітин.

Ресвератрол, відомий антиоксидант, проявляє антивікову, протизапальну, антимікробну та антиканцерогенну активність [13]. Дослідження були проведені в основному з акцентом впливу ресвератролу на жіноче безпліддя [14]. Механізми його дії та потенційні терапевтичні ефекти продовжують активно вивчати. Відомо про дію сиртуїну 1 та 6 у регуляції пошкоджень ДНК і її репарації у людини та миші [15–17]. Є також відомості про те, що сиртуїн 7 відкриває шлях для репарації ДНК [18].

Відомо, що для ініціації репарації слід ремоделювати та вилучати сусідні нуклеосоми. Цей процес може бути спрощено при поєднанні зондування пошкоджень та ремоделюванням нуклеосом. Деякі з цих форм пошкодження ДНК усуваються за допомогою її репарації з порушенням парності [19]. Розриви ланцюга ДНК можуть виникати безпосередньо в результаті хімічних реакцій або опосередковано внаслідок реплікації ДНК на пошкодженій матриці чи зіткнення з транскрипційним механізмом [19]. Так, ПАРП-1 – ядерний фермент, що активується при ушкодженні ДНК, синтезує негативно зарядженні ланцюги полімеру АДФ-рибози із $НАД^+$ та приєднує їх до білків репарації ДНК (гістонів) та транскрипційних факторів [20]. Цей процес здатен безпосередньо модифікувати гістони та індукувати розкручування нуклеосом [21]. Залежно від того в яких формах відбувається пошкодження ДНК, запускаються різні шляхи репарації, тому, ймовірно існує широка варіабельність доступності хроматину в чутливості до пошкоджень ДНК [22, 23]. Також було показано, що сиртуїни зменшують пошкоджуючий вплив окисного стресу на оваріальні клітини [24, 25]. Отримані нами результати дають підстави стверджувати, що сиртуїн 1 бере участь у регуляції репарації одноніткових розривів ДНК клітин ФОО.

ВИСНОВКИ

У роботі отримано нові результати про розподіл одноніткових розривів ДНК ядер клітин ФОО за умов окисного стресу *in vitro* та впливу *активатора сиртуїну* 1, блокатора ПАРП-1 і блокатора iNOS (як разом, так і окремо). Показано, що застосування субстрату NOS і активатора сиртуїну 1 призводить до зменшення пошкоджень викликаних окисним стресом. Отже, наявність сиртуїну 1 та NO, є необхідною умовою для здійснення репарації ДНК

клітин фолікулярного оточення ооцитів, тоді як їх надлишок або дефіцит можуть стати фактором пригнічення репарації при окисному стресі.

Таким чином, можна стверджувати, що активація сіртуїну 1 – це перспективна стратегія зменшення пошкодження ДНК клітин фолікулярного оточення ооцитів.

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 co-authors of the article.

V.O. Sribna, O.T. Blashkiv, Yu.V. Perepelitsa, T.Yu. Voznesenska

SIRTUIN 1 ACTIVATION IS A PROMISING STRATEGY FOR REDUCING DNA DAMAGE IN MOUSE OOCYTES FOLLICULAR CELLS

[1] Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;
[2] Bogomolets National Medical University, Kyiv;
e-mail: voz@biph.kiev.ua

Research aimed at understanding DNA repair mechanisms in both damaged and normal cells remains highly relevant. The aim of this study was to investigate how activation of sirtuin 1 affects the distribution of DNA single-strand breaks in mouse oocyte follicular cells. The alkaline comet assay was used, in which, during electrophoresis of lysed cells embedded in agarose gel, loops and fragments of damaged DNA migrate toward the anode, producing a characteristic comet-like appearance. The length of the comet tail positively correlates with the extent of DNA damage (nuclei were classified into damage classes 0-4). Under conditions of oxidative stress, the proportions of class 3 and class 4 nuclei increased by 2.6-fold and 7.8-fold, respectively, whereas the proportions of class 0/1 and class 2 nuclei decreased by 18.6-fold and 2.3-fold, respectively, compared with control cells. These findings indicate a redistribution of DNA single-strand breaks in follicular cells under oxidative stress. Resveratrol, a sirtuin 1 activator, was found to promote DNA repair, as evidenced by an increase in the proportion of cells with class 0/1 nuclei and a decrease in the proportion of cells with class 3 and class 4 nuclei. The obtained results provide evidence that sirtuin 1 activation represents a promising strategy for reducing DNA damage in mouse oocyte follicular cells.

Key words: oocyte follicular cells; DNA single-strand breaks; oxidative stress; sirtuin 1.

REFERENCES

1. Atha D, Reipa V. Standards for quantitative measurement of DNA damage in mammalian cells. Int J Mol Sci. 2023; 12; 24(6): 5427. doi: 10.3390/ijms24065427.
2. Nelson B, Dizdaroglu M. Implications of DNA damage and DNA repair on human diseases. Mutagenesis. 2020; 13; 35(1): 1-3. doi: 10.1093/mutage/gez048.
3. Li W, Sancar A. Methodologies for detecting environmentally-induced DNA damage and repair. Environ Mol Mutagen. 2020; 61: 664-79. doi: 10.1002/em.22365.
4. Pollard Ch-L, Gibb Z, Swegen A, Grupen ChG. NAD^+, sirtuins and PARPs: enhancing oocyte developmental competence. J Reprod Dev. 2022; 19; 68(6): 345-54. doi: 10.1262/jrd.2022-052.
5. Stupchuk MS, Voznesenskaja TYu. Biological effects and properties of eukaryotic sirtuins. Fiziol Zh. 2017; 63(4): 105-13. [Ukrainian]. doi:org/10.15407/fz63.04.105.
6. Canto C, Sauve A, Bai P. Crosstalk between poly(ADP-ribose) polymerase and sirtuin enzymes. Mol Aspect Med. 2013; 34(6): 1168-201. doi: 10.1016/j.mam.2013.01.004.
7. Collins A. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. Mol Biotechnol. 2004; 26; 3: 249-61. doi: 10.1385/MB:26:3:249.
8. Collins A, El Yamani N, Lorenzo Y, Shaposhnikov S, Brunborg G, Azqueta A. Controlling variation in the comet assay. Front Genet. 2014; 5: 1-6. doi: 10.3389/fgene.2014.0035.
9. Liguori I, Russo G, Curcio F, Bulli G, Aran L, Della-Mort D, et al. Oxidative stress, aging, and diseases. Clin Interv Aging. 2018; 26; 13: 757-72. doi: 10.2147/CIA.S158513.
10. Hajam Y, Rani R, Ganie Sh, Sheikh T, Javaid D, Qadri S, et al. Oxidative stress in human pathology and aging. Mol Mechan Perspect Cell. 2022; 5; 11(3): 552. doi: 10.3390/cells11030552.
11. Velykyi V, Voznesenska T. Types of cell death that occurred due to the influence of active forms of oxygen and damage to DNA. Fiziol Zh. 2023; 69(4): 115-25. [Ukrainian]. doi.org/10.15407/fz69.04.115.
12. Kurutas E. The importance of antioxidants which play the role in cellular response against oxidative/nitrosative stress: current state. Nutr J. 2016; 25; 15(1):71. doi: 10.1186/s12937-016-0186-5.
13. Podgrajsek R, Ban Frangez H, Stimpfel M. Molecular mechanism of resveratrol and its therapeutic potential on female infertility. Int J Mol Sci. 2024; 23; 25(7): 3613. doi: 10.3390/ijms25073613.
14. Morita Y, Wada-Hiraike O, Yano T, Shirane A, Hirano M, Hiraike H, et al. Resveratrol promotes expression of SIRT1 and StAR in rat ovarian granulosa cells: an implicative role of SIRT1 in the ovary. Reprod Biol Endocrinol. 2012;10:14. doi: 10.1186/1477-7827-10-14.
15. Grzeczka A, Kordowitzki P. Resveratrol and SIRT1: Antiaging cornerstones for oocytes? Nutrients. 2022; 14; 23: 5101. doi: 10.3390/nu14235101.
16. Meng F, Qian M, Peng B, Peng L, Wang X, Zheng K, et al. Synergy between SIRT1 and SIRT6 helps recognize

DNA breaks and potentiates the DNA damage response and repair in humans and mice. Life. 2020; 15; 9: e55828. doi: 10.7554/eLife.55828.

17. Ahmed M, Riaz U, Lv H, Yang L. A molecular perspective and role of NAD^+ in ovarian aging. Int J Mol Sci. 2024; 25; 25(9): 4680. doi: 10.3390/ijms25094680.
18. Paredes S,Chua K. SIRT7 clears the way for DNA repair. EMBO J. 2016. 14; 35(14): 1483-85. doi: 10.15252/embj.201694904.
19. Kowalczykowski S. An overview of the molecular mechanisms of recombinational DNA. Repair Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015; 7(11): a016410. doi: 10.1101/cshperspect.a 016410.
20. Makogon NV, Aleksieieva IM. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP): physiological and pathological roles. Fiziol Zh. 2012; 58(3): 95-112. [Ukrainian]. doi.org/10.15407/fz58.03.095.
21. Perez B, Wong K, Schwartz E, Herrera R, King D, García-Nieto P, Morrison A. Genome-wide profiles of UV lesion susceptibility, repair, and mutagenic potential in melanoma. Mutat Res. 2021; 823: 111758. doi:10.1016/j.mrfmmm.2021.111758.
22. Andres S, Schellenberg M, Wallace B, Tumbale P, Williams R. Recognition and repair of chemically heterogeneous structures at DNA ends. Environ Mol Mutagen. 2015; 56(1): 1-21. doi:10.1002/em.21892.
23. Meas R, Wyrick JJ, Smerdon MJ. Nucleosomes regulate base excision repair in chromatin. Mutat Res Rev Mutat Res. 2019; 780: 29-36. doi:10.1016/j.mrrev.2017.10.002.
24. Cai M, Wang J, Sun H, Guo Q, Zhang C, Yao H, Chen Z, Jia Y, Zhu H. Resveratrol attenuates hydrogen peroxide-induced injury of rat ovarian granulosa-lutein cells by resisting oxidative stress *via* the SIRT1/Nrf2/ARE signaling. Pathway. 2023; 29(12): 947-56. doi:10.2174/1381612829666230403133322.
25. Di Emidio G, Falone S, Vitti M, D'Alessandro A, Vento M, Di Pietro C, Amicarelli F, Tatone C. SIRT1 signalling protects mouse oocytes against oxidative stress and is deregulated during aging. Hum Reprod. 2014; 29(9): 2006-17. doi:10.1093/humrep/deu160.

Матеріал надійшов до редакції 09.12.2025