

## ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

© 2019 г. А. Б. Узденский<sup>а</sup>, С. В. Демьяненко<sup>а, \*</sup>

<sup>а</sup>Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии,  
Лаборатория “Молекулярная нейробиология”, 344090, Россия, Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/1

\*e-mail: auzd@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.04.2019 г.

После доработки 02.05.2019 г.

Принята к публикации 02.05.2019 г.

Инсульт — одна из основных причин смерти и инвалидизации людей. Окклюзия мозговых сосудов очень быстро приводит к дефициту кислорода и глюкозы и инфаркту нервной ткани, однако нейропротекторы, защищающие нейроны, пока не найдены. В настоящем обзоре рассмотрены молекулярные факторы распространения повреждения из ишемического ядра на соседние ткани и биохимические процессы, ведущие к смерти клеток в прилегающей зоне (пенумбре). Хотя ишемическое повреждение ведет к подавлению биосинтетических процессов, некоторые белки экспрессируются после ишемии. Эпигенетические процессы — один из механизмов глобальной регуляции транскрипции и синтеза белков, биосинтетических процессов и функционального состояния клеток. В настоящем обзоре описаны основные эпигенетические процессы, которые регулируют экспрессию генов и синтез клеточных белков — метилирование ДНК, метилирование и ацетилирование гистонов. Основное внимание уделено белкам, осуществляющим эпигенетическую регуляцию — ДНК-метилтрансферазам, гистон-ацетилтрансферазам, гистондеацетилазам и их изоформам. Обсуждается роль этих белков в реакциях мозга на ишемическое повреждение. Модуляция белков эпигенетической регуляции может считаться перспективной стратегией для лечения ишемического инсульта. Рассмотрены возможности применения ингибиторов гистондеацетилазы и ДНК-метилтрансферазы в качестве нейропротекторов при ишемическом инсульте.

**Ключевые слова:** ишемический инсульт, эпигенетические процессы, метилирование ДНК, ацетилирование гистонов, гистондеацетилаза, ингибиторы гистондеацетилазы

**DOI:** 10.1134/S0233475519050098

### ИШЕМИЧЕСКИЙ ИНСУЛЬТ

Инсульт — одна из основных причин смерти и инвалидизации людей. Более 17 млн человек во всем мире ежегодно страдают от инсульта, из них более 500 тыс. в России. По сообщению Министерства здравоохранения Российской Федерации, среди причин смертности в России в 2015 г. инсульт (28%) опередил инфаркт миокарда (20%) или рак (14%) [1]. Ишемический инсульт составляет 70–80% всех инсультов. Около трети пациентов умирают сразу, а еще 10–15% в течение года. У 80% выживших после инсульта остаются различные неврологические нарушения. Из них около 20–30% пациентов нуждаются в постоянном уходе, что создает колоссальную физическую, материальную и моральную нагрузку на родственников и близких людей, а также на общество [2, 3].

Ишемический инсульт, вызванный окклюзией мозговых артерий, за считанные минуты приводит к нарушению кровоснабжения, дефициту кислорода и глюкозы, некрозу и инфаркту нерв-

ной ткани. Защитить нервные клетки в ишемическом ядре невозможно. Но повреждение распространяется из ядра инфаркта на окружающие ткани. Область поражения мозга расширяется, что приводит к более существенным нарушениям. В переходной зоне (ишемической пенумбре) смерть клеток развивается медленней, в течение нескольких часов. Это “терапевтическое окно” (обычно 2–6 ч) дает время для спасения нервных клеток, ограничения зоны повреждения и снижения неврологических последствий [2–6].

В настоящее время разрабатываются два основных пути ограничения повреждений ткани ишемической пенумбры — тромболизис и нейропротекция, направленная на сохранение нервных клеток. В отличие от тромболитиков первого поколения (стрептокиназа, урокиназа), тканевый активатор плазминогена (tPA) селективно разрушает фибриновые волокна путем активации образования плазмина из связанного с тромбом плазминогена. Недавно tPA получил разрешение FDA (Food and Drug Administration) на применение в США. У нас этот препарат распространяет-

ся под названием актилизе (альтеплаза). На основе tPA получен усовершенствованный препарат – метализе (тенектеплаза). Но эти препараты эффективны только в первые 4–4.5 ч после инсульта и даже в США только 5% пациентов успевают получить это лечение. Кроме того, эти препараты повышают вероятность кровотечения и перехода ишемического инсульта в геморрагический. К тому же реперфузия, возникающая при растворении тромба, стимулирует окислительный стресс и дополнительное повреждение нервной ткани.

Другое направление – нейропротекция. Испытаны тысячи потенциальных лекарственных препаратов, нацеленных на первичные механизмы повреждения нервных клеток, включая блокаторы кальциевых каналов и глутаматных рецепторов, антиоксиданты, ингибиторы апоптоза и т.д. Но пока не найден нейропротектор для скоропомощного лечения людей, который с доказанной эффективностью мог бы в первые часы после инсульта защитить нейроны пенумбры и ограничить распространение патологического процесса. Многие из этих веществ защищали нервные клетки в культуре или мозг лабораторных животных в опытах *in vitro* и *in vivo*. Но в клинических испытаниях на человеке они либо были неэффективны, либо вызывали неприемлемые побочные эффекты [7–15]. Для поиска эффективных нейропротекторов необходимо глубокое и всестороннее изучение молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропротекции.

### ПАТОБИОХИМИЯ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

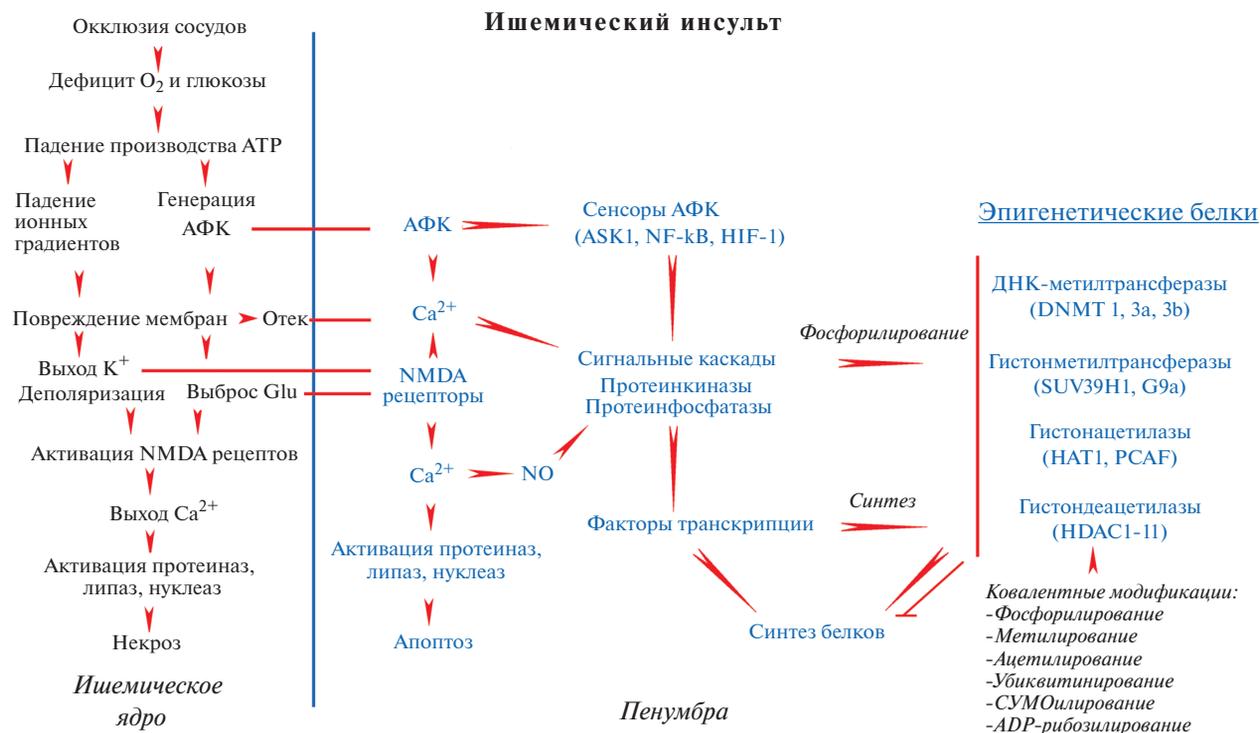
Патологические процессы в ишемическом ядре включают ряд взаимосвязанных компонентов. Закупорка сосудов быстро прекращает доставку глюкозы и кислорода к клеткам мозга. Это приводит к ингибированию окислительного фосфорилирования и снижению синтеза АТФ. Последующая активация анаэробного гликолиза вызывает накопление молочной кислоты и тканевый ацидоз. Ингибирование  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ - и  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-аз приводит к падению ионных градиентов. В клетки входят ионы  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Cl}^-$ ; при этом из них выходят ионы  $\text{K}^+$  и развивается калиевая деполяризация соседних клеток. Нарушение целостности мембран вызывает отек и набухание внутриклеточных органелл (цитотоксический отек), а нарушение проницаемости сосудистых стенок – отек сосудов (вазогенный отек) [2, 12, 16–18]. Массивное высвобождение глутамата из поврежденных нейронов и деполяризация активируют глутаматные NMDA-рецепторы в соседних клетках, через которые в них проникает большое количество  $\text{Ca}^{2+}$ , активирующего гидролитические ферменты, такие как нуклеазы, липазы и протеиназы,

включая кальпаины и катепсины, разрушающие клетки (рис. 1). Предполагается, что NMDA-рецепторы играют ведущую роль в эксайтотоксичности и патологии инсульта [19, 20].  $\text{Ca}^{2+}$  также выделяется в цитозоль из внутриклеточных депо – митохондрий и эндоплазматического ретикулума [21]. Нарушение электронного транспорта в митохондриях приводит к утечке электронов из электронно-транспортной цепи и переносу их на кислород с образованием супероксид-аниона ( $\text{O}_2^-$ ) и последующей генерации пероксида водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), гидроксил-радикала ( $\text{OH}^\bullet$ ) и других активных форм кислорода (АФК), а также свободных радикалов, которые участвуют в патогенезе ишемического инсульта [10, 22, 23].  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемая нейрональная NO-синтаза продуцирует оксид азота NO, который взаимодействует с супероксид-анионом с образованием мощного окислителя пероксинитрита ( $\text{ONOO}^-$ ) [24]. Окислительный и нитрозильный стресс включают перекисное окисление липидов, инактивацию белков, повреждение мембран, дисфункцию органелл и даже повреждение ДНК [10].

### РАСПРОСТРАНЕНИЕ ПАТОГЕННЫХ ФАКТОРОВ И ФОРМИРОВАНИЕ ПЕНУМБРЫ

Патогенные факторы, которые распространяются из некротического ядра и формируют ишемическую пенумбру, включают глутамат,  $\text{K}^+$ , АФК, ацидоз и отек. Высвобождающийся  $\text{K}^+$  деполяризует соседние клетки. Деполяризация способствует активации глутаматом NMDA-рецепторов в соседних нейронах, через которые в клетки входит большое количество ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Они активируют протеолитические ферменты, осуществляющие некротическое или апоптотическое разрушение клеток. Цитозольный  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает дисфункцию митохондрий со снижением выработки АТФ и развитием окислительного стресса. При этом из митохондрий высвобождаются депонированный  $\text{Ca}^{2+}$  и проапоптотические белки, такие как цитохром c, SMAC/DIABLO, AIF и т.д.  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемые протеазы кальпаин и катепсины способствуют нейродегенерации [25]. Это усиливает начальное ишемическое повреждение и способствует распространению патогенных процессов и образованию пенумбры [26].

Первичные патогенные сигналы инициируют разнообразные сигнальные пути в клетках ишемической пенумбры, которые определяют выживание или смерть клеток.  $\text{Ca}^{2+}$ - и АФК-опосредованные сигнальные пути стимулируют разные факторы транскрипции, в частности такие, как NF- $\kappa$ B, AP-1 и др., которые регулируют экспрессию белков, участвующих в выживании или гибели клеток [10] (рис. 1). Из трех MAP-киназ ERK



**Рис. 1.** Основные процессы, ведущие к некрозу нервной ткани в ишемическом ядре, распространению повреждения на окружающие ткани и формированию пенумбры, а также сигнальные и эпигенетические процессы в пенумбре.

регулирует выживание клеток, а JNK и p38 обычно стимулируют апоптоз при действии факторов стресса [27, 28].

NO, диффундирующий на большое расстояние, может оказывать двойное действие на окружающие ткани. На начальной стадии ишемии NO, продуцируемый эндотелиальной NO-синтазой (eNOS), способствует расширению сосудов, что поддерживает кровоснабжение и играет защитную роль. Но затем  $Ca^{2+}$  активирует нейронную NO-синтазу (nNOS) в ишемических клетках. Позднее фактор транскрипции NF- $\kappa$ B стимулирует синтез индуцибельной NO-синтазы (iNOS), которая еще эффективнее генерирует NO [24].

### ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКОВ, РЕГУЛИРУЮЩИХ АПОПТОЗ, В ИШЕМИЧЕСКОЙ ПЕНУМБРЕ

Ответ клетки на острое повреждение изначально осуществляется белками, присутствующими в клетке. Но при сильном воздействии они могут не справиться с первичным повреждением, и тогда синтезируются дополнительные белки. В коре мозга крысы сверхэкспрессия каспаз 1, 3, 6, 8 и 9 и появление цитохрома c в цитоплазме нейронов наблюдались в ядре инфаркта уже через 0.5–1 ч после МСАО. В ишемической пенумбре экспрессия каспазы 3 и высвобождение цитохрома c в нейронах отмечалось позже, через 3–4 ч, а в

астроцитах – через 12–24 ч [29–31]. Другие митохондриальные проапоптотические белки – AIF, Smac/DIABLO и HtrA2/Omi – сверхэкспрессировались в пенумбре через 4–12 ч после МСАО [30, 32, 33]. Повышение экспрессии каспаз 3, 6, 7 и Smac/DIABLO в пенумбре отмечено через 1–4 ч после фототромботического инсульта в коре мозга крысы [34, 35]. В первые часы после ишемического инсульта в коре мозга грызунов в пенумбре повышалась экспрессия ряда сигнальных белков: c-Fos, c-Jun, Jun B, I $\kappa$ B $\alpha$  и STAT3 [37, 38] и отмечено фосфорилирование сигнальных белков и факторов транскрипции, таких как ERK1/2, MEK3/6, JNK, p38, c-Jun, c-Myc, ATF, CREB, STAT-1, которые затем активируют разные сигнальные и метаболические процессы [38, 39].

Недавнее протеомное исследование с использованием микрочипов выявило повышение экспрессии нескольких десятков сигнальных и нейронных белков в пенумбре через 1–24 ч после фототромботического инсульта в коре головного мозга крысы [34, 35, 40]. Фототромботический инсульт – простая и воспроизводимая модель ишемического инсульта. Для его реализации животному вводят фотосенсибилизатор бенгальский розовый, который в силу своей гидрофильности не преодолевает клеточные мембраны и не проникает в клетки. Он остается в сосудистом русле, а при лазерном облучении интенсивно ге-

нерирует высокоактивный окислитель синглетный кислород. Это вызывает окислительные повреждения мембран сосудистого эндотелия, агрегацию тромбоцитов и закупорку мелких сосудов в зоне облучения [41].

Существенным результатом фототромботического инсульта была одновременная экспрессия в пенумбре белков, которые инициируют, опосредуют или регулируют апоптоз. Это (1) белки, которые выполняют апоптотическую программу: каспазы 3, 6 и 7; SMAC/DIABLO и AIF; (2) сигнальные белки, которые инициируют или регулируют различные проапоптотические пути: Bcl-10, MAP киназы p38 и JNK, DYRK1A; (3) факторы транскрипции, которые контролируют экспрессию апоптотических белков: E2F1, p53, с-Мус и GADD153; (4) разнообразные многофункциональные белки, которые в дополнение к другим функциям, в некоторых ситуациях стимулируют апоптоз: белок Par4, глутаматный рецептор NMDAR2a, рецептор нейротрофинов p75 и глутаматдекарбоксилаза GAD65/67. Одновременно в пенумбре экспрессировались некоторые противоапоптотические белки: Bcl-x, антагонисты p53 MDM2, p21/WAF-1 и p63, протеинкиназа B $\alpha$  (Akt), ERK1, ERK5, протеинфосфатазы 1 $\alpha$  и MKP-1, кальмодулин и кальмодулинзависимые киназы II и IV, рецепторы эстрогена и EGF [34, 35].

Пока не известно, какие сигнальные пути и факторы транскрипции инициируют и контролируют экспрессию этих белков в ишемической пенумбре, но можно подозревать некоторые из них. Некоторые белки, экспрессирующиеся в пенумбре, являются глобальными регуляторами транскрипции. Так, фактор транскрипции с-Мус, действуя как активатор, а иногда как репрессор, регулирует экспрессию 10–15% всех генов, включая гены, кодирующие белки, регулирующие энергетический обмен, синтез белка, онкогенез, клеточный цикл и апоптоз. Он функционирует как на транскрипционном, так и на эпигенетическом уровнях. В частности, с-Мус стимулирует экспрессию проапоптотических белков p53 и E2F1 [42–44]. Белок p53 регулирует транскрипцию сотен, а может и тысяч генов-мишеней, участвующих в регуляции метаболизма, трансляции мРНК, репарации ДНК, в остановке клеточного цикла, аутофагии и апоптозе [45]. К ключевым игрокам, определяющим судьбу клетки, также можно отнести фактор транскрипции E2F1, который контролирует экспрессию генов, которые регулируют клеточный цикл, синтез и репарацию ДНК, и апоптоз при нарушениях клеточного цикла. Он индуцирует экспрессию таких проапоптотических белков, как каспазы 3, 7, 8 и 9, SMAC/DIABLO, Araf-1, белки семейства Bcl-2, p53 и p73 [46, 47].

## ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

В отличие от специфических сигнальных путей, эпигенетические процессы осуществляют глобальную регуляцию экспрессии генов и синтеза клеточных белков. Они включают метилирование и деметилирование ДНК, ковалентные модификации гистонов (ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, сумоилирование, убиквитинирование и ADP-рибозилирование), а также регуляцию экспрессии генов с помощью микроРНК [48–50]. Регулируя транскрипцию, модуляторы эпигенетических белков могут оказывать положительное влияние на важнейшие клеточные процессы. В последнее время растет понимание важной роли эпигенетических процессов в реакциях мозга на ишемическое повреждение и в восстановлении после инсульта. Ишемия приводит к значительным изменениям в экспрессии генов, в основном, к репрессии транскрипции в результате повышенного метилирования ДНК и деацетилирования гистонов, но также стимулирует экспрессию ряда белков. На клеточных культурах и экспериментальных животных получены данные о нейропротекторном потенциале некоторых модуляторов эпигенетических белков при ишемии, таких как вальпроат или фенилбутират натрия.

В настоящем обзоре мы кратко опишем роль процессов метилирования ДНК в повреждении мозга после ишемического инсульта и сосредоточимся на ферментах, регулирующих ацетилирование гистонов. Также рассмотрим эффекты эпигенетических модуляторов и перспективы их применения при инсульте.

### *Метилирование ДНК*

Метилирование ДНК заключается в присоединении метильной группы к цитозину в динуклеотиде CpG, в котором цитозин и гуанин связаны фосфатной группой (5' CpG3'). У млекопитающих метилированы 60–70% всех CpG-динуклеотидов. Но в регуляторных областях многих генов человека и животных присутствуют неметилированные CpG-динуклеотиды, сгруппированные в CpG-островки. Это участки ДНК, состоящие примерно из 1000 п.н. с повышенным содержанием неметилированных CpG. Примерно половина генов человека содержит CpG-островки в промоторах. Обычно это промоторы генов домашнего хозяйства, экспрессирующихся во всех тканях, а в промоторах тканеспецифических генов CpG-островки не метилированы только в тех тканях, где этот ген экспрессируется. Их метилирование обычно подавляет синтез тех или иных белков. У млекопитающих паттерны метилирования устанавливаются в ходе эмбрионального развития и поддерживаются при делении клеток, а их наследование делает эпигенетическую маркировку ста-

бильной в ряду многих клеточных делений, т.е. может рассматриваться как одна из форм клеточной памяти.

У человека метилирование ДНК осуществляется ДНК-метилтрансферазами DNMT1, DNMT3a и DNMT3b. Из них DNMT3a и DNMT3b формируют *de novo* паттерн метилирования ДНК на ранних стадиях развития и в ходе дифференцировки клеток. DNMT1 поддерживает метилированное состояние ДНК. Этот фермент присоединяет метильные группы к цитозинам одной из цепей ДНК там, где комплементарная цепь уже метилирована [51]. ДНК-метилтрансферазы в большом количестве представлены в мозге млекопитающих [52]

Метилирование цитозинов в промоторах устойчиво подавляет транскрипцию соответствующих генов. Это происходит в результате связывания метилцитозинов в CpG-динуклеотидах с метилцитозин-связывающими белками семейства MBD (MBD1-4 и MESP2). Например, MESP2 (метил-CpG-связывающий белок 2) содержит два функциональных домена: домен MBD из 85 аминокислотных остатков, связывающийся с метилцитозинами ДНК и домен репрессии транскрипции TRD из 104 остатков, который реагирует с белковым комплексом Sin3a и рекрутирует гистондеацетилазы (HDAC), перестраивающие хроматин так, что он становится недоступным для факторов транскрипции и РНК-полимераз. Окисление метилцитозинов специальными ферментами может приводить к деметилированию цитозина [51]

Церебральная ишемия может резко повысить метилирование ДНК и репрессировать экспрессию генов в нейронах [48–50, 52–54]. Показано, что глобальное гиперметилирование ДНК коррелирует со степенью развития атеросклероза у людей и экспериментальных животных [53, 54]. Но связь ишемического повреждения мозга с метилированием ДНК непростая. Метилирование ДНК зависит от характера воздействия. Так, ишемическое повреждение ДНК вызывало появление локусов повышенного метилирования в хромосомах 2, 12 и 13. Ишемическое прекодиционирование (сравнительно слабая предварительная ишемия) может снижать глобальное метилирование ДНК и приводить к ишемической толерантности, т.е. переносимости более тяжелых ишемических воздействий. Однако при этом очаги повышенного метилирования ДНК наблюдались на хромосомах 1, 7 и 17. Следовательно, при ишемии и выработке толерантности метилирование ДНК по-разному осуществлялось в разных хромосомах. В прекодиционированных клетках частота экзон- и интрон-ассоциированного метилирования возрастала, а частота межгенного метилирования сравнительно снижалась. То есть измене-

ния в метилировании ДНК носят региональный и многофакторный характер [55]. Другое исследование показало, что активация метилирования ДНК, индуцированная метилазоксиметанолом, блокирует нейропротекторные эффекты ишемической толерантности [56]. Эти данные свидетельствуют о том, что пониженное метилирование ДНК обеспечивает нейропротекцию в ишемическом мозге.

Endres и соавт. [52] наблюдали повышение глобального уровня метилирования ДНК в мозге крыс через 30 мин после ишемического инсульта, вызванного окклюзией среднечерепной артерии (МКАО), хотя общая активность DNMT не изменялась. Применение ингибитора DNMT 5-аза-2'-дезоксцитидина (децитабина) защищало мозг мышей от инсульта и улучшало неврологический исход. Мыши, в нейронах которых снижен уровень DNMT1, легче переносили ишемическое повреждение мозга [52]. Замедленная смерть нейронов в области CA1 гиппокампа песчанки через 4 дня после транзиторной (5 мин) церебральной ишемии была связана со снижением экспрессии DNMT1 [57]. На клеточном уровне ингибиторы DNMT 5-азацитидин и децитабин снижали некроз глиальных клеток, вызванный фотодинамическим воздействием, мощным индуктором окислительного стресса [58]. Следовательно, DNMT1 участвует в ишемическом повреждении клеток мозга. Предполагается, что при сниженном уровне DNMT1 в мозге он слабее влияет на структуру хроматина и меньше препятствует связыванию факторов транскрипции, регулирующих экспрессию генов, участвующих в нейропротекции [52]. Однако полное отсутствие DNMT1 в результате делеции гена не защищало нейроны от ишемического повреждения и не приводило к функциональной реабилитации [59].

К числу ингибиторов DNMT, которые должны защищать мозг от церебральной ишемии, относятся аналоги нуклеозидов (азацитидин, децитабин, зебуларин), синтетические ингибиторы (прокаин, гидралазин, RG108) и некоторые природные соединения (ресвератрол, EGCG) [60]. Как показано выше, децитабин защищает мозг от ишемического инсульта путем ингибирования метилирования ДНК. Но он вызывает ряд побочных эффектов. Зебуларин, другой ингибитор DNMT, также снижает неблагоприятные последствия ишемического повреждения мозга мышей. Он стабилен в водных растворах и менее токсичен [61].

#### *Ковалентные модификации гистонов*

ДНК, связанная с гистоновыми белками, образует хроматин. Организация хроматина диктует доступ факторов транскрипции и РНК-полимераз к промоторам генов. Посттрансляционные ковалентные модификации гистонов, такие как ацети-

лирование, метилирование, фосфорилирование, убиквитинирование, сумоилирование, ADP-рибозилирование (рис. 1), регулируют транскрипционную активность генома. Наиболее изученные модификации гистонов – метилирование и ацетилирование. Гистон-ацетилтрансферазы (НАТ) ацетируют остатки лизина в “хвостах” гистонов, а гистондеацетилазы (HDAC) катализируют удаление ацетильных групп. Ацетилирование гистонов приводит к разрыхлению хроматина и формированию транскрипционно активного эухроматина в клеточном ядре, в котором осуществляется экспрессия разнообразных генов. Деацетилирование гистонов ведет к образованию компактного, транскрипционно неактивного гетерохроматина, в котором затруднена экспрессия генов [62]. Однако оказалось, что для поддержания транскрипционно активного состояния генов необходима совместная работа НАТ и HDAC [49, 50, 63].

Модификации гистонов в значительной степени обратимы. Это позволяет динамически изменять экспрессию генов в ответ на внешние воздействия и изменения клеточной среды, в частности, на дефицит кислорода и глюкозы при ишемии мозга. Со снижением аэробного обмена при ишемическом инсульте в мозге падает уровень ацетил-коэнзима А (ацетил-КоА), который, кроме ключевой роли в окислительном метаболизме, служит источником ацетильных групп для гистон-ацетилтрансфераз. Так как НАТ активируются при фосфорилировании, то с дефицитом ацетил-КоА и АТФ при ишемическом инсульте снижается уровень активации НАТ, что считается одной из причин снижения уровня ацетилирования гистонов при инсульте [64]. Однако показано, что активность не всех НАТ, изменяется при инсульте [65]. Так, доказано участие PCAF (также известного как CBP/p300) и SRC-1 в активации HIF-1, а ингибирование PCAF оказывало нейропротекторный эффект. Оно снижало гиперактивацию проапоптотического белка p53 [66].

В соответствии с функциями, клеточной локализацией и паттерном экспрессии у млекопитающих выделяют четыре класса гистондеацетилаз. Класс I содержит HDAC1, HDAC2, HDAC3 и HDAC8. Класс II – HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 и HDAC10. Класс IV – только HDAC11. Все они – цинк-зависимые ферменты. В отличие от них, в сиртуинах, гистондеацетилазах класса III, кофактором является NAD<sup>+</sup>.

HDAC первого класса локализируются, в основном, в ядрах. Они экспрессируются во всех тканях, имея самый высокий уровень в мозге. Высокоомологичные HDAC1 и HDAC2 могут гомо- и гетеродимеризоваться. Они входят в состав комплексов Sin3, NuRD, CoREST и NODE, подавляющих транскрипцию [67, 68]. Каждый комплекс содержит две молекулы HDAC1 или две молеку-

лы HDAC2, или HDAC1 и HDAC2, причем место утраченной HDAC1 может занять HDAC2 [69]. Подавление экспрессии генов после инсульта частично опосредовано комплексом CoREST, который активируется после повреждения нейронов. Это приводит к подавлению экспрессии генов, участвующих в синаптической пластичности и восстановлении [70, 71]. Комплекс CoREST также ассоциирован с репрессором транскрипции MeCP2 и метилтрансферазой гистонов G9a [72]. В нормальных условиях HDAC1 действует как позитивный регулятор пролиферации клеток мозга у позвоночных [73, 74].

Гистон-метилтрансферазы (HMT) метилируют остатки лизина (K) в гистонах H3 или H4, что может приводить как к активации, так и к репрессии транскрипции в зависимости от положения лизина и количества присоединенных метильных групп. Метилирование лизина 9 в гистоне H3 (H3K9), осуществляемое гистон-метилтрансферазами SUV39H1 или G9a, защищало нейроны при ишемии, а нокдаун G9a или ингибирование репрессорного комплекса REST/HDAC1/HDAC2 вызывало эпигенетическую дерепрессию нейропротекторных генов, таких как ген, кодирующий мозговой нейротрофический фактор BDNF [70, 71].

#### *Участие гистондеацетилаз в ишемическом инсульте*

Снижение уровня ацетилирования гистонов H3 и H4 в результате ингибирования гистон-ацетилтрансфераз и/или активации гистондеацетилаз обычно приводит к подавлению транскрипции генов [75]. Эти процессы различаются в ядре инфаркта и в ишемической пенумбре, а также зависят от времени после инсульта.

Снижение уровня ацетилирования лизина 9 в гистоне H3 отмечено в ишемической пенумбре через 1, 4 или 24 ч после фототромботического инсульта в коре мозга крыс. Этот эффект связан, вероятно, с повышенной экспрессией гистондеацетилаз HDAC1 и HDAC2 [76, 77]. Деацетилирование гистона H3 приводит к конденсации хроматина и подавлению его транскрипционной активности, что в конечном итоге способствует апоптозу клеток пенумбры.

Сверхэкспрессия HDAC1 и HDAC2 в нейронах ишемической пенумбры и в глиальных клетках белого вещества мозга мыши наблюдались и позднее, в период регенерации через 1 неделю после окклюзии среднемозговой артерии. При этом их уровни в ядре инфаркта снижались [78]. Длительное повышение экспрессии HDAC1, HDAC2 и HDAC8 отмечено в нейронах и астроцитах коры мозга мыши через 3–14 дней после фототромботического инсульта [79]. Показано, что ингибирование экспрессии HDAC1 препятствует гибели нейронов и защищает астроциты и эндотелиаль-

ные клетки от гибели при гипоксии [80]. В отличие от этих данных, через 48 ч после МСАО отмечено снижение уровней мРНК HDAC1 и HDAC2 в коре мыши, тогда как экспрессия HDAC3, HDAC6 и HDAC11 увеличивалась, что указывало на вклад этих гистондеацетилаз в патогенез инсульта [81].

HDAC1 и HDAC2, по данным [78], локализируются в клеточных ядрах, поскольку у них отсутствует сигнал ядерного экспорта. Нами показано, что HDAC1 может находиться как в ядрах, так и в цитоплазме нейронов и астроцитов, а HDAC2 — исключительно в ядрах клеток мозга [79]. Согласно [82], HDAC1 и HDAC3 могут переходить из ядра в цитоплазму при их ассоциации с I $\kappa$ B $\alpha$ , а HDAC1 и HDAC2 могут транслоцироваться из ядра в цитоплазму при диссоциации репрессорного комплекса CoREST/REST/HDAC1 [83]. Однако при решении вопроса о внутриклеточном перераспределении белков надо учитывать, что все белки первоначально синтезируются в цитоплазме, а потом могут переходить в ядро или органеллы, либо оставаться в цитоплазме, либо экспортироваться из клетки, либо деградировать.

Показано, что HDAC2 подавляет экспрессию генов синаптической пластичности, препятствуя формированию памяти [84, 85]. HDAC2 играет особенно важную роль в регуляции выживаемости и смерти клеток [86]. Кроме глобального деацетилирования гистона H3, приводящего к снижению транскрипционной активности генома и подавлению белкового синтеза, HDAC2 может стимулировать клеточную смерть за счет взаимодействия с фактором транскрипции FOXO3a. Комплекс FOXO3a с HDAC2, но не с HDAC1, активирует экспрессию проапоптотических генов-мишеней FOXO3a, которые стимулируют апоптоз мотонейронов мозжечка при окислительном стрессе [87]. На разных тканях показано, что роль HDAC2 в регуляции клеточной смерти опосредована стимуляцией проапоптотического белка p53 [88, 89]. Повышение экспрессии HDAC2 играло решающую роль в выживаемости или смерти нейронов в пенумбре, а ее ингибирование способствовало восстановлению функций мозга после инсульта. При этом ингибирование других изоформ HDAC было неэффективным [90].

В работах [91–94] гистондеацетилазы HDAC3, HDAC6 и HDAC8 рассматриваются в качестве потенциальных медиаторов нейротоксичности в ряде моделей ишемии и нейродегенерации. HDAC3 регулирует экспрессию генов путем деацетилирования гистонов и ряда негистоновых белков. Он входит в состав корепрессорного комплекса NCoR/SMRT [95]. Кроме того, HDAC3 участвует в регуляции выживаемости клеток и апоптоза, ингибируя экспрессию белка c-Jun [96]. Увеличение экспрессии HDAC3 в области

пенумбры, отмеченное через 3 и 24 ч, сохранялось в течение недели после реперфузии в модели МСАО. Иммунофлуоресцентный анализ выявил преимущественную локализацию HDAC3 в ядрах нейронов, но не в астроцитах или в микроглии. Ингибирование белка с помощью коротких шпилечных РНК (shRNA) повышало жизнеспособность клеток [81]. В наших исследованиях HDAC3 преимущественно обнаруживалась как в ядрах нейронов, так и в ядрах и цитоплазме астроцитов коры мозга и гиппокампа мышей. Экспрессия HDAC3 в ранний восстановительный период (1 неделя) после фототромботического инсульта не изменялась [79]. Нейротоксическое действие HDAC3 во многом обусловлено связью с HDAC1 [97]. Взаимодействие HDAC1 и HDAC3 значительно повышалось в условиях нейродегенерации в моделях *in vitro* или *in vivo*. Нокдаун HDAC3 подавлял нейротоксичность HDAC1, а нокдаун HDAC1 — нейротоксичность HDAC3. HDAC3 и HDAC1 взаимодействуют с белком HDRP (histone deacetylase-related protein), укороченной формой HDAC9, экспрессия которого подавляется при гибели нервных клеток. В отличие от HDAC3, взаимодействие между HDRP и HDAC1 защищало нейроны от смерти. При этом повышенное содержание HDRP ингибировало взаимодействие HDAC1/HDAC3 и предотвращало нейротоксическое действие любого из этих белков. Таким образом, HDAC1 представляет собой молекулярный переключатель между выживанием и смертью нейронов. Его взаимодействие с HDRP способствует выживанию нейронов, а взаимодействие с HDAC3 приводит к их гибели [97].

HDAC6 — преимущественно цитоплазматический фермент [98], участвующий во многих клеточных процессах, включая деградацию поврежденных белков, миграцию клеток и межклеточные взаимодействия [99]. Тубулин — один из основных субстратов HDAC6. Ингибирование HDAC6 резко увеличивает ацетилирование тубулина, что повышает устойчивость и функциональную активность микротрубочек [100]. HDAC6 деацетилюет и другие клеточные белки, а также связывает свободный убиквитин, модулируя защиту клеток при цитотоксическом накоплении поврежденных белков и их агрегатов [101]. В наших последних исследованиях HDAC6 обнаруживалась в цитоплазме и ядрах большинства нейронов, но не астроцитов гиппокампа и коры мозга мыши [102]. Ряд исследований указывает на возможность миграции белка из цитоплазмы в ядро и наоборот. Так, в пролиферирующих клетках В16 мыши HDAC6 обнаружена исключительно в цитоплазме, но при дифференцировке клеток и аресте пролиферации этот белок также обнаруживался в ядрах, что свидетельствовало о его транслокации в ядро при аресте клеточного деления [103]. Через 3, 7 и 14 дней после фототромботиче-

ского инсульта экспрессия HDAC6 возрастала в нейронах коры и гиппокампа мыши не только вблизи места повреждения, но и в контралатеральном полушарии [102]. Chen и соавт. [81] наблюдали увеличение экспрессии HDAC6 через 3 ч после МСАО с последующим снижением к 24 ч. Ингибирование экспрессии HDAC6 с помощью микроРНК способствовало выживанию нейронов, выращиваемых в условиях недостатка кислорода и глюкозы. Ингибирование HDAC6 может защищать нейроны и глию от ишемического повреждения, снижая апоптоз клеток [104–106].

HDAC8 деацетирует все гистоны [107]. Функции HDAC8 в клетках мозга малоизвестны. Этот белок присутствует преимущественно в цитоплазме нейронов коры головного мозга, миндалине, гиппокампе и гипоталамусе [79, 108, 109]. Его селективный ингибитор PCI-34051 защищал нейроны коры мозга от смерти, вызванной окислительным стрессом [110].

Участие HDAC класса II менее изучено. Данные о роли HDAC4 в нейродегенерации и нейропротекции противоречивы. С одной стороны, есть сведения о значительной роли HDAC4 в поддержании выживаемости нейронов [111, 112], но в другой работе [113] не найдено зависимости выживания нейронов от экспрессии этого белка. В норме HDAC4 экспрессируется преимущественно в цитоплазме большинства нейронов. В некоторых областях мозга, таких как зубчатая извилина, HDAC4 не экспрессируется в ядрах нейронов, но в других областях коры и в гиппокампе (области CA1, CA3 и CA4) некоторые ядра нейронов содержат HDAC4 [114]. Ишемия стимулирует транслокацию белка в ядра клеток мозга, что связывают со смертью нейронов [115, 116]. Chen и соавт. не обнаружили существенного влияния МСАО на экспрессию HDAC4 [81]. Однако показано снижение экспрессии HDAC4 в ядре инфаркта и в пенумбре через 24 ч после инсульта, которое сохранялось через 14 суток [117]. Локализация HDAC4 зависит от кальмодулин-зависимой киназы (CaMK) и от активности нейронов [118]. Ингибирование CaMK и снижение уровня трофических факторов способствовало транслокации HDAC4 в ядро и приводило к апоптозу нейронов [119].

В центральной нервной системе HDAC5 участвует в дифференцировке нейронов [120], регулирует выживание нейронов коры мозга при действии факторов, вызывающих апоптоз [121]. Сверхэкспрессия HDAC5 и ее ядерная локализация вызывали апоптоз культивируемых нейронов гранулярного слоя мозжечка [122]. С другой стороны, ядерный экспорт HDAC5 стимулирует регенерацию аксонов сенсорных нейронов после повреждения [123]. МСАО вызывала снижение

экспрессии HDAC5 в пенумбре через 1, 2 и 14 суток [81, 117].

### ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ИНГИБИТОРОВ ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ПОСЛЕДСТВИЙ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА

Ингибирование HDAC способствует ацетилированию гистонов, транскрипции генов и синтезу белков, улучшая общее состояние клеток. В настоящее время доступны как неспецифические ингибиторы гистондеацетилаз, так и селективные ингибиторы отдельных HDAC (табл. 1). Рядом исследователей показано, что ингибирование HDAC с помощью бутирата натрия, вальпроата натрия или трихостатина А (TSA) может модулировать активность 2–5% генов, не только вызывая их активацию, но и подавляя экспрессию некоторых генов, участвующих в апоптозе и воспалении [65, 124]. Так, введение неспецифических ингибиторов HDAC уменьшало объем инфаркта мозга и способствовало функциональному восстановлению нервной системы. Но пан-ингибиторы HDAC могут оказывать цитотоксическое действие и при длительном применении вызывать побочные эффекты. Некоторые ингибиторы гистондеацетилаз защищали клетки мозга после ишемии, тогда как другие способствовали их смерти [125, 126]. Однако не только гистоны являются мишенями HDAC. Ацетилированию могут подвергаться порядка 4000 белков, входящих в крупные макромолекулярные комплексы, участвующие в регуляции разнообразных клеточных процессов, таких как перестройки хроматина, клеточный цикл, сплайсинг, ядерный транспорт и др. [127, 128].

Модуляция белков эпигенетической регуляции является одной из перспективных стратегий для поиска подходов к лечению ишемического инсульта. Но применение ингибиторов гистондеацетилаз связано с серьезными проблемами, основными из которых – небольшая специфичность и низкая способность проникать в нейроны головного мозга через гематоэнцефалический барьер, а также сравнительно высокая токсичность. Для преодоления этих проблем необходимо углубить понимание функций и механизмов действия HDAC в нервных клетках разного типа и в разных отделах нервной системы. Учитывая сложность и динамичность процессов ацетилирования и деацетилирования гистонов и других белков, необходимо выяснить, какие эпигенетические изменения транскрипционной активности обеспечивают защиту нейронов и клеток глии после ишемического повреждения в зоне инфаркта и в пенумбре; какие белки являются потенциальными мишенями для ингибиторов или активаторов HDAC и других эпигенетических белков, воздействие на кото-

**Таблица 1.** Ингибиторы HDAC (по данным APExBIO <http://www.apexbt.com/signaling-pathways/chromatin-epigenetics.html>)

Описание	Наименование
Ингибиторы HDAC с низкой специфичностью	Vorinostat (SAHA), Apicidin BRD6688 Chidamide CI994 (Tacedinaline) Droxinostat Mocetinostat (MGCD0103, MG0103) PCI-24781 (CRA-024781) Pracinostat (SB939) Resminostat hydrochloride RG2833 (проникает в мозг) Sodium phenylbutyrate Sodium valproate Trichostatin A (TSA)
Ингибитор HDAC I класса	4SC-202
Ингибитор HDAC I и II классов	4-Iodo-SAHA
Ингибиторы HDAC1	Pyroxamide Valproic acid
Ингибитор HDAC1/HDAC2	Romidepsin (FK228)
Ингибиторы HDAC1 и HDAC3	Entinostat (MS-275, SNDX-275) SBHA
Ингибиторы HDAC3	BG45 RGFP966
Ингибитор HDAC4/HDAC5	LMK 235
Ингибитор HDAC4/HDAC5/ HDAC7/HDAC9	TMP269
Ингибиторы HDAC6	НРОВ Nexturastat A Rocilinostat (ACY-1215) TCS HDAC6 20b Tubacin (селективный, проникает в клетки) Tubastatin A Tubastatin A HCl (мощный, селективный)
Ингибитор HDAC8	PCI-34051
Ингибиторы HDAC II класса	MC1568
Активатор HDAC	ITSA-1

рые может оказать нейропротекторное действие; какие эпигенетические регуляторы вовлечены в развитие разных типов инсульта. Для решения проблемы нейропротекции в первые часы после инсульта и терапии в восстановительный период необходим системный подход, учитывающий тип инсульта, возраст пациентов, сопутствующие заболевания, генетические особенности. Сочетание модуляторов сигнальных и эпигенетических процессов, вероятно, наиболее перспективно для терапии ишемического инсульта.

Работа поддержана грантом РНФ №18-15-00110.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Невинная И. 2015. Бери в голову. Инсульты вышли на первое место среди причин смертности в России. *Российская газета. Федеральный выпуск*. **246** (6817). <https://rg.ru/2015/10/30/insult.html>
2. Iadecola C., Anrather J. 2011. Stroke research at a crossroad: Asking the brain for directions. *Nat. Neurosci.* **14**, 1363–1368.
3. Hankey G.J. 2017. Stroke. *Lancet*. **389** (10069), 641–654.
4. Singh T.P., Weinstein J.R., Murphy S.P. 2017. Stroke: Basic and clinical. *Adv. Neurobiol.* **15**, 281–293.

5. Chavez J.C., Hurko O., Barone F.C., Feuerstein G.Z. 2009. Pharmacologic interventions for stroke: Looking beyond the thrombolysis time window into the penumbra with biomarkers, not a stopwatch. *Stroke*. **40** (10), e558–563.
6. Узденский А.Б., Демьяненко С.В. 2016. *Фототромботический инсульт. Биохимия пенумбры*. Ростов-на-Дону.: Изд-во Южного федерального университета. 127 с.
7. Ginsberg M.D. 2008. Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future. *Neuropharmacology*. **55**, 363–389.
8. Zhou Z., Lu J., Liu W.W., Manaenko A., Hou X., Mei Q., Huang J.L., Tang J., Zhang J.H., Yao H., Hu Q. 2018. Advances in stroke pharmacology. *Pharmacol. Ther.* **191**, 23–42.
9. O'Collins V.E., Macleod M.R., Donnan G.A., Horley L.L., van der Worp B.H., Howells D.W. 2006. 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann. Neurol.* **59** (3), 467–477.
10. Chen H., Yoshioka H., Kim G.S., Jung J.E., Okami N., Sakata H., Maier C.M., Narasimhan P., Goeders C.E., Chan P.H. 2011. Oxidative stress in ischemic brain damage: Mechanisms of cell death and potential molecular targets for neuroprotection. *Antioxid. Redox Signal.* **14**, 1505–1517.
11. Majid A. 2014. Neuroprotection in stroke: Past, present, and future. *ISRN Neurol.* **2014**, 1–17.
12. Puyal J., Ginet V., Clarke P.G. 2013. Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: A challenge for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* **105**, 24–48.
13. Rajah G.B., Ding Y. 2017. Experimental neuroprotection in ischemic stroke: A concise review. *Neurosurg. Focus.* **42**, E2.
14. Patel Rajan A.G., McMullen P.W. 2017. Neuroprotection in the treatment of acute ischemic stroke. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **59** (6), 542–548.
15. Karsy M., Brock A., Guan J., Taussky P., Kalani M.Y., Park M.S. 2017. Neuroprotective strategies and the underlying molecular basis of cerebrovascular stroke. *Neurosurg. Focus.* **42**, E3.
16. Krafft P.R., Bailey E.L., Lekic T., Rolland W.B., Altay O., Tang J., Wardlaw J.M., Zhang J.H., Sudlow C.L. 2012. Etiology of stroke and choice of models. *Int. J. Stroke.* **7**, 398–406.
17. Mehta S.L., Manhas N., Raghbir R. 2007. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res. Rev.* **4**, 34–66.
18. Sommer C.J. 2017. Ischemic stroke: Experimental models and reality. *Acta Neuropathol.* **133**, 245–261.
19. Choi D.W. 1992. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* **23**, 1261–1276.
20. Lau A., Tymianski M. 2010. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch.* **460**, 525–542.
21. Brini M., Cali T., Ottolini D., Carafoli E. 2014. Neuronal calcium signaling: Function and dysfunction. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**, 2787–2814.
22. Abramov A.Y., Scorziello A., Duchon M.R. 2007. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J. Neurosci.* **27**, 1129–1138.
23. Allen C.L., Bayraktutan U. 2009. Oxidative stress and its role in the pathogenesis of ischemic stroke. *Int. J. Stroke.* **4**, 461–470.
24. Garry P.S., Ezra M., Rowland M.J., Westbrook J., Pattinson K.T. 2015. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment—from bench to bedside. *Exp. Neurol.* **263**, 235–243.
25. Yamashita T., Oikawa S. 2009. The role of lysosomal rupture in neuronal death. *Prog. Neurobiol.* **89**, 343–358.
26. Guo M.F., Yu J.Z., Ma C.G. 2011. Mechanisms related to neuron injury and death in cerebral hypoxic ischaemia. *Folia Neuropathol.* **49**, 78–87.
27. Irving E.A., Bamford M. 2002. Role of mitogen- and stress-activated kinases in ischemic injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **22**, 631–647.
28. Le Bras M., Clement M.V., Pervaiz S., Brenner C. 2005. Reactive oxygen species and the mitochondrial signaling pathway of cell death. *Histol. Histopathol.* **20**, 205–219.
29. Ferrer I., Friguls B., Dalfó E., Justicia C., Planas A.M. 2003. Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **29**, 472–481.
30. Ferrer I., Planas A.M. 2003. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: Life and death struggle in the penumbra. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **62**, 329–339.
31. Krupinski J., Lopez E., Marti E., Ferrer I. 2000. Expression of caspases and their substrates in the rat model of focal cerebral ischemia. *Neurobiol. Dis.* **7**, 332–342.
32. Althaus J., Siegelin M.D., Dehghani F., Cilenti L., Zervos A.S., Rami A. 2007. The serine protease Omi/HtrA2 is involved in XIAP cleavage and in neuronal cell death following focal cerebral ischemia/reperfusion. *Neurochem. Int.* **50**, 172–180.
33. Saito A., Hayashi T., Okuno S., Ferrand-Drake M., Chan P.H. 2003. Interaction between XIAP and Smac/DIABLO in the mouse brain after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **23**, 1010–1019.
34. Demyanenko S., Uzdensky A. 2017. Profiling of signaling proteins in penumbra after focal photothrombotic infarct in the rat brain cortex. *Mol. Neurobiol.* **54**, 6839–6856.
35. Demyanenko S.V., Panchenko S.N., Uzdensky A.B. 2015. Expression of neuronal and signaling proteins in penumbra around a photothrombotic infarction core in rat cerebral cortex. *Biochemistry (Moscow)*. **80**, 790–799.
36. Hata R., Maeda K., Hermann D., Mies G., Hossmann K.A. 2000. Dynamics of regional brain metabolism and gene expression after middle cerebral artery occlusion in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **20**, 306–315.

37. Küry P., Schroeter M., Jander S. 2004. Transcriptional response to circumscribed cortical brain ischemia: Spatiotemporal patterns in ischemic vs. remote non-ischemic cortex. *Eur. J. Neurosci.* **19**, 1708–1720.
38. Ferrer I. 2006. Apoptosis: Future targets for neuroprotective strategies. *Cerebrovasc. Dis.* **21** (Suppl. 2), 9–20.
39. Li F., Chong Z.Z., Maiese K. 2005. Vital elements of the Wnt-Frizzled signaling pathway in the nervous system. *Curr. Neurovasc. Res.* **2**, 331–340.
40. Uzdensky A., Demyanenko S., Fedorenko G., Lapteva T., Fedorenko A. 2017. Photothrombotic infarct in the rat brain cortex: Protein profile and morphological changes in penumbra. *Mol. Neurobiol.* **54**, 4172–4188.
41. Uzdensky A.B. 2017. Photothrombotic stroke as a model of ischemic stroke. *Transl. Stroke Res.* **9** (5), 437–451.
42. Pelengaris S., Khan M., Evan G. 2002. c-MYC: More than just a matter of life and death. *Nat. Rev. Cancer.* **2**, 764–776.
43. Dang C.V., O'Donnell K.A., Zeller K.I., Nguyen T., Osthus R.C., Li F. 2006. The c-Myc target gene network. *Semin. Cancer Biol.* **16**, 253–264.
44. Poole C.J., van Riggelen J. 2017. MYC-Master regulator of the cancer epigenome and transcriptome. *Genes (Basel).* **8**, E142.
45. Fisher O.M., Lord S.J., Falkenback D., Clemons N.J., Eslick G.D., Lord R.V. 2017. The prognostic value of TP53 mutations in oesophageal adenocarcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Gut.* **66**, 399–410.
46. Engelmann D., Pützer B.M. 2010. Translating DNA damage into cancer cell death—A roadmap for E2F1 apoptotic signalling and opportunities for new drug combinations to overcome chemoresistance. *Drug Resist. Updat.* **13**, 119–131.
47. Meng P., Ghosh R. 2014. Transcription addiction: Can we garner the Yin and Yang functions of E2F1 for cancer therapy? *Cell Death Dis.* **5**, e1360.
48. Simon R.P. 2016. Epigenetic modulation of gene expression governs the brain's response to injury. *Neurosci. Lett.* **625**, 16–19.
49. Hu Z., Zhong B., Tan J., Chen C., Lei Q., Zeng L. 2017. The Emerging role of epigenetics in cerebral ischemia. *Mol. Neurobiol.* **54**, 1887–1905.
50. Schweizer S., Meisel A., Märtschenz S. 2013. Epigenetic mechanisms in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **33**, 1335–1346.
51. Brown T.A. 2007. *Genomes*. 3. London: Garland Scie. Ins. 713 p.
52. Endres M., Meisel A., Biniszkiwicz D., Namura S., Prass K., Ruscher K., Lipski A., Jaenisch R., Moskowitz M.A., Dirnagl U. 2000. DNA methyltransferase contributes to delayed ischemic brain injury. *J. Neurosci.* **20**, 3175–3181.
53. Krupinski J., Carrera C., Muiño E., Torres N., Al-Baradie R., Cullell N., Fernandez-Cadenas I. 2018. DNA Methylation in stroke. Update of latest advances. *Comp. Struct. Biotechnol. J.* **16**, 1–5.
54. Zaina S., Heyn H., Carmona F.J., Varol N., Sayols S., Condom E., Ramírez-Ruz J., Gomez A., Gonçalves I., Moran S., Esteller M. 2014. DNA methylation map of human atherosclerosis. *Circ. Cardiovasc. Genet.* **7**, 692–700.
55. Meller R., Pearson A., Simon R.P. 2015. Dynamic changes in DNA methylation in ischemic tolerance. *Front. Neurol.* **6**, 102.
56. Maysami S., Lan J.Q., Minami M., Simon R.P. 2008. Proliferating progenitor cells: A required cellular element for induction of ischemic tolerance in the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **28** (6), 1104–1113.
57. Lee J.C., Park J.H., Yan B.C., Kim I.H., Cho G.S., Jeoung D., Kwon Y.G., Kim Y.M., Lee Y.L., Shin H.C., Won M.H. 2013. Effects of transient cerebral ischemia on the expression of DNA methyltransferase 1 in the gerbil hippocampal CA1 region. *Neurochem. Res.* **38** (1), 74–81.
58. Sharifulina S.A., Komandirov M.A., Uzdensky A.B. 2014. Epigenetic regulation of death of crayfish glial cells but not neurons induced by photodynamic impact. *Brain Res. Bull.* **102**, 15–21.
59. Endres M., Fan G., Meisel A., Dirnagl U., Jaenisch R. 2001. Effects of cerebral ischemia in mice lacking DNA methyltransferase 1 in post-mitotic neurons. *Neuroreport.* **12**, 3763–3766.
60. Singh V., Sharma P., Capalash N. 2013. DNA methyltransferase-1 inhibitors as epigenetic therapy for cancer. *Curr. Cancer Drug Targets.* **13** (4), 379–399.
61. Dock H., Theodorsson A., Theodorsson E. 2015. DNA Methylation inhibitor zebularine confers stroke protection in ischemic rats. *Transl. Stroke Res.* **6** (4), 296–300.
62. Эллис С.Д., Дженювейн Т., Рейнберг Д. 2010. *Эпигенетика*. М.: Техносфера. 495 с.
63. Wang Z., Zang C., Cui K., Schones D.E., Barski A., Peng W., Zhao K. 2009. Genome-wide mapping of HATs and HDACs reveals distinct functions in active and inactive genes. *Cell.* **138**, 1019–1031.
64. Johnson A.B., Barton M.C. 2007. Hypoxia-induced and stress-specific changes in chromatin structure and function. *Mutat. Res.* **618**, 149–162.
65. Faraco G., Pancani T., Formentini L., Mascagni P., Fossati G., Leoni F., Moroni F., Chiarugi A. 2006. Pharmacological inhibition of histone deacetylases by suberoylanilide hydroxamic acid specifically alters gene expression and reduces ischemic injury in the mouse brain. *Mol. Pharmacol.* **70** (6), 1876–1884.
66. Raz L., Zhang Q.G., Han D., Dong Y., De Sevilla L., Brann D.W. 2011. Acetylation of the pro-apoptotic factor, p53 in the hippocampus following cerebral ischemia and modulation by estrogen. *PLoS One.* **6**, e27039.
67. Kelly R.D., Cowley S.M. 2013. The physiological roles of histone deacetylase (HDAC) 1 and 2: Complex co-stars with multiple leading parts. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 741–749.
68. Brunmeir R., Lagger S., Seiser C. 2009. Histone deacetylase HDAC1/HDAC2-controlled embryonic

- development and cell differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* **53** (2-3), 275–289.
69. Dovey O.M., Foster C.T., Conte N., Edwards S.A., Edwards J.M., Singh R., Vassiliou G., Bradley A., Cowley S.M. 2013. Histone deacetylase 1 and 2 are essential for normal T-cell development and genomic stability in mice. *Blood*. **121**, 1335–1344.
70. Calderone A., Jover T., Noh K.M., Tanaka H., Yokota H., Lin Y., Grooms S.Y., Regis R., Bennett M.V., Zukin R.S. 2003. Ischemic insults derepress the gene silencer REST in neurons destined to die. *J. Neurosci.* **23**, 2112–2121.
71. Noh K.M., Hwang J.Y., Follenzi A., Athanasiadou R., Miyawaki T., Grealley J.M., Bennett M.V., Zukin R.S. 2012. Repressor element-1 silencing transcription factor (REST)-dependent epigenetic remodeling is critical to ischemia-induced neuronal death. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **109**, E962–E971.
72. Formisano L., Noh K.M., Miyawaki T. 2007. Ischemic insults promote epigenetic reprogramming of mu opioid receptor expression in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **104**, 4170–4175.
73. Harrison M.R., Georgiou A.S., Spaink H.P., Cunniffe V.T. 2011. The epigenetic regulator Histone Deacetylase 1 promotes transcription of a core neurogenic programme in zebrafish embryos. *BMC Genomics*. **12** (24), 1–17.
74. Yoo J.Y., Larouche M., Goldowitz D. 2013. The expression of HDAC1 and HDAC2 during cerebellar cortical development. *Cerebellum*. **12**, 534–546.
75. Lanzillotta A., Pignataro G., Branca C., Cuomo O., Sarnico I., Benarese M., Annunziato L., Spano P., Pizzi M. 2012. Targeted acetylation of NF-kappaB/RelA and histones by epigenetic drugs reduces post-ischemic brain injury in mice with an extended therapeutic window. *Neurobiol. Dis.* **49C**, 177–189.
76. Demyanenko S.V., Dzreyan V.A., Guzenko V.V., Uzdensky A.B. 2018. Epigenetic alterations in ischemic penumbra in the rat cerebral cortex induced by photothrombotic stroke. *J. Bioenerg. Biomembr.* **50**, 467. <https://doi.org/10.1007/s10863-018-9775-7>
77. Demyanenko S.V., Dzreyan V.A., Guzenko V.V., Uzdensky A.B. 2019. Epigenetic processes in the ischemic penumbra after photothrombotic stroke in the rat cerebral cortex. *Cell Death Discovery*, **5**, 14. <https://www.nature.com/articles/s41420-018-0128-4>
78. Baltan S., Bachleda A., Morrison R.S., Murphy S.P. 2011. Expression of histone deacetylases in cellular compartments of the mouse brain and the effects of ischemia. *Transl. Stroke Res.* **2** (3), 411–423.
79. Demyanenko S., Neginskaya M., Berezhnaya E. 2018. Expression of class I histone deacetylases in ipsilateral and contralateral hemispheres after the focal photothrombotic infarction in the mouse brain. *Transl. Stroke Res.* **9**, 471–483.
80. Tsai H.D., Wu J.S., Kao M.H., Chen J.J., Sun G.Y., Ong W.Y., Lin T.N. 2016. Clinacanthus nutans protects cortical neurons against hypoxia-induced toxicity by downregulating HDAC1/6. *Neuromolecular Med.* **18** (3), 274–282.
81. Chen Y.T., Zang X.F., Pan J., Zhu X.L., Chen F., Chen Z.B., Xu Y. 2012. Expression patterns of histone deacetylases in experimental stroke and potential targets for neuroprotection. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **39** (9), 751–758.
82. Viatour P., Legrand-Poels S., van Lint C., Warnier M., Merville M.P., Gielen J., Piette J., Bours V., Chariot A. 2003. Cytoplasmic I-kappaBalpha increases NF-kappaB-independent transcription through binding to histone deacetylase (HDAC)1 and HDAC3. *J. Biol. Chem.* **278** (47), 46541–46548.
83. Gu H., Liang Y., Mandel G., Roizman B. 2005. Components of the REST/CoREST/histone deacetylase repressor complex are disrupted, modified, and translocated in HSV-1-infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **102** (21), 7571–7576.
84. Morris M.J., Mahgoub M., Na E.S., Pranav H., Monteggia L.M. 2013. Loss of histone deacetylase 2 improves working memory and accelerates extinction learning. *J. Neurosci.* **33**, 6401–6411.
85. Guan J.S., Haggarty S.J., Giacometti E., Dannenberg J.H., Joseph N., Gao J., Nieland T.J., Zhou Y., Wang X., Mazitschek R., Bradner J.E., DePinho R.A., Jaenisch R., Tsai L.H. 2009. HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity. *Nature*. **459**, 55–60.
86. Krämer O.H. 2009. HDAC2: A critical factor in health and disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **30**, 647–655.
87. Peng S., Zhao S., Yan F., Cheng J., Huang L., Chen H., Liu Q., Ji X., Yuan Z. 2015. HDAC2 selectively regulates FOXO3a-mediated gene transcription during oxidative stress-induced neuronal cell death. *J. Neurosci.* **35**, 1250–1259.
88. Chen S., Yao X., Li Y., Saifudeen Z., Bachvarov D., El-Dahr S.S. 2015. Histone deacetylase 1 and 2 regulate Wnt and p53 pathways in the ureteric bud epithelium. *Development*. **142**, 1180–1192.
89. Sun D., Yu M., Li Y., Xing H., Gao Y., Huang Z., Hao W., Lu K., Kong C., Shimozato O., Ozaki T., Zhu Y. 2019. Histone deacetylase 2 is involved in DNA damage-mediated cell death of human osteosarcoma cells through stimulation of the ATM/p53 pathway. *FEBS Open Biol.* **9**, 478–489.
90. Lin Y.H., Dong J., Tang Y., Ni H.Y., Zhang Y., Su P., Liang H.Y., Yao M.C., Yuan H.J., Wang D.L., Chang L., Wu H.Y., Luo C.X., Zhu D.Y. 2017. Opening a new time window for treatment of stroke by targeting HDAC2. *J. Neurosci.* **37**, 6712–6728.
91. Bardai F.H., D’Mello S.R. 2011. Selective toxicity by HDAC3 in neurons: Regulation by Akt and GSK3beta. *J. Neurosci.* **31** (5), 1746–1751.
92. Bardai F.H., Verma P., Smith C., Rawat V., Wang L., D’Mello S.R. 2013. Disassociation of histone deacetylase-3 from normal huntingtin underlies mutant huntingtin neurotoxicity. *J. Neurosci.* **33**, 11833–11838.
93. Bates E.A., Victor M., Jones A.K., Sh Y., Hart A.C. 2006. Differential contributions of *Caenorhabditis elegans* histone deacetylases to huntingtin polyglutamine toxicity. *J. Neurosci.* **26**, 2830–2838.

94. Soriano F.X., Hardingham G.E. 2011. In cortical neurons HDAC3 activity suppresses RD4-dependent SM-RT export. *PLoS One*. **6** (6), e21056.
95. Bhaskara S., Knutson S.K., Jiang G., Chandrasekharan M.B., Wilson A.J., Zheng S., Yenamandra A., Locke K., Yuan J.L., Bonine-Summers A.R., Wells C.E., Kaiser J.F., Washington M.K., Zhao Z., Wagner F.F., Sun Z.W., Xia F., Holson E.B., Khabele D., Hiebert S.W. 2010. Hdac3 is essential for the maintenance of chromatin structure and genome stability. *Cancer Cell*. **18**, 436–447.
96. Xia Y., Wang J., Liu T.J., Yung W.K., Hunter T., Lu Z. 2007. c-Jun downregulation by HDAC3-dependent transcriptional repression promotes osmotic stress-induced cell apoptosis. *Mol. Cell*. **25**, 219–232.
97. Bardai F.H., Price V., Zaayman M., Wang L., D’Mello S.R. 2012. Histone deacetylase-1 (HDAC1) is a molecular switch between neuronal survival and death. *J. Biol. Chem.* **287**, 35444–35453.
98. Noack M., Leyk J., Richter-Landsberg C. 2014. HDAC6 inhibition results in tau acetylation and modulates tau phosphorylation and degradation in oligodendrocytes. *Glia*. **62** (4), 535–547.
99. Valenzuela-Fernández A., Cabrero J.R., Serrador J.M., Sánchez-Madrid F. 2008. HDAC6: A key regulator of cytoskeleton, cell migration and cell-cell interactions. *Trends Cell Biol.* **18** (6), 291–297.
100. Zhang Y., Li N., Caron C., Matthias G., Hess D., Khochbin S., Matthias P. 2003. HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules *in vivo*. *EMBO J.* **22** (5), 1168–1179.
101. Simões-Pires C., Zwick V., Nurisso A., Schenker E., Carrupt P.A., Cuendet M. 2013. HDAC6 as a target for neurodegenerative diseases: What makes it different from the other HDACs? *Mol. Neurodegener.* **87**, 1–16.
102. Demyanenko S., Berezhnaya E., Neginskaya M., Nikul V. 2019. HDAC6 may influence the death of brain cells in the early post-stroke recovery period. *Cell Death Discovery*. **5**, 26. <https://www.nature.com/articles/s41420-018-0128-4>
103. Verdel A., Curtet S., Brocard M.P., Rousseaux S., Lemerrier C., Yoshida M., Khochbin S. 2000. Active maintenance of mHDA2/mHDAC6 histone-deacetylase in the cytoplasm. *Curr. Biol.* **10** (12), 747–749.
104. Rivieccio M.A., Brochier C., Willis D.E., Walker B.A., D’Annibale M.A., McLaughlin K., Siddiq A., Koziowski A.P., Jaffrey S.R., Twiss J.L., Ratan R.R., Langley B. 2009. HDAC6 is a target for protection and regeneration following injury in the nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **106** (46), 19599–19604.
105. Fukada M., Hanai A., Nakayama A., Suzuki T., Miyata N., Rodriguiz R.M., Wetsel W.C., Yao T.P., Kawaguchi Y. 2012. Loss of deacetylation activity of HDAC6 affects emotional behavior in mice. *PLoS One*. **7** (2), e30924.
106. Su M., Guan H., Zhang F., Gao Y., Teng X., Yang W. 2016. HDAC6 regulates the chaperone-mediated autophagy to prevent oxidative damage in injured neurons after experimental spinal cord injury. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2016**, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2016/7263736>
107. Lee H., Sengupta N., Villagra A., Rezai-Zadeh N., Seto E. 2006. Histone deacetylase 8 safeguards the human ever-shorter telomeres 1B (hEST1B) protein from ubiquitin-mediated degradation. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 5259–5269.
108. Takase K., Oda S., Kuroda M., Funato H. 2013. Monoaminergic and neuropeptidergic neurons have distinct expression profiles of histone deacetylases. *PLoS One*. **8** (3), e58473.
109. Funato H., Oda S., Yokofujita J., Igarashi H., Kuroda M. 2011. Fasting and high-fat diet alter histone deacetylase expression in the medial hypothalamus. *PLoS One*. **6**, e18950.
110. Sleiman S.F., Olson D.E., Bourassa M.W., Karuppagounder S.S., Zhang Y.L., Gale J., Wagner F.F., Basso M., Coppola G., Pinto J.T., Holson E.B., Ratan R.R. 2014. Hydroxamic acid-based histone deacetylase (HDAC) inhibitors can mediate neuroprotection independent of HDAC inhibition. *J. Neurosci.* **34**, 14328–14337.
111. Majdzadeh N., Wang L., Morrison B.E., Bassel-Duby R., Olson E.N., D’Mello S.R. 2008. HDAC4 inhibits cell-cycle progression and protects neurons from cell death. *Dev. Neurobiol.* **68**, 1076–1092.
112. Chen B., Cepko C.L. 2009. HDAC4 regulates neuronal survival in normal and diseased retinas. *Science*. **323**, 256–259.
113. Price V., Wang L., D’Mello S.R. 2013. Conditional deletion of histone deacetylase-4 in the central nervous system has no major effect on brain architecture or neuronal viability. *J. Neurosci. Res.* **91** (3), 407–415.
114. Darcy M.J., Calvin K., Cavnar K., Ouimet C.C. 2010. Regional and subcellular distribution of HDAC4 in mouse brain. *J. Compar. Neurol.* **518**, 722–740.
115. Kassis H., Shehadah A., Chopp M., Roberts C., Zhang Z.G. 2015. Stroke induces nuclear shuttling of histone deacetylase 4. *Stroke*. **46** (7), 1909–1915.
116. Yuan H., Denton K., Liu L., Li X.J., Benashski S., McCullough L., Li J. 2016. Nuclear translocation of histone deacetylase 4 induces neuronal death in stroke. *Neurobiol. Dis.* **91**, 182–193.
117. He M., Zhang B., Wei X., Wang Z., Fan B., Du P., Zhang Y., Jian W., Chen L., Wang L., Fang H., Li X., Wang P.A., Yi F. 2013. HDAC4/5-HMGB1 signalling mediated by NADPH oxidase activity contributes to cerebral ischaemia/reperfusion injury. *J. Cell. Mol. Med.* **17** (4), 531–542.
118. Chawla S., Vanhoutte P., Arnold F.J., Huang C.L., Bading H. 2003. Neuronal activity-dependent nucleocytoplasmic shuttling of HDAC4 and HDAC5. *J. Neurochem.* **85** (1), 151–159.
119. Bolger T.A., Yao T.P. 2005. Intracellular trafficking of histone deacetylase 4 regulates neuronal cell death. *J. Neurosci.* **25**, 9544–9553.
120. Schneider J.W., Gao Z., Li S., Farooqi M., Tang T.S., Bezprozvanny I., Frantz D.E., Hsieh J. 2008. Small-

- molecule activation of neuronal cell fate. *Nat. Chem. Biol.* **4** (7), 408–410.
121. Wei J.Y., Lu Q.N., Li W.M., He W. 2015. Intracellular translocation of histone deacetylase 5 regulates neuronal cell apoptosis. *Brain Res.* **1604**, 15–24.
122. Linseman D.A., Bartley C.M., Le S.S., Laessig T.A., Bouchard R.J., Meintzer M.K., Li M., Heidenreich K.A. 2003. Inactivation of the myocyte enhancer factor-2 repressor histone deacetylase-5 by endogenous  $Ca^{2+}$ -calmodulin-dependent kinase II promotes depolarization-mediated cerebellar granule neuron survival. *J. Biol. Chem.* **278** (42), 41472–41481.
123. Cho Y., Sloutsky R., Naegle K.M., Cavalli V. 2013. Injury-induced HDAC5 nuclear export is essential for axon regeneration. *Cell.* **155** (4), 894–908.
124. Xuan A., Long D., Li J., Ji W., Hong L., Zhang M., Zhang W. 2012. Neuroprotective effects of valproic acid following transient global ischemia in rats. *Life Sci.* **90** (11–12), 463–468.
125. Ganai S.A., Ramadoss M., Mahadevan V. 2016. Histone deacetylase (HDAC) inhibitors – emerging roles in neuronal memory, learning, synaptic plasticity and neural regeneration. *Curr. Neuropharmacol.* **14** (1), 55–71.
126. Wang Z.Y., Qin W., Yi F. 2015. Targeting histone deacetylases: Perspectives for epigenetic-based therapy in cardio-cerebrovascular disease. *J. Geriatr. Cardiol.* **12** (2), 153–164.
127. Choudhary C., Kumar C., Gnad F., Nielsen M. L., Rehman M., Walther T.C., Olsen J.V., Mann M. 2009. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science.* **325**, 834–840.
128. Liu F., Yang M., Wang X., Yang S., Gu J., Zhou J., Zhang X.E., Deng J., Ge F. 2014. Acetylome analysis reveals diverse functions of lysine acetylation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell Proteomics.* **13**, 3352–3366.

## Epigenetic Mechanisms of Ischemic Stroke

A. B. Uzdensky<sup>1</sup>, \* and S. V. Demyanenko<sup>1</sup>

Laboratory of Molecular Neurobiology, Academy of Biology and Biotechnology, Southern Federal University, pr. Stachky 194/1, Rostov-on-Don, 344090 Russia

\*e-mail: auzd@yandex.ru

Stroke is one of the main causes of human death and disability. Occlusion of the cerebral vessels in minutes leads to a deficiency of oxygen and glucose and the infarction of the nervous tissue. However, neuroprotectors that defend neurons from ischemic damage have not been found yet. This review examines the biochemical processes leading to cell death in the ischemic brain and the molecular factors that spread the damage to neighboring tissues. Although ischemic damage leads to suppression of biosynthetic processes, some proteins are expressed in the brain after ischemia. Epigenetic processes are among mechanisms accomplishing the global regulation of transcription and protein synthesis and control of the cell functional state. This review considers the main epigenetic processes that regulate gene expression and protein synthesis – methylation of DNA, as well as methylation and acetylation of histones. The main attention is paid to proteins that carry out epigenetic regulation: DNA methyltransferases, histone acetyltransferases, histone deacetylases and their isoforms. Their role in brain responses to ischemic damage is discussed. Modulation of proteins of epigenetic regulation is one of the promising strategies for the treatment of ischemic stroke. The application of inhibitors of histone deacetylase and DNA methyltransferase for neuroprotection in ischemic stroke is discussed.

**Keywords:** ischemic stroke, epigenetic processes, DNA methylation, histone acetylation, histone deacetylase, histone deacetylase inhibitors