

РОЛЬ МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННОГО АНТИОКСИДАНТА SkQ1 В РЕГУЛЯЦИИ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ KEAP1/Nrf2/ARE И АПОПТОЗА В ГОЛОВНОМ МОЗГЕ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Внуков В.В.¹, Гуценко О.И.¹, Милютин Н.П.¹, Ананян А.А.¹, Корниенко И.В.²,
Плотников А.А.¹

¹ Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванковского
ул. Стачки, 194/1, г. Ростов-на-Дону, 344090, РФ; e-mail: natmilut@rambler.ru

² Федеральный исследовательский центр Южный научный центр РАН
ул. Чехова, 41, г. Ростов-на-Дону, 344006, РФ

Поступила в редакцию: 08.07.2019

Аннотация. В работе исследовано влияние митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 на уровень экспрессии гена фактора транскрипции *Nrf2*, *Nrf2*-зависимых генов антиоксидантных ферментов, гена *CASP3* и активность ферментов, кодируемых исследуемыми генами, в коре больших полушарий мозга крыс при окислительном стрессе, индуцированном гипербарооксигенацией (ГБО). Установлено, что в физиологических условиях введение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение 5 дней приводит к значительному повышению уровня мРНК фактора транскрипции *Nrf2* и *Nrf2*-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx4* на фоне базального уровня экспрессии гена *CASP3* в коре больших полушарий мозга крыс. При этом наблюдается активация антиоксидантных ферментов - супероксиддисмутазы (SOD), каталазы (CAT), глутатионпероксидазы (GPx), глутатион-S-трансферазы (GST) и повышение концентрации восстановленного глутатиона (GSH), активность каспазы-3 не изменяется. При ГБО-индуцированном окислительном стрессе (0,5 МПа, 90 мин) отмечено снижение уровня мРНК фактора транскрипции *Nrf2*, значительное повышение экспрессии гена *CASP3*, тогда как не выявлено достоверных различий в транскрипционной активности *Nrf2*-регулируемых генов антиоксидантных ферментов (*SOD1-3*, *CAT*, *GPx4*) в коре больших полушарий мозга крыс. В условиях гипероксии наблюдается повышение интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) на фоне ингибирования CAT и умеренной активации GST, сохранения стационарного уровня активности SOD и GPx и существенной активации каспазы-3 в больших полушариях мозга крыс. Предварительное применение SkQ1 перед сеансом ГБО приводит к повышению уровня мРНК фактора транскрипции *Nrf2* и *Nrf2*-регулируемых генов антиоксидантных ферментов *SOD1-2*, *CAT* и *GPx4* и поддержанию базального уровня экспрессии гена *CASP3* в коре больших полушарий мозга при окислительном стрессе. Одновременно наблюдается увеличение активности антиоксидантных ферментов, содержания восстановленного глутатиона и поддержание близкой к норме активности каспазы-3. Предполагается, что защитный эффект SkQ1 в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса может реализовываться посредством прямого антиоксидантного действия, а также путем стимуляции редокс-зависимой сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE и активации антиапоптотических механизмов.

Ключевые слова: окислительный стресс, гипероксия, митохондриально-направленный антиоксидант, головной мозг, экспрессия генов, антиоксидантные ферменты, каспаза-3.

Окислительный стресс, вызывающий повреждение клеток мозга, вносит существенный вклад в патогенез многих заболеваний нервной системы. В последнее время в качестве чувствительного сенсора и регулятора окислительного стресса рассматривается сигнальный путь Keap1/Nrf2/ARE, который вовлечен в молекулярные механизмы многих патологических процессов [1]. Установлено, что транскрипционный фактор *Nrf2* и его репрессор Keap1 регулируют сеть цитопротекторных генов, включающих около 1% генома [2]. Экспрессия транскрипционного фактора *Nrf2* в ЦНС рассматривается как важный элемент ответной реакции при острых и хронических патологиях нервной системы, связанных с окислительным стрессом [3]. Известно, что окислительный стресс вызывает различные формы гибели клеток, в том числе, апоптоз, который является важнейшей причиной потери нейронов при нейродегенеративных расстройствах, ишемии и травматических повреждениях головного мозга [4, 5]. К распространенным моделям окислительного стресса относится гипербарооксигенация (ГБО), посредством которой исследуются механизмы нарушения свободнорадикального гомеостаза и запрограммированной гибели клеток в нервной и других тканях организма [6]. Установлено, что окислительный стресс, развивающийся при гипероксии, индуцирует митохондриальный и рецепторный пути апоптоза, что рассматривают как важнейший механизм повреждающего действия ГБО [6].

Цель работы – исследование влияния митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 – катионного производного пластохинона – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфония – на уровень экспрессии гена фактора транскрипции *Nrf2*, *Nrf2*-зависимых генов антиоксидантных ферментов, а также гена *CASP3* и активность ферментов, кодируемых исследуемыми генами, в коре больших полушарий мозга крыс при окислительном стрессе, индуцированном гипербарооксигенацией (ГБО).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на беспородных крысах – самцах *Rattus norvegicus* массой 180-200 г. Все подопытные животные были разделены на четыре группы: 1 группа (контроль) – интактные животные, содержащиеся в стандартных условиях вивария; 2 группа – крысы, которым в течение 5 дней вводили препарат SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг, (группа «К+ SkQ1»); 3 группа – животные, подвергнутые действию ГБО (0,5 МПа, 90 мин) с последующей декапитацией через 12 ч после ГБО (группа «ГБО»). Подопытных животных помещали в барокамеру объемом 60 л, снабженную щелочным поглотителем углекислоты. После 3-минутной вентиляции чистым кислородом в барокамере создавалось давление 0,5 МПа. Компрессию и декомпрессию проводили со скоростью 0,2 МПа/мин, изопрессия составляла 90 мин. Данный режим ГБО (0,5 МПа 90 мин) вызывает острый окислительный стресс [7]. 4 группу составили животные, которым в течение 5 дней вводили препарат SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг, а затем через 1 час после последнего введения подвергали действию ГБО (0,5 МПа, 90 мин) с последующей декапитацией через 12 ч после сеанса ГБО – группа («SkQ1 + ГБО»). Препарат вводили в рассчитанной дозе, растворенной в 100 мкл 0,2%-ного раствора этанола в защитные мешки животных. Выбор дозы и схемы введения препарата проводили согласно рекомендациям [8] и собственным исследованиям.

При исследовании экспрессии генов количество животных в каждой из четырех групп составило: 18-22, в биохимических и биофизических исследованиях количество животных во всех группах – 12.

Все процедуры, выполненные на животных, проводились с соблюдением принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в эксперименте или в научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.) и положениями Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях (статья 27).

Анализ экспрессии мРНК проводили с помощью метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) со специфическими праймерами. Для исследования брали 30 мг коры больших полушарий головного мозга. Суммарную РНК выделяли методом гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции с помощью коммерческого набора «РИБО-золь-В» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Качество выделенной РНК оценивали при помощи электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле, количество выделенной РНК определяли по оптической плотности при 260 нм. Для синтеза кДНК использовали набор реагентов для обратной транскрипции («Syntol», Россия), содержащий MMLV-RT (ревертазу вируса лейкемии мышей Молони), праймер Random-6, смесь дезоксирибонуклеотид трифосфатов (dNTP), ингибитор РНКаз.

Исследование уровня экспрессии генов фактора транскрипции Nrf2 (*Nrf2*), изоферментов супероксиддисмутазы – Cu,Zn-СОД (*SOD1*), Mn-СОД (*SOD2*), экстрацеллюлярной СОД – Э-СОД (*SOD3*), каталазы (*CAT*), глутатионпероксидазы 4 (*Gpx4*), каспазы-3 (*CASP3*) выполняли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в присутствии интеркалирующего красителя EVA Green («Molecular probes», США) с использованием набора реагентов для проведения ПЦР-РВ производства «SYNTOLE» (Россия). Для проведения ПЦР-РВ использовался прибор iQ5 real-time PCR detection system («Bio-Rad Laboratories», США). В качестве гена сравнения использовали β -актин (*BACT*). Специфические праймеры подбирали с помощью программы Primer BLAST и Primer 3.

ПЦР-РВ проводили при условиях: 1-й этап – 95 °С 300 с, 2-й этап – 58(60) °С 50 с (детекция флуоресценции), 3-й этап – 95 °С 15 с с переходом на шаг № 2. Этап 2 и 3 повторяли 40 раз, после завершения данной операции получали графики изменения флуоресценции со временем. Специфичность получаемого продукта амплификации проверяли с помощью кривых плавления продуктов ПЦР.

Ткань мозга гомогенизировали в соотношении 1 : 10 (масса/объем) в буфере, состоявшем из 100 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4, 0,5 мМ ЭДТА в гомогенизаторе Potter S (тефлон-стекло) со скоростью 1500 об/мин. Часть полученных гомогенатов обрабатывали Triton X-100 (конечная концентрация 0,1%) и инкубировали в течение 10 мин при 37 °С, затем центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Полученный супернатант использовали для определения активности ферментов.

О состоянии антиоксидантной системы судили по активности супероксиддисмутазы (SOD) [9], каталазы [10], глутатион-зависимой антиоксидантной системы [11]. Определяли активность глутатионпероксидазы (GPx), глутатион-S-трансферазы (GST), содержание восстановленного глутатиона (GSH). Определение активности каспазы-3 проводили с помощью набора «Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric» («Sigma», США). В гомогенатах, не обработанных детергентом, определяли интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) по накоплению молекулярных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов (ДК) [12], малонового диальдегида (МДА) [13], шиффовых оснований [14]. Хлороформный экстракт готовили по методу Bligh и Dyer [15].

Статистический анализ данных проводился при помощи пакета программ Statistica 10 «Stat-Soft». Проверка нормальности распределения проводилась с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для сравнения групп использовали двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующими попарными сравнениями групповых средних (Newman–Keuls test). Множественную линейную регрессию, с включением всех предикторов, использовали для оценки потенциальной взаимосвязи между зависимой переменной – экспрессией гена *CASP3* – и экспрессией гена *Nrf2* и Nrf2-контролируемыми генами антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *SOD2*, *Gpx4*, *CAT*). Различия считали достоверными при $p < 0,05$. При $0,05 < p < 0,1$ рассматривали тенденцию к достоверности различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В проведенном исследовании установлено, что в физиологических условиях применение SkQ1 (50 нмоль/кг, 5 дней) приводит к повышению более, чем вдвое, транскрипционной активности гена *Nrf2* в коре больших полушарий мозга крыс. Влияние SkQ1 на уровень мРНК фактора транскрипции в условиях нормы статистически значимо и на 121% ($F = 13,95$; $p = 0,001$) превышает контроль. В этих же условиях наблюдается повышение уровня мРНК генов антиоксидантных ферментов: *SOD1* – на 41% ($F = 13,95$; $p = 0,0004$), *SOD2* – на 50% ($F = 9,7$; $p < 0,003$), *CAT* – на 62% ($F = 10,66$; $p < 0,002$), *GPx4* – на 58% ($F = 7,81$; $p = 0,007$) на фоне стационарного уровня мРНК гена *SOD3*. Это свидетельствует о повышении уровня экспрессии гена *Nrf2*, способного регулировать собственную транскрипцию и транскрипцию *Nrf2*-зависимых генов антиоксидантных ферментов. Как было показано ранее [16, 17], SkQ1 повышает экспрессию гена *Nrf2* в лейкоцитах периферической крови крыс в физиологических условиях и при окислительном стрессе, индуцированном гипероксией, тем самым оказывая стимулирующее действие на сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE.

В настоящее время открыты различные индукторы *Nrf2*, среди которых важнейшая группа – хиноны природного происхождения (флавоноиды, куркумин, ресвератрол, пластохинон и др.) [6, 18]. Многие авторы указывают, что наличие ОН-групп в орто- и пара-положении в структуре фенольных антиоксидантов обуславливает их стимулирующее влияние на *Nrf2* [18]. Именно такое положение ОН-групп характерно для SkQ1, содержащего в своем составе пластохинон (производное 1,4-бензохинона) [19]. Как известно, антиоксидантные свойства фенольных соединений связаны, в первую очередь, с наличием в их структуре ОН-групп. Можно полагать, что благодаря хинонной составляющей в молекуле SkQ1, последний может индуцировать *Nrf2*. Важно подчеркнуть, что в промоторной области гена *Nrf2* имеются две ARE-подобные последовательности. Вследствие этого *Nrf2* способен регулировать собственную транскрипцию и транскрипцию *Nrf2*-зависимых генов антиоксидантных ферментов через антиоксидант-респонсивные элементы (ARE), которые содержатся в промоторах как *Nrf2*, так и ARE-контролируемых генов [20, 21]. Наличие петли положительной обратной связи внутри сигнального пути Keap1/Nrf2/ARE существенно повышает чувствительность системы и мощность клеточных защитных механизмов [22].

Известно, что *Nrf2* (NF-E2-related factor 2) относится к семейству Cap'n'Collar (CNC), входит в большую группу ДНК-связывающих белков с «лейциновой молнией» bZIP [1] и широко экспрессируется в различных тканях, и, в том числе, в мозге [23]. *Nrf2* контролирует как базальную экспрессию генов в условиях гомеостаза, так и индуцибельную экспрессию множества генов при нарушениях редокс-баланса и развитии окислительного/электрофильного стресса [3].

Действительно индуцированное SkQ1 повышение экспрессии *Nrf2* в коре больших полушарий мозга в физиологических условиях стимулирует увеличение содержания мРНК *Nrf2*-регулируемых генов антиоксидантных ферментов, что может способствовать повышению антиоксидантного потенциала клеток нервной ткани. Установлено, что введение животным SkQ1 в течение 5 дней в условиях физиологической нормы приводит к активации антиоксидантных ферментов в больших полушариях мозга. Показано, что активность SOD повышается на 50% ($F = 32,86$; $p < 0,0001$), каталазы – на 53% ($F = 41,2$; $p < 0,0001$), GPx – на 63% ($F = 23,6$; $p < 0,0001$), GST – на 55% ($F = 23,0$; $p < 0,0001$) относительно контроля, при этом уровень восстановленного глутатиона (GSH) возрастает на 39% ($F = 10,77$; $p = 0,002$). Это имеет особое значение, так как мозг весьма чувствителен к окислительному стрессу, и окислительная модификация компонентов клеток нервной ткани может развиваться как при острых повреждениях, так и хронических расстройствах ЦНС [23].

Полученные результаты показывают, что применение SkQ1 в течение 5 дней в условиях нормы не вызывает изменения интенсивности ПОЛ в больших полушариях мозга.

В данном исследовании после ГБО-индуцированного окислительного стресса (0,5 МПа, 90 мин) выявлено снижение на 23% ($F = 11,83$; $p < 0,001$) транскрипционной активности гена *Nrf2* в мозге крыс. В нашей работе [17], выполненной ранее, также показано ингибирование экспрессии гена *Nrf2* в лейкоцитах крови крыс при ГБО. Снижение экспрессии гена фактора транскрипции при гипероксии вследствие повышенной дегградации *Nrf2*, в свою очередь, неизбежно уменьшит его способность к аутоактивации и ауторегуляции, связанные с наличием в его промоторном регионе ARE-элементов [20]. В исследовании [24] на хромосоме 2 был идентифицирован локус 1, чувствительный к гипероксии, содержащий ген-кандидат *Nrf2*, кодирующий транскрипционный фактор *Nrf2*. Доказано, что мыши с нокаутированным геном *Nrf2* более чувствительны к повреждению легких и клеточной гибели, индуцированных гипероксией, чем дикий тип животных [25]. В то же время при ГБО содержание мРНК генов антиоксидантных ферментов (*SOD1-3*, *CAT*, *GPx4*) незначительно изменяется относительно контроля. Следует отметить, что в исследовании [26] при действии нормобарической гипероксии (95% O₂, 18 ч) также обнаружено существенное снижение экспрессии гена *Nrf2* и отсутствие изменений транскрипционной активности генов антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx1*, *HO1*) в мозге самцов мышей CBA/H. Очевидно, что уровень экспрессии генов, регулирующих состояние антиоксидантной системы, в значительной степени зависит от выраженности окислительного стресса, типа ткани, ее метаболического статуса, взаимодействия сигнальных путей и многих других факторов.

При окислительном стрессе, вызванном ГБО (через 12 ч после воздействия), на фоне незначительных изменений активности СОД наблюдается снижение на 18% активности каталазы ($F = 11,49$; $p < 0,001$), повышение на 18% активности GST ($F = 8,06$; $p < 0,01$) относительно контрольной группы животных, т.е. наблюдается

дисбаланс компонентов антиоксидантной системы. Как правило, нарушение сопряженности функционирования антиоксидантной системы в мозге и других тканях выражено в значительно большей степени сразу после действия гипероксии, чем в течение постгипероксического периода [7].

После ГБО-индуцированного окислительного стресса в мозге крыс наблюдается интенсификация ПОЛ. В группе «ГБО» содержание первичных молекулярных продуктов ПОЛ – диеновых конъюгатов – повышается на 30% ($F = 18,93; p < 0,0001$), промежуточного продукта ПОЛ – МДА – на 42% ($F = 12,95; p < 0,001$), конечных продуктов ПОЛ – шиффовых оснований – на 18% ($F = 7,02; p = 0,015$) относительно контроля.

Предварительное введение SkQ1 (50 нмоль/кг) в течение 5 дней перед сеансом ГБО приводит к достоверному повышению уровня мРНК как гена *Nrf2*, так и *Nrf2*-зависимых генов антиоксидантных ферментов в коре больших полушарий мозга. Установлено, что в группе «SkQ1 + ГБО» уровень мРНК *Nrf2* повышается на 41% ($F = 16,14; p < 0,0003$) по сравнению с контролем и вдвое превышает ее содержание относительно группы «ГБО» ($F = 7,12; p = 0,0012$), в которой не применялся препарат перед действием гипероксии. Повышение экспрессии *Nrf2* в постгипероксический период сопровождается достоверным возрастанием уровня мРНК *Nrf2*-контролируемых генов антиоксидантных ферментов: *SOD1* – на 54% ($F = 9,04; p = 0,005$), *SOD2* – на 48% ($F = 5,12; p = 0,03$), *CAT* – на 39% ($F = 3,08; 0,05 < p < 0,1$), *GPx4* – на 44% ($F = 3,97; p = 0,05$) относительно контроля. Следует отметить, что уровень мРНК генов антиоксидантных ферментов *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx4* достоверно возрастает на 29–72% относительно группы животных, которым не применяли SkQ1 перед воздействием ГБО (группа «ГБО»), что свидетельствует о стимулирующем эффекте препарата. При этом содержание мРНК *SOD3* в этих условиях изменяется незначительно.

Повышение уровня экспрессии *Nrf2* и *Nrf2*-регулируемых генов при введении животным SkQ1 в течение 5 дней перед сеансом ГБО приводит к активации антиоксидантных ферментов в больших полушариях мозга. Показано, что активность SOD возрастает на 43% ($F = 22,72; p < 0,0001$), каталазы – на 27% ($F = 7,95; p = 0,01$), GPx – на 65% ($F = 29,78; p < 0,0001$), глутатион-S-трансферазы – на 25% ($F = 13,76; p < 0,001$) и уровень GSH увеличивается на 35% ($F = 10,76; p = 0,003$) в больших полушариях мозга крыс относительно контроля. При этом в данной группе животных («SkQ1 + ГБО») активность антиоксидантных ферментов (SOD, CAT, GPx) достоверно увеличивается на 27–55% и в два раза возрастает уровень GSH по сравнению с группой «ГБО», которой предварительно не применяли SkQ1, что указывает на эффект препарата. Это существенно повышает антиоксидантный потенциал мозга в постгипероксический период и способствует поддержанию стационарного уровня ПОЛ, что свидетельствует об эффективности применения SkQ1 в условиях окислительного стресса, вызванного гипероксией.

При ГБО в группе с предварительным введением SkQ1 интенсивность ПОЛ в больших полушариях мозга поддерживается на стационарном уровне, но достоверно снижается относительно группы «ГБО», т.е. группы животных, не получавших SkQ1 перед сеансом гипероксии. Уровень ДК снижается на 24% ($F = 6,46; p = 0,015$), МДА – на 25% ($F = 6,39; p = 0,015$), в содержании ШО наблюдается тенденция к снижению ($0,05 < p < 0,1$) по сравнению с группой «ГБО». Таким образом, дисперсионный анализ показывает достоверные различия в содержании продуктов ПОЛ: увеличение их уровня относительно контроля при гипероксии и снижение их содержания в группе «SkQ1 + ГБО» по сравнению с группой «ГБО», что свидетельствует о достоверном эффекте SkQ1.

Таким образом, предварительное применение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение 5 дней в физиологических условиях и перед действием ГБО стимулирует защитную сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE путем стимуляции экспрессии гена фактора транскрипции *Nrf2*, *Nrf2*-зависимых генов антиоксидантных ферментов и повышения их активности.

В проведенном исследовании установлено, что в физиологических условиях применение митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQ1 не приводит к изменению экспрессии гена *CASP3* и активности каспазы-3 в клетках коры головного мозга крыс. Каспаза-3 – внутриклеточная эффекторная протеаза, содержащая активированный цистеин внутри высоко консервативного активного сайта, что определяет связывание субстрата и его гидролиз после аспартата. Фермент локализован в цитоплазме и межмембранном пространстве митохондрий, он является центральным эффектором многих апоптотических путей и фактором терминальной стадии апоптотической гибели нервных и глиальных клеток [27]. Ген *CASP3* локализован в четвертой хромосоме (4q35.1), его промотор лишен ТАТА-бокса и содержит сайты связывания различных факторов транскрипции, регулирующих экспрессию гена [28]. Выявлена многоуровневая регуляция активности каспаз, включая транскрипцию, протеолитический процессинг, модуляцию энзиматической функции и деградацию [27].

При окислительном стрессе, вызванном ГБО (0,5 МПа, 90 мин, через 12 ч после действия) в клетках коры больших полушарий мозга содержание мРНК *CASP3* увеличивается на 57% ($F = 9,96; p = 0,0002$) по сравнению с нормой. Это может свидетельствовать о стимуляции экспрессии гена эффекторной каспазы-3, которая способна к расщеплению множества жизненно важных белковых субстратов клетки в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса. При этом в условиях ГБО найдено достоверное увеличение на 89% ($F = 62,15; p < 0,0001$) активности каспазы-3 в коре полушарий мозга относительно контроля.

Очевидно, что повышение транскрипционной активности гена эффекторной каспазы-3 в условиях окислительного стресса может быть следствием различных причин, среди которых важное место принадлежит факторам транскрипции, регулирующим экспрессию гена. Анализ промотора гена *CASP3* выявил сайты связывания для различных факторов транскрипции: кластеров Sp1, Ets1-подобных элементов [28], AP1, NF-kB, p53 и др. [29]. В то же время в условиях гипероксии показана активация этих и других транскрипционных

факторов, которые могут активировать ген *CASP3* и способствовать повышению интенсивности апоптоза [30]. Снижение транскрипционной активности гена *Nrf2* в коре больших полушарий мозга крыс при ГБО также может способствовать усилению запрограммированной гибели клеток. Поскольку известно, что антиапоптотические белки семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL) в своих промоторах содержат ARE-последовательности, с которыми связывается транскрипционный фактор Nrf2, регулируя их экспрессию [31]. Дефицит антиапоптотических белков семейства Bcl-2 может приводить к повышению проницаемости наружной мембраны митохондрий (MOMP), выходу цитохрома *c*, образованию апоптосомы и запуску каспазного каскада с последующим расщеплением и активацией каспазы-3.

Предварительное применение SkQ1, катионного производного пластохинона, в течение 5 дней перед действием гипероксии способствует сохранению уровня экспрессии гена *CASP3* и активности каспазы-3, которые характерны для нормы. Этот результат заслуживает особого внимания, вследствие того, что поддержание базального уровня активности каспаз в условиях окислительного стресса относится к перспективным стратегиям нейропротекции. Можно полагать, что одной из причин нормализующего влияния SkQ1 на экспрессию гена *CASP3* и активность фермента в мозге крыс при ГБО-индуцированном окислительном стрессе является активация транскрипционной активности гена *Nrf2* и Nrf2-контролируемых генов антиоксидантных ферментов. Это, с одной стороны, приводит к снижению уровня окислительного стресса, вызванного ГБО, и нормализации транскрипционной активности гена *CASP3*, который, как известно, активируется редокс-чувствительными факторами транскрипции. С другой стороны, повышение экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL, регулируемых Nrf2, предотвращает формирование апоптосомы, где по механизму индуцированного сближения активируется каспаза-9, активирующая затем каспазу-3.

Таким образом, антиапоптотический эффект SkQ1 в ткани мозга при гипероксии связан с предотвращением повышения экспрессии гена *CASP3* в коре и активности эффекторной каспазы в кортикальных отделах мозга. Протекторное действие SkQ1 при ГБО-индуцированном стрессе опосредуется разнообразным спектром антиоксидантных эффектов и стимуляцией антиапоптотических факторов.

Далее с помощью линейной множественной регрессии был проведен анализ потенциальной взаимосвязи между экспрессией гена *CASP3* и уровнями экспрессии *Nrf2* и Nrf2-контролируемых генов антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *SOD2*, *Gpx4*, *CAT*) в качестве возможных предикторов. Наиболее значимой ($R = 0,750$, $R^2 = 0,562$) из всех возможных регрессионных моделей оказалась модель, в которой оценивалось вероятное влияние предикторов на уровень экспрессии гена *CASP3* в гипероксических условиях (табл. 1). Из таблицы 1 видно, что из пяти генов-предикторов значимое влияние на уровень экспрессии *CASP3* при гипероксии могут оказать два – транскрипционный уровень генов *CAT* и *Gpx4*. При этом, с активацией экспрессии *CASP3* связано снижение экспрессии гена *CAT* ($B = -3,43$; 95% CI (-6,74 и -0,13), $p = 0,043$) и, напротив, повышение экспрессии гена *Gpx4* ($B = 0,16$, 95% CI (0,04 и 0,27), $p = 0,013$). Остальные проанализированные регрессионные модели не включали значимых предикторов и характеризовались низкими коэффициентами детерминации. Проведение регрессионного анализа позволило выявить определенную взаимосвязь уровня экспрессии гена *CASP3* и генов антиоксидантных ферментов. Обратная зависимость экспрессии генов *CASP3* и *CAT* при гипероксии может быть обусловлена важнейшей ролью гидропероксида (H_2O_2) в индукции апоптоза [32]. С другой стороны, не исключено, что прямая взаимосвязь между экспрессией генов *CASP3* и *Gpx4* является компенсаторной реакцией генома на окислительный стресс при гипероксии. Известно, что *Gpx4* синтезируется как короткая (20 кДа) и длинная (23 кДа) изоформы, причем последняя локализована в митохондриях и играет ведущую роль в защите клетки от окислительного стресса и апоптоза [33]. Показано, что делеция гена *Gpx4* у мышей вызывает не только эмбриональную и неонатальную летальность, но и гибель взрослых животных. Кроме того, у мышей, дефицитных по *Gpx4*, наблюдалась митохондриальная дисфункция, повышенный уровень апоптоза и нейродегенерация [34].

Таким образом, защитный эффект SkQ1 в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса может реализоваться посредством прямого антиоксидантного действия, а также путем стимуляции редокс-зависимой сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE и активации антиапоптотических механизмов.

Таблица 1. Результаты регрессионного анализа: модель, в которой зависимой переменной является уровень экспрессии гена *CASP3* при гипероксии, в качестве независимых предикторов – уровни экспрессии генов *Nrf2*, *SOD1*, *SOD2*, *Gpx4* и *CAT*

| Предиктор | B-коэффициент | SE(B) ¹ | β-коэффициент | t | p | 95% CI для B | |
|-------------|---------------|--------------------|---------------|--------|--------------|----------------|-----------------|
| | | | | | | Нижняя граница | Верхняя граница |
| (Константа) | 0,149 | 0,036 | | 4,164 | 0,001 | 0,071 | 0,227 |
| <i>Nrf2</i> | -3,371 | 3,176 | -0,215 | -1,061 | 0,309 | -10,290 | 3,548 |
| <i>SOD1</i> | 0,059 | 0,091 | 0,126 | 0,642 | 0,533 | -0,140 | 0,257 |
| <i>SOD2</i> | -0,320 | 0,241 | -0,445 | -1,329 | 0,208 | -0,844 | 0,204 |
| <i>CAT</i> | -3,431 | 1,517 | -0,542 | -2,261 | 0,043 | -6,736 | -0,125 |
| <i>Gpx4</i> | 0,156 | 0,054 | 0,819 | 2,894 | 0,013 | 0,038 | 0,273 |

*Значимые предикторы выделены жирным шрифтом ($p < 0,05$)

¹ – Стандартная ошибка B-коэффициента

Исследование выполнено на оборудовании ЦКП "Высокие технологии" ЮФУ в рамках базовой части госзадания Минобрнауки РФ, проект № 6.6762.2017/БЧ.

Список литературы / References:

1. Suzuki T., Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1–Nrf2 system, *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, vol. 88, no. 6. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.
2. Holmström K.M., Baird L., Zhang Y., Hargreaves I., Chalasani A., Land J.M., Stanyer L., Yamamoto M., Dinkova-Kostova A.T. Abramov A.Y. Nrf2 impacts cellular bioenergetics by controlling substrate availability for mitochondrial respiration. *Biology Open*, 2013, vol. 2, no. 8, DOI: 10.1242/bio.20134853.
3. Tebay L.E., Robertson H., Durant S.T., Vitale S.R., Penning T.M., Dinkova-Kostova A.T., Haye J.D. Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease. *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, vol. 88, pt. B, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.
4. Sinha K., Das, J., Pal P.B., Sil P.C. Oxidative stress: the mitochondria dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis, *Arch. Toxicol.*, 2013, vol. 87, no. 7, DOI: 10.1007/s00204-013-1034-4
5. Redza-Dutordoir M., Averill Bates D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species, *Biochim. Biophys. Acta*, 2016, vol. 1863, no. 12, DOI: 10.1016/j.bbamer.
6. Gore A., Muralidhar M., Espey M.G., Degenhardt K., Mantell L.L. Hyperoxia sensing: from molecular mechanisms to significance in disease, *J. Immunotoxicol.*, 2010, vol. 7, no. 4, DOI: 10.3109/1547691X.2010.492254
7. Лукаш А.И., Внуков В.В., Ананян А.А., Милютин Н.П., Кваша П.Н. *Металлосодержащие соединения плазмы крови при гипербарической оксигенации. (Экспериментальные и клинические аспекты)*, Ростов-на-Дону: Изд-во РГУ, 1996, 107 с. [Lukash A.I., Vnukov V.V., Ananyan A.A., Milyutina N.P., Kvasha P.N. *Metal-containing compounds of blood plasma during hyperbaric oxygenation. (Experimental and clinical aspects)*, Rostov-on-Don: RSU, 1996, 107 p. (In Russ.)]
8. Chistyakov V.A., Serezhenkov V.A., Alexandrova A.A., Milyutina N.P., Prokof'ev V.N., Mashkina E.V., Gutnikova L.V., Dem'yanenko S.V. Effect of plastoquinone derivative 10-(6'-plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium (SkQ1) on contents of steroid hormones and NO level in rats, *Biochemistry (Moscow)*, 2010, vol. 75, no. 11. DOI: 10.1134/S0006297911060150.
9. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы. *Вопр. мед. химии*, 1999, т. 45, с. 14-15. [Sirota T.V. New approach to investigation of autooxidation of adrenaline and its use for change of superoxide dismutase. *Vopr. Med. Khim.*, 1999, vol. 45, pp. 14-15. (In Russ.)]
10. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы. *Лаб. дело*, 1988, № 1, с. 16-19. [Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Maiorova I.G., Tokarev V.E. A method for determination of catalase activity, *Lab. Delo*, 1988, no. 1, pp. 16-19. (In Russ.)]
11. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. *Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма. Методические рекомендации*. СПб: ИКФ «Фолиант», 2000, 104 с. [Arutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zybina N.N. *Metodi otsenki svobodnoradikalnogo okislenia i antioksidantnoi sistemi organizma. Metodicheskie rekomendatsii (Methods for assessing free radical oxidation and the body's antioxidant system. Guidelines)*, SPb: IKF "Foliant", 2000, 104 p. (In Russ.)]
12. Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот. *Современные методы в биохимии* (под ред. В.Н. Ореховича), М.: Медицина, 1977, с. 63–64. [Stalnaya I.D. Method for determination of diene conjugation of unsaturated higher fatty acids. *Modern methods in biochemistry* (V.N. Orechovich, ed.), M.: Medicine, 1977, pp.63-64. (In Russ.)]
13. Стальная И.Д., Гаришвили Т.Г. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. *Современные методы в биохимии* (под ред. В.Н. Ореховича), М.: Медицина, 1977, с. 66-68. [Stalnaya I.D., Garishvily T.G. Method for the determination of malonic dialdehyde using thiobarbituric acid. *Modern methods in biochemistry* (V.N. Orechovich, ed.), M.: Medicine, 1977, pp. 66-68. (In Russ.)]
14. Bidlack, W.R., Tappel, A.T. Fluorescent products of phospholipids during lipid peroxidation. *Lipids*, 1973, vol. 8, no. 4. DOI: 10.1007/BF02544636.
15. Bligh, E., Dyer, W. Rapid method of lipids extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 1959, vol. 37, no. 8. DOI: 10.1139/o59-099.
16. Vnukov V.V., Gutsenko O.I., Milyutina N.P., Ananyan A.A., Danilenko A.O., Panina S.B., Kornienko I.V. Influence of SkQ1 on Expression of Nrf2 Transcription Factor Gene, ARE-Controlled Genes of Antioxidant Enzymes and Their Activity in Rat Blood Leukocytes. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, vol. 80, no. 5. DOI: 10.1134/S0006297915050107.
17. Vnukov V.V., Gutsenko O.I., Milyutina N.P., Kornienko I.V., Ananyan A.A., Danilenko A.O., Panina S.B., Plotnikov A.A., Makarenko M.S. Influence of SkQ1 on Expression of Nrf2 Gene, ARE-Controlled Genes of Antioxidant Enzymes and Their Activity in Rat Blood Leukocytes under Oxidative Stress. *Biochemistry (Moscow)*, 2015, vol. 80, no.12, DOI: 10.1134/S0006297915120081.
18. Forman H.J., Davies K.J.A., Ursini F. How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and parahormesis versus free radical scavenging *in vivo*. *Free Radic. Biol. Med.*, 2014, vol. 66, SI. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.045.

19. Antonenko Y.N., Avetisyan A.V., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Chertkov V.A., Domnina L.V., Ivanova O.Y., Izyumov D.S., Khailova L.S., Klishin S.S., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Muntyan M.S., Nepryakhina O.K., Pashkovskaya A.A., Pletjushkina O.Y., Pustovidko A.V., Roginsky V.A., Rokitskaya T.I., Ruuge E.K., Saprunova V.B., Severina I.I., Simonyan R.A., Skulachev I.V., Skulachev M.V., Sumbatyan N.V., Sviryaeva I.V., Tashlitsky V.N., Vassiliev J.M., Vyssokikh M.Y., Yaguzhinsky L.S., Zamyatin A.A., Jr., Skulachev V.P. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of the aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and *in vitro* studies. *Biochemistry (Moscow)*, 2008, vol. 73, no. 12, DOI: 10.1134/S0006297908120018.
20. Kwak M.K., Itoh K., Yamamoto M., Kensler T.W. Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the *nrf2* promoter. *Mol. Cell Biol.*, 2002, vol. 22, no. 9, DOI: 10.1128/mcb.22.9.2883-2892.2002.
21. Harder B., Jiang T., Wu T., Tao S., Rojo de la Vega M., Tian W., Chapman E., Zhang D.D. Molecular mechanisms of Nrf2 regulation and how these influence chemical modulation for disease intervention. *Biochem. Soc. Trans.*, 2015, vol. 43, no. 4, DOI: 10.1042/BST20150020.
22. Bryan H.K., Olayanju A., Goldring C.E., Park B.K. The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochem. Pharmacol.*, 2013, vol. 85, no. 4, DOI: 10.1042/BST20150020.
23. Sandberg M., Patil J., D'Angelo B., Weber S.G., Mallard C. NRF2-regulation in brain health and disease: Implication of cerebral inflammation. *Neuropharmacology*, 2014, vol. 79, SI, DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.11.004
24. Cho H.-Y., Jedlicka A.E., Reddy S.P., Zhang L.Y., Kensler T.W., Kleeberger S.R. Linkage analysis of susceptibility to hyperoxia. *Nrf2* is a candidate gene. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2002, vol. 26, no. 1, DOI: 10.1165/ajrcmb.26.1.4536.
25. Reddy S.P. The antioxidant response element and oxidative stress modifiers in airway diseases. *Curr. Mol. Med.*, 2008, vol. 8, no. 5.
26. Saric A., Sobocanec S., Safranko Z.M., Hadzija M.P., Bagaric R., Farkas V., Svarc A., Marotti T., Balog T. Diminished resistance to hyperoxia in brains of reproductively senescent female CBA/H mice. *Med. Sci. Monit. Basic Res.*, 2015, vol. 21, no. 9. DOI: 10.12659/MSMBR.895356.
27. Parrish A.B., Freel C.D., Kornbluth S. Cellular mechanisms controlling caspase activation and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2013, vol. 5, no. 6. DOI: 10.1101/cshperspect.a008672.
28. Liu W., Wang G., Yakovlev F.G. Identification and functional analysis of the rat caspase-3 gene promoter. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, no. 10, DOI: 10.1074/jbc.M110768200.
29. Song B., Xie B., Wang C., Li M. Caspase-3 is a target gene of c-Jun: ATF2 heterodimers during apoptosis induced by activity deprivation in cerebellar granule neurons. *Neurosci. Lett.*, 2011, vol. 505, no. 2. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.09.060.
30. Terraneo L., Samaja M. Comparative response of brain to chronic hypoxia and hyperoxia. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 9. DOI: 10.3390/ijms18091914.
31. Niture S.K., Jaiswal A.K. Nrf2 protein upregulates antiapoptotic protein Bcl-2 and prevents cellular apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 2012, vol. 287, no. 13. DOI: 10.1074/jbc.M111.312694.
32. Zhang L., Wang K., Lei Y., Li Q., Nice E.C., Huang C. Redox signaling: Potential arbitrator of autophagy and apoptosis in therapeutic response. *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, vol. 89, no. 12. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.
33. Liang H., Ran Q., Jang Y.C., Holstein D., Lechleiter J., McDonald-Marsh T., Musatov A., Song W., Van Remmen H., Richardson A. Glutathione peroxidase 4 differentially regulates the release of apoptogenic proteins from mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.*, 2009, vol. 47, no. 3. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.
34. Yoo S.-E., Chen L., Na R., Liu Y., Rios C., Van Remmen H., Richardson A., Ran Q. Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain. *Free Radic. Biol. Med.*, 2012, vol. 52, no. 9, DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.

THE ROLE OF MITOCHONDRIA-TARGETED ANTIOXIDANT SkQ1 IN REGULATION OF SIGNAL SYSTEM KEAP1/Nrf2/ARE AND APOPTOSIS IN THE BRAIN UNDER OXIDATIVE STRESS**Vnukov V.V.¹, Gutsenko O.I.¹, Milyutina N.P.¹, Ananyan A.A.¹, Kornienko I.V.², Plotnikov A.A.¹**¹ Southern Federal University, Academy of Biology and Biotechnology

Stachky av., 194/1, Rostov-on-Don, 344090, Russia; e-mail: natmilut@rambler.ru

² Federal Research Center Southern Scientific Center of the Russian Academy of Sciences

Chechov str., 41, Rostov-on-Don, 344006, Russia

Abstract. The administration of SkQ1 (50 nmol/kg for 5 days) significantly increased mRNA level of transcription factor *Nrf2* and *Nrf2*-controlled genes encoding antioxidant enzymes *SOD1*, *SOD2*, and *CAT* with inconsiderable changes in mRNA level of *SOD3* and *GPx4* in the cerebral cortex of rat brain. This was accompanied by the activation of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx, GST) and increase in reduced glutathione level. Hyperoxia-induced oxidative stress (0.5 Pa for 90 min) decreased the mRNA level of transcription factor *Nrf2*; the changes in transcriptional activity of *Nrf2*-induced genes encoding antioxidant enzymes (*SOD1-3*, *CAT*, *GPx4*) were insignificant in rat cerebral cortex. Hyperoxia resulted in increased lipid peroxidation intensity, inhibition of CAT, and increase in GST activity, and maintenance of stationary level of SOD and GPx activity in rat cerebral cortex. Pretreatment with SkQ1 before hyperoxic exposure lead to increase in mRNA level of transcription factor *Nrf2* and *Nrf2*-induced genes encoding antioxidant enzymes *SOD1-2*, *CAT*, and *GPx4*; *SOD3* expression was unchanged in the cerebral cortex under oxidative stress. The activity of these antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPx, GST) and reduced glutathione level were concurrently increased. The effect of the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 on the level of expression of the *CASP3* gene and the caspase-3 activity in the cortex of the cerebral hemispheres was studied in normal conditions and in HBO-induced oxidative stress. It was found that under physiological conditions the applying of SkQ1 (50 nmol/kg, 5 days) does not lead to a change in the expression of the *CASP3* gene and caspase-3 activity in the cells of the cerebral cortex. In HBO-induced oxidative stress (0.5 MPa, 90 min), a significant increase in the mRNA level of the *CASP3* gene and caspase-3 activity in the cortex of the cerebral hemispheres was revealed. The preliminary applying of SkQ1 before the HBO session promotes maintaining the basal level of expression of the *CASP3* gene and the activity of the enzyme in the cells of the cerebral cortex and also leads to the normalization of caspase-3 activity. We suggest that the protective effect of SkQ1 under hyperoxia-induced oxidative stress may be realized via direct antioxidant activity, the activation of defense system Keap1/Nrf2/ARE and stimulation of antiapoptotic mechanisms.

Key words: oxidative stress, hyperoxia, mitochondria-targeted antioxidant, brain, gene expression, antioxidant enzymes, caspase-3.