

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ  
РАБОТЫ

УДК 616.092.9

УРОВЕНЬ КАРБОНИЛИРОВАНИЯ БЕЛКОВ И АКТИВНОСТЬ  
ПРОТЕАЗ В МОЗГЕ НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС С ПРЕНАТАЛЬНОЙ  
ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИЕЙ

© 2022 г. А. В. Яковлев<sup>1</sup>\*, С. А. Дмитриева<sup>2</sup>, А. Н. Краснова<sup>1</sup>, О. В. Яковлева<sup>1</sup>, Г. Ф. Ситдикова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Казанский Федеральный университет, Казань, Россия

<sup>2</sup> Казанский институт биохимии и биофизики, ФИЦ КазНЦ РАН, Казань, Россия

Поступила в редакцию 10.03.2022 г.

После доработки 19.04.2022 г.

Принята к публикации 27.04.2022 г.

Гомоцистеин – серосодержащая аминокислота, образующаяся из метионина, является фактором риска развития целого ряда патологий. Повышение уровня гомоцистеина (гипергомоцистеинемия, ГГЦ) во время беременности приводит к различным осложнениям беременности, гипоксии плода и, как следствие, развитию ранних и отсроченных постнатальных патологий. Одним из основных механизмов действия гомоцистеина является окислительный стресс. Целью нашего исследования было проанализировать окислительную модификацию белков и активность протеаз, а также уровень окислительного стресса в ткани головного мозга крыс с пренатальной ГГЦ в первую неделю после рождения. Экспериментальная модель ГГЦ создавалась у самок крыс путем использования корма с повышенным содержанием метионина в течение 3 недель до начала и во время беременности. Было показано, что в гомогенате ткани мозга потомства с пренатальной ГГЦ наблюдалось усиление спонтанного карбонилирования белков, что свидетельствует о падении резервно-адаптационного потенциала клеток мозга и снижении устойчивости ткани к действию свободных радикалов. В мозге крыс с пренатальной ГГЦ была увеличена активность кислых и нейтральных протеаз, что, по-видимому, обусловлено агрегацией и фрагментацией белковых молекул вследствие карбонилирования аминокислотных остатков. Ткани мозга новорожденных крыс с пренатальной ГГЦ характеризовались высоким содержанием  $H_2O_2$ , маркера перекисного окисления липидов – малонового диальдегида, а также снижением активности антиоксидантных ферментов. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о значительном усилении необратимого процесса окислительной модификации белков в головном мозге новорожденных крыс с пренатальной ГГЦ в результате развития окислительного стресса. Эти процессы вносят вклад в механизмы нейротоксичности гомоцистеина в критический период развития мозга, когда в условиях повышенной нейропластичности наблюдается интенсивный нейрогенез, синаптогенез и формирование нервных сетей.

*Ключевые слова:* окислительная модификация белков, пренатальная гипергомоцистеинемия, мозг, протеазы, антиоксидантные системы, перекисное окисление липидов

DOI: 10.31857/S1027813322030141

ВВЕДЕНИЕ

Мозг плода чрезвычайно пластичен и уязвим к воздействиям как окружающей, так и внутренней среды, которые могут иметь долгосрочные последствия для здоровья и развития потомства [1]. Известно, что ведущая роль в возникновении и развитии пренатального стресса принадлежит окислительным реакциям, которые приводят к увеличению концентрации активных форм кислорода (АФК) и стимуляции процессов свободно-радикального окисления [2]. Избыточная продукция АФК на ранних сроках беременности вызывает

повреждение клеточных мембран плода, что во многом определяет долговременные постнатальные изменения в головном мозге, и является одной из причин развития нейродегенеративных заболеваний [3]. Одним из факторов, вызывающих окислительный стресс в тканях плода является гомоцистеин и его продукты [4–9]. Повышение уровня гомоцистеина в крови матери свыше 12 мкм/л, называемое гипергомоцистеинемией (ГГЦ), является результатом генетических дефектов ферментов метаболизма метионина, дефицита фолиевой кислоты и других витаминов группы В (В6, В12), приема противосудорожных препаратов и других факторов [6, 10]. ГГЦ вызывает эндотелиальные дисфункции и считается факто-

\* Адресат для корреспонденции: 420008 Казань, ул. Кремлевская 18, e-mail: alv.yakovlev@gmail.com.

ром риска развития сердечно-сосудистых заболеваний, а также патологий центральной и периферической нервной системы, таких как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, шизофрения, эпилепсия, боковой амиотрофический склероз и мигрень [6, 11, 12].

Гомоцистеин и продукты его метаболизма способны свободно проникать через плацентарный и гематоэнцефалический барьер [13], вызывая нарушения кровообращения плаценты, хроническую фетоплацентарную недостаточность и внутриутробную гипоксию плода [14, 15], а также оказывать нейротоксические эффекты на развивающийся мозг как в эмбриональном, так и в раннем постнатальном периоде развития. Помимо окислительного стресса нейротоксическое действие гомоцистеина обусловлено его способностью активировать ионотропные и метаболитные глутаматные рецепторы [16–20], вызывать нейровоспаление, активацию глиальных клеток, нарушение целостности мембран и, в конечном счете, апоптоз нейронов [21–25]. Эти процессы лежат в основе нарушения формирования нейрональных сетей мозга, поскольку именно в раннем постнатальном онтогенезе происходит миграция и дифференцировка нейронов, созревание синапсов [26]. Одним из последствий ГГц также является снижение активности ферментов, синтезирующих эндогенный газотрансмиттер – сероводород, который проявляет антиоксидантные свойства [8, 9], а также участвует в регуляции плацентарной сосудистой сети [27].

АФК взаимодействуют с функциональными группами аминокислот, вызывая окислительную модификацию белков (ОМБ), включающую процессы карбонилирования аминокислотных остатков, образование дисульфидов, S-нитрозилирование и окисление до сульфопроизводных продуктов и гомоцистеинилирование [28–31]. Сравнительный анализ чувствительности к окислению белков и липидов под действием АФК показал, что белки реагируют раньше на действие радикалов, чем липиды [32]. Модификация белков делает их более чувствительными к протеолизу за счет активации протеаз. Повышение активности нейтральных и кислых протеаз в различных структурах мозга было показано при окислительном стрессе [33], что, по мнению авторов, связано с усилением входа ионов кальция в клетку. С другой стороны, карбонилирование белков может приводить к образованию комплексов, защищённых от действия протеаз и снижению скорости протеолитических реакций [34].

Целью нашей работы было проанализировать окислительную модификацию белков и активность протеаз, а также уровень окислительного стресса в тканях головного мозга крыс в модели пренатальной ГГц в первую неделю после рождения.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Объект исследования.** Исследование проводили на крысах линии Wistar в течение первой недели после рождения. Эксперименты выполнены с соблюдением принципов Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными и одобрены локальным этическим комитетом Казанского федерального университета (протокол № 8 от 05.05.2015). Были приняты меры для использования минимального количества экспериментальных животных. Животные содержались в стандартных условиях вивария и имели постоянный доступ к воде. Крысы получали стандартный комбикорм для лабораторных крыс и мышей “Дельта Фидс”, ДБК 120 С-19 (АО “БиоПро”, Новосибирская обл., Россия). Самки крыс были разделены на две группы. Одна группа находилась весь период на контрольной диете, а другая группа получала корм с повышенным содержанием метионина (7.7 г/кг корма) в течение 3 недель до начала и во время беременности, а также 3 недели после родоразрешения [8, 9, 35].

**Определение содержания гомоцистеина.** Забор крови у крыс проводили путем пункции сердца или надреза десны животного [36, 37]. Полученные образцы центрифугировались в течение 15 мин при 1500 g. Гомоцистеин в плазме крови крыс определялся с использованием набора Homocysteine Colorimetric Assay Kit (E-BC-K143, ElabScience, США) спектрофотометрическим методом с использованием ИФА-ридера (Multiskan FS, Thermo Fisher Scientific, США). Концентрация гомоцистеина в плазме у контрольных самок составляла  $7.9 \pm 0.3$  мкМ ( $n = 12$ ), а у самок, получавших метионин, –  $27.3 \pm 2.4$  мкМ ( $n = 15$ ,  $p < 0.05$ ) [8, 9].

**Обработка ткани мозга.** Для исследований использовали мозг новорожденных крыс в возрасте от 2 до 7 дней после рождения. Ткани мозга после декапитации немедленно замораживались в жидком азоте и хранились при  $-80^\circ\text{C}$  до начала анализа. Для измерения редокс-метаболизма ткани мозга гомогенизировали в 20 мМ HEPES (pH 7.2) (1 : 9 – масса : объем), центрифугировали при 10000 g в течение 10 мин при  $4^\circ\text{C}$ , и супернатант использовали для анализа. Содержание общего белка оценивали прямым методом по оптической плотности 1 мкл супернатанта при длине волны 280 нм с помощью спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные значения содержания белка в мг/мл использовали для количественного выражения содержания окисленных белков и активности ферментов.

**Анализ спонтанной и металл-зависимой (индуцированной) окислительной модификации белков (ОМБ).** Уровень спонтанной ОМБ определяется количеством присутствующих в пробе карбонильных производных белков. Метод основан на реакции взаимодействия карбонильных произ-

водных окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином (2,4-ДНФГ) с образованием окрашенных 2,4-динитрофенилгидразонов [28]. Реакцию проводили в 100 мкл образца с добавлением 1 мл 0.01 М 2,4-ДНФГ, растворенного в 2 М HCl. Пробы инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 1 ч, затем центрифугировали в течение 15 мин при 10000 g. Полученный осадок промывали смесью этанол : этилацетат (1 : 1) для удаления липидов и 2,4-ДНФГ, не прореагировавшего с карбонильными группами окисленных белков, и растворяли в 3 мл 8 М раствора мочевины; для лучшего растворения к осадку добавляли 2 М HCl. Оценка металл-зависимой ОМБ проводилась после предварительной инкубации с реактивом Фентона, содержащем 0.4 мМ FeSO<sub>4</sub> и 0.1 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение часа. Оптическую плотность образовавшихся производных 2,4-ДНФГ определяли при длине волны 363 нм ( $\epsilon = 22 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) с помощью спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, США). Содержание окисленных белков выражали в нг/мг белка.

Для оценки резервно-адаптационного потенциала ткани мозга использовали соотношение концентрации спонтанно окисленных к уровню металл-индуцированных карбонильных производных белков, принимая последний за 100%. Чем больше доля спонтанной ОМБ, тем меньше резервно-адаптационный потенциал исследуемого образца [26, 28].

Общую протеолитическую активность измеряли с использованием специфического протеазного субстрата – азоказеина (Sigma Aldrich, США) [38]. Для исследования активности кислотных протеаз в пробирку вносили 400 мкл 1 мМ ацетатного буфера (pH 5.5), а цитоплазматических протеаз – 400 мкл 1 мМ HEPES буфера (pH 7.2). Полученные растворы смешивали с 10 мкл 0.1% раствора Triton X-100, затем в пробирку добавляли 400 мкл 0.4% азоказеина, 200 мкл супернатанта, 5 мкл 250 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанола и инкубировали в течение 12 ч при 30°C. Реакцию останавливали путем добавления 100 мкл 50% ТХУ, затем центрифугировали 10 мин при 10000 g. Оптическую плотность супернатанта измеряли при длине волны 330 нм с использованием спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, США). Протеазную активность рассчитывали по изменению оптической плотности азоказеина и представляли в виде удельной активности в единицу времени, пересчитанной на количество белка в пробе ( $U_{PT}/\text{мин мкг}$ ).

Интенсивность перекисного окисления липидов определяли в растворимой фракции гомогената ткани мозга по содержанию малонового диальдегида (МДА), реагирующего с тиобарбитуровой кислотой. Образцы смешивали с реактивом, содержащим 0.3% Тритона X-100, 0.1 М HCl и 0.03 М 2-тиобарбитурата. Смесь инкубировали в течение 45 мин при 95°C, затем центрифугировали в течение

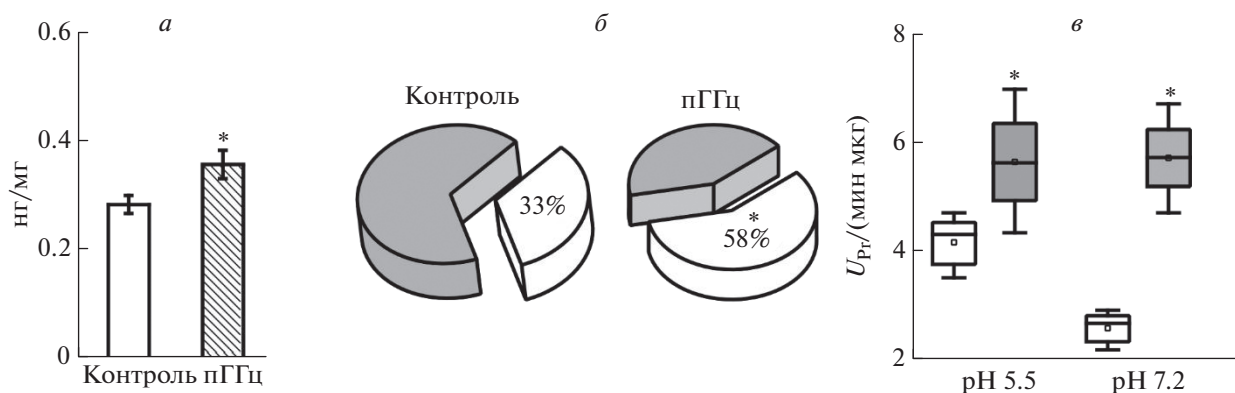
10 мин при 10000 g. Оптическую плотность измеряли при длине волны 532 нм с использованием спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, США). Концентрация МДА в пробах рассчитывалась с использованием молярного коэффициента экстинкции ( $\epsilon = 1.55 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) и выражалась в мкг/г ткани.

Содержание перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) определяли методом, основанным на реакции окисления пероксидами Fe(II) до Fe(III) с реагентом FOX1 и последующим образованием красно-фиолетового ферроксисеннолового комплекса с максимумом поглощения при длине волны 560 нм с использованием спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, США). В состав реагента входили: 0.5 мМ FeSO<sub>4</sub>, 0.5 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 50 мМ H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 мМ ксиленил оранж, 200 мМ сорбитол (Sigma Aldrich, США). Супернатант и реагент смешивали в соотношении 1 : 1 при комнатной температуре, через 30 мин измеряли оптическую плотность. Содержание H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> рассчитывали по стандартной калибровочной кривой с известными концентрациями H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и выражали в мкг/г ткани.

Активность супероксиддисмутазы (SOD) определяли с помощью нитросинего тетразолия (NBT) в системе ксантин – ксантиноксидаза [39]. Реакционная смесь объемом 500 мкл содержала 100 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 7.4), 0.1 мМ ЭДТА, 1 мМ цитохрома C, 1 мМ ксантина, 0.04 мМ NBT и 150 мкл образца. Реакция инициировалась добавлением 50 мкл 0.5 ед. ксантиноксидазы. Процентное ингибирование восстановления NBT, пропорциональное активности SOD, присутствующей в образце, определяли на спектрофотометре Lambda-25 (Perkin Elmer, США) при длине волны 560 нм. За единицу активности SOD принимали количество фермента, способного подавить на 50% реакцию восстановления NBT, а удельная активность выражали в единицах на миллиграмм белка ( $U_{SOD}/\text{мин мкг}$ ).

Активность каталазы (CAT) определяли по скорости разложения H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $\epsilon = 0.44 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ ) при длине волны 240 нм [39] с помощью спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, США). Реакционная смесь (500 мкл) содержала 50 мМ HEPES (pH 7.0), 40 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и 150 мкл образца. Реакцию инициировали добавлением H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. За единицу активности каталазы принимали количество субстрата (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) в мкМ, преобразуемого ферментом в единицу времени (мин), рассчитанное на мг сырой ткани в пробе ( $U_{CAT}/\text{мин мкг}$ ).

Активность глутатионпероксидазы (GPx) определяли по методу Вейдера и Каллена [40]. В присутствии глутатионредуктазы и НАДФН окисленный глутатион (GSH) превращается в восстановленную форму (GSSG) с сопутствующим окислением НАДФН в НАДФ. Скорость реакции, катализи-



**Рис. 1.** Уровень ОМБ и протеолитической активности ферментов в головном мозге крыс с пренатальной ГГц. (а) Уровень спонтанной ОМБ в контроле и в условиях пренатальной ГГц (пГГц). (б) Вклад спонтанной ОМБ в металл-катализируемое окисление, принятое за 100% в контроле и в условиях пренатальной ГГц. (в) Общая протеолитическая активность кислых (рН 5.5) и нейтральных (рН 7.2) протеаз в тканях мозга животных из контрольной (белый) и ГГц (серый) групп. Боксплот – 25–75% проценталь, усы – минимальное и максимальное значения, поперечная линия – медиана, квадрат – среднее значение. \*  $p < 0.05$  относительно контроля.

руемой GPx, оценивали с помощью спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, США) по уменьшению оптической плотности раствора при длине волны 340 нм ( $\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). Реакционная смесь (400 мкл) состояла из 50 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  буфера (рН 7.2), 1 мМ восстановленного глутатиона, 0.5 единицы глутатионредуктазы, 0.15 мМ НАДФН, 1 мМ ЭДТА и 150 мкл образца. Одна единица GPx определяется как 1 мкМ глутатиона, потребляемого в минуту, а удельная активность указывается в единицах на мг белка в минуту ( $U_{\text{GPx}}/\text{мин мг}$ ).

**Активность глутатионредуктазы (GR)**, которая катализирует НАДФН-зависимое восстановление окисленного глутатиона до восстановленного, определяли с помощью спектрофотометра Lambda-25 (Perkin Elmer, США) при длине волны 412 нм. Предварительно пробы разводили в NEPES (рН 8.0) до конечного объема 500 мкл в соотношении 1 : 9. Тиоловые группы ( $-\text{SH}$ ) в пробе восстанавливали в течение 5 мин с использованием 10 мкл 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ , затем образцы инкубировали в течение 5 мин с 10 мкл свежеприготовленного раствора каталазы (Sigma Aldrich, США). Реакцию инициировали внесением в пробу НАДФН в объеме 10 мкл до конечной концентрации 0.1 мМ. Активность глутатионредуктазы оценивали по изменению содержания глутатиона с помощью 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты и выражали в единицах на мг белка ( $U_{\text{GR}}$  нмоль/мин мг).

**Статистическая оценка различий** в сравниваемых выборках оценивалась для 5% уровня значимости. Нормальность распределения выборки определяли при помощи F-теста Фишера и критерия Шапиро–Уилка с использованием программы OriginPro 8.5 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, США). Достоверность различий оценивали с помощью критерия Манна–Уитни для непараметрических

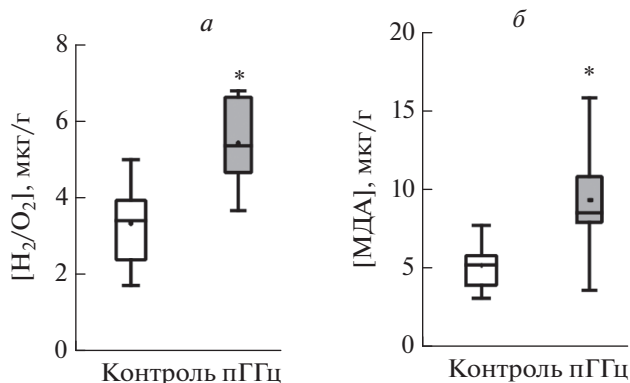
выборок (OriginPro 8.5, OriginLab Corporation, Northampton, MA, США), где  $n$  – количество животных. Все измерения проводили не менее, чем в 3 параллельных пробах, используя для повторения животных из разных пометов. Экспериментальные данные в тексте представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования показали, что содержание продуктов спонтанной ОМБ в тканях мозга крыс с пренатальной ГГц в течение первой недели постнатального развития существенно выше, чем в контрольной группе. Средний уровень карбонильных производных в гомогенате мозга крыс (P2–P7) в контрольной группе составлял  $0.28 \pm 0.02$  нг/мг белка ( $n = 5$ ), а у крыс с пренатальной ГГц –  $0.36 \pm 0.03$  нг/мг белка ( $n = 5, p < 0.05$ , рис. 1а).

Индукцированная ОМБ отражает количество всех имеющихся на данный момент в ткани молекул, которые могут подвергнуться карбонилированию [26]. У животных контрольной группы уровень металл-катализируемой ОМБ составил  $0.86 \pm 0.03$  нг/мг белка ( $n = 5$ ), тогда как у крыс с пренатальной ГГц количество индуцированной ОМБ было меньше –  $0.61 \pm 0.07$  нг/мг белка ( $n = 5, p < 0.05$ ). Далее был проведен анализ вклада спонтанной ОМБ в металл-индуцируемое окисление. Оказалось, что доля спонтанной ОМБ в группе ГГц составляла 58% ( $n = 5, p < 0.05$ ), тогда в контрольной группе – 33% ( $n = 5$ ; рис. 1б).

Известно, что продукты ОМБ способны вызывать повышение проницаемости мембран лизосом и усиливать активность лизосомальных ферментов [41]. В следующей серии экспериментов была проанализирована активность протеаз в тканях мозга



**Рис. 2.** Концентрация  $\text{H}_2\text{O}_2$  (а) и маркера перекисного окисления липидов – МДА (б) в тканях головного мозга крыс с пренатальной ГГЦ. Боксплот – 25–75% проценталь, усы – минимальное и максимальное значения, поперечная линия – медиана, квадрат – среднее значение. \*  $p < 0.05$  относительно контроля.

крыс с пренатальной ГГЦ. Общая протеолитическая активность кислых протеаз при pH 5.5 составляла в контроле  $4.16 \pm 0.23 U_{Pr}/\text{мин мкг}$  и в группе ГГЦ –  $5.65 \pm 0.54 U_{Pr}/\text{мин мкг}$  ( $n = 4$ ,  $p < 0.05$ , рис. 1в). Кроме того, наблюдали двукратное увеличение активности нейтральных протеаз в тканях мозга крыс с пренатальной ГГЦ ( $5.72 \pm 0.41 U_{Pr}/\text{мин мкг}$ ,  $n = 4$ ,  $p < 0.05$ , рис. 1б) по сравнению с группой контроля ( $2.58 \pm 0.14 U_{Pr}/\text{мин мкг}$ ,  $n = 5$ ).

АФК являются основными индукторами ОМБ [31]. Для оценки степени окислительного стресса исследовали уровень  $\text{H}_2\text{O}_2$  и МДА, продукта перекисного окисления липидов в тканях головного мозга животных. Уровень  $\text{H}_2\text{O}_2$  в контрольной группе составил  $3.4 \pm 0.4$  мкг/г ( $n = 15$ ), а в группе ГГЦ –  $5.4 \pm 0.5$  мкг/г ( $n = 6$ ,  $p < 0.05$ ; рис. 2а). Уровень МДА в контрольной группе составил  $5.2 \pm 0.3$  мкг/г ( $n = 15$ ), а у животных группы ГГЦ –  $9.4 \pm 0.9$  мкг/г ( $n = 13$ ,  $p < 0.05$ ; рис. 2б).

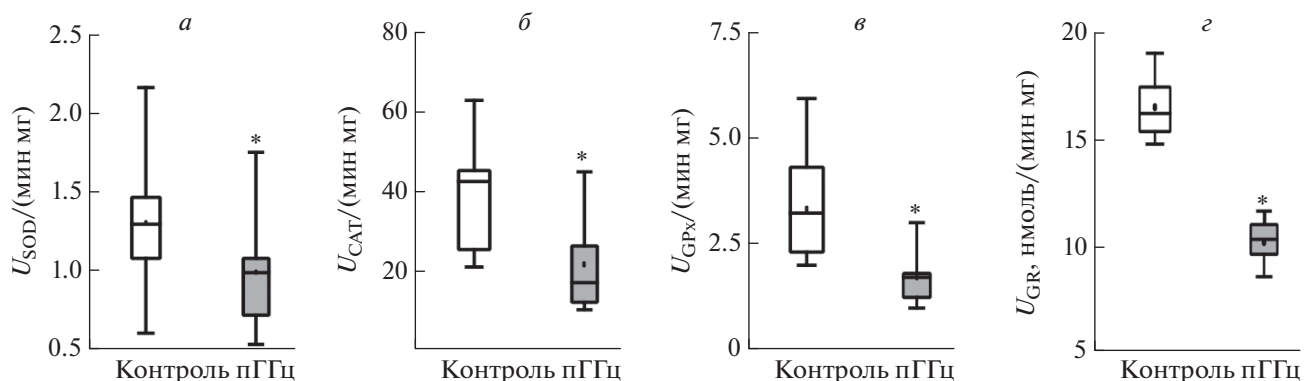
Активность антиоксидантных ферментов – SOD, CAT, GPx и GR была достоверно ниже у животных с пренатальной ГГЦ. Активность SOD в контроле составила  $1.31 \pm 0.11 U_{SOD}/\text{мин мг}$  ( $n = 13$ ) и в группе ГГЦ –  $0.99 \pm 0.14 U_{SOD}/\text{мин мг}$  ( $n = 12$ ,  $p < 0.05$ ; рис. 3а). Активность CAT в контроле составила  $39.31 \pm 5.35 U_{cat}/\text{мин мг}$  ( $n = 7$ ), а у крыс с пренатальной ГГЦ –  $21.91 \pm 4.54 U_{cat}/\text{мин мг}$  ( $n = 7$ ,  $p < 0.05$ ; рис. 3б).

В контроле показатели активности GPx и GR составляли  $3.41 \pm 0.53 U_{GPx}/\text{мин мг}$  ( $n = 11$ ) и  $16.55 \pm 0.65 U_{GR}/\text{нмоль/мин мг}$  ( $n = 6$ ), соответственно. У крыс с пренатальной ГГЦ активность GPx составляла  $1.8 \pm 0.3 U_{GPx}/\text{мин мг}$  ( $n = 10$ ,  $p < 0.05$ ) и GR –  $10.17 \pm 0.41 U_{GR}/\text{нмоль/мин мг}$  ( $n = 6$ ,  $p < 0.05$ ), соответственно (рис. 3в, г).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании было продемонстрировано, что высокий уровень гомоцистеина у самок во время беременности вызывает следующие изменения в ткани мозга потомства на первой неделе постнатального развития: повышение уровня карбонильных производных белков, увеличение доли спонтанного окисления в металл-индуцированной модификации белков, одновременно с выраженным снижением антиоксидантной защиты и усилением продукции перекиси водорода и перекисного окисления липидов, и повышение общей протеолитической активности.

Нервная ткань характеризуется высокой чувствительностью к повреждающему действию свободных радикалов из-за повышенного содержания субстратов перекисного окисления (полиненасыщенных жирных кислот и ионов металлов) и низкой активностью антиоксидантных ферментов в сочетании с высокой интенсивностью обменных процессов [42, 43]. Особенно это характерно для раннего периода онтогенеза, когда благодаря вы-



**Рис. 3.** Активность антиоксидантных систем супероксиддисмутазы (а), каталазы (б), глутатионпероксидазы (в) и глутатионредуктазы (г) в тканях мозга крыс с пренатальной ГГЦ. Боксплот – 25–75% проценталь, усы – минимальное и максимальное значения, поперечная линия – медиана, квадрат – среднее значение. \*  $p < 0.05$  относительно контроля.

сокому уровню нейропластичности происходит интенсивный нейрогенез, синаптогенез, что сопровождается повышением синтеза белков и липидов, нейроспецифических ростовых факторов и медиаторов [26].

Накопление гомоцистеина в ранний период онтогенеза в различных отделах головного мозга приводит к усилению перекисного окисления липидов, снижению общей антиокислительной активности и экспрессии адгезивных белков, участвующих в процессах синаптической пластичности [44], окислительному повреждению ДНК и белков [5], повышению активности каспазы-3 [21], что нарушает созревание нейрональных сетей в первые недели постнатального развития крыс [45]. Действительно, увеличение возбудимости нейронов наряду со снижением частоты гигантских деполяризующих потенциалов, необходимых для установления межнейронных связей, было показано в гиппокампе новорожденных крыс с пренатальной ГГц [46].

ОМБ является одним из ранних и наиболее надежных маркеров окислительного стресса [47, 48], затрагивает рецепторы и каналы мембраны, белки цитоскелета, факторы транскрипции [49]. Ряд исследователей полагают, что ОМБ является превалирующим механизмом токсического действия гомоцистеина, приводящим к ингибированию  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы в нейронах гиппокампа и миндалины [50, 51], а также ферментов антиоксидантной защиты [23, 25, 52, 53]. Действительно, в наших экспериментах уровень карбонильных производных белков, являющихся одним из типов необратимой ОМБ в тканях мозга крыс с пренатальной ГГц, был выше на 30% по сравнению с контролем.

Известно, что в физиологических условиях интенсивность ОМБ повышается в течение раннего постнатального онтогенеза и зависит от процессов созревания нервной системы, в том числе миелинизации нервных волокон и формирования новых синапсов [48]. Максимальный пик ОМБ регистрировался к 2–3-м неделям постнатального развития мозга крыс. В то же время патологические факторы в период эмбриогенеза, включая пренатальный стресс, усиливают спонтанный и индуцированный ОМБ в гиппокампе, стриатуме и гипоталамусе крыс в первый месяц постнатального развития [26]. Нами было отмечено увеличение доли спонтанной ОМБ у животных с пренатальной ГГц с 33% до 58%, что говорит о значительном падении резервно-адаптационного потенциала клеток мозга и свидетельствует как о снижении устойчивости системы к действию свободных радикалов, так и о нарушении процессов метаболизма белков. Подобные изменения отмечались также в скелетной, сердечной и гладкомышечной тканях при умеренной ГГц у взрослых животных [54, 55].

Карбонилирование аминокислотных остатков способствует агрегации и фрагментации белковых

молекул и, как следствие, резкому повышению их чувствительности к деградации протеазами [56]. Дестабилизация лизосомальной мембраны в результате окислительного стресса вызывает высвобождение и активацию лизосомальных цистеиновых протеаз — катепсинов, что вызывает повреждение клеточных структур [57]. В наших экспериментах в ткани мозга крыс с пренатальной ГГц возрастала общая протеолитическая активность при pH 5.5, что указывает на активацию лизосомальных протеаз. Кроме того, мы наблюдали усиление активности цитоплазматических протеаз, что согласуется с данными об увеличении активности внелизосомальной фракции протеаз в клетках гладкой мускулатуры, печени и почек при ГГц [55]. Полученные данные свидетельствуют об активации системы протеолиза в первую неделю развития мозга крыс с пренатальной ГГц.

Триггером ОМБ является окислительный стресс, характерный для ГГц и показанный в нашем исследовании у животных первой недели после рождения, у которых наблюдалось высокое содержание  $\text{H}_2\text{O}_2$  и МДА с одновременным снижением активности антиоксидантных ферментов — SOD, CAT, GPx и GR.

В условиях ГГц снижение активности SOD и CAT может быть обусловлено как инактивацией ферментов вследствие окисления тирозиновых аминокислотных остатков пероксинитритами и другими АФК, так и с угнетением их экспрессии за счет изменения метилирования ДНК [1, 19, 23, 30, 45, 53]. В условиях окислительного стресса из-за быстрого окисления глутатиона соотношение восстановленного/окисленного глутатиона падает [53]. Снижение активности как глутатионпероксидазы, так глутатионредуктазы, вызванное ГГц, может приводить к нарушению метаболизма глутатиона и уменьшению его уровня [8, 53, 58]. В результате полного или частичного истощения запасов глутатиона в клетках мозга крыс будет усиливаться карбонилирование белков и активность сериновых протеаз [60–62], что и наблюдалось в головном мозге крыс с пренатальной ГГц.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашей работы показывают значительное усиление необратимого процесса ОМБ в головном мозге новорожденных крыс с пренатальной ГГц вследствие развития окислительного стресса. Принимая во внимание описанные здесь эффекты и литературные данные, можно предложить, что в условиях ГГц матери в тканях мозга новорожденных крыс происходит ослабление антиоксидантной защиты, преобладание генерации АФК над их деградацией, накопление супероксидных и гидроксильных радикалов, что стимулирует перекисное окисление липидов и активирует ОМБ, которая, в свою очередь, может служить источником генерации новых свободных радикалов и дальнейшей инактивации антиоксидантных си-



стем, приводя к клеточной гибели и нарушению развития нервной ткани развивающегося организма.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета и поддержана ФИЦ КазНЦ РАН (Д.С.А.).

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена за счет средств РНФ 20-15-00100.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

*Конфликт интересов.* Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

*Этическое одобрение.* Исследование выполнено с соблюдением принципов Хельсинской декларации о гуманном обращении с животными и одобрено локальным этическим комитетом Казанского федерального университета (протокол № 8 от 05.05.2015).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арутюнян А.В., Керкешко Г.О., Милютин Ю.П., Щербицкая А.Д., Залозная И.В. // Биохимия. 2021. Т. 86. № 6. С. 871–884.
2. Marseglia L., D'Angelo G., Manti S., Arrigo T., Barberi I., Reiter R.J., Gitto E. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2014. № 358375.
3. Мальцева Н.В., Волчегорский И.А., Шемяков С.Е. // Нейрохимия. 2017. Т. 34. № 1. С. 54–61.
4. Baydas G., Koz S.T., Tuzcu M., Nedzvetsky V.S., Etem E. // Int. J. Dev. Neurosci. 2007. V. 25. P. 133–139.
5. Koz S.T., Gouwy N.T., Demir N., Nedzvetsky V.S., Etem E., Baydas G. // Int. J. Dev. Neurosci. 2010. V. 28. P. 325–329.
6. Troen, A.M. // Prog. Neuropsychopharm. Biol. Psychiatry. 2005. V. 29. P. 1140–1151.
7. Арутюнян А.В., Пустыгина А.В., Милютин Ю.П., Залозная И.В., Козина Л.С. // Молекулярная медицина. 2015. № 5. С. 41–46.
8. Yakovleva O., Bogatova K., Mukhtarova R., Yakovlev A., Shakhmatova V., Gerasimova E., Ziyatdinova G., Hermann A., Sitdikova G. // Biomolecules. 2020. V. 10. № 7. P. 995.
9. Yakovleva O.V., Ziganshina A.R., Dmitrieva S.A., Arslanova A.N., Yakovlev A.V., Minibayeva F.V., Khaertdinov N.N., Ziyatdinova G.K., Giniatullin R.A., Sitdikova G.F. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2018. V. 2018. № 2. P. 2746837–2746837.
10. Sharma M., Tiwari M., Tiwari R.K. // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2015. V. 117. P. 287–296.
11. Herrmann W., Obeid R. // Clin Chem Lab Med. 2011. V. 49. № 3. P. 435–441.
12. Gerasimova E., Burkhanova G., Chernova K., Zakharov A., Enikeev D., Khaertdinov N., Giniatullin R., Sitdikova G. // Behavioural Brain Resh. 2021. V. 409. P. 1–8.
13. Beard R.S., Reynolds J.J., Bearden S.E. // Blood. 2011. V. 118. № 7. P. 2007–2014.
14. Милютин Ю.П., Щербицкая А.Д., Салтыкова Е.Д., Козина Л.С., Журавин И.А., Наливаева Н.Н., Арутюнян А.В. // Росс. физ. журнал. им. И.М. Сеченова. 2017. Т. 103. № 11. С. 1280–1291.
15. Dai C., Fei Y., Li J., Shi Y., Yang X. // BioMed. Res. International. 2021. V. 2021. № 6652231.
16. Bolton A.D., Phillips M.A., Constantine-Paton M. // J. Neurophysiol. 2013. V. 16. № 110. P. 1567–1582.
17. Abushik P.A., Niitykoski M., Giniatullina R., Shakhirzyanova A., Bart G., Fayuk D. // J. Neurochem. 2014. V. 11. № 129. P. 264–274.
18. Lipton S.A., Kim W.K., Choi Y.B., Kumar S., D'Emilia D.M., Rayuda P.V., Arnelle D.R., Stamper J.S. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1997. V. 94. P. 5923–5928.
19. Sibarov D.A., Abushik P.A., Giniatullin R., Antonov S.M. // Front. Cell. Neurosci. 2016. V. 10. № 246.
20. Курмашова Е.Д., Гатаулина Э.Д., Зефиоров А.Л., Ситдткова Г.Ф., Яковлев А.В. // Росс. физ. журнал. им. И.М. Сеченова. 2019. Т. 105. № 10. С. 1236–1246.
21. Арутюнян А.В., Милютин Ю.П., Щербицкая А.Д., Керкешко Г.О., Залозная И.В., Михель А.В. // Биохимия. 2020. Т. 85. № 2. С. 248–259.
22. Арутюнян А.В., Козина Л.С., Арутюнов В.А. // Журнал акушерства и женских болезней. 2010. № 59. С. 16–23.
23. Pustygina A.V., Milyutina Y.P., Zaloznyaya I.V., Arutyunyan A.V. // Neurochem. J. 2015. V. 9. P. 60–65.
24. Longoni A., Bellaver B., Bobermin L.D., Santos C.L., Nonose Y., Kolling J., Dos Santos T.M., de Assis A.M., Quincozes-Santos A., Wyse A.T.S. // Mol. Neurobiol. 2018. V. 55. № 3. P. 1966–1976.
25. Shcherbitskaia A.D., Vasilev D.S., Milyutina Yu.P., Tumanova N.L., Mikhel A.V., Zalozniaia I.V., Arutyunyan A.V. // Cells. 2021. V. 10. № 6. P. 1536.
26. Вьюшина А.В., Притворова А.В., Флеров М.А. // Нейрохимия. 2012. Т. 29. № 3. С. 240–246.
27. Cindrova-Davie T., Herrera E.A., Niu Y., Kingdom J., Giussani D.A., Burton G.J. // Am. J. Pathol. 2013. V. 182. P. 1448–1458.
28. Дубинина Е.Е. Физиологические и клиничко-биохимические аспекты. СПб.: Медицинская пресса, 2006. 400 с.
29. Sibrian-Vazquez V., Escobedo J.O., Lim S., Samoei G.K., Strongin R.M. // Proc. National Academy of Sciences. 2010. V. 107. № 2. P. 551–554.
30. Perla-Kajan J., Twardowski T., Jakubowski H. // Amino Acids. 2007. V. 12. № 32. P. 561–572.
31. Stadtman E.R. // Free Radical Res. 2006. V. 40. P. 1250–1258.
32. Reinheckel T., Noack H., Lorenz S., Wiswedel I., Augustin W. // Free Radical Res. 1998. V. 29. P. 297–305.
33. Телушкин П.К. // Проблемы эндокринологии. 1998. Т. 44. № 3. С. 35–37.
34. Nyström T. // EMBO J. 2005. V. 24. № 7. P. 1311–1317.
35. Gerasimova E.E., Yakovleva O.V., Burkhanova G., Ziyatdinova G., Khaertdinov N., G. Sitdikova G. // BioNanoScience. 2017. V. 7. № 1. P. 55–158.
36. Parasuraman S., Raveendran R., Kesavan R. // J. Pharmacology & Pharmacotherapeutics. 2010. V. 1. № 2. P. 87–93.
37. Teixeira de Oliveira D., Souza-Silva E., Tonussi C.R. // Scand. J. Lab. Anim. Sci. 2009. V. 36. № 2. P. 109–113.
38. Śliwa-Józwick A., Józwick I.A., Fronczyk W., Guskiewicz I.A., Kołataj A. // Animal Science Papers and Reports. 2004. V. 22. № 2. P. 237–245.

39. Fulle S., Di Donna S., Puglielli C., Pietrangelo T., Beccafico S., Bellomo R., Protasi F., Fanò G. // *Exp. Gerontol.* 2005. V. 40. P. 189–197.
40. Weydert C.J., Cullen J.J. // *Nat Protoc.* 2010. V. 5. P. 51–66.
41. Brunk, U.T. Neuzil J., Eaton J.W. // *Redox Rep.* 2001. V. 6. № 2. P. 91–97.
42. Aruoma O., Halliwell B., Laughton M.J. // *Biochem. J.* 1989. V. 258. № 2. P. 617–620.
43. Болдырев А.А. // Соросовский образовательный журнал 2001. № 4. С. 21–28.
44. Hoffman K.B., Murray B.A., Lynch G., Munirathinam S., Bahr B.A. // *Neuroscience Res.* 2001. V. 39. № 2. P. 167–173
45. Blaise S.A., Nédélec E., Schroeder H., Alberto J.M., Bossenmeyer-Pourie C., Guéant J.L., Daval J.L. // *The American Journal of Pathology.* 2007. V. 170. № 2. P. 667–679.
46. Yakovlev A.V., Kurmasheva E.D., Giniatullin R., Khalilov I., Sitdikova G.F. // *Neurosci.* 2017. V. 340. P. 153–165.
47. Губский Ю.И., Беленичев И.Ф., Павлов С.В., Левицкий Е.Л., Бухтиярова Н.В. // *Современные проблемы токсикологии.* 2006 Т. 2. С. 37–43.
48. Bizzozero O.A. // *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology* / Ed. Lajtha A., Banik N., Ray S.K. Boston: Springer, 2009. P. 543–562.
49. Wehr N.B., Levine R.L. // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 965. P. 265–281.
50. Streck E.L., Matte C., Vieira P.S., Rombaldi F., Wannmacher C.M.D., Wajner M., Wyse A.T.S. // *Neurochem. Res.* 2002. V. 27. № 12. P. 1593–1598.
51. Matte C., Mackedanz, V., Stefanello, F.M., Schererna E.B.S. Andrezza A.C., Zanotto C., Moro A.M., Garcia S.C., Gonçalves C.A., Erdtmann B., Salvador M., Wyse A.T.S. // *Neurochem. Int.* 2009. V. 54. P. 7–13.
52. Durmaz A., Dikmen N. // *J Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2007. V. 22. № 6. P. 733–738.
53. Lubos E., Loscalzo J., Handy D.E. // *Antioxid. Redox Signal.* 2007. V. 9. P. 1923–1940.
54. Ильичева А.С., Фомина М.А. // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова.* 2015. Т. 1. С. 45–51.
55. Фомина М.А., Терентьев А.А. // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова.* 2018. Т. 26. № 2. С. 195–212.
56. Shringarpure R., Davies K.J.A. // *Free Radic. Biol. Med.* 2002. V. 32. № 11. P. 1084–1089.
57. Tiwari S.C., Soni R.M. // *J. Alzheimer's Disease & Parkinsonism.* 2014. № 4. P. 5–9.
58. Durmaz A., Dikmen N. // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 2007. V. 22. № 6. P. 733–738.
59. Dasgupta A., Zheng J., Bizzozero O.A. // *ASN NEURO.* 2012. V. 4. № 3. art: e00084.
60. Zheng J., Hu Ch.-L., Shanley K.L., Bizzozero O.A. // *Neurochem. Res.* 2018. V. 43. P. 609–618.
61. Mandaviya P.R., Stolk L., Heil S.G. // *Mol. Genet. Metab.* 2014. V. 113. P. 243–252.
62. de Moreira S.D., Figueiró P.W., Siebert C., Prezzi C.A., Rohden. F, Guma F.C.R., Manfredini V., Wyse A.T.S. // *Neurotox. Res.* 2018. V. 33. № 3. P. 580–592.

## Levels of Protein Carbonylation and Activity of Proteases in the Brain of Newborn Rats with Prenatal Hyperhomocysteinemia

A. V. Yakovlev<sup>a</sup>, S. A. Dmitrieva<sup>b</sup>, A. N. Krasnova<sup>a</sup>, O. V. Yakovleva<sup>a</sup>, and G. F. Sitdikova<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Kazan Federal University, Kazan, Russia

<sup>b</sup> Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics, FRC Kazan Scientific Center of RAS, Kazan, Russia

Homocysteine is a sulfur-containing amino acid formed from methionine and considered as a risk factor for a number of pathologies. An increase in the homocysteine level (hyperhomocysteinemia, HHcy) during pregnancy leads to various complications of pregnancy, fetal hypoxia and, consequently, development of early and delayed postnatal pathologies. One of the main mechanisms of homocysteine action is induction of oxidative stress. The aim of our study was to analyze oxidative modification of proteins and activity of proteases, as well as the level of oxidative stress in the brain tissue of rats with prenatal HHcy in the first week after birth. The experimental HHcy was induced in female rats by feeding them with elevated amounts of methionine for 3 weeks before, during and after pregnancy. In the homogenates of brain tissue of offspring with prenatal HHcy a significant increase in spontaneous protein carbonylation was observed. This result indicates a decrease in the reserve-adaptive potential of brain cells and the decrease in the resistance of the tissue to the action of free radicals. In the brains of rats with prenatal HHcy the activity of acidic and neutral proteases was higher compared to controls which could be a result of aggregation and fragmentation of protein molecules due to carbonylation of amino acid residues. Brain tissues of newborn rats with prenatal HHcy were also characterized by a high content of hydrogen peroxide, malondialdehyde as the marker of lipid peroxidation, along with a decrease in the activity of antioxidant enzymes: superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase. Thus, the data obtained indicate a significant increase in the irreversible process of oxidative modification of proteins in the brain of newborn rats with prenatal HHcy because of the oxidative stress. These processes contribute to the mechanisms of homocysteine neurotoxicity during the critical period of brain development in the early postnatal period, when intensive neurogenesis, synaptogenesis, and neuroplasticity take place.

*Keywords:* oxidative modification of proteins, prenatal hyperhomocysteinemia, brain, proteases, antioxidant systems, lipid peroxidation