

УДК 616.12-008.46-036.12-037:616.146.2-073.432  
<https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-2-78-87>

## Уровень мРНК генов антиоксидантной системы и активность НАДФН-генерирующих ферментов при ротенон-индуцированном паркинсонизме у крыс

Крыльский Е.Д., Разуваев Г.А., Попова Т.Н., Нихаев Л.Е., Акинина А.И.

Воронежский государственный университет (ВГУ)  
 Россия, 394018, г. Воронеж, Университетская пл., 1

### РЕЗЮМЕ

**Цель.** Исследование уровня мРНК генов антиоксидантных ферментов и регулирующих их экспрессию транскрипционных факторов Nrf2 и Foxo1, активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат-изоцитратдегидрогеназы (НАДФ-ИДГ), а также анализ корреляционных связей между данными параметрами, состоянием оксидативного статуса и моторно-координационными показателями у крыс с ротенон-индуцированным паркинсонизмом.

**Материалы и методы.** Исследование было выполнено на крысах самцах Вистар в возрасте 4–6 мес и массой 200–250 г. Паркинсонизм моделировали путем подкожного введения в течение 10 сут ротенона в дозе 2,5 мг/кг. Для подтверждения развития патологии использовали моторно-координационные тесты и гистологические методы с окрашиванием коры полушарий и полосатого тела головного мозга гематоксилином и эозином. Состояние оксидативного статуса оценивали на основании концентрации диеновых конъюгатов, карбонильных остатков аминокислот в белках и  $\alpha$ -токоферола. Активность ферментов исследовали спектрофотометрически по образованию НАДФН. Для анализа уровня мРНК генов использовали метод полимеразной цепной реакции в реальном времени.

**Результаты.** В ходе исследования у крыс опытной группы по сравнению с контролем наблюдалось возрастание в сыворотке крови и мозге концентрации диеновых конъюгатов, карбонильных остатков аминокислот, а также  $\alpha$ -токоферола, что могло быть связано с перераспределением данного соединения между тканями при развитии патологии. Для животных с экспериментальным паркинсонизмом, кроме этого, было характерно снижение уровня мРНК генов *Sod1*, *Gpx1*, *Gsr*, *Gsta2*, *Nfe2l2* и *Foxo1*, а также активности Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ. У крыс с экспериментальным паркинсонизмом была найдена отрицательная корреляция активности НАДФ-ИДГ в мозге с концентрацией  $\alpha$ -токоферола в сыворотке и положительная – с уровнем мРНК *Gpx1* и *Foxo1* в полосатом теле головного мозга. Уровень окислительно-модифицированных белков в мозге животных с патологией отрицательно коррелировал с концентрацией мРНК *Gsta2* в полосатом теле, а удельная активность Г6ФДГ в сыворотке характеризовалась наличием положительной взаимосвязи с силой хвата.

**Заключение.** Полученные данные свидетельствуют, что угнетение транскрипции генов антиоксидантных ферментов и регуляторных факторов Nrf2 и Foxo1 вносило существенный вклад в развитие окислительного стресса при БП. Наблюдаемое снижение активности Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ уменьшало доступность НАДФН – лимитирующего фактора для функционирования глутатионовой антиоксидантной системы, что также, очевидно, являлось важным патогенетическим фактором прогрессирования патологии. Наряду со снижением в тканях мозга содержания мРНК генов антиоксидантных ферментов, у крыс с паркинсонизмом возрастала концентрация  $\alpha$ -токоферола, что могло быть результатом развития дисбаланса в функционировании антиоксидантной системы.

**Ключевые слова:** болезнь Паркинсона, окислительный стресс, антиоксидантная система, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, НАДФ-изоцитратдегидрогеназа

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

✉ Крыльский Евгений Дмитриевич [evgenij.krylsky@yandex.ru](mailto:evgenij.krylsky@yandex.ru)

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии финансирования при проведении исследования.

**Соответствие принципам этики.** Исследование одобрено этическим комитетом по экспертизе биомедицинских исследований Воронежского государственного университета (протокол № 42-02 от 04.10.2021).

**Для цитирования:** Крыльский Е.Д., Разуваев Г.А., Попова Т.Н., Нихаев Л.Е., Акинина А.И. Уровень мРНК генов антиоксидантной системы и активность НАДФН-генерирующих ферментов при ротенон-индуцированном паркинсонизме у крыс. *Бюллетень сибирской медицины*. 2023;22(2):78–87. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-2-78-87>.

## mRNA level of antioxidant genes and activity of NADPH-generating enzymes in rotenone-induced parkinsonism in rats

Kryl'skii E.D., Razuvaev G.A., Popova T.N., Nikhaev L.E., Akinina A.I.

Voronezh State University

1, Universitetskaya Sq., Voronezh, 394018, Russian Federation

### ABSTRACT

**Aim.** To analyze the mRNA level of genes encoding antioxidant enzymes and the transcription factors Nrf2 and Foxo1 regulating their expression and the activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and NADP-dependent isocitrate dehydrogenase (NADP-IDH) and assess the correlation between these parameters, oxidative status, and motor coordination parameters in rats with rotenone-induced parkinsonism.

**Materials and methods.** The study was performed on male Wistar rats aged 4–6 months and weighing 200–250 g. Parkinsonism was modeled by subcutaneous administration of rotenone for 10 days at a dose of 2.5 mg / kg. To confirm the development of the pathology, motor coordination tests and histological staining of the cerebral cortex and striatum with hematoxylin and eosin were used. The oxidative status was analyzed based on the levels of conjugated dienes, carbonyl amino acid residues in proteins, and  $\alpha$ -tocopherol. The enzyme activity was studied spectrophotometrically by the formation of NADPH. Real-time PCR was used to analyze the level of gene mRNA.

**Results.** During the study, an increase in serum and brain concentrations of conjugated dienes, carbonyl amino acid residues, and  $\alpha$ -tocopherol was observed in the experimental group of rats compared to the controls. It could be associated with the redistribution of this compound between tissues during pathology development. The animals with experimental parkinsonism, in addition, were characterized by a decrease in the mRNA level of the *Sod1*, *Gpx1*, *Gsr*, *Gsta2*, *Nfe2l2*, and *Foxo1* genes, as well as the activity of G6PDH and NADP-IDH. In the rats with experimental parkinsonism, a negative correlation of NADPH-IDH activity in the brain with serum  $\alpha$ -tocopherol level and a positive correlation with *Gpx1* and *Foxo1* mRNA levels in the striatum were found. The level of oxidatively modified proteins in the brain of the animals with PD was negatively correlated with the concentration of *Gsta2* mRNA in the striatum, while the specific activity of G6PDH in the serum was characterized by the positive relationship with grip strength.

**Conclusion.** The data obtained indicate that the inhibition of transcription of the genes encoding antioxidant enzymes and regulatory factors Nrf2 and Foxo1 contributed significantly to the development of oxidative stress in PD. A decrease in the activity of G6PDH and NADP-IDH led to a decrease in the availability of NADPH, which is a limiting factor in the functioning of the glutathione antioxidant system. Obviously, the inhibition of G6PDH and NADP-IDH was also an important pathogenic factor in the progression of the pathology. Along with a decrease in the content of antioxidant gene mRNA in the brain tissues, the level of  $\alpha$ -tocopherol increased in the rats with parkinsonism, which could be the result of an imbalance in the functioning of antioxidant system.

**Keywords:** Parkinson's disease, oxidative stress, antioxidant system, glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADP-dependent isocitrate dehydrogenase

**Conflict of interest.** The authors declare the absence of obvious or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Source of financing.** The authors state that they received no funding for the study.

**Conformity with the principles of ethics.** The study was approved by the Biomedical Ethics Committee at Voronezh State University (Protocol No. 42-02 of 04.10.2021).

**For citation:** Kryl'skii E.D., Razuvaev G.A., Popova T.N., Nikhaev L.E., Akinina A.I. mRNA level of antioxidant genes and activity of NADPH-generating enzymes in rotenone-induced parkinsonism in rats. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2023;22(2):78–87. <https://doi.org/10.20538/1682-0363-2023-2-78-87>.

## ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – второе по распространенности нейродегенеративное заболевание после болезни Альцгеймера и самое распространенное двигательное расстройство в мире. Патогенез БП характеризуется потерей дофаминергических нейронов в черной субстанции и присутствием в среднем мозге телец Леви – агрегатов белков с нарушенным фолдингом, включая  $\alpha$ -синуклеин [1]. Нейродегенерация при БП развивается также в норадренергической, серотонинергической и холинергической системе, коре головного мозга, зрительной луковице и отделах вегетативной нервной системы [2].

Было продемонстрировано, что на ранних этапах развития БП имеет место формирование окислительного стресса. Таким образом, неконтролируемая генерация активных форм кислорода (АФК) выступает в качестве причинного фактора гибели дофаминергических нейронов, а не является следствием иных патогенетических факторов нейродегенерации [3]. Защиту нейронов от окислительного стресса обеспечивает антиоксидантная система, включающая такие ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза, ферменты глутатионового звена, а также неферментативные антиоксиданты. Ключевым регуляторным фактором, отвечающим за реализацию антиоксидательного ответа, является белок Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2 – ядерный фактор, связанный с эритроидным фактором 2). В условиях покоя Nrf2 находится в комплексе с белком Keap1 (Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок) в цитоплазме, в результате чего он убиквитинируется и подвергается протеасомной деградации.

В условиях окислительного стресса комплекс Nrf2-Keap1 разрушается, что приводит к высвобождению Nrf2 и его ядерной транслокации. Оказавшись в ядре, Nrf2 активирует экспрессию ARE-содержащих (antioxidant responsive elements – элементы антиоксидантного ответа) генов, кодирующих, в том числе, антиоксидантные ферменты [4]. Еще одним регуляторным фактором, участвующим в выживании клеток при окислительном стрессе, является Foxo1. Данный белок модулирует активность многочисленных генов, включая гены антиоксидантных ферментов, аутофагии и апоптоза, в частности фактора

некроза опухоли  $\alpha$ , FAS-лиганда (лиганда к члену суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли б), каспазы-3, каспазы-8 и каспазы-9 [5]. Другим важным компонентом защиты, лимитирующим работу глутатионового звена антиоксидантной системы, выступает никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН), необходимый для восстановления окисленного глутатиона. Основным источником НАДФН является пентозофосфатный путь, ключевым ферментом которого выступает глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (Г6ФДГ) [6]. Альтернативным источником НАДФН может выступать НАДФ-изоцитратдегидрогеназа (НАДФ-ИДГ), локализованная преимущественно в цитоплазме, однако небольшая активность фермента обнаруживается также в митохондриях. НАДФ-ИДГ обеспечивает координацию процессов углеродного и азотного обмена, а также участвует в генерировании НАДФН [7].

Как показывают исследования, порядка 70% нейронов гибнут до появления клинических симптомов БП, в связи с чем изучение различных аспектов метаболизма при данном заболевании, представляющих интерес, в плане выяснения механизмов поддержания окислительно-восстановительного гомеостаза, а также с точки зрения возможности ранней диагностики паркинсонизма, является актуальной задачей [8]. В настоящее время экспериментальная БП, индуцируемая введением ротенона, по-прежнему остается предпочтительной моделью патологии. Последняя последовательно имитирует нейропатологические признаки БП вследствие способности ротенона воспроизводить прогрессирующую природу заболевания с характерной медленной скоростью гибели клеток и двигательными нарушениями, а также с признаками  $\alpha$ -синуклеинопатии [9]. Ранее нами было показано, что у крыс с ротенон-индуцированным паркинсонизмом наблюдается угнетение активности ферментов глутатионового звена и каталазы [10]. В то же время в литературе остаются весьма ограниченными исследования, демонстрирующие наличие взаимосвязей между факторами регуляции антиоксидантной системы на уровне транскрипции, ферментами-поставщиками НАДФН и параметрами окислительного статуса при экспериментальной БП.

Таким образом, целью настоящей работы стало исследование уровня мРНК генов антиоксидантных

ферментов и регулирующих их экспрессию транскрипционных факторов Nrf2 и Foxo1, оценка активности Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ, а также анализ корреляционных связей между данными параметрами, состоянием оксидативного статуса и моторно-координационными показателями у крыс с ротенон-индуцированным паркинсонизмом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования выступали крысы-самцы возрастом 4–6 мес и массой 200–250 г, содержащиеся при 12-часовом световом дне и доступе к еде и пище *ad libitum*. Работа выполнялась с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации. Моделирование БП осуществляли путем подкожного введения крысам ротенона в дозе 2,5 мг/кг в виде раствора в 98%-м очищенном оливковом масле и 2%-м диметилсульфоксиде на протяжении 10 сут [11]. Животные были случайным образом разделены на две экспериментальные группы численностью по 12 особей. Первую группу составляли животные, которые получали подкожно инъекции носителя; во вторую группу входили крысы, которым моделировали БП. Через 24 ч после последней инъекции у крыс анализировали моторные показатели, после чего умерщвляли и забирали исследуемый материал.

Для оценки моторики и координации животных применялись следующие тесты: 1) животное помещали в прозрачную клетку, после включения видеозаписи исследователь покидал помещение. На видеозаписи регистрировали количество вертикальных стоек за 3 мин [11]; 2) удерживая крысу, ей давали зацепиться передними лапками за скобу электронных весов. Весы оттягивали и регистрировали максимальную величину показателя [12]; 3) животное помещали в прозрачную клетку и наклеивали на голову кусочек липкой бумаги. Регистрировали время, за которое крыса воспримет раздражитель и снимет бумагу с головы [13]. Все тесты проводили в трехкратной повторности, определяли среднее значение показателей.

Ткани головного мозга от трех крыс из каждой группы использовали для приготовления гистологического препарата, окрашенного гематоксилином и эозином. Крыс анестезировали, мозг быстро извлекали и погружали в 10%-й формалин на 2 ч, затем промывали проточной водой в течение 1 сут. После обезживания спиртом и заливки парафином из ткани приготавливали срезы толщиной 5 мкм с помощью ротационного микротомы НМ-325 (Thermo Fisher Scientific, США) с последующим окрашиванием ге-

матоксилином и эозином. Изображения получали с помощью светового микроскопа AxioLab A1 (Carl Zeiss, Германия) и камеры AxioCam 105 color. Оценивались не менее пяти полей зрения для каждого слайда.

Для анализа концентрации диеновых конъюгатов (ДК) к исследуемому образцу добавляли гептан и изопропанол, перемешивали и осаждали центрифугированием при 3 000 г. Гептановую фазу супернатанта разбавляли этанолом и анализировали спектрофотометрически при 233 нм [14]. Для оценки степени окислительной модификации белков (ОМБ) использовали метод, в основе которого лежит способность взаимодействия карбонильных остатков аминокислот с 2,4-динитрофенил-гидразином (2,4-ДНФГ) с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, поглощающих при 370 нм [15]. Образец разбавляли 100 мМ фосфатным буфером (рН 7,4), вносили 10 мМ 2,4-ДНФГ в 2,5 М НСl, инкубировали в течение 1 ч и затем добавляли 20%-й ТХУ. После охлаждения образцы центрифугировали при 3 000 г, промывали осадок белка 10%-м ТХУ и смесью этанол : этилацетат в соотношении 1 : 1, после чего растворяли в 2 мл 8 М мочевины. Концентрацию  $\alpha$ -токоферола определяли методом, основанным на фотометрировании хромогенного комплексного соединения  $Fe^{2+}$  и ортофенатролина [16]. К исследуемому образцу добавляли этанол и гексан, центрифугировали при 3 000 г, после чего отбирали гексановый слой и выпаривали гексан на водяной бане. К сухому остатку приливали бензол и хлорное железо. Через 5 мин добавляли 0,05%-й ортофенантролин, затем через 2 мин измеряли оптическую плотность при 510 нм. Выделение тотальной РНК осуществляли с помощью реагента Extract RNA (Евроген, Россия). Качество выделения РНК контролировали с помощью агарозного гель-электрофореза. Обратную транскрипцию для каждого образца осуществляли с помощью набора MMLV RT kit (Евроген, Россия). Ст каждого гена был нормирован на среднее геометрическое *Ct Gapdh* и *Act $\beta$* , используемых в качестве хаус-кипинг генов. Праймеры, используемые в работе: Sod1 F: 5'-CCAGCGGATGAAGAGAGG-3', Sod1 R: 5'-GGACACATTGGCCACACC-3', Cat F: 5'-CAGCGACCAGATGAAGCA-3', Cat R: 5'-GGTCAGGACATCGGGTTTC-3', Nfe2l2 F: 5'-GCCTTGACTTTGAAGACTGTATGC-3', Nfe2l2 R: 5'-GCAAGCGACTGAAATGTAGGT-3', Foxo1 F: 5'-AGATCTACGAGTGGATGGTGAAGAG-3', Foxo1 R: 5'-GGACAGATTGTGGCGAATTGAAT-3', Gsta2 F: 5'-CGGGAATTTGATGTTTGACC-3', Gsta2 R: 5'-AGAATGGCTCTGGTCTGTGC-3', Gpx1 F: 5'-TTTCCCGTGCAATCAGTTC-3', Gpx1 R: 5'-GGACATACTTGAGGGAATTCAGA-3',

Gapdh F: 5'-CCCTCAAGATTGTCAGCAATG-3',  
 Gapdh R: 5'-AGTTGTCATGGATGACCTTGG-3',  
 Actb F: 5'-CCCGCGAGTACAACCTTCT-3',  
 Actb R: 5'-CGTCATCCATGGCGAACT-3',  
 Gsr F: 5'-TTCCTCATGAGAACCAGATCC-3',  
 Gsr R: 5'-CTGAAAGAACCCATCACTGGT-3'.

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени проводили с помощью смеси qPCRmix-NS SYBR (Евроген, Россия) на приборе АНК-32 (Синтол, Россия). Анализ результатов производили с помощью 2<sup>-ΔΔCt</sup> метода. Специфичности реакции оценивали на основе кривых плавления.

Активность НАДФ-ИДГ измеряли в среде для спектрофотометрии, состоящей из 50 мМ трис-НСl буфера (рН 7,8), 1,5 мМ изоцитрата, 2 мМ MnCl<sub>2</sub>, 0,4 мМ НАДФ. Среда спектрофотометрирования для оценки активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ) представляла собой 50 мМ трис-НСl буфер (рН 7,8), содержащий 3,2 мМ глюкозо-6-фосфат, 0,25 мМ НАДФ, 1,0 мМ MgCl<sub>2</sub>. О скорости ферментативной реакции судили по изменению оптической плотности на 340 нм с помощью спектрофотометра Hitachi U1900 (Япония). Для определения содержания белка использовали биуретовый метод.

Результаты анализировали с помощью программы SPSS Statistics 23.0 с использованием одновыборочного критерия Колмогорова – Смирнова для анализа нормальности распределения значений переменных. Значения показателей в группах сравнивали с помощью *t*-критерия Стьюдента или критерия Манна – Уитни. Для выявления корреляционных взаимосвязей между изучаемыми переменными использовали коэффициент корреляции Пирсона для значений с нор-

мальным распределением и коэффициент корреляции Спирмена для показателей, распределение которых не согласуется с нормальным законом. В настоящей работе приводятся значения средней (0,30–0,69) и сильной (>0,70) степени корреляции (*r*). Статистически значимыми считали различия при *p* < 0,05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведенные исследования показали, что развитие ротенон-индуцированного паркинсонизма у крыс сопровождалось значимым (*p* < 0,05) изменением моторно-координационных показателей (табл. 1). Так, в данных условиях наблюдалось уменьшение количества вертикальных стоек и силы хвата, а также увеличение времени, затраченного на удаление бирки с головы. Кроме того, индукция патологии подтверждалась морфологическими изменениями в тканях головного мозга (рис. 1). В частности, в коре и полосатом теле головного мозга крыс с экспериментальным БП характерными изменениями были уменьшение количества нейронов, развитие их атрофии и пикноза, конденсация ядер, инфильтрация ткани глиальными клетками.

Таблица 1

Показатель	Группа		<i>p</i>
	Контроль, <i>n</i> = 12	Патология, <i>n</i> = 12	
Количество вертикальных стоек	11,0 (9,5–12,0)	4,0 (2,0–7,0)	0,002
Сила хвата, кг	0,300 (0,269–0,300)	0,157(0,135–0,200)	0,001
Отклеивание бирки, с	21,5 (15,3–40,8)	127,0 (91,8–152,5)	0,003

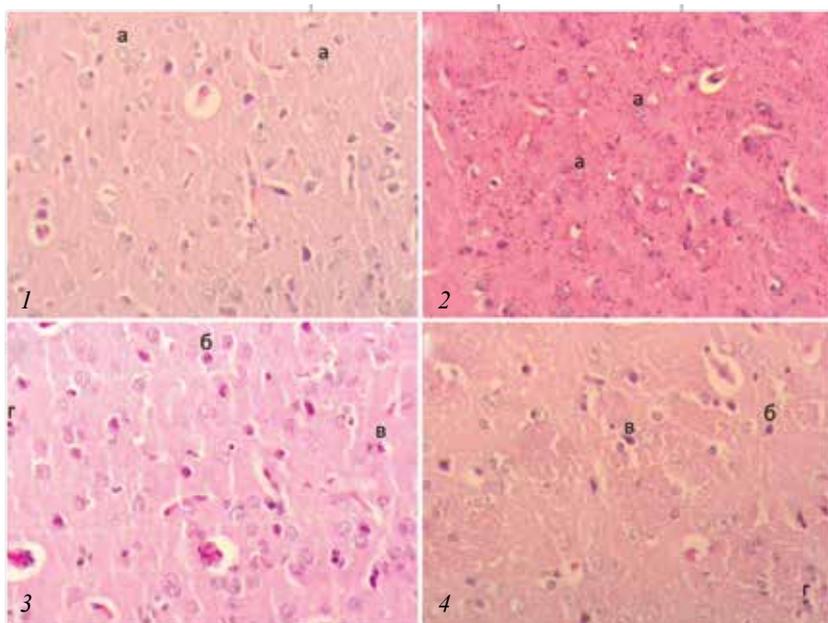


Рис. 1. Окраска гематоксилином и эозином тканей головного мозга у крыс: коры (1), полосатого тела (2) в норме и при ротенон-индуцированном паркинсонизме (3, 4), ×400. На срезах тканей крыс контрольной группы визуализировались рассеянные крупные мультиполярные нейроны с везикулярными ядрами (а). Развитие патологии характеризовалось наличием клеток с более темнокрашенным ядром (б), сморщенных клеток с признаками кариолизиса (с), а также инфильтрацией глиальными клетками (д)

Развитие ротенон-индуцированного паркинсонизма у крыс сопровождалось активизацией процессов свободнорадикального окисления, о чем свидетельствовало увеличение ( $p < 0,05$ ) концентрации ДК и уровня ОМБ в сыворотке крови и мозге животных (рис. 2). Вместе с тем для крыс с экспериментальной БП наблюдалось также возрастание концентрации  $\alpha$ -токоферола в тканях ( $p < 0,05$ ).

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что при патологии у животных наблюдается снижение уровня мРНК генов антиоксидантных ферментов и транскрипционных факторов Nrf2 и Foxo1, что согласуется с полученными нами ранее данными по активности ферментов при экс-

периментальной БП [10]. Так, результаты настоящей работы продемонстрировали снижение ( $p < 0,01$ ) уровня мРНК Nrf2 (ген *Nfe2l2*) в коре и полосатом теле животных с патологией (рис. 3). Подобная тенденция наблюдалась также для мРНК фактора Foxo1 ( $p < 0,05$ ). На фоне снижения концентрации мРНК данных факторов в тканях животных с патологией происходило уменьшение ( $p < 0,05$ ) уровня мРНК генов супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, а также глутатионтрансферазы в полосатом теле (гены *Sod1*, *Gpx1*, *Gsr*, *Gsta2* соответственно). Экспрессия гена каталазы (*Cat*) статистически значимо не изменялась.

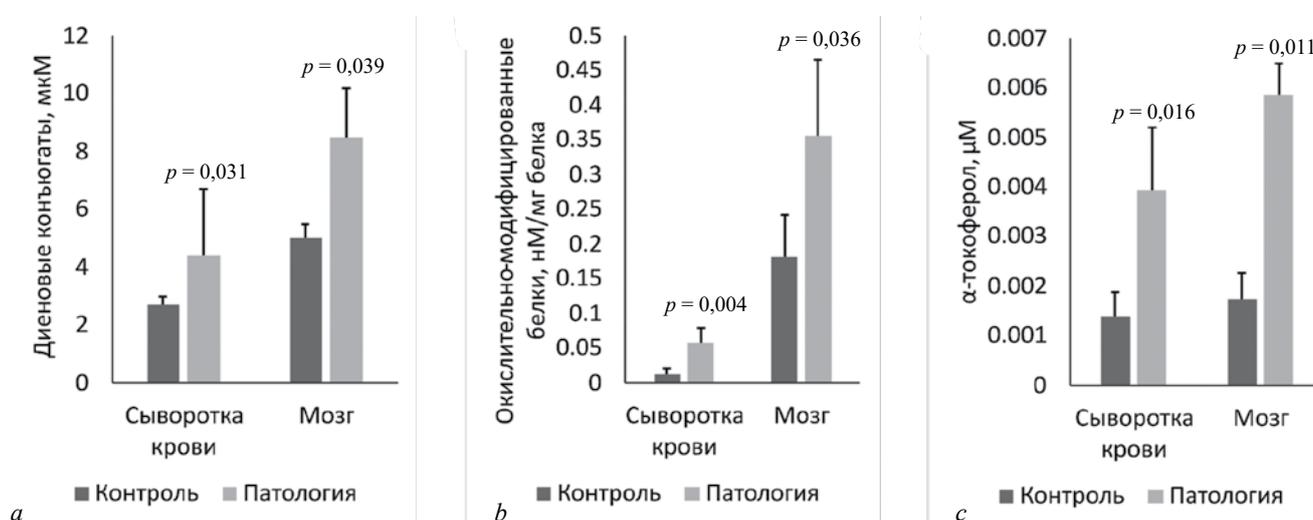


Рис. 2. Концентрация в мозге и сыворотке крови крыс с ротенон-индуцированным паркинсонизмом и контрольной группы: диеновых конъюгатов (a), окислительно-модифицированных белков (b) и  $\alpha$ -токоферола (c),  $Me (Q_1-Q_3)$

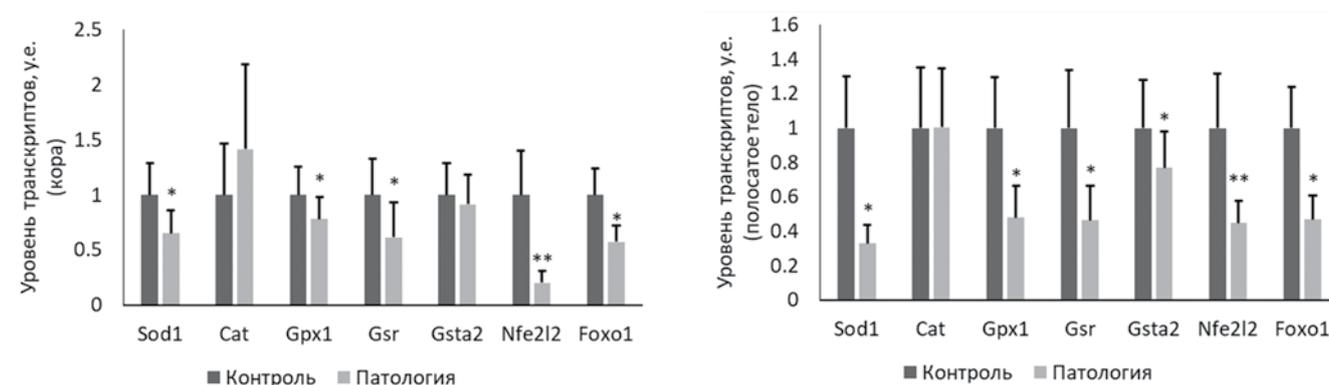


Рис. 3. Уровень мРНК генов антиоксидантных ферментов и регуляторных факторов в коре и полосатом теле головного мозга крыс с ротенон-индуцированным паркинсонизмом и контрольной группы,  $M \pm SD$

В ходе работы показано, что активность НАДФН-генерирующих ферментов – Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ, снижалась ( $p < 0,05$ ) в сыворотке крови и мозге крыс с экспериментальной БП (табл. 2). Схожая динамика наблюдалась и для активности

исследуемых ферментов, выраженной в Е/мг белка. Вместе с тем удельная активность Г6ФДГ в мозге животных с патологией статистически значимо не изменялась, что могло быть сопряжено с уменьшением содержания общего белка ( $p = 0,032$ ).

Таблица 2

Активность НАДФН-генерирующих ферментов в сыворотке крови и мозге крыс при ротенон-индуцированном паркинсонизме, Me ( $Q_1-Q_3$ )				
Показатель	Ткань	Группа		p
		Контроль, n = 12	Патология, n = 12	
НАДФ-ИДГ, Е/мл, Е/г сырой массы	Сыворотка крови	0,024 (0,017–0,071)	0,011 (0,010–0,023)	0,009
	Мозг	1,005 (0,352–1,378)	0,451 (0,268–0,550)	0,037
НАДФ-ИДГ, Е/мг белка	Сыворотка крови	0,000270 (0,000194–0,000673)	0,000126 (0,000096–0,000253)	0,01
	Мозг	0,010078 (0,008777–0,014880)	0,005692 (0,004279–0,007018)	0,041
Г6ФДГ, Е/мл, Е/г сырой массы	Сыворотка крови	0,034 (0,021–0,046)	0,013 (0,012–0,019)	0,004
	Мозг	0,450 (0,239–0,518)	0,390 (0,273–0,398)	0,036
Г6ФДГ, Е/мг белка	Сыворотка крови	0,000414 (0,000309–0,000575)	0,000281 (0,000249–0,000349)	0,031
	Мозг	0,011762 (0,006048–0,012862)	0,007308 (0,002237–0,018642)	0,594
Общий белок, г/л	Сыворотка крови	76,5 (53,8–107,6)	58,0 (39,1–61,6)	0,043
	Мозг	18,2 (13,2–25,1)	13,4 (8,8–16,9)	0,032

Проведенный корреляционный анализ подтвердил наличие зависимости между моторно-координационными показателями, параметрами оксидативного статуса, уровнем мРНК исследуемых генов и активностью НАДФН-генерирующих ферментов у крыс с ротенон-индуцированным паркинсонизмом (табл. 3).

Таблица 3

Корреляция между исследуемыми показателями у животных с ротенон-индуцированным паркинсонизмом		
Показатель	r	p
Сила хвата – удельная активность Г6ФДГ в сыворотке	0,673	0,023
Уровень окислительной модификации белков в мозге – уровень мРНК <i>Gsta2</i> в полосатом теле	–0,848	0,049
Активность НАДФ-ИДГ в мозге – уровень мРНК <i>Grx1</i> в полосатом теле	0,877	0,022
Активность НАДФ-ИДГ в мозге – уровень мРНК <i>Foxo1</i> в полосатом теле	0,825	0,043
Концентрация $\alpha$ -токоферола в сыворотке – время отклеивания бирки	0,916	0,029
Концентрация $\alpha$ -токоферола в сыворотке – активность НАДФ-ИДГ в мозге	–0,709	0,049

## ОБСУЖДЕНИЕ

БП представляет собой распространенное нейродегенеративное заболевание, патогенез которого тесно сопряжен с окислительным стрессом и характеризуется поздним проявлением клинических симптомов. В связи с этим интерес представляют исследования регуляторных аспектов состояния редокс-гомеостаза при моделировании данной патологии. В настоящей работе нами была проведена оценка транскрипционной регуляции антиоксидантной системы и активности ферментов-поставщиков НАДФН для глутатионового звена антиоксидантной системы у крыс с ротенон-индуцированным паркинсонизмом.

Как показали результаты нашего исследования, для животных с экспериментальной БП было характерно увеличение уровня продуктов свободно-радикального, в частности перекисного окисления липидов (ПОЛ) – ДК, и окисленных остатков аминокислот в белках. Окисление белков под действием АФК играет особую роль в патогенезе БП. Окислительный стресс вызывает реакции гликооксидации, модификации свободных аминогрупп в белках, что приводит к образованию конечных продуктов гликирования. Данные продукты обеспечивают сшивание белковых молекул, что способствует превращению белков нейрофиламентов в нерастворимые агрегаты, наличие которых в нейронах является ключевым признаком патогенеза БП [17].

Защиту от окислительного стресса обеспечивает антиоксидантная система, ферментативное звено которой включает такие компоненты, как супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и глутатионтрансфераза. Ген *Sod1* кодирует изофермент Cu,Zn-супероксиддисмутаза, преимущественно локализованный в цитоплазме, для которого известна роль в поддержании устойчивости к 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропирдину – токсину, вызывающему экспериментальную БП [18]. *Gpx1* представляет собой ген изофермента глутатионпероксидазы-1, наиболее распространенной в тканях млекопитающих из всех глутатионпероксидаз [19].

*Gsta2* кодирует фермент из суперсемейства глутатионтрансфераз, обеспечивающих детоксикацию электрофильных молекул, обезвреживание канцерогенов и лекарственных средств. Глутатионтрансферазы альфа-класса являются наиболее универсальными ферментами, среди которых *Gsta2* является одним из ключевых ARE-контролируемых белков, защищающих от окислительного стресса [20]. Проведенные нами исследования продемонстрировали

снижение уровня мРНК генов данных ферментов в полосатом теле и коре головного мозга животных с патологией. Это согласуется с полученными ранее результатами, свидетельствующими о нарушении функционирования ферментов антиоксидантной системы при экспериментальной БП [10].

Наличие отрицательной взаимосвязи между уровнем мРНК *Gsta2* в полосатом теле и содержанием окислительно-модифицированных белков в мозге подтверждает существенную роль снижения интенсивности транскрипции генов антиоксидантной системы в развитии свободнорадикального окисления при паркинсонизме. По-видимому, наблюдаемые изменения были обусловлены уменьшением уровня мРНК факторов *Nrf2* и *Foxo1* – ключевых регуляторов активности генов, обеспечивающих резистентность клеток к окислительному стрессу. Так, известно, что *Nrf2* выступает в качестве важнейшего активатора экспрессии генов антиоксидантных ферментов и ферментов – поставщиков НАДФН, модулятора функционирования митохондрий, а также обеспечивает снижение интенсивности воспалительных процессов при нейродегенерации [21, 22].

Транскрипционные факторы *Foxo*, в число которых входит *Foxo1*, играют важную роль в ряде физиологических процессов, таких как регуляция метаболизма, клеточного цикла и реакции на стрессовые факторы, включая чрезмерную генерацию АФК. Имеются сведения, что подавление сигнального пути PI3K-AKT-Foxo у крыс с БП усугубляет окислительный стресс в нигральных дофаминергических нейронах [23]. В то же время не было показано значимого снижения уровня мРНК для гена *Cat*, а также *Gsta2* в коре головного мозга крыс с патологией. По-видимому, к моменту выведения животных из эксперимента уровни мРНК данных генов еще оставались достаточно стабильными и не переходили в стадию декомпенсации.

Нами было также показано, что для крыс с ротенон-индуцированным паркинсонизмом характерно уменьшение активности в мозге и сыворотке крови основных поставщиков НАДФН – Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ. По-видимому, снижение эффективности образования НАДФН также вносит существенный вклад в нарушение функционирования антиоксидантных ферментов и развитие окислительного стресса при БП. Так, имеются данные, показывающие существенную роль данных ферментов в резистентности клеток к чрезмерно генерируемым АФК [24, 25].

Более того, показано, что повышение активности Г6ФДГ у трансгенных мышей обуславливало

их меньшую восприимчивость к 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридину и тормозило развитие признаков паркинсонизма [26]. Показанная нами положительная корреляция между силой хвата животных с патологией и удельной активностью Г6ФДГ в сыворотке крови подтверждает вклад снижения активности НАДФН-генерирующих ферментов в развитие нарушений координации при паркинсонизме. Кроме того, положительная корреляция между активностью НАДФ-ИДГ в мозге и уровнем мРНК *Gpx1* и *Foxo1* свидетельствует о значительном взаимном влиянии НАДФН-генерирующих ферментов и транскрипционной активности антиоксидантных генов.

К неферментативным антиоксидантам липидной фазы, способным эффективно нормализовывать оксидативный статус в клетках путем предотвращения ПОЛ и стабилизации структуры мембран, относится  $\alpha$ -токоферол. Главным регулятором распределения  $\alpha$ -токоферола в организме является белок – переносчик  $\alpha$ -токоферола ( $\alpha$ ТТР) [27]. В мозге  $\alpha$ ТТР регулирует аполипопротеин Е-опосредованный транспорт витамина из астроцитов в соседний нейрон. При окислительном стрессе экспрессия  $\alpha$ ТТР в астроцитах увеличивается, что облегчает доставку  $\alpha$ -токоферола к нейронам, тем самым защищая их от окислительного повреждения [28]. Как показали результаты нашей работы, на фоне интенсификации свободнорадикального окисления, у крыс с паркинсонизмом происходило возрастание концентрации  $\alpha$ -токоферола в сыворотке крови и мозге.

Данная тенденция, наблюдавшаяся наряду с угнетением активности антиоксидантных ферментов [10] и транскрипции их генов, указывает на развитие дисбаланса в функционировании антиоксидантной системы при паркинсонизме. В пользу этого свидетельствует наличие положительной корреляции между концентрацией  $\alpha$ -токоферола в сыворотке и временем, затрачиваемым на отклеивание бирки, а также активностью НАДФ-ИДГ в мозге у животных с экспериментальной БП.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами исследование продемонстрировало, что развитие ротенон-индуцированного паркинсонизма было сопряжено с уменьшением уровня мРНК большинства исследуемых генов антиоксидантных ферментов, что, по-видимому, взаимосвязано со снижением активации генов регуляторных белков *Nrf2* и *Foxo1*. Данные изменения, судя по всему, являлись ключевым фактором снижения активности антиоксидантных ферментов, возрастания интенсивности свободнорадикального окисления и,

как следствие, развития окислительного стресса при БП. Другим патогенетическим механизмом нарушения оксидативного статуса в тканях животных с патологией выступало снижение активности ферментов – поставщиков НАДФН для функционирования антиоксидантной системы – Г6ФДГ и НАДФ-ИДГ. Наряду с этим у крыс с rotenone-индуцированным паркинсонизмом наблюдалось возрастание концентрации  $\alpha$ -токоферола в сыворотке крови и мозге, что могло быть результатом развития дисбаланса в функционировании антиоксидантной системы при окислительном стрессе.

### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Blauwendraat C., Nalls M.A., Singleton A.B. The genetic architecture of Parkinson's disease. *Lancet Neurol.* 2020;19(2):170–178. DOI: 10.1016/S1474-4422(19)30287-X.
2. Raza C., Anjum R., Shakee N.U.A. Parkinson's disease: Mechanisms, translational models and management strategies. *Life Sci.* 2019;226:77–90. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.03.057.
3. Trist B.G., Hare D.J., Double K.L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell.* 2019;18(6):e13031. DOI: 10.1111/ace1.13031.
4. Hannan Md.A., Dash R., Sohag A.A.M., Haque Md.N., Moon I.S. Neuroprotection against oxidative stress: phytochemicals targeting TrkB signaling and the Nrf2-ARE antioxidant system. *Front. Mol. Neurosci.* 2020;13:116. DOI: 10.3389/fnmol.2020.00116.
5. Xing Y., Li A., Yang Y., Li X., Zhang L., Guo H. The regulation of FOXO1 and its role in disease progression. *Life Sciences.* 2018;193:124–131. DOI: 10.1016/j.lfs.2017.11.030.
6. Nóbrega-Pereira S., Fernandez-Marcos P.J., Brioche T., Gomez-Cabrera M.C., Salvador-Pascual A., Flores J.M. et al. G6PD protects from oxidative damage and improves health span in mice. *Nat Commun.* 2016;7:10894. DOI: 10.1038/ncomms10894.
7. Popova T., Pinheiro de Carvalho M.A.A., Matasova L., Medvedeva L. Regulation of mitochondrial NADP-isocitrate dehydrogenase in rat heart during ischemia. *Mol. Cell Biochem.* 2007;294(1–2):97–105. DOI: 10.1007/s11010-006-9249-9.
8. Ball N., Teo W.P., Chandra S., Chapman J. Parkinson's disease and the environment. *Front. Neurol.* 2019;10:218. DOI: 10.3389/fneur.2019.00218.
9. Farombi E.O., Awogbindin I.O., Farombi T.H., Oladele J.O., Izomoh E.R., Aladelokun O.B. et al. Neuroprotective role of kolaviron in striatal redo-inflammation associated with rotenone model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 2019;73:132–141. DOI: 10.1016/j.neuro.2019.03.005.
10. Крыльский Е.Д., Разуваев Г.А., Попова Т.Н., Акинина А.И., Нихаев Л.Е. Функционирование системы антиокислительной защиты при rotenone-индуцированном паркинсонизме у крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2021;171(6):701–707. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-171-6-701-707.
11. Ablat N., Lv D., Ren R., Xiaokaiti Y., Ma X., Zhao X. et al. Neuroprotective effects of a standardized flavonoid extract from safflower against a rotenone-induced rat model of Parkinson's disease. *Molecules.* 2016;21(9):1107. DOI: 10.3390/molecules21091107.
12. Sharma S., Kumar P., Deshmukh R. Neuroprotective potential of spermidine against rotenone induced Parkinson's disease in rats. *Neurochemistry International.* 2018;116:104–111. DOI: 10.1016/j.neuint.2018.02.010.
13. Park H.J., Lee P.H., Bang O.Y., Lee G., Ahn Y.H. Mesenchymal stem cells therapy exerts neuroprotection in a progressive animal model of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry.* 2008;107(1):141–151. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05589.x.
14. Recknagel R.O., Ghoshal A.K. Lipoperoxidation of rat liver microsomal lipids induced by carbon tetrachloride. *Nature.* 1966;210(5041):1162–1163. DOI: 10.1038/2101162a0.
15. Reznick A.Z., Packer L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994;233:357–363. DOI: 10.1016/S0076-6879(94)33041-7.
16. Desai I.D., Martinez F.E. Bilirubin interference in the colorimetric assay of plasma vitamin E. *Clin. Chim. Acta.* 1986;154(3):247–250. DOI: 10.1016/0009-8981(86)90040-9.
17. Sharma A., Weber D., Raupbach J., Dakal T.C., Fließbach K., Ramirez A. et al. Advanced glycation end products and protein carbonyl levels in plasma reveal sex-specific differences in Parkinson's and Alzheimer's disease. *Redox. Biol.* 2020;34:101546. DOI: 10.1016/j.redox.2020.101546.
18. Tripanichkul W., Jaroensupparach E.-O. Ameliorating effects of curcumin on 6-OHDA-induced dopaminergic denervation, glial response, and SOD1 reduction in the striatum of hemiparkinsonian mice. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2013;17(10):1360–1368.
19. Toppo S., Vanin S., Bosello V., Tosatto S.C.E. Evolutionary and structural insights into the multifaceted glutathione peroxidase (Gpx) superfamily. *Antioxid. Redox. Signal.* 2008;10(9):1501–1514. DOI: 10.1089/ars.2008.2057.
20. Liu J., Liu H., Zhao Z., Wang J., Guo D., Liu Y. Regulation of Actg1 and Gsta2 is possible mechanism by which capsaicin alleviates apoptosis in cell model of 6-OHDA-induced Parkinson's disease. *Biosci. Rep.* 2020;40(6):BSR20191796. DOI: 10.1042/BSR20191796.
21. Jayaram S., Krishnamurthy P.T. Role of microgliosis, oxidative stress and associated neuroinflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease: The therapeutic role of Nrf2 activators. *Neurochem. Int.* 2021;145:105014. DOI: 10.1016/j.neuint.2021.105014.
22. Tejo F.V., Quintanilla R.A. Contribution of the Nrf2 pathway on oxidative damage and mitochondrial failure in Parkinson and Alzheimer's disease. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(7):1069. DOI: 10.3390/antiox10071069.
23. Gong J., Zhang L., Zhang Q., Li X., Xia X.J., Liu Y.Y. et al. Lentiviral vector-mediated SHC3 silencing exacerbates oxidative stress injury in nigral dopamine neurons by regulating the PI3K-AKT-FoxO signaling pathway in rats with Parkinson's disease. *Cell Physiol. Biochem.* 2018;49(3):971–984. DOI: 10.1159/000493228.
24. Itsumi M., Inoue S., Elia A.J., Murakami K., Sasaki M., Lind E.F. et al. Idh1 protects murine hepatocytes from

- endotoxin-induced oxidative stress by regulating the intracellular NADP(+)/NADPH ratio. *Cell Death Differ.* 2015;22(11):1837–1845. DOI: 10.1038/cdd.2015.38.
25. Wang Y.P., Zhou L.S., Zhao Y.Z., Wang S.W., Chen L.L., Liu L.X. et al. Regulation of G6PD acetylation by SIRT2 and KAT9 modulates NADPH homeostasis and cell survival during oxidative stress. *EMBO J.* 2014;33(12):1304–1320. DOI: 10.1002/embj.201387224.
26. Mejías R., Villadiego J., Pintado C.O., Vime P.J., Gao L., Toledo-Aral J.J. et al. Neuroprotection by transgenic expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in dopaminergic nigrostriatal neurons of mice. *Journal of Neuroscience.* 2006;26(17):4500–4508. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0122-06.2006.
27. Ulatowski L., Dreussi C., Noy N., Barnholtz-Sloan J., Klein E., Manor D. Expression of the  $\alpha$ -tocopherol transfer protein gene is regulated by oxidative stress and common single-nucleotide polymorphisms. *Free Radic. Biol. Med.* 2012;53(12):2318–2326. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.10.528.
28. Ulatowski L., Manor D. Vitamin E trafficking in neurologic health and disease. *Annu. Rev. Nutr.* 2013;33:87–103. DOI: 10.1146/annurev-nutr-071812-161252.

## Вклад авторов

Крыльский Е.Д. – разработка концепции и дизайна, анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи. Разуваев Г.А. – получение данных, анализ и интерпретация данных, обоснование рукописи. Попова Т.Н. – обоснование рукописи, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи. Нихаев Л.Е., Акиннина А.И. – получение данных, анализ и интерпретация данных.

## Информация об авторах

**Крыльский Евгений Дмитриевич** – канд. биол. наук, доцент кафедры медицинской биохимии и микробиологии, ВГУ, г. Воронеж, evgenij.krylsky@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-8855-5515>

**Разуваев Григорий Андреевич** – студент, кафедра медицинской биохимии и микробиологии, ВГУ, г. Воронеж, storiesofgames@gmail.com

**Попова Татьяна Николаевна** – д-р биол. наук, профессор, декан медико-биологического факультета, ВГУ, г. Воронеж, biomed-porova@yandex.ru, <http://orcid.org/0000-0002-9660-3054>

**Нихаев Леонид Евгеньевич** – студент, кафедра медицинской биохимии и микробиологии, ВГУ, г. Воронеж, nikhaev.l@yandex.ru.

**Акиннина Алина Игоревна** – студент, кафедра медицинской биохимии и микробиологии, ВГУ, г. Воронеж, alina\_0611@bk.ru

(✉) **Крыльский Евгений Дмитриевич**, evgenij.krylsky@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.03.2022;  
одобрена после рецензирования 25.08.2022;  
принята к публикации 08.12.2022