

ПАТОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ, МОРФОЛОГИЯ, ФИЗИОЛОГИЯ, ФАРМАКОЛОГИЯ И ТОКСИКОЛОГИЯ

ANIMAL PATHOLOGY, MORPHOLOGY, PHYSIOLOGY, PHARMACOLOGY AND TOXICOLOGY



УДК 576.3+576.32/36

<https://doi.org/10.23947/2949-4826-2025-24-2-19-28>

Оригинальное эмпирическое исследование

Н₂S-зависимые механизмы экспрессии и локализации каспазы-3 в клетках головного мозга мышей при черепно-мозговой травме

С.В. Родькин , Е.Ю. Кириченко

Донской государственный технический университет, г. Ростов-на-Дону, Российская Федерация

✉ rodkin_stas@mail.ru

EDN: HPMRMX

Аннотация

Введение. Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является распространенной нейротравмой среди животных. ЧМТ вызывает сложный каскад патологических процессов: первичное повреждение мозга переходит во вторичное, связанное с воспалением, окислительным стрессом, эксайтотоксичностью и апоптозом. Вторичное повреждение усугубляет состояние после травмы. В этой связи особый интерес представляет роль газотрансммиттера сероводорода (Н₂S), который участвует в нейромодуляции, противовоспалительных, антиоксидантных и антиапоптотических процессах в центральной нервной системе. Важным элементом апоптоза при ЧМТ является каспаза-3. Н₂S потенциально может модулировать экспрессию и активность каспазы-3, влияя на выживание нервных клеток и восстановление мозга после ЧМТ. Однако Н₂S-зависимые механизмы регулирования каспазы-3 при травматическом повреждении до конца не изучены. Цель статьи — исследовать роль Н₂S в экспрессии и локализации каспазы-3 в нейронах и астроцитах головного мозга мышей при ЧМТ.

Материалы и методы. Исследования проводились на кафедре «Биоинженерия» ДГТУ (г. Ростов-на-Дону) в условиях, соответствующих международным и национальным стандартам, в период с 20 апреля по 1 июня 2024 г. Объект исследования — 36 взрослых самцов мышей, поделенных на три группы: контрольную и две экспериментальные. Моделирование ЧМТ проводилось путем сброса груза (200 г) на необнаженный череп под анестезией хлоралгидратом. Донор Н₂S сульфид натрия (Na₂S), способный эффективно высвобождать Н₂S, либо ингибитор (аминооксиуксусная кислота, АООА) цистатионин-β-синтазы (CBS), фермента, ответственного за эндогенный синтез Н₂S, — вводились ежедневно после ЧМТ в течение 7 дней до выведения животных из эксперимента. Использование Na₂S и АООА позволяло эффективно модулировать уровень эндогенного Н₂S в головном мозге. Контрольной группе вводили физиологический раствор. Срезы мозга, фиксированные в 4 % PFA, инкубировались с антителами к каспазе-3 и нейрональному ядерному маркеру NeuN либо к астроцитарному маркеру GFAP. Колокализация оценивалась с помощью программы *ImageJ*. Анализ экспрессии каспазы-3 проводился в пенумбре мозга методом вестерн-блота с использованием первичных антител к каспазе-3 и β-актину и вторичных антител IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена, детекция — хемилюминесцентным методом.

Результаты исследования. Изначальный уровень каспазы-3 в клетках головного мозга исследуемых мышей был низким. ЧМТ индуцировала экспрессию каспазы-3 в нейронах и глиальных клетках ипсилатерального поврежденного полушария через 7 дней во всех группах после травмы. Использование донора Na₂S приводило к снижению уровня каспазы-3 в нейронах на 32 %, тогда как ингибитор АООА вызывал его увеличение на 31 % относительно травмированных нервных клеток контрольной группы, которой вводили физиологический раствор, об этом свидетельствуют показатели коэффициента M1 колокализации каспазы-3-положительных клеток с маркером нейрональных ядер NeuN. Аналогичные эффекты были продемонстрированы и на астроцитах, которые визуализировались с помощью специфичного астроцитарного маркера GFAP. Вестерн-блот анализ подтвердил эти данные, показывая значительное снижение уровня каспазы-3 при использовании Na₂S и его увеличение при введении АООА через 7 дней после ЧМТ.

Обсуждение и заключение. Результаты исследования демонстрируют, что ЧМТ приводит к значительной активации каспазы-3 в нейронах и астроцитах поврежденного полушария головного мозга мышей, отражая развитие апоптоза в ответ на травматическое повреждение. Применение Na₂S эффективно снижало уровень каспазы-3,

указывая на его нейропротекторное и антиапоптотическое действие. В то же время введение АОАА индуцировало увеличение экспрессии каспазы-3, подтверждая важную роль CBS и, соответственно, H₂S в регуляции клеточной гибели после ЧМТ. Надежность этих наблюдений была подтверждена как иммуногистохимически, так и методом вестерн-блот анализа. Полученные данные помогут лучше понять фундаментальные H₂S-зависимые сигнальные механизмы выживания и гибели нейронов и глиальных клеток при травматическом повреждении нервной системы, а ингибитор CBS и донор H₂S, использованные в нашем исследовании, могут лечь в основу разработки клинически эффективных нейропротекторных препаратов.

Ключевые слова: черепно-мозговая травма, сероводород, H₂S, сульфид натрия, Na₂S, аминоксипропановая кислота, АОАА, цистатионин-β-синтаза, CBS, каспаза-3, апоптоз

Декларация о соблюдении принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей: авторы заявляют, что все проведенные исследования соответствовали принципам конвенции и правилам надлежащей лабораторной практики.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ № FZNE-2024-0004.

Для цитирования. Родькин С.В., Кириченко Е.Ю. H₂S-зависимые механизмы экспрессии и локализации каспазы-3 в клетках головного мозга мышей при черепно-мозговой травме. *Ветеринарная патология*. 2025;24(2):19–28. <https://doi.org/10.23947/2949-4826-2025-24-2-19-28>

Original Empirical Research

H₂S-Dependent Mechanisms of Caspase-3 Expression and Localization in Brain Cells of Mice with Traumatic Brain Injury

Stanislav V. Rodkin , Evgeniya Yu. Kirichenko 

Don State Technical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

✉ rodkin_stas@mail.ru

Abstract

Introduction. Traumatic brain injury (TBI) is a neurotrauma widespread in animals. TBI causes a complex cascade of pathological processes: primary brain injury turns into secondary brain injury associated with inflammation, oxidative stress, excitotoxicity and apoptosis. Secondary injury aggravates the condition after injury. In this regard, the role of hydrogen sulfide (H₂S) as a gasotransmitter involved in neuromodulation, anti-inflammatory, antioxidant and anti-apoptotic processes in the central nervous system is of particular interest. Caspase-3 is an important element in TBI-induced apoptosis. H₂S has a potential to modulate the expression and activity of caspase-3 affecting the survival of nerve cells and brain recovery after TBI. However, H₂S-dependent mechanisms of caspase-3 regulation in traumatic injury are not fully investigated. The aim of the research is to study the role of H₂S in the expression and localization of caspase-3 in neurons and astrocytes of mice with TBI.

Materials and Methods. The research was conducted at the Bioengineering Department of DSTU (Rostov-on-Don) from April 20 to June 1, 2024 in conditions compliant with the international and national standards. The objects of the study were 36 adult male mice divided into three groups: control group and two experimental ones. TBI was simulated by dropping a weight (200 g) on the intact skulls of mice anesthetized with chloral hydrate. During 7 days after the TBI, the animals were daily administered the sodium sulfide (Na₂S), a donor of H₂S, which can efficiently release H₂S, or the aminooxyacetic acid (AOAA), an inhibitor of cystathionine β-synthase (CBS), an enzyme responsible for the endogenous synthesis of H₂S, until the animals were withdrawn from the experiment. The use of Na₂S and AOAA enabled efficient modulation of the level of endogenous H₂S in the brain. The control group was administered physiological saline solution. Brain sections fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) solution were incubated with antibodies to caspase-3 and to the neuronal nuclear antigen (NeuN) or to the astrocytic marker (GFAP). Colocalization was assessed using the *ImageJ* software. Caspase-3 expression in the brain penumbra was analysed by Western blotting using primary antibodies against caspase-3 and β-actin and secondary antibodies IgG conjugated to horseradish peroxidase. For detection, the chemiluminescence method was used.

Results. The initial level of caspase-3 in the brain cells of mice under study was low. Seven days after injury, TBI had induced caspase-3 expression in neurons and glial cells of the ipsilateral injured hemisphere in animals of all groups. Administering the donor Na₂S led to decrease of caspase-3 level in neurons by 32%, whereas administering the inhibitor AOAA led to its increase by 31% compared to the injured nerve cells of animals from the control group, which were administered the physiological saline solution. This was confirmed by the values of the M1 colocalization coefficient

demonstrating colocalization of caspase-3-positive cells with the neuronal nuclear antigen (NeuN). Similar effects were demonstrated in astrocytes, which were visualized using the astrocyte-specific marker GFAP. Western blot analysis confirmed these data and showed a significant decrease of caspase-3 level with administering Na₂S and its increase with that of AOAA 7 days after TBI.

Discussion and Conclusion. The results of the study demonstrate that TBI leads to significant activation of caspase-3 in neurons and astrocytes of the injured hemisphere of mice brain, which means development of apoptosis in response to traumatic injury. Administering Na₂S has efficiently decreased caspase-3 level, which indicates its neuroprotective and anti-apoptotic effect. Whereas, administering the AOAA has induced an increase in caspase-3 expression, which confirms the important role of CBS and, therefore, of H₂S in regulation of cell death after TBI. The reliability of these findings was ascertained by both immunohistochemical and Western blot analysis. The obtained data contribute to better understanding the fundamental H₂S-dependent signaling mechanisms of survival and death of neurons and glial cells during traumatic injury of the nervous system. The CBS inhibitor and H₂S donor used in our study may serve a basis for development of the clinically efficient neuroprotective agents.

Keywords: traumatic brain injury, hydrogen sulfide, H₂S, sodium sulfide, Na₂S, aminooxyacetic acid, AOAA, cystathionine β-synthase, CBS, caspase-3, apoptosis

Declaration of Compliance with the Principles of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes: the authors declare that all research was conducted in compliance with the principles of Good Laboratory Practice.

Funding. The study was conducted with the support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation grant No. FZNE-2024-0004.

For Citation. Rodkin SV, Kirichenko EYu. H₂S-Dependent Mechanisms of Caspase-3 Expression and Localization in Brain Cells of Mice with Traumatic Brain Injury. *Russian Journal of Veterinary Pathology*. 2025;24(2):19–28. <https://doi.org/10.23947/2949-4826-2025-24-2-19-28>

Введение

Черепно-мозговая травма (ЧМТ) является одной из самых распространенных причин смерти и инвалидности среди животных. ЧМТ приводит к сложному каскаду патофизиологических процессов, включая первичное механическое повреждение ткани мозга и последующее вторичное повреждение, обусловленное воспалением, окислительным стрессом, эксайтотоксичностью и апоптозом. Вторичное повреждение, развивающееся после травмы, играет ключевую роль в прогрессировании тяжести состояния, привлекая значительное внимание ученых всего мира, стремящихся найти эффективные стратегии лечения и нейропротекторные препараты [1–3].

В последние годы растет интерес к роли газотрансмиттеров, таких как сероводород (H₂S), в патофизиологии ЧМТ. H₂S, долгое время считавшийся исключительно токсичным газом, в настоящее время признан важной биологически активной молекулой, способной участвовать в ряде физиологических и патофизиологических процессов, включая нейромодуляцию, сосудистую регуляцию, противовоспалительное действие и антиоксидантную защиту. В центральной нервной системе H₂S действует как нейромодулятор и нейропротектор, влияя на различные сигнальные пути, включая связанные с клеточной гибелью по типу апоптоза [4, 5].

Одним из ключевых проапоптотических белков является каспаза-3 — эффекторная цистеин-содержащая протеаза, расщепляющая белки исключительно

после аспартата и занимающая центральную позицию в реализации апоптоза. Было показано, что каспаза-3 может являться потенциальной мишенью для H₂S и его активных производных. Однако сведения о роли H₂S-зависимых механизмов в регулировании каспазы-3 носят противоречивый характер. В одних исследованиях было показано, что H₂S может уменьшать экспрессию данного фермента [6–8], а в других научных работах демонстрируется H₂S-зависимая экспрессия каспазы-3 и цитотоксический эффект [9–11]. Таким образом, механизмы, посредством которых H₂S влияет на экспрессию и локализацию каспазы-3 при ЧМТ, остаются малоизученными [9].

Целью настоящего исследования является изучение H₂S-зависимых механизмов регуляции каспазы-3 при ЧМТ. Мы предполагаем, что H₂S может оказывать модулирующее влияние на экспрессию и локализацию каспазы-3, тем самым воздействуя на интенсивность и продолжительность нейровоспалительного ответа при ЧМТ. Изучение этих механизмов позволит лучше понять сложный патогенез ЧМТ и открыть новые перспективы для разработки терапевтических стратегий, направленных на модуляцию нейровоспаления и улучшение восстановительных процессов в мозге.

Материалы и методы

Этическое одобрение

Все исследования были одобрены этическим комитетом ДГТУ, также они соответствовали международным требованиям по биоэтике.

Объект и процедуры

Исследования проводились в лаборатории «МедЦифра» факультета «Биоинженерия и ветеринарная медицина» кафедры «Биоинженерия» ДГТУ в период с 20 апреля по 1 июня 2024 г. В общей сложности в эксперимент было включено 36 взрослых самцов мышей CD-1, возраст которых составлял от 14 до 15 недель, а масса тела — 20–25 г. Мыши содержались в стандартных условиях вивария: в пластиковых клетках с подстилкой из опилок, при температуре 22 ± 2 °C, относительной влажности 50–60 % и 12-часовом свето-темновом режиме. Кормление осуществлялось стандартным гранулированным кормом для лабораторных грызунов, доступ к воде был свободным.

Мыши были разделены на три группы: контрольную, которой вводили физиологический раствор, и две экспериментальные, которым вводили инъекции донора H₂S сульфида натрия (Na₂S, 0,1 мг/кг; *Khimikon*, Россия), либо ингибитора цистатинин-β-синтазы (CBS) аминоксиуксусную кислоту (АОАА, 5,0 мг/кг; *Tianjin Xidian Chemical Technology Co., Ltd.*, Китай), соответственно. Использование Na₂S и АОАА позволяло эффективно модулировать уровень эндогенного H₂S в головном мозге: Na₂S способен эффективно высвобождать H₂S; а АОАА — ингибитор CBS, фермента, ответственного за эндогенный синтез H₂S. Препараты вводились внутривентрально после травмы в течение 7 дней ежедневно до выведения животных из эксперимента.

Для всех групп применялась одна модифицированная версия стандартного протокола для моделирования ЧМТ. Мыши получали анестезию путем внутривентральной инъекции хлоралгидрата (300 мг/кг). Затем сбрасывался груз с высоты 3 см на необнаженный череп. Координаты сброса груза задавались как 2 мм дорсально от брегмы, 1 мм латерально от срединной линии. Удар осуществлялся устройством для сброса груза, которое представляло собой металлический стержень (с наконечником диаметром 3 мм, длиной 5 мм) весом 200 г. После пробуждения от наркоза мыши возвращались в свое обычное жилище [12].

Иммунофлуоресцентный анализ

Для идентификации локализации каспазы-3 через 7 дней после ЧМТ использовался следующий протокол. Извлекалась область вокруг очага некроза, вызванного ударом груза, а также из левого, неповрежденного полушария. Вырезанный кусочек коры головного мозга мыши фиксировали в 4 % PFA в течение 12 часов при температуре +4 °C с постоянным помешиванием. Далее с помощью автоматического микротомы с вибрирующим лезвием Leica VT1000 S (*Leica Biosystems Nussloch*, Германия) были получены срезы толщиной 20 мкм. Для блокирования сайтов неспецифического связывания срезы инкубировали 60 мин при температуре +24 °C в растворе, содержащем 5 % BSA и 0,3 % тритоном X-100.

Затем срезы инкубировали с первичными антителами anti-CASP3 (1:100, Rabbit, AF6311, *Affinity*, Китай, антитело против каспазы-3) и anti-NeuN (1:1000, Mouse, FNA10266, *Fine Test*, Китай, антитело против ядерного белка NeuN) в течение 48 часов при температуре +4 °C. После многократной промывки в PBS срезы инкубировали с вторичными антителами anti-Rabbit IgG (H+L) Fluor 488-conjugated (1:500; S0018, *Affinity Biosciences*, Китай) и anti-Mouse IgG (H+L) Fluor 594-conjugated (1:500; S0005, *Affinity Biosciences*, Китай). Затем срезы заключали в глицерин, получая препараты для анализа на флуоресцентном микроскопе Альтами ЛЮМ 1 (*Ningbo Haishu Honyu Opto-Electro Co., LTD*, Китай совместно с компанией «Альтами», Россия), оснащенном цифровой камерой высокого разрешения EXCCD01400KPA (*Hangzhou Toup Tek Photonics Co., Ltd.*, Китай).

Анализ колокализации каспазы-3 с NeuN осуществлялся с использованием специального пакетного обеспечения *Image J*, дополненным плагином JACoP [13]. Оценку среднего уровня флуоресценции каспазы-3 проводили на 10 фотографиях срезов для каждой мыши, опыта и контроля, по следующей формуле:

$$I_{norm} = \frac{I_{mean} - I_{back}}{I_{back}},$$

где I_{mean} — средняя интенсивность в исследуемой области; I_{back} — средняя интенсивность фона.

Иммуноблоттинг

Исследование экспрессии каспазы-3 в условиях активации или ингибирования сигнального пути H₂S в области пенумбры коры головного мозга мышей после ЧМТ было проведено методом вестерн-блота. Через 7 дней после травмы животные были декапитированы, извлечен мозг, и на льду с помощью цилиндрического ножа была удалена область инфаркта. Далее другим ножом было вырезано кольцо шириной 2 мм, соответствующее пенумбре. Эти кольца сравнивались с контрольными образцами из коры другой стороны мозга той же мыши. Образцы подвергали гомогенизированию в буфере для лизиса тканей, который был дополнен ингибиторами протеаз и фосфатаз. Далее полученный гомогенат центрифугировали для получения надосадочной жидкости. В супернатанте определяли концентрацию белка, используя метод Бредфорда. Затем в лунки в полиакриламидном геле вносили 25 мкг белка в 20 мкл и подвергали электрофорезу в присутствии додецилсульфата натрия. В качестве оборудования использовалась Mini-PROTEAN Tetra (*Bio-Rad*, США). После электрофореза белки переносились на нитроцеллюлозную мембрану методом полусухого переноса с помощью Trans-Blot Turbo Transfer System (*Bio-Rad*, США). Затем использовались первичные антитела против каспазы-3 (1:100, AF6311, *Affinity*, Китай) и β-актина и вторичное антитело кролика к иммуноглобулину IgG, конъюгированное с пероксидазой хрена (HRP) (1:1000; S0001, *Affinity Biosciences*, Китай). Затем проводили хемилюминесцентную детекцию

белков. Для обнаружения хемилюминисценции использовали систему гель-документирования SH-Advance523 (Shenhua Science Technology Co., Ltd., Китай).

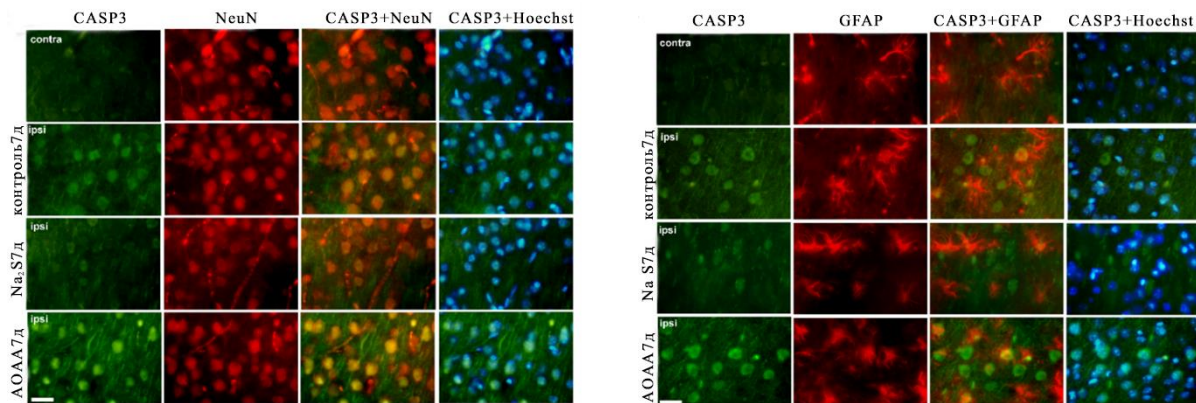
Статистический анализ

Для статистической обработки и анализа полученных результатов использовали метод однофакторного дисперсионного анализа. Парное множественное сравнение проводили с помощью критерия Тьюки. Параметрические критерии использовались при соблюдении правил нормальности и однородности дисперсий, которые оценивали с помощью теста Шапиро-Уилка и Брауна-Форсайта, соответственно. Если гипотеза о нормальности и гомогенности

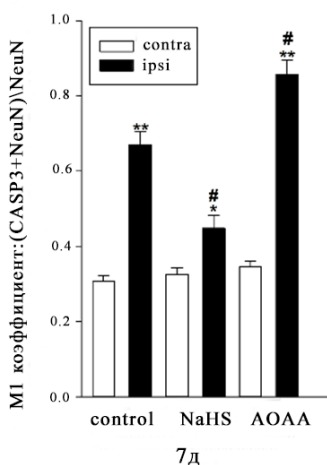
дисперсий не подтверждалась, использовался непараметрический критерий Краскела-Уоллиса. Статистически значимая достоверность считалась при $p < 0.05$. Для статистического анализа использовался программный пакет SigmaPlot версии 12.5 (Systat Software, Inc., США).

Результаты

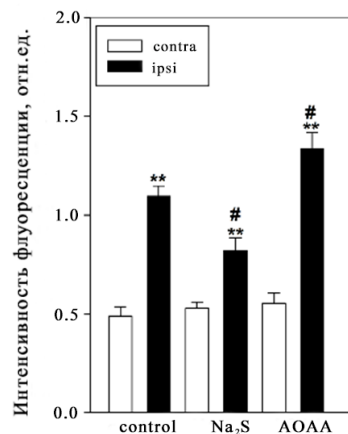
В результате иммунофлуоресцентной микроскопии было продемонстрировано, что каспаза-3 имеет локализацию в нервных и глиальных клетках. Их нуклеоплазма была визуализирована с помощью флуорохрома Hoechst 33342. Также колокализационный анализ показал, что каспаза-3 совместно обнаруживается с NeuN, ядерным белком нейронов, и GFAP, маркером астроцитов (рис. 1 а).



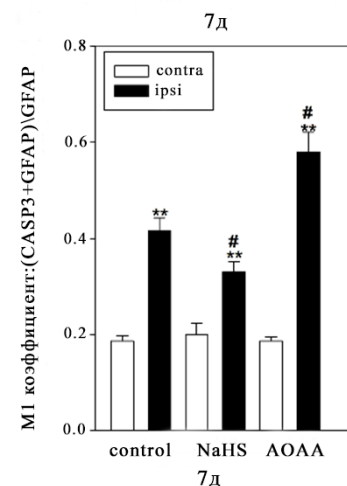
а)



б)



с)



д)

Рис. 1. Иммунофлуоресцентная микроскопия:

а — экспрессия каспазы-3 (Casp3, зеленая флуоресценция) в нейронах и астроцитах головного мозга мышей контрольной и экспериментальных групп через 7 суток после травмы. Масштабная линейка 20 мкм. NeuN — маркер ядер нейронов (красная флуоресценция); NeuN+Casp3 и Hoechst+Casp3 — колокализация. GFAP — маркер астроцитов (красная флуоресценция); GFAP+Casp3 и Hoechst+Casp3 — колокализация. Флуоресценция Hoechst — Hoechst 33342 (синяя флуоресценция), визуализирующий ядра всех клеток;

б — коэффициент M1 колокализации каспазы-3 и NeuN в контралатеральных и ипсилатеральных нейронах контрольной и экспериментальной групп через 7 суток после травмы;

с — зависимость средней интенсивности флуоресценции каспазы-3 в цитоплазме нервных клеток контралатеральной и ипсилатеральной коры контрольной и экспериментальных групп через 7 суток после травмы;

д — коэффициент M1 колокализации каспазы-3 и GFAP в астроцитах контралатеральной и ипсилатеральной коры контрольной и экспериментальной групп через 7 дней после ЧМТ. Contra — контралатеральная кора;

Ipsi — ипсилатеральная кора. One-wayANOVA. $M \pm SEM$. $n=6$

Примечание: ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ — ипсилатеральная кора относительно контралатеральной коры одного животного; # $p < 0.05$ — ипсилатеральная кора мышей экспериментальной группы по сравнению с ипсилатеральной корой мышей контрольной группы в течение одного периода времени после травмы

При этом экспрессия каспазы-3 в нейронах ипсилатеральной и контралатеральной коры мозга мышей контрольной и экспериментальных групп значительно отличается. Это подтверждают результаты коэффициента M1, отражающего степень колокализации NeuN с целевым белком, а именно с каспазой-3. В контралатеральной коре уровень каспазы-3 был незначительным во всех группах на протяжении всех временных интервалов после моделирования ЧМТ. Однако травматическое воздействие приводило к быстрому росту экспрессии каспазы-3 в нейронах поврежденной зоны мозга относительно контралатеральной области в 2,2 раза через 7 дней после ЧМТ ($p<0.01$). Использование Na₂S приводило к снижению уровня каспазы-3 на 32 % в ипсилатеральной коре относительно ипсилатерального полушария контрольной группы ($p<0.05$) (рис. 1 б).

Применение ингибитора CBS оказывало обратный эффект. Так через 7 суток после травмы значение коэффициента M1 каспазы-3 в поврежденных нейронах мозга животных, которым делали инъекцию АОАА, увеличился на 31 % ($p<0.05$) относительно поврежденных клеток контроля. Также экспрессия каспазы-3 увеличилась в 2,5 раза ($p<0.01$) в нервных клетках ипсилатерального полушария группы животных, которым делали инъекцию АОАА, относительно нейронов противоположного полушария этого же животного (рис. 1 б).

Анализ флуоресценции каспазы-3 в цитоплазме нейронов также показал, что уровень данного фермента увеличивается в поврежденных нервных клетках. Интенсивность флуоресценции в цитоплазме нейронов контрольной группы и экспериментальных животных, которым вводили Na₂S и АОАА, увеличивалась в 2,7 раза ($p<0.01$), на 56 % ($p<0.01$), и в 2,4 раза ($p<0.01$) относительно контралатеральной коры, соответственно. При этом уровень каспазы-3 уменьшался в ипсилатеральной коре животных, которым вводили Na₂S, и увеличивался в группе, которой вводили АОАА, относительно ипсилатеральной коры контроля на 26 % ($p<0.05$) и 21 % ($p<0.05$) через 7 дней после ЧМТ, соответственно (рис. 1 с).

Далее мы исследовали уровень каспазы-3 в астроцитах, которые идентифицировали с помощью специфического маркера GFAP. С помощью анализа колокализации нам удалось установить, что каспаза-3 экспрессируется в этом типе глиальных клеток после ЧМТ. Кроме этого, донор Na₂S и ингибитор АОАА оказывали противоположные эффекты на динамику экспрессии каспазы-3 в астроцитах после ЧМТ (рис. 1 д). Так было показано, что уровень данного фермента увеличивается в ипсилатеральной коре контрольной и экспериментальных групп, которым

вводили Na₂S и АОАА, относительно контралатеральной коры в 2,2 раза ($p<0.01$), 65 % ($p<0.01$), и в 3 раза ($p<0.01$), соответственно. Также уровень каспазы-3 уменьшался в ипсилатеральной коре животных, которым вводили Na₂S, и увеличивался в группе, которой вводили АОАА, относительно ипсилатеральной коры контроля на 19 % ($p<0.05$) и 41 % ($p<0.05$) через 7 дней после ЧМТ, соответственно (рис. 1 с).

Данные флуоресцентной микроскопии подтверждают результаты, полученные в ходе вестерн-блот анализа общей фракции нервной ткани головного мозга контрольной и экспериментальных групп, которым вводили Na₂S и АОАА (рис. 2).

Было показано, что экспрессия каспазы-3 через 7 дней после ЧМТ увеличивается в ипсилатеральной коре мозга животных контрольной и экспериментальных групп, которым вводили Na₂S и АОАА, относительно контралатеральной коры в 2 раза ($p<0.001$), 36 % ($p<0.05$), и практически в 2,6 раза ($p<0.001$), соответственно. При этом экспрессия каспазы-3 в ипсилатеральной коре животных, которым вводили Na₂S и АОАА, относительно ипсилатеральной коры контроля уменьшалась на 24 % ($p<0.05$) и увеличивалась на 44 % ($p<0.05$), соответственно (рис. 2).

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что иммунофлуоресцентная микроскопия показала, что каспаза-3 колокализуется с маркерами нейрональных ядер NeuN и астроцитов GFAP в нейронах и глиальных клетках. В контрольной и экспериментальных группах наблюдались различия в экспрессии каспазы-3 между ипсилатеральной (поврежденной) и контралатеральной (неповрежденной) корой мозга. Травма приводила к значительному увеличению экспрессии каспазы-3 в нейронах и глиальных клетках поврежденной области через 7 дней после ЧМТ, что указывало на активацию апоптоза.

Использование донора Na₂S снижало уровень каспазы-3 в нейронах ипсилатеральной коры, а ингибитор АОАА вызывал противоположный эффект, увеличивая экспрессию каспазы-3. Аналогичные результаты были получены при изучении каспазы-3 в астроцитах, где наблюдалась повышенная экспрессия в группе с АОАА и пониженная в группе с Na₂S.

Вестерн-блот анализ общей фракции нервной ткани головного мозга контрольной и экспериментальных групп подтвердил результаты иммунофлуоресцентной микроскопии. Введение Na₂S снижало экспрессию каспазы-3 в поврежденной области, тогда как АОАА способствовало её увеличению. Эти данные свидетельствуют о важной роли H₂S в регуляции апоптоза в нейронах и глиальных клетках после ЧМТ.

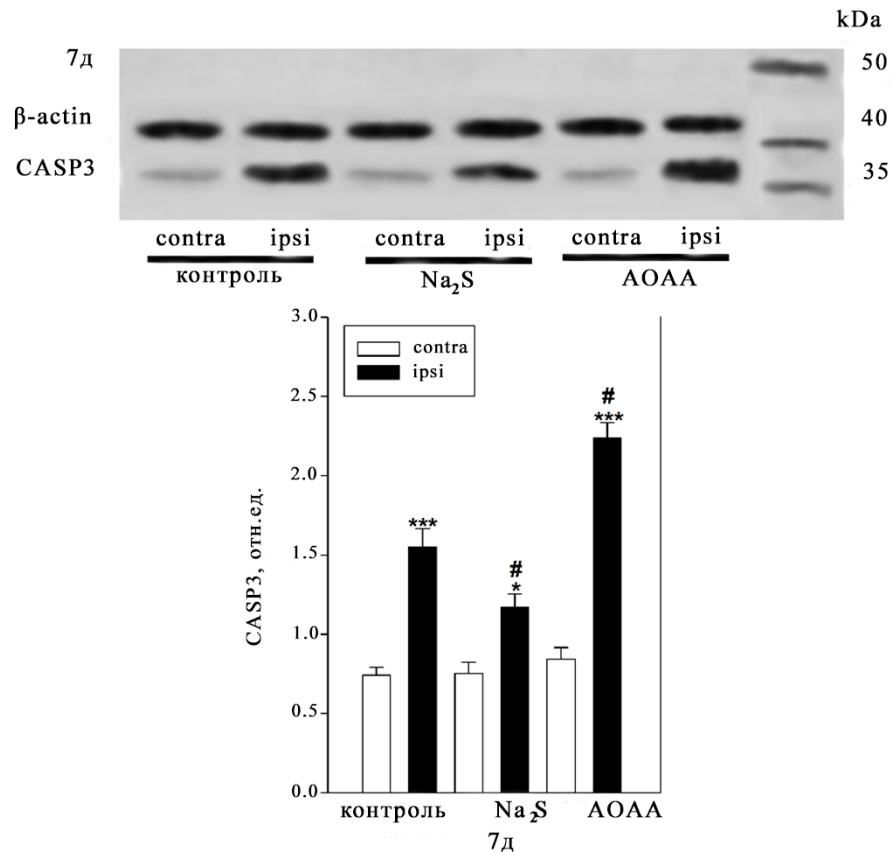


Рис. 2. Вестерн-блот. Экспрессия каспазы-3 в контралатеральной и ипсилатеральной коре контрольной и экспериментальных групп через 7 суток после травмы. One-way ANOVA. M±SEM. n=6

Примечание: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ — ипсилатеральная кора относительно контралатеральной коры одного животного; # $p < 0.05$ — ипсилатеральная кора экспериментальной группы по сравнению с ипсилатеральной корой контрольной группы в течение одного периода времени после травмы

Обсуждение

На сегодняшний день известно, что H₂S может выступать в качестве мощного регулятора процесса апоптоза при нейротравмах. H₂S-зависимые механизмы регулирования клеточной гибели исследовались на многих экспериментальных моделях с использованием разных доноров H₂S и ингибиторов ферментов, ответственных за синтез H₂S. Однако роль H₂S-зависимых сигнальных механизмов в регулировании экспрессии и локализации каспазы-3 в нейронах и глиальных клетках при ЧМТ недостаточно изучены.

В нашем исследовании было показано, что H₂S является важным звеном в контроле уровня каспазы-3 в клетках головного мозга в условиях индуцированной механической травмы, моделирующей ЧМТ. Интенсивность клеточной гибели при вторичном повреждении, вызванном ЧМТ, напрямую коррелирует с уровнем проапоптотических белков. Каспаза-3 является одним из ключевых белков апоптоза. Увеличение уровня данного протеолитического фермента свидетельствует об инициации процессов, ведущих к клеточной гибели. Примененные нами быстрый донор сероводорода Na₂S и классический ингибитор ключевого фермента синтеза H₂S в нервной ткани АОАА оказывали противо-

ложные эффекты на экспрессию данного белка. Исходный уровень каспазы-3 в неповрежденных нейронах и глиальных клетках головного мозга был низким. Однако через 7 дней после ЧМТ уровень каспазы-3 значительно увеличивался, особенно в нейронах, а также глиальных клетках. Использование Na₂S позволяло снизить экспрессию данного фермента. Обратный эффект наблюдался в условиях ингибирования CBS с помощью АОАА.

H₂S регулирует уровень каспазы-3 через различные молекулярные механизмы, многие из которых связаны с его способностью влиять на антиапоптотические и антиоксидантные системы клеток. Одним из ключевых путей является повышение экспрессии белков семейства Bcl-2 [14], которые препятствуют активации каспаз, включая каспазу-3 [15]. Bcl-2 взаимодействует с проапоптотическими белками, такими как Bax и Bak, и предотвращает высвобождение цитохрома c из митохондрий. Это важный этап в процессе апоптоза, так как Cyt c участвует в формировании апоптосомного комплекса с Araf-1 [16], который активирует каспазы и инициирует клеточную гибель. H₂S, повышая уровень Bcl-2, стабилизирует митохондриальные мембраны и препятствует апоптозу.

Кроме того, H₂S действует как мощный антиоксидант, эффективно снижая уровень активных форм кислорода (АФК), которые играют важную роль в индукции апоптоза через активацию каспаз [4, 5, 17, 18]. Повышение уровня АФК вызывает повреждение митохондрий, что ведет к активации каспаз и последующей гибели клеток. Однако H₂S, обладая восстановительными свойствами, может напрямую нейтрализовать АФК, снижая их окислительный потенциал. Это уменьшает стресс на клеточные структуры, в том числе на митохондрии, и препятствует запуску каскада апоптоза. Более того, H₂S может активировать ряд антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза и каталаза, защищая клетки от избыточного уровня АФК [4, 19].

H₂S также способен напрямую взаимодействовать с ферментом каспазой-3. Важно отметить, что в составе каспазы-3 содержится критически важный остаток цистеина, который может быть мишенью для модификации через персульфидирование — процесс, при котором H₂S присоединяет серу к тиоловой группе цистеина. Персульфидирование остатка цистеина 163 в активном центре каспазы-3 приводит к ингибированию её протеолитической активности, что предотвращает расщепление субстратов каспазы-3 и, соответственно, замедляет или останавливает апоптоз [20]. Это показывает, что H₂S может оказывать двойное действие на апоптоз: как опосредованно — через регуляцию антиапоптотических и антиоксидантных путей, — так и напрямую, ингибируя активацию каспаз.

Список литературы/References

1. Maas AIR, Menon DK, Manley GT, Abrams M, Åkerman C, Andelic N, et al. Traumatic Brain Injury: Progress and Challenges in Prevention, Clinical Care, and Research. *Lancet Neurology*. 2022;21(12):1004–1060. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(22\)00309-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(22)00309-X)
2. Capizzi A, Woo J, Verduzco-Gutierrez M. Traumatic Brain Injury: An Overview of Epidemiology, Pathophysiology, and Medical Management. *Medical Clinics of North America*. 2020;104(2):213–238. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2019.11.001>
3. Ladak AA, Enam SA, Ibrahim MT. A Review of the Molecular Mechanisms of Traumatic Brain Injury. *World Neurosurgery*. 2019;131:126–132. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.07.039>
4. Rodkin S, Nwosu C, Sannikov A, Raevskaya M, Tushev A, Vasilieva I, et al. The Role of Hydrogen Sulfide in Regulation of Cell Death Following Neurotrauma and Related Neurodegenerative and Psychiatric Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(13):10742. <https://doi.org/10.3390/ijms241310742>
5. Rodkin S, Nwosu C, Sannikov A, Tyurin A, Chulkov VS, Raevskaya M, et al. The Role of Gasotransmitter-Dependent Signaling Mechanisms in Apoptotic Cell Death in Cardiovascular, Rheumatic, Kidney, and Neurodegenerative Diseases and Mental Disorders. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(7):6014. <https://doi.org/10.3390/ijms24076014>
6. Sun J, Li X, Gu X, Du H, Zhang G, Wu J, et al. Neuroprotective Effect of Hydrogen Sulfide against Glutamate-Induced Oxidative Stress Is Mediated via the p53/Glutaminase 2 Pathway after Traumatic Brain Injury. *Aging*. 2021;13(5):7180–7189. <https://doi.org/10.18632/aging.202575>
7. Zhang J, Zhang S, Shan H, Zhang M. Biologic Effect of Hydrogen Sulfide and Its Role in Traumatic Brain Injury. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2020;2020(1):7301615. <https://doi.org/10.1155/2020/7301615>
8. Chen D, Fang Y-L, Zhang L-L, Niu X-Y, Sun X-R, Niu X-Z, et al. Hydrogen Sulfide Ameliorates Isoflurane-Induced Cognitive Impairment in Mice: Implication of Caspase-3 Activation. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2020;19(4):773–780. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v19i4.14>

Дополнительно H₂S может модулировать другие сигнальные пути, связанные с клеточной гибелью. Например, он может активировать сигнальный путь Nrf2 (ядерный фактор эритроидного 2-го типа), который является ключевым регулятором антиоксидантной защиты клеток. Nrf2 при активации запускает транскрипцию множества генов, отвечающих за антиоксидантную и цитопротекторную функции, тем самым снижая уровень оксидативного стресса и защищая клетки от апоптотического повреждения [21, 22].

Также следует отметить, что H₂S может взаимодействовать с другими газотрансмиттерами, такими как оксид азота (NO) и угарный газ (CO), образуя комплексные сигнальные сети, которые регулируют клеточную выживаемость [23]. Синергетическое или антагонистическое взаимодействие H₂S с NO и CO может оказывать влияние на различные этапы апоптоза, включая активацию или ингибирование каспаз.

Таким образом, в нашем исследовании мы детально рассмотрели экспрессию и локализацию каспазы-3 в нейронах и астроцитах головного мозга при ЧМТ. Полученные в ходе исследования результаты носят как фундаментальное, так и практическое значение. Данные о роли H₂S в регуляции ключевого проапоптотического белка каспазы-3 расширяют представления о внутриклеточных сигнальных процессах выживания и гибели клеток нервной системы, а АОАА и Na₂S могут лечь в основу разработки клинически эффективных нейропротекторных препаратов.

9. Yang G, Sun X, Wang R. Hydrogen Sulfide-Induced Apoptosis of Human Aorta Smooth Muscle Cells via the Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases and Caspase-3. *FASEB Journal*. 2004;18(14):1782–1784. <https://doi.org/10.1096/fj.04-2279fje>
10. Kobayashi C, Yaegaki K, Calenic B, Ishkitiev N, Imai T, Ii H, et al. Hydrogen Sulfide Causes Apoptosis in Human Pulp Stem Cells. *Journal of Endodontics*. 2011;37(4):479–484. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.01.017>
11. Ryazantseva NV, Novitsky VV, Starikova EG, Kleptsova LA, Jakushina VD, Kaigorodova EV. Role of Hydrogen Sulfide in the Regulation of Cell Apoptosis. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011;151:702–704. <https://doi.org/10.1007/s10517-011-1420-y>
12. Rodkin S, Nwosu C, Raevskaya M, Khanukaev M, Bekova K, Vasilieva I, et al. The Role of Hydrogen Sulfide in the Localization and Expression of p53 and Cell Death in the Nervous Tissue in Traumatic Brain Injury and Axotomy. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023;24(21):15708. <https://doi.org/10.3390/ijms242115708>
13. Fletcher PA, Scriven DRL, Schulson MN, Moore EDW. Multi-Image Colocalization and Its Statistical Significance. *Biophysical Journal*. 2010;99(6):1996–2005. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2010.07.006>
14. Zhang L-M, Jiang C-X, Liu D-W. Hydrogen Sulfide Attenuates Neuronal Injury Induced by Vascular Dementia Via Inhibiting Apoptosis in Rats. *Neurochemical Research*. 2009;34:1984–1992. <https://doi.org/10.1007/s11064-009-0006-9>
15. Mooney SM, Miller MW. Expression of Bcl-2, Bax, and Caspase-3 in the Brain of the Developing Rat. *Developmental Brain Research*. 2000;123(2):103–117. [https://doi.org/10.1016/S0165-3806\(00\)00081-X](https://doi.org/10.1016/S0165-3806(00)00081-X)
16. Alam M, Alam S, Shamsi A, Adnan M, Elsbali AM, Al-Soud WA, et al. Bax/Bcl-2 Cascade Is Regulated by the EGFR Pathway: Therapeutic Targeting of Non-Small Cell Lung Cancer. *Frontiers in Oncology*. 2022;12:869672. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.869672>
17. Luo Y, Yang X, Zhao S, Wei C, Yin Y, Liu T, et al. Hydrogen Sulfide Prevents OGD/R-Induced Apoptosis via Improving Mitochondrial Dysfunction and Suppressing an ROS-Mediated Caspase-3 Pathway in Cortical Neurons. *Neurochemistry International*. 2013;63(8):826–831. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2013.06.004>
18. Thayyullathil F, Chathoth S, Hago A, Patel M, Galadari S. Rapid Reactive Oxygen Species (ROS) Generation Induced by Curcumin Leads to Caspase-Dependent and -Independent Apoptosis in L929 Cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008;45(10):1403–1412. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.014>
19. Rodkin SV, Nwosu CD. Role of Nitric Oxide and Hydrogen Sulfide in Neuronal and Glial Cell Death in Neurodegenerative Processes. *Biologičeskie membrany*. 2023;40(5):306–327. <https://doi.org/10.31857/S0233475523050067>
20. Ye X, Li Y, Lv B, Qiu B, Zhang S, Peng H, et al. Endogenous Hydrogen Sulfide Persulfidates Caspase-3 at Cysteine 163 to Inhibit Doxorubicin-Induced Cardiomyocyte Apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022;(1):6153772. <https://doi.org/10.1155/2022/6153772>
21. Corsello T, Komaravelli N, Casola A. Role of Hydrogen Sulfide in NRF2- and Sirtuin-Dependent Maintenance of Cellular Redox Balance. *Antioxidants*. 2018;7(10):129. <https://doi.org/10.3390/antiox7100129>
22. Yang G, Zhao K, Ju Y, Mani S, Cao Q, Puukila S, et al. Hydrogen Sulfide Protects Against Cellular Senescence via S-Sulfhydration of Keap1 and Activation of Nrf2. *Antioxidants and Redox Signaling*. 2013;18(15):1906–1919. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4645>
23. Huang Y-Q, Jin H-F, Zhang H, Tang C-S, Du J-B. Interaction among Hydrogen Sulfide and Other Gasotransmitters in Mammalian Physiology and Pathophysiology. In: Zhu YC. (Ed.) *Advances in Hydrogen Sulfide Biology. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol 1315*. Singapore: Springer; 2021. P. 205–236. https://doi.org/10.1007/978-981-16-0991-6_9

Об авторах:

Станислав Владимирович Родькин, кандидат биологических наук, доцент кафедры биоинженерии, заведующий лабораторией медицинских цифровых изображений на основе базисной модели Донского государственного технического университета (344003, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, д. 1), [SPIN-код](#), [ORCID](#), rodkin_stas@mail.ru

Кириченко Евгения Юрьевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой биоинженерии Донского государственного технического университета (344003, Российская Федерация, г. Ростов-на-Дону, пл. Гагарина, д. 1), [SPIN-код](#), [ORCID](#), kiriche.evgeniya@yandex.ru

Заявленный вклад авторов:

С.В. Родькин: формирование основной концепции, цели и задач исследования, проведение лабораторных исследований, анализ полученных результатов, написание рукописи.

Е.Ю. Кириченко: анализ полученных результатов, валидация, написание рукописи.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант рукописи.

About the Authors:

Stanislav V. Rodkin, Cand.Sci. (Biology), Associate Professor of the Bioengineering Department, Head of the Laboratory "Digital Medical Imaging Using the Basic Model", Don State Technical University (1, Gagarin Sq., Rostov-on-Don, 344003, Russian Federation), [SPIN-code](#), [ORCID](#), rodkin_stas@mail.ru

Evgeniya Yu. Kirichenko, Dr.Sci.(Biology), Professor, Head of the Bioengineering Department, Don State Technical University (1, Gagarin Sq., Rostov-on-Don, 344003, Russian Federation), [SPIN-code](#), [ORCID](#), kiriche.evgeniya@yandex.ru

Claimed Contributorship:

SV Rodkin: formulating the main concept, aim and objectives of the research, conducting laboratory experiments, analysis of the obtained results, writing the manuscript.

EYu Kirichenko: analysis of the obtained results and validation thereof, writing the manuscript.

Conflict of Interest Statement: the authors declare no conflict of interest.

All authors have read and approved the final manuscript.

Поступила в редакцию / Received 15.02.2025

Поступила после рецензирования / Reviewed 13.03.2025

Принята к публикации / Accepted 19.03.2025