

## ВЛИЯНИЕ SKQ1 НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА *NRF2*, ARE-КОНТРОЛИРУЕМЫХ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ АКТИВНОСТЬ В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ КРЫС ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

© 2015 В.В. Внуков, О.И. Гуценко, Н.П. Милютин\*,  
И.В. Корниенко, А.А. Ананян, А.О. Даниленко, С.Б. Панина,  
А.А. Плотников, М.С. Макаренко

Южный федеральный университет, Академия биологии  
и биотехнологии им. Д.И. Иванковского, кафедра биохимии и микробиологии,  
344090 Ростов-на-Дону; электронная почта: natmilut@rambler.ru

Поступила в редакцию 27.07.15  
После доработки 13.08.15

Установлено, что при окислительном стрессе, вызванном гипероксией (0,5 МПа, 90 мин), наблюдается снижение уровня мРНК фактора транскрипции *Nrf2* и *Nrf2*-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов (*SOD1*, *CAT*, *GPx4*) в лейкоцитах периферической крови крыс. Изменение профиля экспрессии исследованных генов при гипероксии сопровождается дисбалансом активности антиоксидантных ферментов в лейкоцитах – активацией супероксиддисмутазы, ингибированием каталазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Введение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение 5 дней приводит к повышению уровня мРНК фактора транскрипции *Nrf2* и *Nrf2*-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов *SOD2* и *GPx4*, нормализации транскрипционной активности генов *SOD1* и *CAT* в лейкоцитах при окислительном стрессе, вызванном гипероксией. Одновременно в лейкоцитах наблюдалось увеличение активности каталазы и глутатионпероксидазы на фоне возвращения к контрольному уровню активности супероксиддисмутазы и глутатион-S-трансферазы. Предполагается, что протекторный эффект SkQ1 в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса может реализоваться посредством прямого антиоксидантного действия и путем стимуляции защитной системы Keap1/*Nrf2*/ARE.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** митохондриально-адресованный антиоксидант, лейкоциты, экспрессия генов, антиоксидантные ферменты, гипероксия.

Окислительный стресс и свободнорадикальное повреждение клеточных компонентов сопровождают развитие многих заболеваний и экстремальных состояний, а также участвуют в процессах адаптации и старения [1–3]. Для исследования механизмов окислительного стресса применяются методы моделирования, среди которых достаточно распространенной экспериментальной моделью является гипероксия [4, 5]. Согласно данным различных авторов, в развитии окислительного стресса, вызванного гипероксией, важная роль принадлежит митохондриальной дисфункции [6, 7]. Вместе с тем гипербарооксигенация (ГБО) широко используется в клинической практике при терапии различных патологических состояний [8]. Для коррекции нарушений гомеостаза при окислительном стрессе применяют фармакологические агенты, обладающие антиоксидантными свойствами,

среди которых наиболее эффективными являются митохондриально-направленные антиоксиданты семейства SkQ [9, 10].

К настоящему времени установлено, что в защите клетки от электрофильного/окислительного стресса центральную роль играет редокс-чувствительная сигнальная система Keap1/*Nrf2*/ARE [11]. Во многих исследованиях обнаружены различные индукторы данной системы [12], к которым принадлежит SkQ1 (10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний), благодаря присутствию в его структуре пластохинона, содержащего хинонные группы в пара-положении [13].

Целью данной работы являлось изучение влияния митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQ1 на экспрессию гена фактора транскрипции *Nrf2* и *Nrf2*-зависимых генов антиоксидантных ферментов и их активность в лейкоцитах крови крыс при окислительном стрессе, вызванном гипероксией.

\* Адресат для корреспонденции.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на беспородных крысах *Rattus norvegicus* (самцы массой 180–200 г). Все подопытные животные были разделены на три группы: 1 группа (10–23 животных) (контрольная) – интактные животные, содержащиеся в стандартных условиях вивария; 2 группа (10–18 животных) – животные, подвергнутые действию ГБО (0,5 МПа, 90 мин) с последующей декапитацией через 12 час после ГБО. Подопытных животных помещали в барокамеру объемом 60 л, снабженную щелочным поглотителем углекислоты. После 3-минутной вентиляции чистым кислородом в барокамере создавалось давление 0,5 МПа. Компрессию и декомпрессию проводили со скоростью 0,2 МПа/мин, изопрессия составляла 90 мин. Данный режим ГБО (0,5 МПа, 90 мин) вызывает острый окислительный стресс [14]; 3 группу (10–22 животных) составили животные, которым в течение 5 дней вводили препарат SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг, а затем через 1 ч после последнего введения подвергали действию ГБО (0,5 МПа, 90 мин) с последующей декапитацией через 12 ч после сеанса ГБО. Препарат (в рассчитанной дозе) растворяли в 0,2%-ном растворе этанола и вводили 100 мкл в защечные мешки животных.

Все процедуры с животными выполняли с соблюдением принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в эксперименте или научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 г.).

Анализ экспрессии мРНК проводили с помощью метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) со специфическими праймерами. Для исследования брали 50 мкл крови. Суммарную РНК выделяли методом гуанидин-тиоцианат-фенол-хлороформной экстракции с использованием коммерческого набора «РИБО-золь-В» производства ООО «ИнтерЛабСервис» (Россия). Качество выделенной РНК оценивали в электрофорезе в 1,2%-ном агарозном геле, количество – по оптической плотности при 260 нм. Для синтеза кДНК использовали набор реагентов для обратной транскрипции производства «SYNTOL» (Россия), содержащий MMLV-RT (ревертазу вируса лейкемии мышей Молони), праймер Random-6, смесь дезоксирибонуклеотидилтрифосфатов (dNTP), ингибитор РНКаз.

Исследование уровня экспрессии генов фактора транскрипции *Nrf2* (*Nrf2*), изоферментов супероксиддисмутазы – Cu,Zn-СОД (*SOD1*), Mn-СОД (*SOD2*), внеклеточной СОД (*SOD3*), каталазы (*CAT*), глутатионпероксидазы 4 (*GPx4*) выполняли методом ПЦР в реальном времени

(ПЦР-РВ) в присутствии интеркалирующего красителя EVA Green («Molecular probes», США) с использованием набора реагентов для проведения ПЦР-РВ производства «SYNTOL» (Россия). Для проведения ПЦР-РВ использовался прибор iQ5 real-time PCR detection system («Bio-Rad Laboratories», США). В качестве гена сравнения использовали  $\beta$ -актин (*BACT*). Специфические праймеры подбирали с помощью программы Primer BLAST и Primer 3. Последовательности специфических праймеров представлены в таблице. Для оценки эффективности (E) каждой пары праймеров ПЦР проводили с различными разведениями (1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8) кДНК с последующим вычислением усредненного  $\Delta Ct$ . Эффективность используемых праймеров представлена в таблице.

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

Анализ графиков накопления продуктов ПЦР проводили на основе программного обеспечения «Bio-Rad IQ5 Optical System Software Version 2.0»; данные ПЦР-РВ анализа обрабатывали с помощью программного обеспечения iCycler IQ5 («BioRad», USA). Количественную оценку относительного уровня экспрессии генов рассчитывали по методу  $\Delta Ct$  с использованием гена сравнения.

Материалом для биохимических исследований служила суспензия мононуклеарных клеток, выделенных из цельной крови в градиенте плотности фиколл-верографина ( $\rho = 1,077$ ) по методу Боум [15]. Клетки трижды промывали и затем суспендировали забуференным Tris-HCl изотоническим раствором хлорида натрия, pH 7,4.

Активность супероксиддисмутазы (SOD) оценивали по ингибированию восстановления нитросинего тетразолия (НТС) супероксидом, генерируемым при аутоокислении адреналина [16]. Активность каталазы определяли по реакции перекиси водорода с молибдатом аммония [17]; активность глутатионпероксидазы (GPx) – по скорости окисления восстановленного глутатиона в присутствии гидроперекиси третичного бутила [18], активность глутатион-S-трансферазы (GST) – по скорости реакции ферментативного образования конъюгатов восстановленного глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом [19]. Активность миелопероксидазы (MPx) определяли спектрофотометрическим методом [20], активность NADPH-оксидазы – по восста-

Праймеры для ПЦР-РВ и эффективность используемых пар праймеров

Ген	Нуклеотидная последовательность прямого (f) и обратного (r) праймеров	Пара праймеров	Эффективность, E
<i>BACT</i>	f: 5'-agccatgtacgtagccatcc-3' r: 5'-tcggaaccgctcattgccg-3'	<i>BACT-f</i> , <i>BACT-r</i>	0,953
<i>Nrf2</i>	f: 5'-atgtcaccagctcaagggcacagtgc-3' r: 5'-ccatcctccccgaacctagtt-3'	<i>Nrf2-f</i> , <i>Nrf2-r</i>	0,970
<i>SOD1</i>	f: 5'-aaccagttgtgtgtcagga-3' r: 5'-ctcctgagagtgagatcaca-3'	<i>SOD1-f</i> , <i>SOD1-r</i>	0,930
<i>SOD2</i>	f: 5'-taacgcgcagatcatcgag-3' r: 5'-gtcacgcttgatagcctcca-3'	<i>SOD2-f</i> , <i>SOD2-r</i>	0,873
<i>SOD3</i>	f: 5'-aggctctttctcaggcctc-3' r: 5'-agatctccaggtcttggag-3'	<i>SOD3-f</i> , <i>SOD3-r</i>	0,933
<i>CAT</i>	f: 5'-ttctacactgaagatgtaactg-3' r: 5'-gaaagtaacctgatggagagac-3'	<i>CAT-f</i> , <i>CAT-r</i>	0,903
<i>GPx4</i>	f: 5'-ggctacaatgtcaggtt-3' r: 5'-ttatcaatgagaaacttgtaa-3'	<i>GPx4-f</i> , <i>GPx4-r</i>	0,780

новлению 2,6-дихлорфенилиндофенола в присутствии NADPH [21].

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Biostat (Version 2009 Professional – Сборка 5.8.4.3 Analyst Soft); проверку нормальности распределения – по критерию Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Для данных с распределением, отличным от нормального, применяли непараметрический U-критерий Манна–Уитни. Статистическую обработку данных, имеющих нормальное распределение, проводили с использованием t-критерия Стьюдента для малых выборок. Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости  $p$  принимали равным 0,05. При  $0,05 < p < 0,1$  рассматривали тенденцию к достоверности различий.

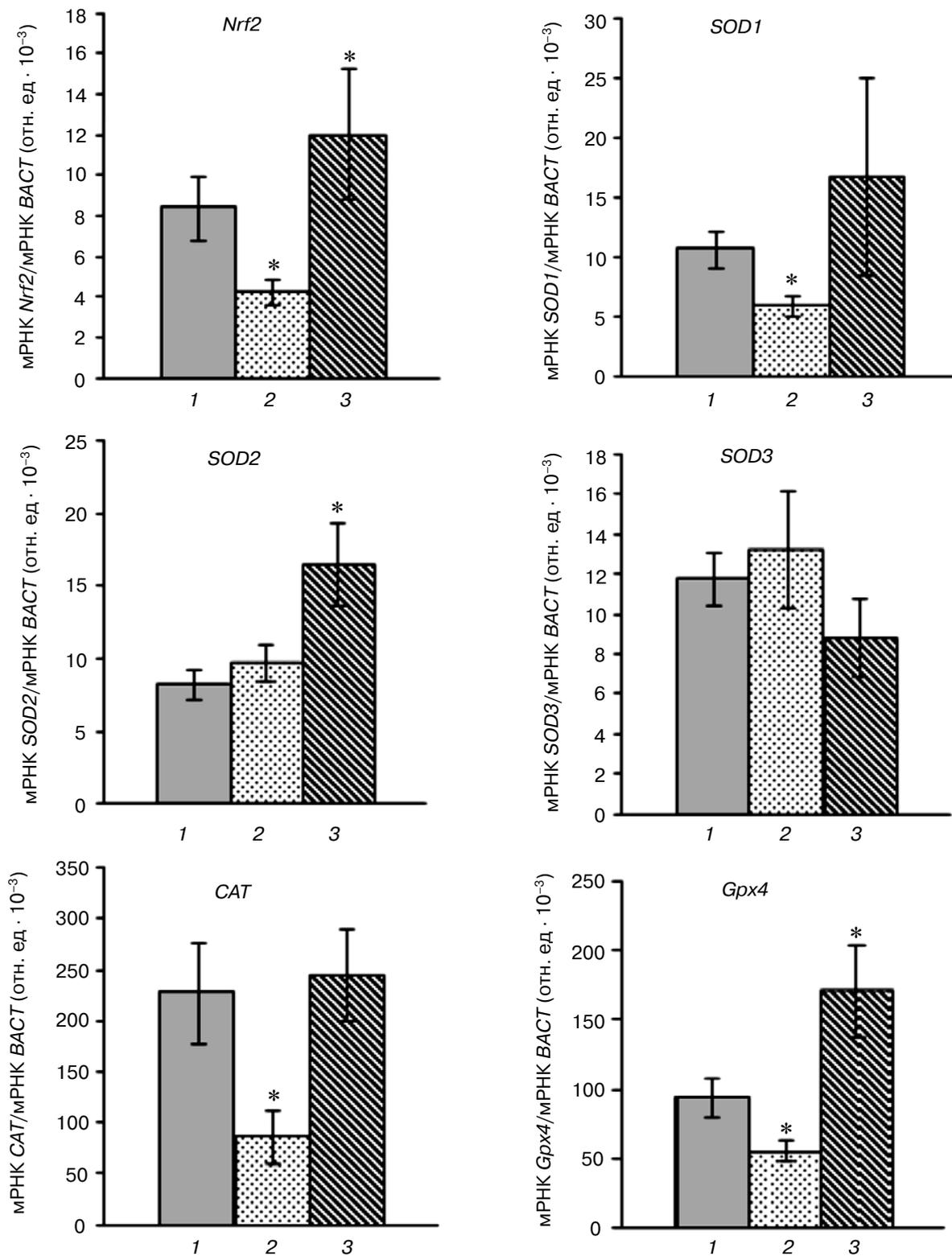
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В условиях окислительного стресса, вызванного ГБО (0,5 МПа, 90 мин), в лейкоцитах крови крыс наблюдается снижение на 33% уровня экспрессии гена ядерного фактора транскрипции *Nrf2*, который, как известно, играет критическую роль в защите от окислительного стресса при гипероксии [22, 23]. Это подтверждается соответствующим снижением относительного уровня мРНК фактора транскрипции *Nrf2* относительно контроля (рис. 1). На фоне подавления транскрипционной активности гена *Nrf2* в лей-

коцитах крови крыс при гипероксии наблюдается снижение уровня экспрессии ARE-контролируемых генов антиоксидантных ферментов – супероксиддисмутазы 1 (*SOD1*), каталазы (*CAT*), митохондриальной изоформы глутатионпероксидазы 4 (*GPx4*). Так, содержание мРНК *SOD1* снижается на 44%, мРНК *CAT* – на 62%, мРНК *GPx4* – на 40% в лейкоцитах по сравнению с нормой (рис. 1). При этом в этих же условиях в лейкоцитах не обнаружено статистически достоверных различий в уровне экспрессии генов *SOD2* и *SOD3* относительно контрольной группы животных.

Предварительное применение SkQ1 в течение 5 дней перед воздействием ГБО приводило в постгипероксический период к повышению транскрипционной активности гена *Nrf2*, а также генов *SOD2* и *GPx4*, что подтверждается увеличением количества мРНК *Nrf2* на 47%, мРНК *SOD2* и *GPx4* – на 99 и 80% соответственно, в лейкоцитах крови крыс относительно контроля. При этом не отличается от нормы экспрессия генов *SOD1* и *CAT*, которая была понижена при ГБО-индуцированном стрессе в лейкоцитах животных, которым не применяли SkQ1 (рис. 1). Ранее было продемонстрировано стимулирующее влияние SkQ1 на экспрессию гена фактора транскрипции *Nrf2* и *Nrf2*-зависимых генов (*SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *GPx4*) в лейкоцитах крови крыс в физиологических условиях [13].

При исследовании активности антиоксидантных ферментов установлено, что после действия



**Рис. 1.** Влияние SkQ1 на уровень мРНК гена *Nrf2* и генов антиоксидантных ферментов в лейкоцитах крови крыс после ГБО-индуцированного окислительного стресса.  $M \pm m$ . Число животных в группах 13–26. Статистически значимые различия между контрольной и опытной группой отмечены символом \* ( $p < 0,05$ ); 1 – контроль, 2 – ГБО, 3 – SkQ1 + ГБО

ГБО (0,5 МПа, 90 мин) в лейкоцитах крови крыс наблюдается нарушение согласованности их функционирования (рис. 2). В постгипероксический период в лейкоцитах активность супероксиддисмутазы (SOD) повышается на 66%, тогда как активность каталазы, глутатионпероксидазы (GPx) и глутатион-S-трансферазы (GST) снижается на 54, 47 и 62% соответственно, что способствует активации свободнорадикального окисления.

Причем, снижение активности каталазы и глутатионпероксидазы в лейкоцитах после ГБО согласуется со снижением уровня экспрессии генов *CAT* и *GPx4*, тогда как повышение общей активности SOD в лейкоцитах происходит на фоне ингибирования уровня экспрессии гена *SOD1* и сохранения уровня транскрипционной активности генов *SOD2* и *SOD3*, характерного для нормы.

Применение SkQ1 в течение 5 дней перед сеансом ГБО приводит в постгипероксический период к нормализации активности SOD и GST, активации каталазы на 67% и GPx на 79% в лейкоцитах крови крыс (рис. 2). Исходя из полученных результатов следует, что предварительное применение SkQ1 способствует нормализации активности одних антиоксидантных ферментов (SOD, GST) и активации других (каталаза, GPx) в постгипероксический период. При этом общая активность SOD в лейкоцитах животных, получавших SkQ1, после ГБО остается в пределах нормы, тогда как уровень экспрессии гена *SOD2* существенно повышается, а генов *SOD1* и *SOD3* не изменяется относительно контроля. Активация каталазы в лейкоцитах животных, которым применяли SkQ1 перед сеансом ГБО, происходит на фоне стационарного уровня экспрессии гена *CAT*, а повышение общей активности GPx совпадает с увеличением транскрипционной активности гена *GPx4*. В ранее проведенных исследованиях [13] было показано, что в физиологических условиях применение SkQ1 способствует значительной активации таких антиоксидантных ферментов как каталаза, GPx, GST, тогда как общая активность SOD поддерживается на стационарном уровне.

Применение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение 5 дней не вызывает достоверных изменений активности прооксидантных ферментов NADPH-оксидазы и миелопероксидазы (MPO) в лейкоцитах крови крыс в физиологических условиях. При окислительном стрессе, вызванном гипероксией, наблюдается повышение активности NADPH-оксидазы и миелопероксидазы на 164 и 68% соответственно, по сравнению с контролем (рис. 2).

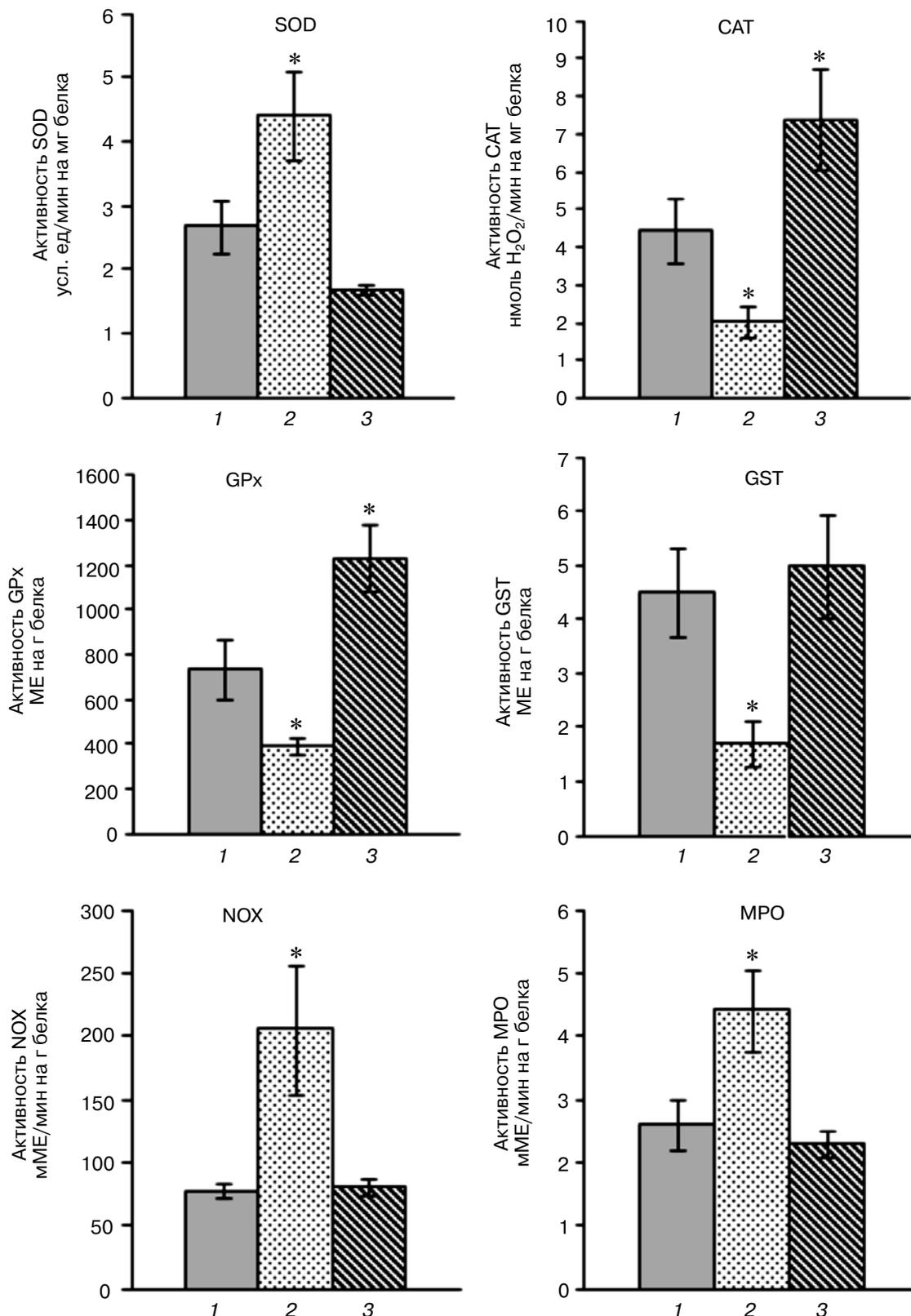
Практически все клетки млекопитающих содержат ферментативные комплексы NADPH-

оксидаз (NOX), ключевая функция которых – образование супероксидного анион-радикала ( $O_2^-$ ) путем переноса электрона с внутриклеточного NADPH на кислород. Из семи известных изоформ фермента в лейкоцитах экспрессируются NOX 1, NOX 2 (в большей степени – в нейтрофилах и моноцитах), NOX 4, NOX 5 (обнаружены в Т- и В-лимфоцитах) [24]. В исследованиях [25] установлено, что гипероксия сопровождается повышением уровня АФК/ $O_2^-$ , и генерация АФК посредством NADPH-оксидазы является ведущим компонентом ГБО-индуцированного повреждения легких. Можно полагать, что активация важнейших прооксидантных ферментов – NADPH-оксидазы и миелопероксидазы в лейкоцитах периферической крови крыс, которая наблюдается при гипероксии, вносит существенный вклад в продукцию активированных кислородных метаболитов в этих условиях. Применение SkQ1 в течение 5 дней перед сеансом ГБО способствует нормализации активности прооксидантных ферментов в лейкоцитах крови крыс (рис. 2).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты показывают, что острый окислительный стресс, вызванный гипероксией, способствует подавлению экспрессии гена *Nrf2*, а также ARE-контролируемых генов *SOD1*, *CAT* и *GPx4*. Известно, что экспрессия гена фактора транскрипции *Nrf2* (NF-E2-related factor 2) наблюдается в клетках различных типов [12, 26, 27], *Nrf2* относится к семейству Cap'n'Collar (CNC) и входит в обширную группу ДНК-связывающих белков с «лейциновой молнией» bZIP [28]. В физиологических условиях уровень *Nrf2* низкий, так как в цитозоле он связывается с Keap1, убиквитинируется с помощью убиквитин E3 лигазы и расщепляется в протеасомной системе [27]. Известно, что активация сигнальной системы сопровождается нарушением слабого контакта (DLG) между *Nrf2* и Keap1, что препятствует убиквитинированию и деградации, но при этом сохраняется связь между белками за счет второго, более прочного контакта (ETGE). В результате вновь синтезированные молекулы *Nrf2* перемещаются в ядро, взаимодействуют с белками партнерами и коактиваторами, связываются с цис-регуляторным антиоксидант-респонсивным элементом (ARE), локализованным в промоторных областях редокс-чувствительных генов, что существенно повышает уровень их экспрессии [26, 27, 29].

Следует особо подчеркнуть, что наряду с цитоплазматическим имеется митохондриально-



**Рис. 2.** Влияние SkQ1 на активность про- и антиоксидантных ферментов в мононуклеарной фракции крови крыс после ГБО-индуцированного окислительного стресса.  $M \pm m$ . Число животных в группах 13–26. Статистически значимые различия между контрольной и опытной группой отмечены символом \* ( $p < 0,05$ ); 1 – контроль, 2 – ГБО, 3 – SkQ1 + ГБО

связанный пул Nrf2 [30]. Установлено образование тройного комплекса, состоящего из белков Nrf2, Keap1 и фосфолипидомутазы (PGAM5), локализованного на внешней мембране митохондрий, что может играть важную роль в передаче сигнала о нарушении свободно-радикального гомеостаза и митохондриальной дисфункции в клеточное ядро и тем самым повышать координацию между митохондриями и экспрессией Nrf2-зависимых генов антиоксидантных ферментов. Исследованиями последних лет продемонстрирована ведущая роль Nrf2 в поддержании структуры и ключевых функций митохондрий, что приобретает особую значимость в условиях окислительного стресса [31].

Изменение профиля экспрессии генов в лейкоцитах крови крыс в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса, установленное в проведенном исследовании, согласуется с данными других авторов. Известно, что при окислительном стрессе активируется комплекс генетических программ, которые приводят к последовательной экспрессии большого числа генов [27, 32]. В исследованиях [23] показано, что гипероксия (95–99% O<sub>2</sub>) приводит к повышению экспрессии 175 генов и снижению транскрипционной активности приблизительно 100 генов. Ранее на хромосоме 2 был идентифицирован локус 1, чувствительный к гипероксии, содержащий ген-кандидат *Nrf2*, кодирующий транскрипционный фактор Nrf2 [22]. Обнаружено, что гомозиготные мыши, нокаутированные по гену *Nrf2* (*Nrf2*<sup>-/-</sup>), были более чувствительны к кислородной интоксикации легких, чем дикий тип животных (*Nrf2*<sup>+/+</sup>). В работе [33] продемонстрировано, что Nrf2 способствует повышению выживаемости и снижает подавление роста альвеол у *Nrf2*<sup>+/+</sup> неонатальных мышей, экспонированных при гипероксии (80–90% O<sub>2</sub>, 24 ч), по сравнению с *Nrf2*<sup>-/-</sup> животными. При этом в легких *Nrf2*<sup>+/+</sup> мышей наблюдалась индукция Nrf2-зависимых генов — глутатионпероксидазы 2 и NAD(P)H-хиноноксидоредуктазы в отличие от животных с нокаутированным геном фактора транскрипции.

Рассматривая возможные причины снижения транскрипционной активности гена *Nrf2* при остром окислительном стрессе, вызванном гипероксией, важно подчеркнуть, что в промоторной области гена *Nrf2* имеются две ARE-подобные последовательности, что указывает на его способность активировать собственную экспрессию [34] и тем самым значительно повышать чувствительность и мощность сигнального пути Keap1/Nrf2/ARE. В настоящее время обнаружено, по крайней мере, два альтернативных механизма регуляции Nrf2 — Keap1-зависи-

мый и Keap1-независимый, включающий фосфорилирование фактора транскрипции различными протеинкиназами (PKC, PI3K/Akt, GSK-3β, JNK), взаимодействие с белками партнерами (p21, кавеолин-1), эпигенетическую модификацию (miRNA, метилирование промоторов) [35]. Все эти процессы потенциально значимы для активации Nrf2 и могут нарушаться при ГБО-индуцированном стрессе. Оценивая вклад различных нарушений в подавление транскрипционной активности *Nrf2*, следует подчеркнуть, что острый окислительный стресс, индуцированный гипероксией, может изменять редокс-гомеостаз клетки посредством окисления тиолов ключевых редокс-чувствительных белков, среди которых белкам Keap1 и Nrf2 принадлежит ведущая роль. В исследованиях [36, 37] показано, что в структуре Keap1 мыши содержится 25, а в Nrf2 — 7 цистеиновых остатков, которые высоко консервативны и выполняют критическую роль при функционировании сигнальной системы Keap1/Nrf2. В исследовании [36] выявлено, что мутации в *Nrf2*, приводящие к замене цистеина в первичной структуре белка, способствовали увеличению прочности комплекса Nrf2-Keap1, повышению скорости убиквитинирования и протеасомной деградации Nrf2. Кроме того, установлено, что мутации в позициях Cys 119, Cys 235 и Cys 506 в структуре Nrf2 приводили к снижению его связывания с антиоксидант-респонсивным элементом (ARE) и коактиватором CBP/p300 [36].

Очевидно, что в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса возможна реализация различных механизмов супрессии гена *Nrf2*, но, по-видимому, к важнейшим следует отнести нарушение структуры остатков цистеина [36] фактора транскрипции Nrf2 и его ингибиторного белка Keap1, связанное с окислительной модификацией цистеиновых остатков белков посредством АФК, уровень которых резко возрастает при гипероксии [38]. Это может вызвать конформационные перестройки Nrf2 и Keap1, что, возможно, ускоряет убиквитинирование Nrf2 и его протеасомную деградацию. Это препятствует ядерной транслокации Nrf2 и последующей активации экспрессии *Nrf2* и Nrf2-зависимых генов антиоксидантных ферментов. Можно полагать, что окислительная модификация цистеиновых остатков в белках Keap1 и Nrf2 в условиях гипероксии может быть связана с повышенной продукцией гипохлорита и супероксидного анион-радикала вследствие активации МПО и НАДФН-оксидазы, показанной в данной работе. Кроме того, в исследованиях [7, 8] продемонстрировано, что существенный вклад в гиперпродукцию АФК при гипер-

оксии вносит митохондриальная дисфункция. Следует подчеркнуть значительную роль Nrf2 в регуляции редокс-гомеостаза митохондрий, показанную в экспериментах на трансгенных животных [31]. Обнаружено, что при дефиците фактора транскрипции Nrf2 наблюдается нарушение функционирования ферментативного комплекса I, приводящее к избыточной продукции АФК.

Интенсификации свободнорадикального окисления при гипероксии может способствовать нарушение согласованности работы важнейших антиоксидантных ферментов. На фоне активации SOD наблюдается ингибирование каталазы, GST и GPx, что может приводить к накоплению гидропероксида, запуску реакций Фентона, Габера–Вейса, Осипова и повышенной продукции высоко токсичного гидроксильного радикала.

Предварительное применение SkQ1 в течение 5 дней перед действием гипероксии приводит в лейкоцитах крови крыс к повышению транскрипционной активности гена *Nrf2* и генов *SOD2* и *GPx4*, белковые продукты которых имеют митохондриальную локализацию, а также нормализации уровня экспрессии *SOD1* и *CAT*, который был понижен при окислительном стрессе у животных, не получавших препарат.

Ранее в работе [13] показано, что в физиологических условиях SkQ1 является позитивным регулятором транскрипционной активности *Nrf2* и связанных с ним генов антиоксидантных ферментов, что может способствовать повышению антиоксидантного потенциала лейкоцитов

при нормоксии. Можно полагать, что протекторный эффект SkQ1 в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса может реализоваться различными путями: посредством прямого антиоксидантного действия, так и опосредованно – путем стимуляции защитной системы Keap1/Nrf2/ARE. Изменение при гипероксии профиля экспрессии *Nrf2* и Nrf2-зависимых генов антиоксидантных ферментов в лейкоцитах крови крыс на фоне применения митохондриально-адресованного антиоксиданта сопровождается изменением их активности. В этих условиях нормализуется активность SOD и GST и повышается активность каталазы и GPx. При этом на фоне применения SkQ1 активность прооксидантных ферментов NADPH-оксидазы и миелопероксидазы в мононуклеарах периферической крови крыс, существенно повышенная при гипероксии, возвращается к норме.

Таким образом, проведенное исследование показывает, что применение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение 5 дней перед действием ГБО способствует повышению экспрессии гена *Nrf2* и Nrf2-регулируемых генов антиоксидантных ферментов (*SOD2*, *GPx4*), нормализации транскрипционной активности генов *SOD1* и *CAT*, а также увеличению активности каталазы и GPx на фоне возвращения к контрольному уровню активности SOD и глутатион-S-трансферазы при окислительном стрессе, вызванном гипероксией.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (базовая часть госзадания № 213.01-11/2014-32).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 44–84.
- Sies, H. (2015) Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine, *Redox Biol.*, **4**, 180–183.
- Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2010) Cell death mechanisms: cross-talk and role in disease, *Exper. Cell Res.*, **316**, 1374–1383.
- Ay, H., Topal, T., Ozler, M., Uysal, B., Korkmaz, A., Oter, S., Ogur, R., and Dundar, K. (2007) Persistence of hyperbaric oxygen-induced oxidative effects after exposure in rat brain cortex tissue, *Life Sci.*, **80**, 2025–2029.
- Berkelhamer, S.K., Kim, G.A., Radder, J.E., Wedgwood, S., Czech, L., Steinhorn, R.H., and Schumacker, P.T. (2013) Developmental differences in hyperoxia-induced oxidative stress and cellular responses in the murine lung, *Free Radic. Biol. Med.*, **61**, 51–60.
- Гипербарическая медицина – практическое руководство (2009) (под ред. Д. Матъе) БИНОМ, Лаборатория знаний, Москва, 720 с.
- Das, K.C. (2013) Hyperoxia decreases glycolytic capacity, glycolytic reserve and oxidative phosphorylation in MLE-12 cells and inhibits complex I and II function, but not complex IV in isolated mouse lung mitochondria, *PLoS One*, **8**, e73358.
- Resseguie, E.A., Stavarsky, R.J., Brookes, P.S., and O'Reilly, M.A. (2015) Hyperoxia activates ATM independent from mitochondrial ROS and dysfunction, *Redox Biol.*, **5**, 176–185.
- Скулачев В.П. (2007) Попытка биохимиков атаковать проблему старения: «Мегапроект» по проникающим ионам. Первые итоги и перспективы, *Биохимия*, **72**, 1700–1714.
- Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Чупыркина А.А., Даньшина М.И., Янкаускас С.С., Моросанова М.А., Стельмашук Е.В., Васильева А.К., Горячева Е.С., Пирогов Ю.А., Исаев Н.К., Зоров Д.Б. (2010) Новое поколение скулачев-ионов, обладающих выраженным нефро- и нейропротекторным действием, *Биохимия*, **75**, 177–184.
- Niture, S.K., Khatri, R., and Jaiswal, A.K. (2014) Regulation of Nrf2—an update, *Free Radic. Biol. Med.*, **66**, 34–36.

12. Forman, H.J., Davies, K.J.A., and Ursini, F. (2014) How do nutritional antioxidants really work: Nucleophilic tone and para-hormesis free radical scavenging *in vivo*, *Free Radic. Biol. Med.*, **66**, 24–35.
13. Внуков В.В., Гуценко О.И., Милютин Н.П., Ананян А.А., Даниленко А.О., Панина С.Б., Корниенко И.В. (2015) Влияние SkQ1 на экспрессию гена фактора транскрипции Nrf2, ARE-контролируемых генов антиоксидантных ферментов и их активность в лейкоцитах крови крыс, *Биохимия*, **80**, 694–701.
14. Лукаш А.И., Внуков В.В., Ананян А.А., Милютин Н.П., Кваша П.Н. (1996) *Металлосодержащие соединения плазмы крови при гипербарической оксигенации. (Экспериментальные и клинические аспекты)* Изд-во РГУ, Ростов-на-Дону.
15. Boyum, A. (1968) Separation of leukocytes from blood and bone marrow, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, **97**, 77–89.
16. Сирота Т.В. (1999) Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы, *Вопр. мед. хим.*, **3**, 14–15.
17. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. (1988) Метод определения активности каталазы, *Лаб. дело*, **1**, 16–19.
18. Моин В.М. (1986) Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах, *Лаб. дело*, **12**, 724–727.
19. Habig, W.H., Pabst, M.J., and Jacoby, W.B. (1974) Glutathione-S-transferase: the first step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130–7139.
20. Саидов М.З., Пинегин Б.В. (1991) Спектрофотометрический метод определения миелопероксидазы в фагоцитирующих клетках, *Лаб. дело*, **3**, 56–59.
21. Длужевская Т.С., Погорелова Т.Н., Афонин А.А. (1989) Активность НАДФН-оксидазы в оценке состояния новорожденных детей, *Педиатрия*, **3**, 44–47.
22. Cho, H.-Y., Jedlicka, A.E., Reddy, S.P., Kensler, T.W., Yamamoto, M., Zhang, L.Y., and Kleeberger, S.R. (2002) Role of NRF2 in protection against hyperoxic lung injury in mice, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **26**, 175–182.
23. Cho, H.-Y., Reddy, S.P., De Biase, A., Yamamoto, M., and Kleeberger, S.R. (2005) Gene expression profiling of NRF2-mediated protection against oxidative injury, *Free Radic. Biol. Med.*, **38**, 325–343.
24. Pendyala, S., and Natarajan, V. (2010) Redox regulation of Nox proteins, *Respir. Physiol. Neurobiol.*, **174**, 265–271.
25. Pendyala, S., Gorshkova, I.A., Usatyuk, P.V., He, D., Pennathur, A., Lambeth, J.D., Thannickal, V.J., and Natarajan, V. (2009) Role of Nox4 and Nox2 in hyperoxia-induced reactive oxygen species generation and migration of human lung endothelial cells, *Antioxid. Redox. Signal.*, **11**, 747–764.
26. Kaspar, J.W., Niture, S.K., and Jaiswal, A.K. (2009) Nrf2: INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress, *Free Radic. Biol. Med.*, **47**, 1304–1309.
27. Ma, Q. (2013) Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **53**, 401–426.
28. Hayes, J.D., and Dinkova-Kostova, A.T. (2014) The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism, *Trends Biochem. Sci.*, **39**, 199–216.
29. Taguchi, K., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2011) Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution, *Genes Cells*, **16**, 123–140.
30. Lo, S.-C., and Hannink, M. (2008) PGAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria, *Exp. Cell Res.*, **14**, 1789–1803.
31. Dinkova-Kostova, A.T., and Abramov, A.Y. (2015) The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function, *Free Radic. Biol. Med.*, in press, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.036.
32. Ma, Q. (2010) Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications, *Pharmacol. Ther.*, **125**, 376–393.
33. McGrath-Morrow, S., Lauer, T., Yee, M., Neptune, E., Podowski, M., Thimmulappa, R.K., O'Reilly, M., and Biswal, S. (2009) Nrf2 increases survival and attenuates alveolar growth inhibition in neonatal mice exposed to hyperoxia, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **296**, 565–573.
34. Kwak, M.-K., Itoh, K., Yamamoto, M., and Kensler, T.W. (2002) Enhanced expression of the transcription factor Nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter, *Mol. Cell Biol.*, **22**, 2883–2892.
35. Bryan, H.K., Olayanju, A., Goldring, C.E., and Park, B.K. (2013) The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation, *Biochem. Pharmacol.*, **85**, 705–717.
36. He X., and Ma, Q. (2009) NRF2 Cysteine residues are critical for oxidant/electrophile-sensing, Kelch-like ECH-Associated protein-1-dependent ubiquitination-proteasomal degradation, and transcription activation, *Mol. Pharmacol.*, **76**, 1265–1278.
37. Внуков В.В., Милютин Н.П., Ананян А.А., Даниленко А.О., Гуценко О.И., Вербицкий Е.В. (2013) Влияние катионного производного пластохинона – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифосфония (SKQ1) – на интенсивность апоптоза и структурное состояние мембран лимфоцитов крыс при окислительном стрессе, вызванном гипербарооксигенацией, *Вестник ЮНЦ РАН*, **9**, 78–86.
38. Takaya, K., Suzuki, T., Motohashi, H., Onodera, K., Satomi, S., Kensler, T.W., and Yamamoto, M. (2012) Validation of the multiple sensor mechanism of the Keap1–Nrf2 system, *Free Rad. Biol. Med.*, **53**, 817–827.

**INFLUENCE OF SkQ1 ON EXPRESSION  
OF *Nrf2* GENE, ARE-CONTROLLED GENES  
OF ANTIOXIDANT ENZYMES, AND THEIR ACTIVITY  
IN LEUKOCYTES OF RAT BLOOD UNDER  
OXIDATIVE STRESS**

**V. V. Vnukov, O. I. Gutsenko, N. P. Milutina\*, I. V. Kornienko,  
A. A. Ananyan, A. O. Danilenko, S. B. Panina,  
A. A. Plotnikov, M. S. Makarenko**

*Southern Federal University, the Academy of Biology and Biotechnology,  
the Department of Biochemistry and Microbiology, prosp. Stachki 194/1,  
Rostov-on-Don 344090, Russia; E-mail: natmilut@rambler.ru*

Received July 27, 2015

Revision received August 13, 2015

This study demonstrated that hyperoxia-induced (0.5 MPa, 90 min) oxidative stress decreased mRNA level of Nrf2 transcription factor and Nrf2-induced genes encoding antioxidant enzymes (*SOD1*, *CAT*, *Gpx4*) in leukocytes of rat blood. The change in gene expression profiles in hyperoxia was accompanied by disbalance of antioxidant enzyme activities in the leukocytes – activation of superoxide dismutase, and inhibition of catalase, glutathione peroxidase, and glutathione-S-transferase. The administration of SkQ1 (50 nmol/kg during 5 days) significantly increased mRNA level of Nrf2 transcription factor and Nrf2-induced genes encoding antioxidant enzymes *SOD2* and *Gpx4* and normalized the transcriptional activity of the *SOD1* and *CAT* genes in the leukocytes under the hyperoxia-induced oxidative stress. Catalase and glutathione peroxidase activity in the leukocytes increased concurrently with reversion of superoxide dismutase and glutathione-S-transferase activity to the control level. The protective effect of SkQ1 in hyperoxia-induced oxidative stress may be realized via direct antioxidant activity and the stimulation of the Keap1/Nrf2/ARE defense system.

*Key words:* mitochondria-targeted antioxidant, leukocytes, gene expression, antioxidant enzymes, hyperoxia