

УДК 577.218;57.044

ВЛИЯНИЕ SkQ1 НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНА ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ *Nrf2*, ARE-КОНТРОЛИРУЕМЫХ ГЕНОВ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ И ИХ АКТИВНОСТЬ В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ КРЫС

© 2015 В.В. Внуков, О.И. Гуценко, Н.П. Милютин*,
А.А. Ананиян, А.О. Даниленко, С.Б. Панина, И.В. Корниенко

Южный федеральный университет, Академия биологии
и биотехнологии, 344090 Ростов-на-Дону, просп. Стачки, 194/1;
электронная почта: natmilut@rambler.ru

Поступила в редакцию 23.10.14

После доработки 16.01.15

В результате проведенного исследования установлено, что введение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение пяти дней приводит к значительному повышению уровня мРНК гена фактора транскрипции *Nrf2* и *Nrf2*-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов *SOD1*, *SOD2*, *CAT* и *Gpx4* в лейкоцитах периферической крови крыс. Повышение уровня экспрессии исследованных генов при введении SkQ1 сопровождается возрастанием в лейкоцитах активности каталазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы. Полученные результаты показывают, что антиоксидантное действие SkQ1 в лейкоцитах может быть связано с влиянием на сигнальную систему *Nrf2*/ARE.

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

В последние годы интенсивно исследуются механизмы цитопротекторного действия нового класса веществ – митохондриально-направленных антиоксидантов, в конструкции которых используется проникающий катион (ион Скулачева), связанный с замещенным хиноном [1, 2]. Среди данного класса веществ высокой эффективностью отличаются соединения семейства SkQ и его первый представитель SkQ1 – 10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний, представляющий собой конъюгат проникающего катиона децилтрифенилфосфония и пластохинона (компонента электрон-транспортной цепи хлоропластов с мощными антиоксидантными свойствами) [2]. Показано, что SkQ1 спе-

цифически накапливается во внутренней мембране митохондрий, является возобновляемым антиоксидантом, что позволяет использовать его в наноконцентрациях [2]. Исследованы механизмы антиоксидантного действия SkQ1 и родственных соединений, обусловленные предотвращением окисления митохондриального кардиолипина [2], элиминацией образовавшихся АФК [1, 3], а также частичным разобщением дыхания и фосфорилирования посредством прямого протонотранспортного действия вещества или вследствие усиления циркуляции анионов жирных кислот, что снижает продукцию АФК митохондриями [4–6].

В настоящее время установлено, что реализация защитных механизмов клетки при окислительном/электрофильном стрессе в большой степени связана с активацией редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2, индуцирующей активацию более 200 генов, среди которых гены антиоксидантных белков, ферментов детоксикации и др. [7–9]. Кроме того, показано влияние фактора транскрипции *Nrf2* на промежуточный метаболизм и митохондриальные функции [9]. Найдены соединения-индукторы данной системы, в частности ее ключевого звена – фактора транскрипции *Nrf2*, среди которых важное место отводится *para*- и *ortho*-

Принятые сокращения: ARE – антиоксидант-реактивный элемент (antioxidant responsive element); Cu,Zn-SOD, SOD1 – Cu,Zn-супероксиддисмутаза; CAT – каталаза; EC-SOD, SOD3 – экстрацеллюлярная супероксиддисмутаза; Gpx – глутатионпероксидаза; GR – глутатионредуктаза; GST – глутатион-S-трансфераза; Keap1 – ассоциированный с ECH Kelch-подобный белок 1 (Kelch-like association protein 1); Mn-SOD, SOD2 – Mn-супероксиддисмутаза; Nrf2 – фактор 2, родственник NF-E2 (NF-E2-related factor 2); NF-E2 – семейство белков эритроидного ядерного фактора 2 (nuclear factor erythroid 2); *BACT* – ген β-актина (ген сравнения).

* Адресат для корреспонденции.

гидрохинонам [10]. В связи с этим представляет интерес исследование возможности влияния SkQ1, содержащего в своей конструкции пластохинон, на уровень экспрессии гена фактора транскрипции Nrf2 и Nrf2-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов, а также их активность в лейкоцитах крови крыс в условиях физиологической нормы.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проведено на половозрелых самцах белых крыс *Rattus norvegicus* массой 180–200 г. Все подопытные животные были разделены на две группы по 10–23 животных. В течение пяти дней крысам вводили SkQ1 по 50 нмоль/кг в день. Рассчитанную дозу препарата, растворенную в 100 мкл 0,2%-ного этанола в дистиллированной воде, вводили в защежные мешки животных. Животные контрольной группы получали в течение пяти дней по 100 мкл 0,2% этанола.

Эксперименты на животных проводились с соблюдением принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в эксперименте или в 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. Тотальную РНК выделяли методом гуанидин-тиоцианат-фенолхлороформной экстракции с помощью коммерческого набора «РИБО-золь-В» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Качество выделенной РНК оценивали при помощи электрофореза в 1,2%-ном агарозном геле, количество – по оптической плотности при 260 нм. Для синтеза кДНК использовали набор реагентов для обратной транскрипции («Синтол», Россия), содержащий MMLV-RT (ревертазу вируса лейкемии мышей Молони), праймер Random-6, смесь dNTP и ингибитор РНКаз.

Исследование уровня экспрессии генов фактора транскрипции Nrf2 (*Nrf2*), изоферментов супероксиддисмутазы – Cu,Zn-SOD (*SOD1*), Mn-SOD (*SOD2*), экстрацеллюлярной SOD – EC-SOD (*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 («Синтол», Россия) и прибора iQ5 Real-Time PCR Detection System («Bio-Rad», США). В качестве гена срав-

нения использовали ген β -актина (*BACT*). Специфические праймеры подбирали с помощью программы Primer BLAST и Primer 3. Последовательности специфических праймеров представлены в табл. 1.

Для оценки эффективности (Е) каждой пары праймеров ПЦР проводили с различными разведениями (1 : 1, 1 : 2, 1 : 4, 1 : 8) кДНК с последующим вычислением усредненного ΔCt . Эффективность всех используемых пар праймеров представлена в таблице 2.

ПЦР-РВ проводили при следующих условиях: 95° – 5 мин, далее 40 циклов: 58 (60)° – 50 с (детекция флуоресценции), 95° – 15 с. После завершения ПЦР получали графики изменения флуоресценции во времени. Специфичность получаемого продукта амплификации проверяли с помощью кривых плавления продуктов ПЦР.

Анализ графиков накопления продуктов ПЦР проводили с помощью программного обеспечения IQ5 Optical System Software version 2.0 («Bio-Rad», США). Данные ПЦР-РВ обрабатывали с помощью программного обеспечения iCycler IQ5 («Bio-Rad», США). Количественную оценку относительного уровня экспрессии генов рассчитывали по методу ΔCt с использованием гена сравнения.

Материалом для биохимических исследований служила суспензия лимфоцитов, выделенных из цельной крови в градиенте плотности фиколл-верографина ($\rho = 1,077$) по методу Бойум [11]. Клетки трижды промывали и сус-

Таблица 1. Праймеры для ПЦР-РВ

Ген	Нуклеотидная последовательность прямого (f) и обратного (r) праймеров
<i>BACT</i>	f: 5'-agccatgtacgtagccatcc-3' r: 5'-tcggaaccgctcattgccg-3'
<i>Nrf2</i>	f: 5'-atgtcaccagctcaagggcacagtgc-3' r: 5'-ccatcctccccgaacctagtt-3'
<i>SOD1</i>	f: 5'-aaccagttgtgtgtcagga-3' r: 5'-ctcctgagagtgagatcaca-3'
<i>SOD2</i>	f: 5'-ttaacgcgagatcatgcag-3' r: 5'-gtcacgcttgatagcctcca-3'
<i>SOD3</i>	f: 5'-aggctctttctcaggcctc-3' r: 5'-agatctccaggtctttggag-3'
<i>CAT</i>	f: 5'-ttctacactgaagatgtaactg-3' r: 5'-gaaagtaacctgatggagagac-3'
<i>Gpx4</i>	f: 5'-ggctacaatgtcaggtt-3' r: 5'-ttatcaatgagaaactggtaa-3'

Таблица 2. Эффективность используемых пар праймеров

Пара праймеров	Эффективность
<i>BACT-f, BACT-r</i>	0,953
<i>Nrf2-f, Nrf2-r</i>	0,970
<i>SOD1-f, SOD1-r</i>	0,930
<i>SOD2-f, SOD2-r</i>	0,873
<i>SOD3-f, SOD3-r</i>	0,933
<i>CAT-f, CAT-r</i>	0,903
<i>Gpx4-f, Gpx4-r</i>	0,780

пендировали забуференным Tris-HCl-изотоническим раствором NaCl, pH 7,4.

Активность супероксиддисмутазы (SOD) оценивали по ингибированию восстановления нитросинего тетразолия (НТС) супероксидом, генерируемым при аутоокислении адреналина [12]. Активность каталазы определяли по реакции перекиси водорода с молибдатом аммония [13]. Активность глутатионпероксидазы (Gpx4) определяли по скорости окисления восстановленного глутатиона в присутствии гидроперекиси третичного бутила [14], активность глутатион-S-трансферазы (GST) – по оценке скорости реакции ферментативного образования конъюгатов восстановленного глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом [15].

Статистическая обработка данных проводилась при помощи пакета программ Biostat (version 2009 Professional – сборка 5.8.4.3 Analyst Soft). Проверка нормальности распределения проводилась по критерию Колмогорова–Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Для данных с распределением, отличных от нормального, применялся 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 принимался равным 0,05. При $0,05 < p < 0,1$ рассматривали тенденцию к достоверности различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате проведенного исследования установлено, что введение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение 5 дней приводит к повышению на 318% уровня экспрессии гена фактора транскрипции *Nrf2* в лейкоцитах крови крыс относительно

контроля (рис. 1). Это подтверждается соответствующим повышением относительного уровня мРНК фактора транскрипции *Nrf2* по сравнению с нормой. Одновременно было исследовано влияние введения SkQ1 на профиль экспрессии *Nrf2*-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов – изоферментов супероксиддисмутазы (*SOD 1–3*), каталазы (*CAT*), глутатионпероксидазы 4 (*Gpx4*) – в лейкоцитах крыс. Проведенное исследование показывает, что в лейкоцитах крови крыс на фоне введения митохондриально-направленного антиоксиданта наблюдается повышение количества мРНК *SOD1* на 70% и мРНК *SOD2* – на 77%, что указывает на увеличение транскрипционной активности соответствующих генов. При этом в содержании мРНК *SOD3* не выявлено достоверных различий по сравнению с контролем (рис. 1). Кроме того, показано, что применение SkQ1 в течение пяти дней приводит к повышению содержания мРНК *CAT* на 95%, а количество мРНК *Gpx4* увеличивается на 156% в лейкоцитах крови крыс, что свидетельствует о повышении уровня экспрессии данных генов под влиянием катионного производного пластохинона (рис. 1).

Исходя из полученных результатов, можно заключить, что SkQ1 является позитивным регулятором транскрипционной активности гена *Nrf2* и генов антиоксидантных ферментов, что может способствовать повышению антиоксидантного потенциала лейкоцитов в физиологических условиях.

Следующим этапом работы явилось исследование влияния SkQ1 на активность антиоксидантных ферментов лейкоцитов крови крыс. Было установлено, что SkQ1 способствует активации некоторых антиоксидантных ферментов в лейкоцитах крови крыс, это подтверждается приростом на 54–56% активности каталазы, *Gpx4* и GST по сравнению с контролем, что способствует повышению антиоксидантного потенциала лейкоцитов крови (рис. 2). При этом общая активность SOD в лейкоцитах на фоне введения SkQ1 остается на уровне контроля (рис. 2), несмотря на то, что, как было показано выше, транскрипционная активность генов *SOD1* и *SOD2* повышается. В то же время в лейкоцитах наблюдаются однонаправленные изменения уровня экспрессии генов *CAT* и *Gpx4* и активности каталазы и глутатионпероксидазы.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенного исследования установлено, что применение катионного производного пластохинона SkQ1 способствует повы-

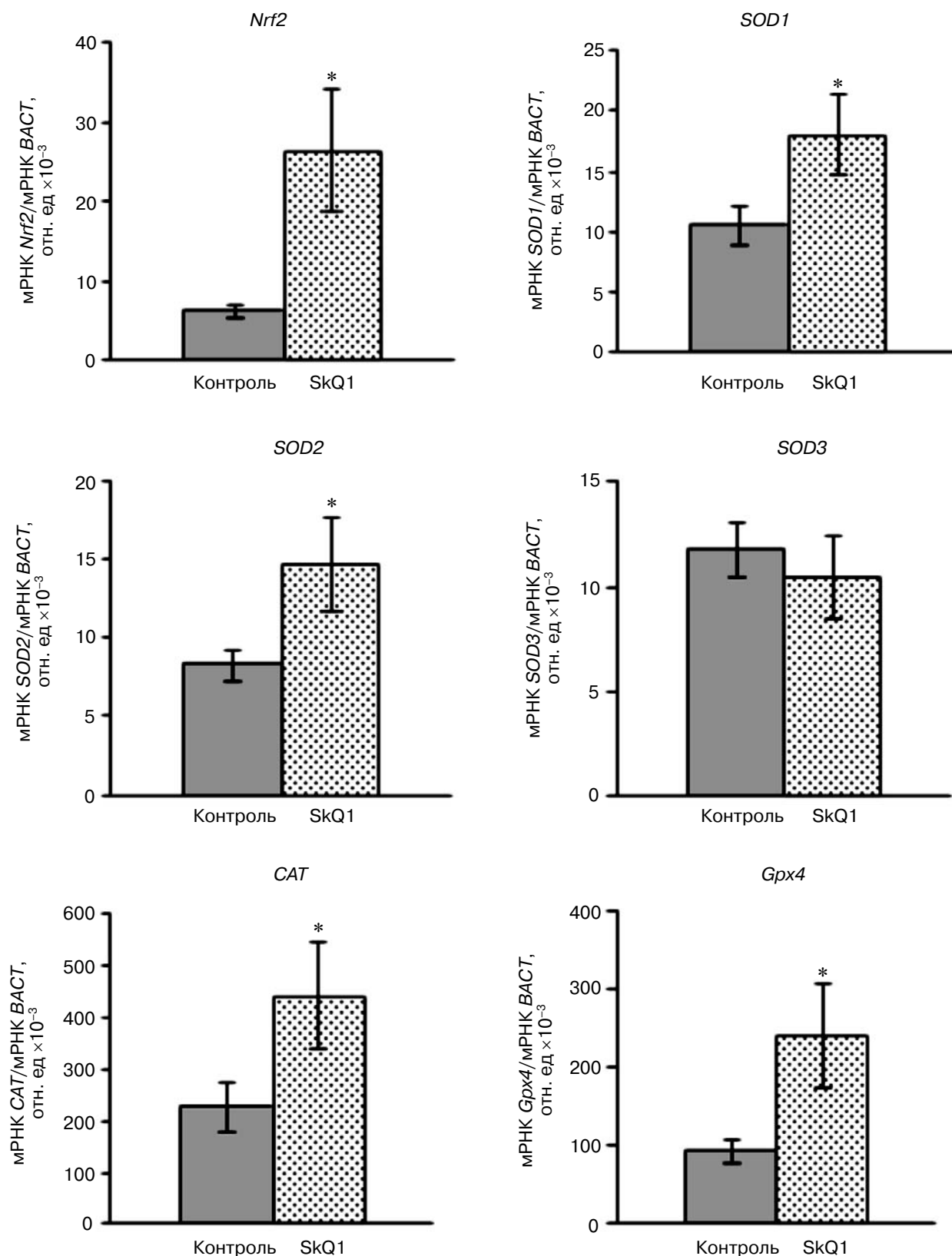


Рис. 1. Влияние SkQ1 на уровень мРНК гена *Nrf2* и генов антиоксидантных ферментов в лейкоцитах крови крыс. $M \pm m$. Количество животных в группах – 13–26. * – Статистически значимые различия между контрольной и опытной группами ($p < 0,05$)

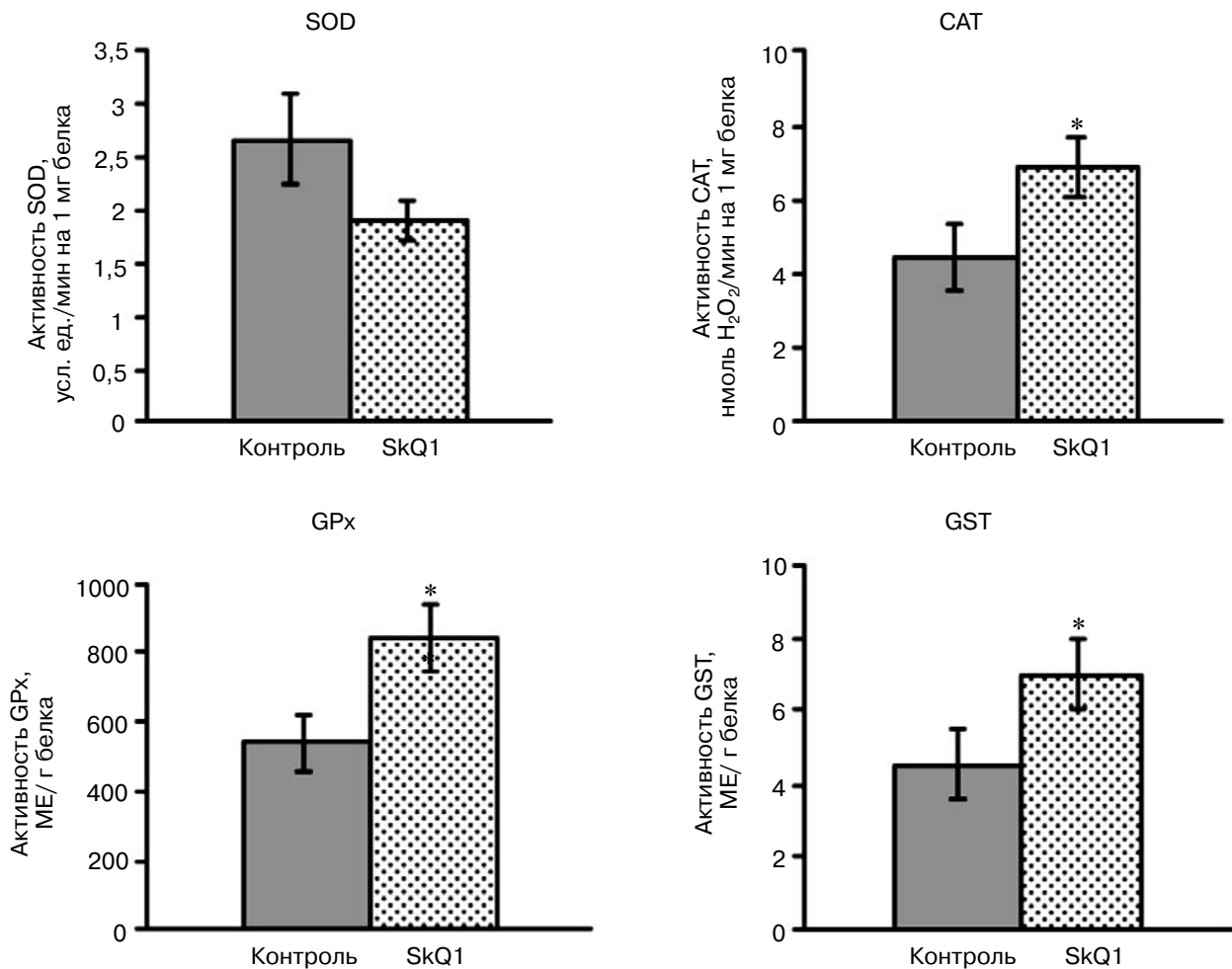


Рис. 2. Влияние SkQ1 на активность антиоксидантных ферментов в мононуклеарной фракции крови крыс. $M \pm m$. Количество животных в группах – 13–26. * – Статистически значимые различия между контрольной и опытной группами ($p < 0,05$)

шению транскрипционной активности гена *Nrf2* (уровень мРНК возрастает в 4 раза). Известно, что ген фактора транскрипции *Nrf2* широко экспрессируется в клетках различных типов [16, 17], в т.ч. в лимфоцитах [18]. *Nrf2* (NF-E2-related factor 2) относится к семейству Cap'n'Collar (CNC) и входит в обширную группу ДНК-связывающих белков с «лейциновой молнией» bZIP [9].

Известно, что активация сигнальной системы Keap1/*Nrf2* сопровождается распадом комплекса *Nrf2* с репрессорным белком Keap1, транслокацией фактора транскрипции в ядро, его димеризацией с малым белком Maf или транскрипционным фактором c-Jun и коактиваторными белками, после чего происходит взаимодействие с *цис*-регуляторным антиоксидант-респонсивным элементом (ARE), локализован-

ном в промоторных областях редокс-чувствительных генов [16, 17]. В настоящее время открыто множество индукторов сигнальной системы Keap1/*Nrf2*/ARE, среди которых хиноны природного и синтетического происхождения [18, 19]. Важнейшей особенностью хинонов – индукторов *Nrf2* – является наличие в структуре молекулы OH-групп в *орто*- или *пара*-положениях [10], что характерно также для SkQ1, содержащего в своем составе пластохинон (производное 1,4-бензохинона) [1]. Можно полагать на основании полученных результатов, что благодаря хинонной составляющей в молекуле SkQ1 последний может индуцировать *Nrf2*. Важно подчеркнуть, что в промоторной области гена *Nrf2* имеются две ARE-подобные последовательности, что указывает на способность *Nrf2* активировать собственную экспрессию [20]. По

мнению Куак с соавт. [20] и Брайэн с соавт. [21] это свидетельствует о наличии петли положительной обратной связи внутри сигнального пути Keap1/Nrf2/ARE, что существенно повышает чувствительность системы и мощность клеточных защитных механизмов.

Проведенное исследование свидетельствует о том, что повышение уровня экспрессии гена *Nrf2* в лейкоцитах крови крыс при введении SkQ1 сопровождается увеличением транскрипционной активности генов-мишеней антиоксидантных ферментов *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, *Gpx4*. Гены данных ферментов содержат в промоторных областях антиоксидант-респонсивный элемент (ARE), вследствие чего возможна их стимуляция транскрипционным фактором Nrf2 [9, 22–24]. В работе Морзадек с соавт. [25] продемонстрирована экспрессия гена *Nrf2* и значительное увеличение уровня белка Nrf2, что приводило к повышению содержания мРНК и белковых продуктов Nrf2-индуцированных генов антиоксидантных ферментов при активации Т-лимфоцитов мононуклеарной фракции крови человека.

Следует отметить, что при исследовании влияния SkQ1 (250 нмоль/кг ежедневно в течение 1,5 мес.) на транскрипционную активность генов сетчатки преждевременно стареющих крыс OXYS и крыс Wistar не обнаружено изменения экспрессии мРНК *Nrf2* и Nrf2-зависимых генов – глутатионредуктазы (*Gsr*) и гемоксигеназы 1 (*Hmox1*), тогда как экспрессия мРНК тиоредоксинредуктазы 1 (*Txrnd1*) была снижена только в сетчатке крыс OXYS [26].

В представленных исследованиях влияния SkQ1 на активность важнейших антиоксидантных ферментов в лейкоцитах крови крыс было установлено повышение активности каталазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы, тогда как в активности SOD не обнаруже-

но достоверных различий относительно контроля. Это объясняется, по-видимому, известным фактом, что суммарная активность ферментов не находится в прямой зависимости от уровня транскрипции, а может определяться скоростью трансляции и посттрансляционной модификацией молекул [27]. Действительно, SOD1 и SOD2 могут подвергаться различным видам посттрансляционных модификаций – нитрованию, фосфорилированию, глутатионилированию (для SOD1 показано, помимо прочего, гликирование), которые приводят к снижению их активности [28]. С другой стороны, обнаруженное нами повышение активности глутатион-S-трансферазы в лейкоцитах крови крыс, получавших SkQ1, возможно, было следствием активации гена *Nrf2*, т.к. известно, что гены различных изоформ данного фермента (например, *GSTA1*, *GSTM1*, *GSTP1*) позитивно регулируются Nrf2 [9].

Таким образом, проведенное исследование показало, что применение катионного производного пластохинона SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение 5 дней приводит к повышению уровня экспрессии гена фактора транскрипции Nrf2 и ARE-контролируемых генов в лейкоцитах крови крыс в условиях физиологической нормы, что сопровождается возрастанием активности каталазы, глутатионпероксидазы и глутатион-S-трансферазы и способствует возрастанию антиоксидантного потенциала клеток.

Авторы выражают глубокую благодарность В.П. Скулачеву за предоставление препарата SkQ1 для исследования и помощь при планировании экспериментов и интерпретации полученных результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России (базовая часть госзадания № 213.01-11/2014-32).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скулачев В.П. (2007) Попытка биохимиков атаковать проблему старения: «мегапроект» по проникающим ионам. Первые итоги и перспективы, *Биохимия*, **72**, 1700–1714.
2. Антоненко Ю.Н., Аветисян А.В., Бакеева Л.Е., Черняк Б.В., Чертков В.А., Домнина Л.В., Иванова О.Ю., Изюмов Д.С., Хайлова Л.С., Клишин С.С., Коршунова Г.А., Лямзаев К.Г., Мунтян М.С., Непряхина О.К., Пашковская А.А., Плетюшкина О.Ю., Пустовидко А.В., Рогинский В.А., Рокицкая Т.И., Рууге Э.К., Сапрунова В.Б., Северина И.И., Симонян Р.А., Скулачев И.В., Скулачев М.В., Сумбатьян Н.В., Свириева И.В., Ташлицкий В.Н., Васильев Ю.М., Высоких М.Ю., Ягужинский Л.С., Замятин А.А. (мл.), Скулачев В.П. (2008) Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. 1. Катионные производные пластохинона: синтез и исследование *in vitro*, *Биохимия*, **73**, 1589–1606.
3. Skulachev, M.V., Antonenko, Y.N., Anisimov, V.N., Chernyak, B.V., Cherepanov, D.A., Chistyakov, V.A., Egorov, M.V., Kolosova, N.G., Korshunova, G.A., Lyamzaev, K.G., Plotnikov, E.I., Roginsky, V.A., Savchenko, A.I., Severina, I.I., Severin, F.F., Shkurat, T.P., Tashlitsky, V.N., Shidrovsky, K.M., Vyssokikh, M.Y., and Zamyatnin, A.A. (2011) Mitochondrial-targeted plastoquinone derivatives. Effect on senescence and acute age-related pathologies, *Curr. Drug Targets*, **12**, 800–826.
4. Skulachev, V.P., Antonenko, Yu.N., Cherepanov, D.A., Chernyak, B.V., Izumov, D.S., Khailova, L.S., Klishin, S.S., Korshunova, G.A., Lyamzaev, K.G., Pletjushkina,

- O.Yu., Roginsky, V.A., Rokitskaya, T.I., Severin, F.F., Severina, I.I., Simonyan, R.A., Skulachev, M.V., Sumbatayan, N.V., Sukhanova, E.I., Tashlitsky, V.N., Trendeleva, T.A., Vyssokikh, M.Yu., and Zvyagilskaya, R.A. (2010) Prevention of cardiolipin and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs), *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 878–889.
5. Severin, F.F., Severina, I.I., Antonenko, Y.N., Rokitskaya, T.I., Cherepanov, D.A., Mokhova, O.V., Yaguzhinsky, L.S., Korshunova, G.A., Sumbatayan, N.V., Skulachev, M.V., and Skulachev, V.P. (2010) Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 663–668.
 6. Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Янкаускас С.С., Рокитская Т.Т., Чупыркина А.А., Певзнер Е.Б., Зорова Л.Д., Исаев Н.Е., Антоненко Ю.Н., Скулачев В.П., Зоров Д.Б. (2012) Частичное разобщение дыхания и фосфорилирования как один из путей реализации нефро- и нейропротекторного действия проникающих катионов семейства SkQ, *Биохимия*, **77**, 1240–1250.
 7. Турпаев К.Т. (2013) Сигнальная система Keap1-Nrf2. Механизмы регуляции и значение для защиты клеток от токсического действия ксенобиотиков и электрофильных соединений, *Биохимия*, **78**, 1240–1250.
 8. Jaiswal, A.K. (2004) Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression, *Free Radic. Biol. Med.*, **36**, 1199–1207.
 9. 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.
 10. Satoh, T., McKercher, S.R., and Lipton, S.A. (2014) Reprint of: Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs, *Free Radic. Biol. Med.*, **66**, 45–57.
 11. Voyum, A. (1968) Separation of leukocytes from blood and bone marrow, *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, **97**, 77–89.
 12. Сирота Т.В. (1999) Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использования его для измерения активности супероксиддисмутазы, *Вопр. мед. химии*, **3**, 14–15.
 13. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. (1988) Метод определения активности каталазы, *Лаб. дело*, **1**, 16–19.
 14. Моин В.М. (1986) Простой и специфический метод определения активности глутатионпероксидазы в эритроцитах, *Лаб. дело*, **12**, 724–727.
 15. 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.
 16. 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.
 17. Ma, Q. (2013) Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **53**, 401–426.
 18. Forman, H.J., Davies, J.A., and Ursini, F. (2014) How do nutritional antioxidants really work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging *in vivo*, *Free Radic. Biol. Med.*, **66**, 24–35.
 19. Uruno, A., and Motohashi, H. (2011) The Keap1-Nrf2 system as an *in vivo* sensor for electrophiles, *Nitric Oxide*, **25**, 153–160.
 20. 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.
 21. 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.
 22. Dhar, S.K., and Clair, D.K.St. (2012) Manganese superoxide dismutase regulation and cancer, *Free Radic. Biol. Med.*, **52**, 2209–2222.
 23. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Ткачев В.О. (2009) Некоторые принципы и механизмы редокс-регуляции, *Кислород и антиоксиданты*, **1**, 3–64.
 24. Miao, L., and Clair, D.K.St. (2009) Regulation of superoxide dismutase genes: implications in disease, *Free Radic. Biol. Med.*, **47**, 344–356.
 25. Morzadec, C., Macoch, M., Sparfel, L., Kerdine-Romer, S., Fardel, O., and Vernhet, L. (2014) Nrf2 expression and activity in human T lymphocytes: stimulation by T cell receptor activation and priming by inorganic arsenic and tert-butylhydroquinone, *Free Radic. Biol. Med.*, **71**, 133–145.
 26. Perepechaeva, M.L., Grishanova, A.Yu., Rudnitskaya, E.A., and Kolosova, N.G. (2014) The mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 downregulates aryl hydrocarbon receptor-dependent genes in the retina of OXYS rats with AMD-like retinopathy, *J. Ophthalmol.*, **530943**, 1–9.
 27. Зоров Д.Б., Исаев Н.К., Плотников Е.Ю., Силачев Д.Н., Зорова Л.Д., Певзнер И.Б., Моросанова М.А., Янкаускас С.С., Зоров С.Д., Бабенко В.А. (2013) Перспективы митохондриальной медицины, *Биохимия*, **78**, 1251–1264.
 28. Yamakura, F., and Kawasaki, H. (2010) Post-translational modification of superoxide dismutase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1804**, 318–325.

**INFLUENCE OF SkQ1 ON EXPRESSION OF TRANSCRIPTION
FACTOR *Nrf2* GENE AND ARE-CONTROLLED GENES
OF ANTIOXIDANT ENZYMES AND THEIR ACTIVITIES
IN LEUCOCYTES OF RAT BLOOD**

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

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

Received October 23, 2014
Revision received January 16, 2015

The study demonstrated that pretreatment of rats with mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 (50 nmol/kg during 5 days) significantly increased the mRNA levels of *Nrf2* gene transcription factor and *Nrf2*-induced genes encoding antioxidant enzymes *SOD1*, *SOD2*, *CAT*, and *Gpx4* in rat peripheral blood leukocytes. The increase in expression of these genes with SkQ1 treatment was accompanied by increased activities of catalase, glutathione peroxidase, and glutathione-S-transferase in leukocytes. The results indicate that the antioxidant properties of SkQ1 might be realized via induction of the *Nrf2*/ARE signal system.

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