

## МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫЙ АНТИОКСИДАНТ SKQ1 РЕГУЛИРУЕТ СИГНАЛЬНУЮ СИСТЕМУ KEAP1/NRF2/ARE И АПОПТОЗ В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

Гуценко О.И., Корниенко И.В., Ананян А.А., Милютин Н.П., Внуков В.В.

Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Д.И. Иванковского

ул. Стачки 194/1, г. Ростов-на-Дону, 344090, РФ; e-mail: natmilut@rambler.ru

Поступила в редакцию 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbc.2022.0569

**Аннотация.** 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. 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. 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. Исследование уровня апоптоза лимфоцитов методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием FITC-меченого аннексина V и пропидиум йодида показало более чем двукратное усиление экспрессии фосфатидилсерина на поверхности лимфоцитарных мембран. Применение SkQ1 в крайне малых количествах (50 нмоль/кг в течение 5 дней) эффективно ингибирует накопление молекулярных продуктов ПОЛ, нормализует структурное состояние мембран лимфоцитов и уровень их апоптоза в условиях физиологической нормы и при окислительном стрессе.

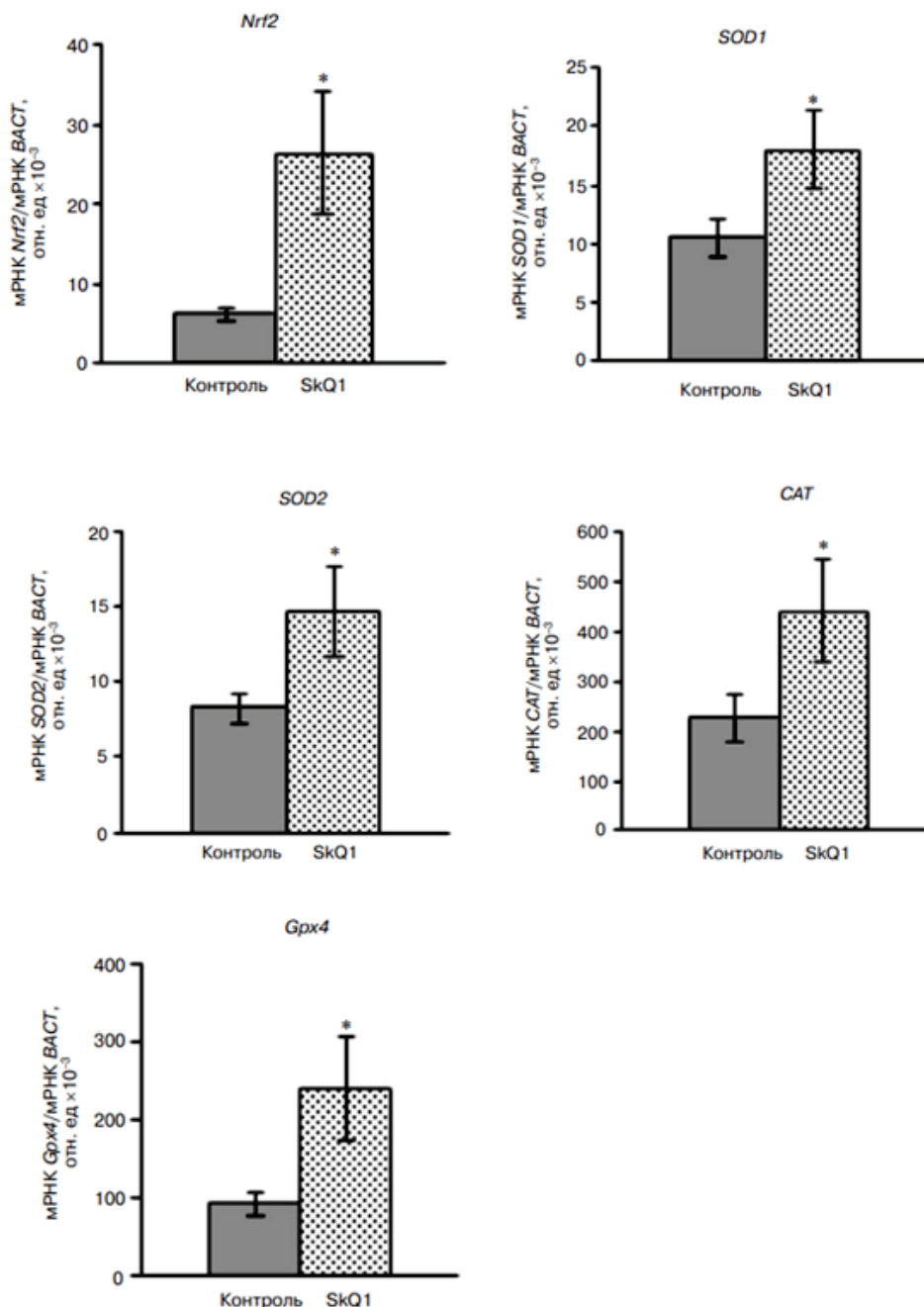
**Ключевые слова:** митохондриально-адресованный антиоксидант, лейкоциты, экспрессия генов, антиоксидантные ферменты, гипероксия, апоптоз.

Окислительный стресс способствует нарушению редокс-гомеостаза и приводит к свободно-радикальному повреждению разнообразных клеточных компонентов, что сопровождается развитием многих заболеваний и старения, а также участвует в развитии программируемой клеточной гибели [1]. Чувствительным сенсором и регулятором окислительного стресса является сигнальный путь Keap1/Nrf2/ARE, который вовлечен в молекулярные механизмы многих патологических процессов [2].

Цитопротекторные свойства и механизмы нового класса веществ - митохондриально-направленных антиоксидантов также являются объектами интенсивного изучения. Среди подобных веществ высокой эффективностью отличаются соединения семейства SkQ и его представитель SkQ1– 10-(6'-пластохинонил) децилтрифенилфосфоний, представляющий собой конъюгат проникающего катиона децилтрифенилфосфония и пластохинона (компонента электротранспортной цепи хлоропластов с мощными антиоксидантными свойствами) [3].

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. [4-6] Кроме того, показано влияние фактора транскрипции Nrf2 на промежуточный метаболизм и митохондриальные функции [6]. Найдены соединения-индукторы данной системы, в частности ее ключевого звена – фактора транскрипции Nrf2, среди которых важное место отводится пара- и орто-гидрохинонам. В связи с этим, целью работы стало исследование влияния SkQ1, содержащего в своей конструкции пластохинон, на уровень экспрессии гена фактора транскрипции Nrf2 и Nrf2-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов, их активность в лейкоцитах крови крыс в условиях физиологической нормы и при окислительном стрессе, индуцированном гипербарооксигенацией (ГБО), а также интенсивность апоптоза в лейкоцитах периферической крови крыс при окислительном стрессе, индуцированном ГБО.

Проведенное исследование показало, что введение SkQ1 в дозе 50 нмоль/кг в течение пяти 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. Параллельно было исследовано влияние введения SkQ1 на экспрессию Nrf2-индуцируемых генов антиоксидантных ферментов – изоферментов супероксиддисмутазы (SOD<sub>1</sub> и SOD<sub>2</sub>), каталазы (CAT), глутатионпероксидазы 4 (GPx4) – в лейкоцитах крыс. Было показано, что в лейкоцитах крови крыс на фоне введения SkQ1 наблюдается повышение количества мРНК SOD<sub>1</sub> на 70% и мРНК



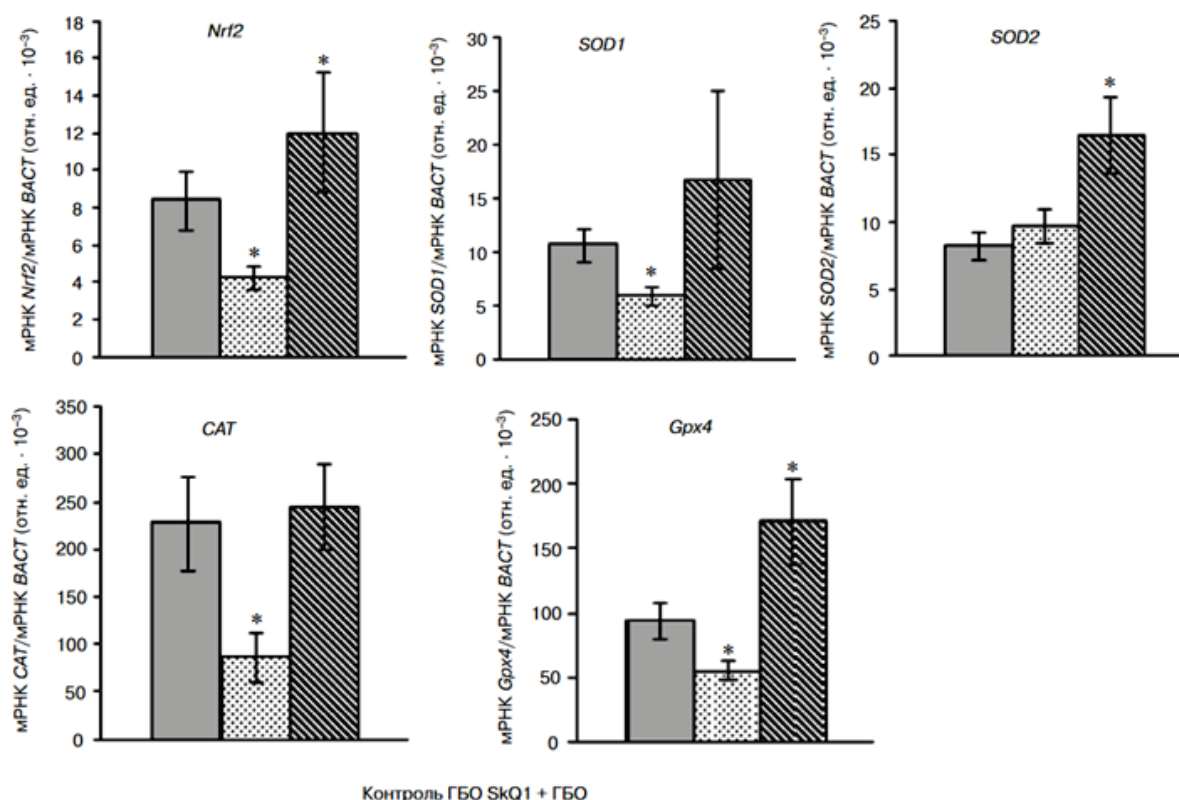
**Рисунок 1.** Влияние SkQ1 на уровень мРНК гена Nrf2 и генов антиоксидантных ферментов в лейкоцитах крови крыс.  $M \pm m$ . Количество животных в группах – 13–26.

\* – Статистически значимые различия между контрольной и опытной группами ( $p < 0,05$ )

SOD<sub>2</sub> – на 77%, что указывает на увеличение транскрипционной активности соответствующих генов (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. 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.

Повышение уровня экспрессии исследованных генов антиоксидантных ферментов в условиях физиологической нормы при введении SkQ1 сопровождается возрастанием в лейкоцитах активности каталазы и глутатионпероксидазы, что способствует повышению антиоксидантного потенциала лейкоцитов крови. При этом общая активность SOD в лейкоцитах на фоне введения SkQ1 оставалась на уровне контроля.

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. Это подтверждается соответствующим снижением относительного уровня мРНК фактора транскрипции Nrf2 относительно контроля.

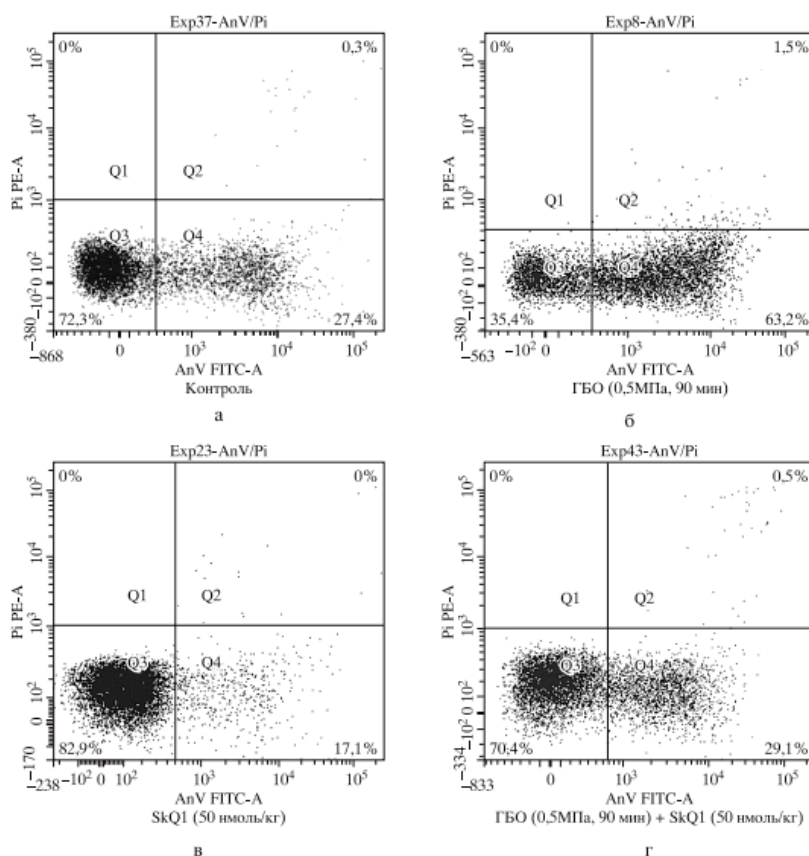


**Рисунок 2.** Влияние SkQ1 на уровень мРНК гена Nrf2 и генов антиоксидантных ферментов в лейкоцитах крови крыс после ГБО-индуцированного окислительного стресса.  $M \pm m$ . Число животных в группах 13–26. Статистически значимые различия между контрольной и опытной группой отмечены символом \* ( $p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

На фоне подавления транскрипционной активности гена Nrf2 в лейкоцитах 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. 2). 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 ГБО-индуцированном окислительном стрессе (рис. 2).

Одновременно в лейкоцитах наблюдалось увеличение активности каталазы и глутатионпероксидазы на фоне возвращения к контрольному уровню активности супероксиддисмутазы. Предполагается, что протекторный эффект SkQ1 в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса может реализоваться посредством прямого антиоксидантного действия и путем стимуляции защитной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE.

Проведенное исследование показывает, что в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса резко возрастает интенсивность апоптоза лимфоцитов периферической крови крыс, что продемонстрировано с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Данный метод позволяет идентифицировать клетки, находящиеся на различных стадиях программируемой клеточной гибели. Внесение в клеточную суспензию двух меток – аннексина V-FITC и пропидиум иодида (PI) – позволяет одновременно оценивать количество интактных (аннексин V-негативных/PI-негативных), ранних апоптотических (аннексин V-позитивных/PI-негативных) и поздних апоптотических/некротических (аннексин V-позитивных/PI-позитивных) клеток. Дискриминационный анализ типа клеточной гибели позволил установить, что при окислительном стрессе, индуцированном ГБО, количество аннексин V-позитивных лимфоцитов, находящихся на ранней стадии апоптоза (квадрант Q4), возрастает на 110% относительно контроля (рис. 3). Известно, что апоптоз является редокс-зависимым процессом, тесным образом связанным с интенсивностью свободнорадикальных процессов, уровень которых при ГБО существенно возрастает [7].



**Рисунок 3.** Влияние SkQ1 на распределение апоптотических и жизнеспособных лимфоцитов периферической крови крыс в условиях физиологической нормы и при ГБО-индуцированном стрессе (двумерная гистограмма). Q1 – аннексин V-негативные/PI-положительные клетки – некроз; Q2 – аннексин V-положительные/PI-положительные клетки – поздний апоптоз/некроз; Q3 – аннексин V-негативные/PI-негативные клетки – жизнеспособные клетки; Q4 – аннексин V-положительные/PI-негативные клетки – ранний апоптоз. Интенсивность апоптоза: а – 27,4%, б – 63,2%, в – 17,1%, г – 29,1%

Исследование уровня апоптоза лимфоцитов методом проточной лазерной цитофлуориметрии с использованием FITC-меченого аннексина V и пропидиум йодида показало, что применение SkQ1 в крайне малых концентрациях (50 нмоль/кг в течение 5 дней) эффективно ингибирует накопление молекулярных продуктов ПОЛ, нормализует структурное состояние мембран лимфоцитов и уровень их апоптоза в условиях физиологической нормы и при окислительном стрессе (рис. 3). Предварительное применение катионного производного пластохинона SkQ1 в течение 5 дней перед действием ГБО способствует нормализации количества апоптотических лимфоцитов в крови при окислительном стрессе. Можно полагать, что важнейшей причиной нормализующего влияния SkQ1 на интенсивность апоптоза лимфоцитов крови при ГБО-индуцирующем окислительном стрессе является активация транскрипционной активности гена *Nrf2* и *Nrf2*-контролируемых генов антиоксидантных ферментов.

Как следует из полученных результатов, предварительное введение митохондриально-адресованного антиоксиданта SkQ1 intactным крысам приводит к снижению уровня раннего апоптоза в условиях физиологической нормы и поддержанию программируемой клеточной гибели лимфоцитов периферической крови на уровне контроля в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса. Антиапоптотический эффект SkQ1 при ГБОиндуцированном окислительном стрессе, показанный на популяции циркулирующих лимфоцитов, по-видимому, является прямым следствием антиоксидантного и мембраностабилизирующего действия препарата, предварительное введение которого способствует сохранению стационарного уровня ПОЛ и структурного гомеостаза мембран лимфоцитов. Очевидно, что значение митохондриальноадресованного антиоксиданта SkQ1 как регулятора программируемой клеточной гибели может играть важнейшую роль при различных патологических состояниях, связанных с митохондриальной дисфункцией

Таким образом, защитный эффект SkQ1 в условиях ГБО-индуцированного окислительного стресса может реализоваться посредством прямого антиоксидантного действия, а также путем стимуляции редокс-зависимой сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE и активации антиапоптотических механизмов.

#### Список литературы / References:

1. Redza-Dutoir M., Averill-Bates D.A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. et Biophys. Acta*, 2016, vol. 1863, no. 9, doi: 10.1016/j.bbamer.2016.09.012.

2. Suzuki T., Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1–Nrf2 system. *Free Radic. Biol. Med.*, 2015, vol. 88, no. 6, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.
3. Антоненко Ю.Н., Аветисян А.В., Бакеева Л.Е. и др. Производное пластохинона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. 1. Катионные производные пластохинона: синтез и исследование *in vitro*. *Биохимия*, 2008, т. 73, с. 1589-1606. [Antonenko Yu.N., Avetisyan A.V., Bakeeva L.E. et al. A plastoquinone derivative targeted to mitochondria as a drug that interrupts the aging program. 1. Cationic derivatives of plastoquinone: synthesis and *in vitro* study. *Biochemistry*, 2008, vol. 73, pp. 1589-1606. (In Russ.)]
4. Турпаев К.Т. Сигнальная система Keap1/Nrf2. Механизмы регуляции и значение для защиты клеток от токсического действия ксенобиотиков и электрофильных соединений. *Биохимия*, 2013, т. 78, с. 1240-1250. [Turpaev K.T. Keap1/Nrf2 signaling system. Regulatory mechanisms and importance for cell protection from the toxic effects of xenobiotics and electrophilic compounds. *Biochemistry*, 2013, vol. 78, pp. 1240-1250. (In Russ.)]
5. Jaiswal A.K. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.*, 2004, vol. 36, pp. 1199-1207.
6. Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.*, 2014, vol. 39, pp. 199-216.
7. Ahmad S., Ahmad A., Ghosh M., Leslie C.C., White C.W. Extracellular ATP-mediated signaling for survival in hyperoxia-induced oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 2004, vol. 279, pp. 16317-16325.

#### MITOCHONDRIA-TARGETED ANTIOXIDANT SKQ1 REGULATES OF SIGNAL SYSTEM KEAP1/NRF2/ARE AND APOPTOSIS IN THE LEUKOCYTES OF BLOOD UNDER OXIDATIVE STRESS

Gutsenko O.I., Kornienko I.V., Ananyan A.A., Milutina N.P., Vnukov V.V.

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 01.08.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0569

**Abstract.** 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. 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 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. Administration of SkQ1 in extremely low amounts (50 nmol/kg for 5 days) effectively inhibits the accumulation of lipid peroxidation molecular products, normalizes the structural state of lymphocyte membranes and the level of their apoptosis under the condition of physiological standard and oxidative stress.

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