

Влияние новых водорастворимых фенольных антиоксидантов на активность Nrf2-подконтрольных ферментов, систему глутатиона и транслокацию Nrf2 в ядро

Е.Б. Меньщикова¹, Н.К. Зенков¹, П.М. Кожин¹, А.В. Чечушков¹, В.С. Павлов¹, Л.П. Ромах¹, М.В. Храпова¹, А.Е. Серых¹, О.Б. Грицык¹, Н.В. Кандалинцева²

¹ ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

² Новосибирский государственный педагогический университет
630126, г. Новосибирск, ул. Вилюйская, 28

Резюме

Понимание роли активированных кислородных метаболитов в формировании эустресса (редокс-баланс) и дистресса (окислительный стресс) ставит перед биомедиками и фармакологами новые задачи в поиске соединений, способных не только обладать непосредственным антиоксидантным (антирадикальным) действием, но и влиять на редокс-чувствительные сигнальные пути, в первую очередь систему Keap1/Nrf2/ARE. Цель настоящего исследования состояла в изучении влияния синтезированных нами водорастворимых структурно-родственных монофенолов на систему Keap1/Nrf2/ARE по воздействию на ключевые элементы ее индукции (активность Nrf2-подконтрольных ферментов, состояние системы глутатиона и внутриклеточное перераспределение транскрипционного фактора Nrf2). **Материал и методы.** В экспериментах на клетках линий U937 и J774 проведен сравнительный анализ способности структурно взаимосвязанного ряда пяти оригинальных гидрофильных монофенолов, отличающихся количеством *трет*-бутильных *орто*-заместителей, длиной *пара*-алкильного заместителя и наличием в нем атома двухвалентной серы или селена (в качестве препарата сравнения использовали феноксан, калиевую соль фенозан-кислоты), индуцировать синтез Nrf2-подконтрольных ферментов II фазы детоксикации ксенобиотиков и антиоксидантных ферментов (NAD(P)H:хиноноксидоредуктазы 1 (NQO1), глутатион-S-трансфераз (GST), глутатионпероксидаз, глутатионредуктазы; биохимическими спектрофотометрическими методами изучали их активность после 24-часовой инкубации с клетками), а также влиять на состояние системы глутатиона (спектрофотометрия) и транслокацию транскрипционного фактора Nrf2 в ядро (иммунофлуоресцентное окрашивание, конфокальная микроскопия) (ключевые моменты активации сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE). **Результаты и их обсуждение.** Установлено, что наиболее эффективным индуктором указанных ферментов в клетках U937 среди структурных аналогов является монофенол ТС-13, при этом для реализации данного эффекта важны строение *пара*-алкильного заместителя и степень экранирования ОН-группы; ТС-13 также эффективно усиливал импорт Nrf2 в ядро клеток J774. NQO1- и GST-индуцирующие способности тестируемых соединений тесно взаимосвязаны, что указывает на возможность координированной индукции данных ферментов и наличие общей регуляторной системы, обеспечивающей их активацию в ответ на обработку клеток фенольными антиоксидантами.

Ключевые слова: активированные кислородные метаболиты, антиоксиданты, сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE, NAD(P)H:хиноноксидоредуктаза 1, глутатион-S-трансфераза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза, система глутатиона.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы».

Автор для переписки: Меньщикова Е.Б., e-mail: lemen@centercem.ru

Для цитирования: Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Кожин П.М., Чечушков А.В., Павлов В.С., Ромах Л.П., Храпова М.В., Серых А.Е., Грицык О.Б., Кандалинцева Н.В. Влияние новых водорастворимых фенольных антиоксидантов на активность Nrf2-подконтрольных ферментов, систему глутатиона и транслокацию Nrf2 в ядро. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2020; 40 (6): 58–69. doi: 10.15372/SSMJ20200606

Effect of new water-soluble phenolic antioxidants on the activity of Nrf2-driven enzymes, glutathione system, and Nrf2 translocation into the nucleus

E.B. Menshchikova¹, N.K. Zenkov¹, P.M. Kozhin¹, A.V. Chechushkov¹, V.S. Pavlov¹, L.P. Romakh¹, M.V. Khrapova¹, A.E. Serykh¹, O.B. Gritsyk¹, N.V. Kandalintseva²

¹ Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2

² Novosibirsk State Pedagogical University
630126, Novosibirsk, Vilyuiskaya str., 28

Abstract

Understanding the role of reactive oxygen and nitrogen species in eustress (redox balance) and distress (oxidative stress) development poses new challenges for biomedical scientists and pharmacologists in the search for compounds that can not only have a direct antioxidant (antiradical) effect, but also affect redox-sensitive signaling pathways, primarily Keap1/Nrf2/ARE system. Aim of the study was to investigate the influence of novel water-soluble structurally related monophenols on key elements of Keap1/Nrf2/ARE system induction (activity of Nrf2-driven enzymes, the state of the glutathione system, and intracellular redistribution of transcription factor Nrf2). **Material and methods.** Five original hydrophilic structurally related monophenols, differing in the number of tert-butyl ortho-substituents, the length of the para-alkyl substituent, and the presence of a divalent sulfur or selenium atom in it were investigated (phenoxane, the potassium salt of phenosan acid, was used as a reference compound). Cell lines U937 and J774 were cultured for 24 h in the presence of tested compounds, and comparative analysis was performed of its ability to induce the synthesis of Nrf2-driven enzymes of phase II xenobiotic detoxification pathway and antioxidant enzymes (NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1), glutathione S-transferases (GST), glutathione peroxidases, glutathione reductase (biochemical spectrophotometric methods were used to study their activity), as well as to influence the state of glutathione system (spectrophotometry) and translocation of transcription factor Nrf2 into the nucleus (immunofluorescent staining, confocal microscopy) (key events of Keap1/Nrf2/ARE signaling system activation). **Results and discussion.** Monophenol TS-13 have found to be the most effective inducer of tested enzymes in U937 cells among the structural analogs, while the structure of the para-alkyl substituent and the degree of OH group hindrance are important for the implementation of this effect; TS-13 also effectively enhanced Nrf2 import into J774 cell nucleus. The NQO1- and GST-inducing abilities of structurally related monophenols are closely interrelated, which indicates the possibility of coordinated induction of these enzymes and the presence of a common regulatory system that ensures their activation in response to cell treatment with phenolic antioxidants.

Key words: reactive oxygen and nitrogen species, antioxidants, Keap1/Nrf2/ARE signaling system, NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1, glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione system.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. Equipment from CCU «Modern optical systems» was used in the study.

Correspondence author: Menshchikova E.B., e-mail: lemen@centercem.ru

Citation: Menshchikova E.B., Zenkov N.K., Kozhin P.M., Chechushkov A.V., Pavlov V.S., Romakh L.P., Khrapova M.V., Serykh A.E., Gritsyk O.B., Kandalintseva N.V. Effect of new water-soluble phenolic antioxidants on the activity of Nrf2-driven enzymes, glutathione system, and Nrf2 translocation into the nucleus. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2020; 40 (6): 58–69. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20200606

Введение

Активированные кислородные метаболиты (прооксиданты) непрерывно генерируются *in vivo* и играют двойную роль – выступают в качестве либо физиологического сигнального мессенджера (эустресс), либо повреждающего фак-

тора (дистресс [1, 2], наиболее часто называемый окислительным стрессом [3, 4]). Прооксиданты, синтезирующиеся регулируемым и контролируемым образом, избирательно реагируют с биологическими молекулами, давая начало специфическим продуктам и дирижируя сигнальными каскадами, в то время как их гиперпродукция

запускает так называемое нерегулируемое окисление липидов, белков и нуклеиновых кислот, вносящее весомый вклад в возникновение и прогрессирование множества патологических процессов и заболеваний, в том числе связанных со старением (воспаление, атеросклероз, онкологические и нейродегенеративные заболевания и многие другие) [1–3].

Формирование представлений об окислительном стрессе как универсальном патогенетическом факторе в последние десятилетия значительно актуализировало исследования в области изучения биоантиоксидантных и фармакологических свойств фенольных соединений. Несмотря на то что фенольные антиоксиданты широко представлены в природе (более 8000 разновидностей [5]), по всему миру ведутся целенаправленные работы по созданию новых веществ с заданными свойствами. К таким свойствам можно отнести не только усиление непосредственной антиоксидантной и антирадикальной активности, но и повышение водорастворимости (большинство природных полифенолов липофильны, что существенно ограничивает их биологическую доступность и ограничивает фармацевтический потенциал [6]), конструирование полифункциональных, или «гибридных», антиоксидантов комбинированного действия, сочетающих за счет внутри- и межмолекулярного синергизма антирадикальную и антипероксидную активность, антиоксидантную и биологическую эффективность (противовоспалительную, антиканцерогенную, нейропротекторную и т.д.).

Разработка таких веществ является одним из чрезвычайно перспективных направлений, поскольку наличие у инновационных соединений не прямой биологической активности позволяет им реализовывать свое действие через сигнальные пути, опосредованные NF-κB и LPS/TLR-4 (провоспалительные каскады), STAT3 и MAP-киназами, PI3K/Akt/mTOR (аутофагия), рецепторами, сопряженными с G-белком [7]. Наибольший интерес в этом ряду представляет редокс-зависи-

мая система антиоксидант-респонсивного элемента Keap1/Nrf2/ARE, во многом определяющая трансдукцию сигнала по другим регуляторным каскадам [3, 8]. Цель настоящего исследования состояла в изучении влияния синтезированных нами водорастворимых структурно-родственных монофенолов на систему Keap1/Nrf2/ARE на основании воздействия на ключевые элементы ее индукции (активность Nrf2-подконтрольных ферментов, состояние системы глутатиона и внутриклеточное перераспределение транскрипционного фактора Nrf2).

Материал и методы

Синтезированы пять оригинальных гидрофильных фенольных соединений структурно взаимосвязанного ряда: 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)этилтиосульфат натрия (ТС-12), 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-13), 3-(3',5'-ди-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-17), 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилселеносульфат натрия (СеС-13) и 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилсульфонат натрия (С-13); в качестве препарата сравнения использовали феноксан (калиевую соль фенозан-кислоты) (рис. 1). Соединения получали из 2,6-ди-*трет*-бутилфенола по последовательности превращений, описанной ранее [9, 10], их строение подтверждали данными элементного анализа, ЯМР-, ИК- и УФ-спектроскопии.

В работе использовали моноцито/макрофагоподобные клетки гистиоцитарной лимфомы человека U937 и гистиоцитарной саркомы мыши J774, полученные из Банка клеточных культур ФГБУН Институт цитологии РАН (г. Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде, содержащей 90 % RPMI-1640, 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) (Hyclone, США), 1 % пенициллина, 1 % стрептомицина, 1 % глутамина в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 8 % CO₂, пересеивали каждые 3–4 дня в зависимости от плотности

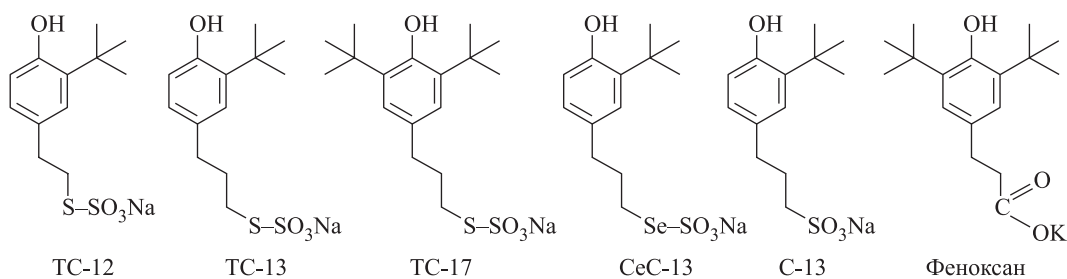


Рис. 1. Структура синтетических монофенолов, использованных в настоящем исследовании
 Fig. 1. The structure of the synthesized monophenols used in the study

клеточного слоя. С исследуемыми соединениями в концентрациях 5, 20 и 100 мкМ клетки инкубировали в течение 24 часов.

Для приготовления лизатов клетки U937 отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS) (Invitrogen, США), ресуспендировали в 0,5 мл лизирующего буфера, содержащего 10 мМ Tris-HCl и 250 мМ сахарозы (Лаборатория Медиген, Россия), pH 7,4, после чего озвучивали на льду ультразвуковым аппаратом МУЗА 01/22-М Надежда-3 (Россия), центрифугировали 10 минут на скорости 13 000 об/мин и отбирали супернатант для измерений. Активность ферментов, содержание белка и глутатиона определяли спектрофотометрически при 25 °С в 96-луночных плоскодонных планшетах для иммунологических измерений на микропланшетном анализаторе ELx808 (BioTek, США) (NAD(P)H:хиноноксидоредуктаза 1 (NQO1), общий белок, глутатион) или в кварцевых кюветках на спектрофотометре Smartspec™ Plus (Bio-Rad Laboratories, США) (глутатион-S-трансферазы (GST), селен-зависимые глутатионпероксидазы (GPx) и глутатионредуктаза (GR)). В качестве «пустой» пробы использовали рабочий раствор без добавления клеточного лизата. Результаты измерений активности ферментов нормировали на общее количество белка, содержание которого определяли по методу Bradford [11].

Активность NQO1 измеряли по скорости реакции NADPH-зависимого двухэлектронного окисления дихлориндофенола [12]. Для этого рабочий раствор, содержащий 50 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 0,08 % Triton X-100 (Лаборатория Медиген, Россия), 0,25 мМ NADPH (Reanal, Венгрия), 80 мкМ 2,6-дихлориндофенола (Fluka, Швейцария), разливали по 140 мкл в лунки 96-луночного планшета, инициировали реакцию добавлением 10 мкл клеточного лизата и измеряли изменение оптической плотности на длине волны 600 нм в кинетическом режиме. Реакцию с каждым образцом проводили дважды – в присутствии 60 мкМ дикумарола и без него, после чего вычисляли чувствительную к дикумаролу способность образцов восстанавливать 2,6-дихлориндофенол. Изменение оптической плотности пересчитывали в изменение концентрации субстрата, используя коэффициент экстинкции $21,0 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Активность GST определяли по скорости образования конъюгатов глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом [13]. Для этого рабочий раствор, содержащий 100 мМ PBS, 1 мМ GSH, 1 мМ 1-хлор-2,4-динитробензола, разливали в кварцевые кюветы по 1400 мкл. Реакцию запускали добавлением к рабочему раствору 100 мкл клеточного лизата, после чего на 1 и на 10 минутах измеряли оптическую плотность на длине

волны 340 нм. Изменение оптической плотности пересчитывали в изменение концентрации продукта, используя коэффициент экстинкции $9,6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Активность GPx определяли по скорости окисления восстановленного глутатиона (GSH) экзогенной H_2O_2 в присутствии NADPH [14]. В реакционную смесь, содержащую 1 мМ ЭДТА, 1 мМ Na_3N , 10 мМ GSH и 2,4 ЕД/мл GR и 100 мкл клеточного лизата, вводили 100 мкл 1,5 мМ NADPH и измеряли базовое окисление последнего в течение 3 мин при 340 нм, после чего инициировали реакцию добавлением 100 мкл 1,5 мМ H_2O_2 и измеряли оптическую плотность на длине волны 340 нм в течение 3 мин; 1 ЕД активности GPx соответствует 1 мкМ окисленного за 1 мин NADPH.

Активность GR измеряли по скорости окисления NADPH, расходующегося на восстановление окисленного глутатиона (GSSG) [13]. Для этого рабочий раствор, содержащий 50 мМ Tris-HCl, 0,1 мМ EDTA, 0,14 мМ NADPH, 1 мМ окисленного глутатиона, разливали в кюветы по 1400 мкл, реакцию запускали добавлением 100 мкл клеточного лизата, после чего измеряли оптическую плотность на длине 340 нм на 1 и 20 минутах реакции. Изменение оптической плотности пересчитывали в изменение концентрации субстрата, используя коэффициент экстинкции $6,2 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Для определения содержания глутатиона клеточные лизаты депротеинизировали добавлением 50%-го водного раствора сульфосалициловой кислоты (1 : 1, объем : объем) с последующим центрифугированием (10 мин, 13 000 об/мин). Суммарное содержание глутатиона (GSH и GSSG) определяли по скорости его взаимодействия с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой [15]. Для этого в лунки 96-луночного планшета к 150 мкл рабочего раствора (100 мМ калиево-фосфатный буфер, содержащий 1 мМ ЭДТА, pH 7, 0,1 мМ 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислоты и 0,44 ЕД/мл GR) вносили по 10 мкл клеточного лизата. Реакцию инициировали добавлением 50 мкл 0,19 мМ раствора NADPH (40 мг/мл) и в кинетическом режиме измеряли изменение оптической плотности на длине волны 450 нм. Калибровочную кривую строили по образцам с известной концентрацией GSH. Для определения содержания GSSG каждую пробу предварительно инкубировали с 2,5 % 2-винилпиридина для необратимой конъюгации GSH и проводили измерение, как описано выше. Концентрацию GSH определяли как разность содержания суммарного глутатиона и GSSG.

Для иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к транскрипционному фактору Nrf2

клетки линии J774 снимали трипсином и сажали на стекла с полилизинным покрытием в полную культуральную среду, после расплавления добавляли раствор исследуемого вещества и инкубировали 4 ч. Затем клетки фиксировали 4%-м формалином в течение 15 мин (эту и все последующие стадии приготовления препаратов проводили при комнатной температуре) и пермеабелизовали 0,15%-м раствором Тритона X-100 в PBS в течение 3 мин, после чего дважды отмывали в PBS в течение 5 мин. После инкубации в блокирующем буфере (0,05 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (Amresco-Inc., США) в PBS) в течение 40 мин препараты инкубировали 3 ч с кроличьими поликлональными антителами к Nrf2 (ab31163, Abcam, Великобритания), после чего дважды отмывали в PBS в течение 10 мин. Затем препараты инкубировали со вторичными антителами к иммуноглобулинам кролика, конъюгированными с флуорохромом Texas Red (Abcam, США), в течение 1 ч в темноте и после двукратной десятиминутной отмывки в PBS заключали в монтирующую среду Fluoroshield, содержащую интеркалирующий краситель DAPI для окраски ядер (Abcam, США). Внутрисклеточную локализацию Nrf2 исследовали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710 (Zeiss, Германия).

Количественные данные на предварительном этапе статистического анализа оценивали на нормальность распределения по критерию Шапиро – Уилка. Поскольку распределения отличались от нормального, переменные представлены на рисунках в виде медианы (столбики) и межквартильных интервалов («усы»). Для оценки различий данных использовали критерии Манна – Уитни и Данна. Связь между признаками определяли с помощью корреляционного анализа величиной коэффициента корреляции Спирмена (r). Критический уровень значимости нулевой статистической гипотезы (p) принимали равным 0,05.

Результаты и их обсуждение

Сравнительный анализ способности фенольных антиоксидантов данного структурно взаимосвязанного ряда индуцировать в клетках миелоидной линии U937 синтез ARE-зависимых ферментов II фазы детоксикации ксенобиотиков и антиоксидантных ферментов был проведен на модели индукции суммарной активности GST, катализирующих реакции химической модификации ксенобиотиков с участием GSH (реакции конъюгации и нуклеофильного замещения ксенобиотиков и GSH и восстановление органических пероксидов до спиртов с образованием GSSG), и

NQO1, катализирующей реакции двухэлектронного восстановления широкого спектра хинонов, предотвращая образование высокорективных семихинонов, и функционирующей как эффективный скэвинджер супероксид-радикала [16].

С-13 не оказывал значимого влияния на активность NQO1 и GST (рис. 2, а; 3, а). ТС-12 не влиял на активность NQO1 и существенно повышал активность GST (в большей степени в концентрациях 5 и 100 мкМ, линейная зависимость эффекта от дозы: достоверность аппроксимации $R^2 = 0,50$, $p = 0,0023$; коэффициент корреляции Спирмена $r_s = 0,79$, $p = 0,0003$) (рис. 2, б; 3, б). ТС-17 значимо увеличивал активность обоих ферментов только в концентрации 100 мкМ, практически не влияя на их индукцию в более низких дозах (рис. 2, в; 3, в), в то же время зависимость эффекта от дозы была линейной – для NQO1 достоверность аппроксимации $R^2 = 0,37$, $p = 0,0073$; коэффициент корреляции Спирмена $r_s = 0,58$, $p = 0,0112$, для GST достоверность аппроксимации $R^2 = 0,73$, $p = 0,0000$; коэффициент корреляции Спирмена $r_s = 0,39$, $p = 0,1107$.

Феноксан (рис. 2, г; 3, г) и СеС-13 (рис. 2, д; 3, д) во всех концентрациях достоверно повышали активность как NQO1, так и GST, однако эффект был умеренным. Кроме того, если для феноксана зависимость эффекта от дозы была однозначно линейной для обоих ферментов (для NQO1 достоверность аппроксимации $R^2 = 0,35$, $p = 0,0103$; коэффициент корреляции Спирмена $r_s = 0,71$, $p = 0,0011$, для GST достоверность аппроксимации $R^2 = 0,24$, $p = 0,0462$; коэффициент корреляции Спирмена $r_s = 0,68$, $p = 0,0024$), то для СеС-13 она не была столь очевидной (для NQO1 достоверность аппроксимации $R^2 = 0,25$, $p = 0,0477$; коэффициент корреляции Спирмена $r_s = 0,72$, $p = 0,0018$, для GST достоверность аппроксимации $R^2 = 0,13$, $p = 0,1649$; коэффициент корреляции Спирмена $r_s = 0,57$, $p = 0,0212$). Здесь необходимо отметить, что СеС-13 довольно токсичен: при инкубировании в течение 24 ч с 100 мкМ соединения погибает более 50 % клеток U937 [10], что и может объяснять колебания эффекта.

Наибольшим же индуцирующим эффектом обладает ТС-13 (рис. 2, е; 3, е), который эффективно повышал активность NQO1 в концентрациях 5 мкМ (увеличение в 2,2 раза по сравнению с контролем), 20 мкМ (в 2,3 раза) и 100 мкМ (в 2,6 раза), линейная зависимость эффекта от дозы (достоверность аппроксимации $R^2 = 0,37$, $p = 0,0074$; коэффициент корреляции Спирмена $r_s = 0,78$, $p = 0,0002$). Инкубация клеток U937 с ТС-13 также приводила к увеличению в них активности GST (нелинейная зависимость), при

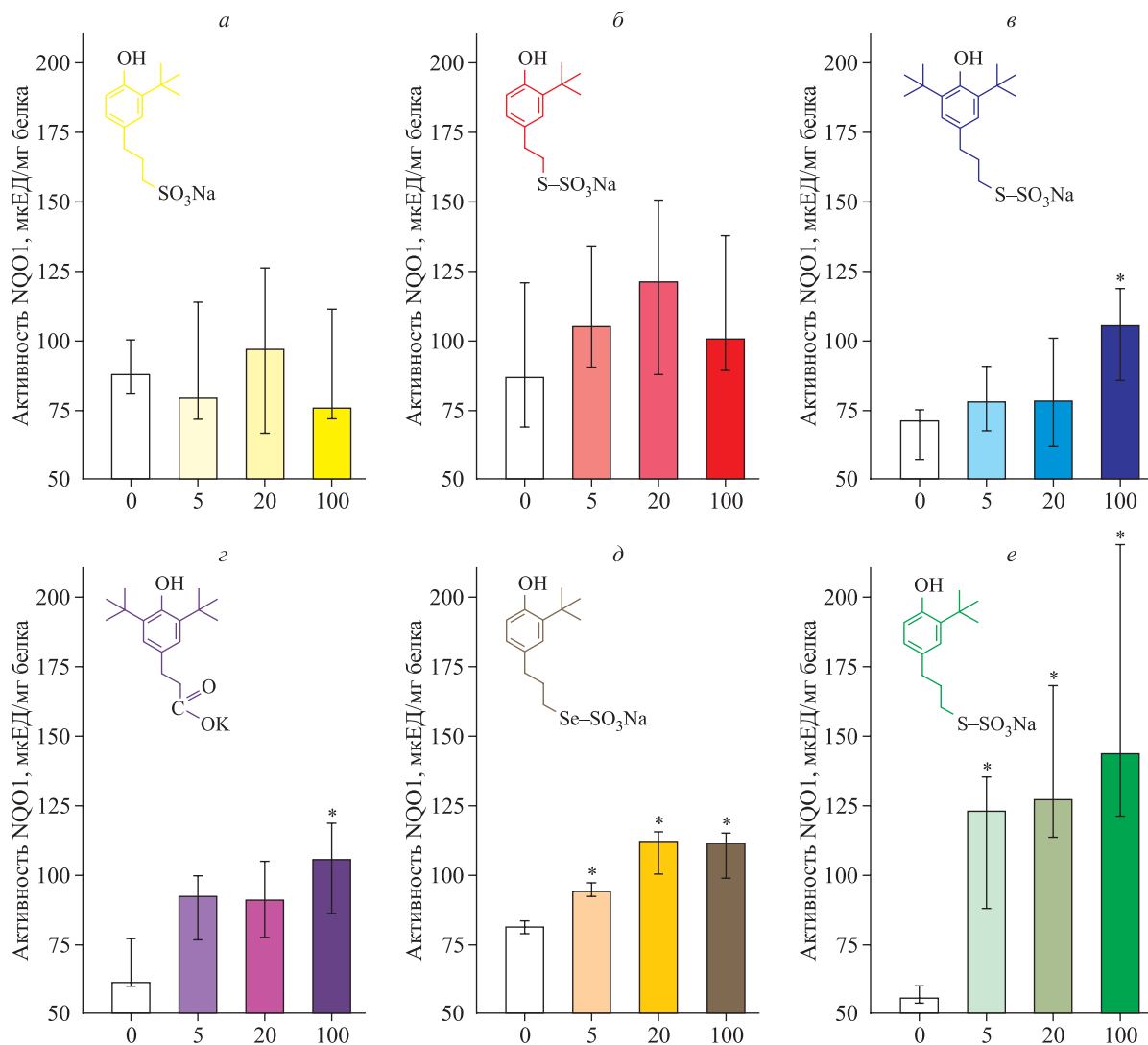


Рис. 2. Влияние S-13 (а), TS-12 (б), TS-17 (в), феноксана (г), SeS-13 (д) и TS-13 (е) на активность NQO1 в клетках U937; здесь и на рис. 3–5 звездочкой обозначено статистически значимое ($p < 0,05$) отличие от величины показателя группы контроля

Fig. 2. Effect of S-13 (a), TS-12 (б), TS-17 (в), phenoxan (г), SeS-13 (д) and TS-13 (e) on NQO1 activity in U937 cells; here and in figures 3–5 an asterisk denotes a statistically significant ($p < 0.05$) difference from the value of the control group

этом интересно, что в данном случае вновь проявился обнаруженный нами ранее [17] горметический эффект TC-13 – в более низких концентрациях (5 и 20 мкМ) соединение дозозависимо ее повышало (соответственно в 1,29 и 1,86 раза), в то время как при увеличении дозы до 100 мкМ стимулирующий эффект исчезал.

Основопологающим моментом, служащим в качестве триггера для индукции системы Keap1/Nrf2/ARE, является изменение редокс-баланса биологической системы в сторону преобладания прооксидантов, в том числе развитие окислительного стресса. Наиболее адекватным показателем окислительно-восстановительного равновесия служит соотношение восстановленных и окис-

ленных SH-групп в белках, непосредственно зависящее от специализированной системы трипептида глутатиона, к которой можно отнести сам глутатион в окисленной (GSSG) и восстановленной (GSH) форме, использующие последний в качестве кофактора ферменты (GPx, GST) и GR, восстанавливающую дисульфидную связь окисленного глутатиона до его сульфгидрильной формы.

Обнаружено, что TC-13 дозозависимо увеличивает активность GPx и GR в клетках U937 (рис. 4). При этом максимальным активирующим эффектом на GPx TC-13 обладает в дозе 100 мкМ (рис. 4, а), тогда как в наибольшей степени активизирует GR в дозе 20 мкМ (аналогично влиянию на

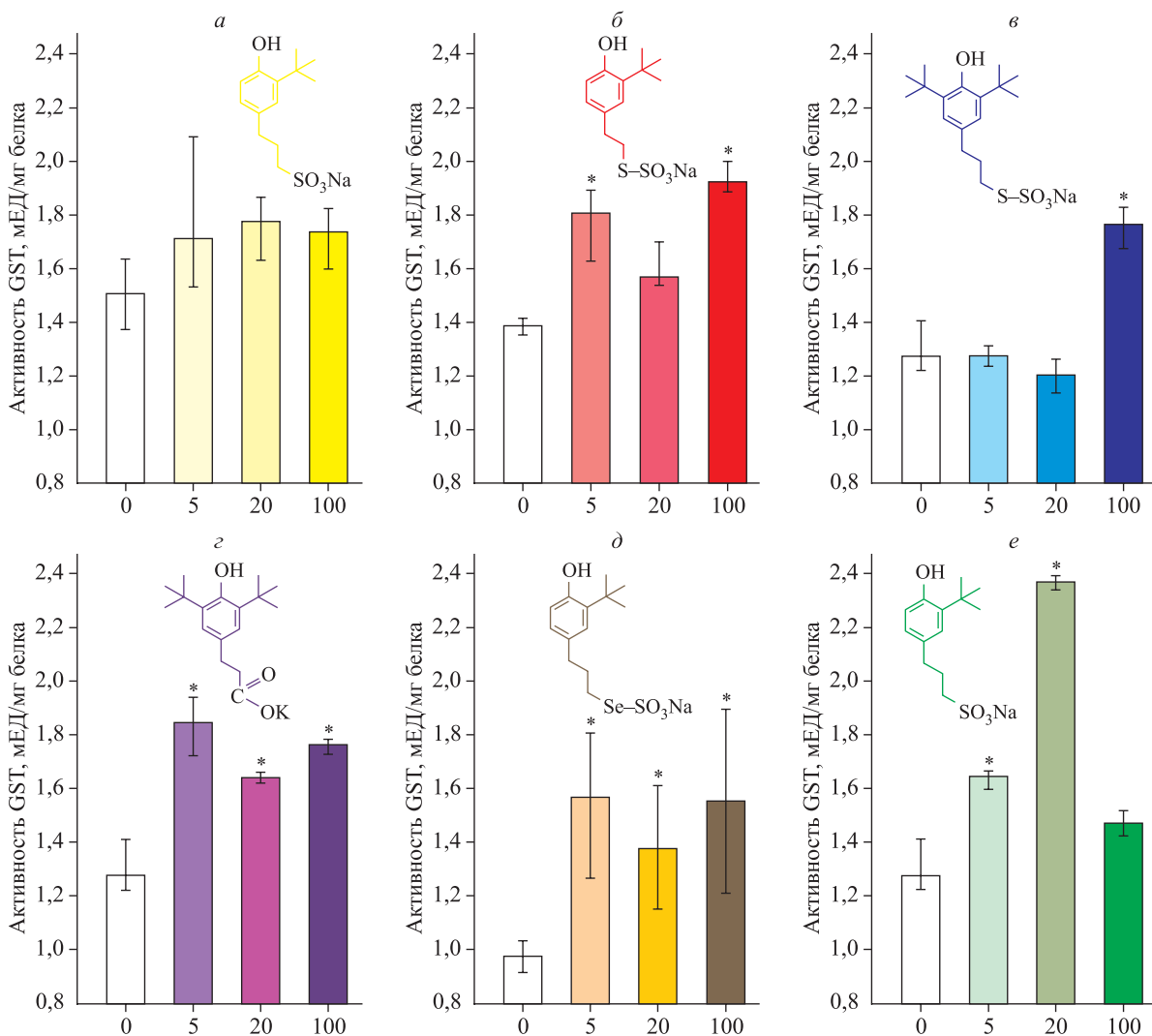


Рис. 3. Влияние S-13 (а), ТС-12 (б), ТС-17 (в), феноксана (г), SeC-13 (д) и ТС-13 (е) на общую активность GST в клетках U937

Fig. 3. Effect of S-13 (a), TS-12 (б), TS-17 (в), phenoxan (г), SeS-13 (д) and TS-13 (e) on GST total activity in U937 cells

GST), увеличивая данный показатель в 1,75 раза по сравнению с контролем, а при дальнейшем повышении конечной концентрации происходит инверсия эффекта (рис. 4, б). Последний феномен можно объяснить уже упоминавшимся явлением гормезиса, часто встречающимся у индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE: их низкие концентрации повышают экспрессию ARE-зависимых генов, а высокие, напротив, снижают [18].

Полученные данные свидетельствуют о наличии у фенольного антиоксиданта ТС-13 способности увеличивать экспрессию и активность комплекса антиоксидантных ферментов и ферментов II фазы детоксикации ксенобиотиков, контролируемых антиоксидант-респонсивным элементом на уровне транскрипции соответствующих генов, что в сочетании с особенностями химиче-

ского строения соединения косвенно подтверждает его принадлежность к индукторам системы Keap1/Nrf2/ARE. Для получения дополнительных доказательств данного предположения на основании сведений о поэтапном механизме активации Nrf2 нами изучена способность ТС-13 инициировать ядерную транслокацию молекулы Nrf2, являющуюся ключевым моментом активации системы Keap1/Nrf2/ARE. Установлено, что в интактных клетках J774 Nrf2 равномерно локализован как в цитоплазме, так и в клеточном ядре; спустя 4 часа после добавления ТС-13 происходит его перераспределение в ядро. Наибольший эффект достигался при концентрации ТС-13 20 мкМ (рис. 5, а), при этом до 50 мкМ он зависел от дозы (достоверность аппроксимации $R^2 = 0,35$; $p = 0,000001$; коэффициент корреляции Спирмена

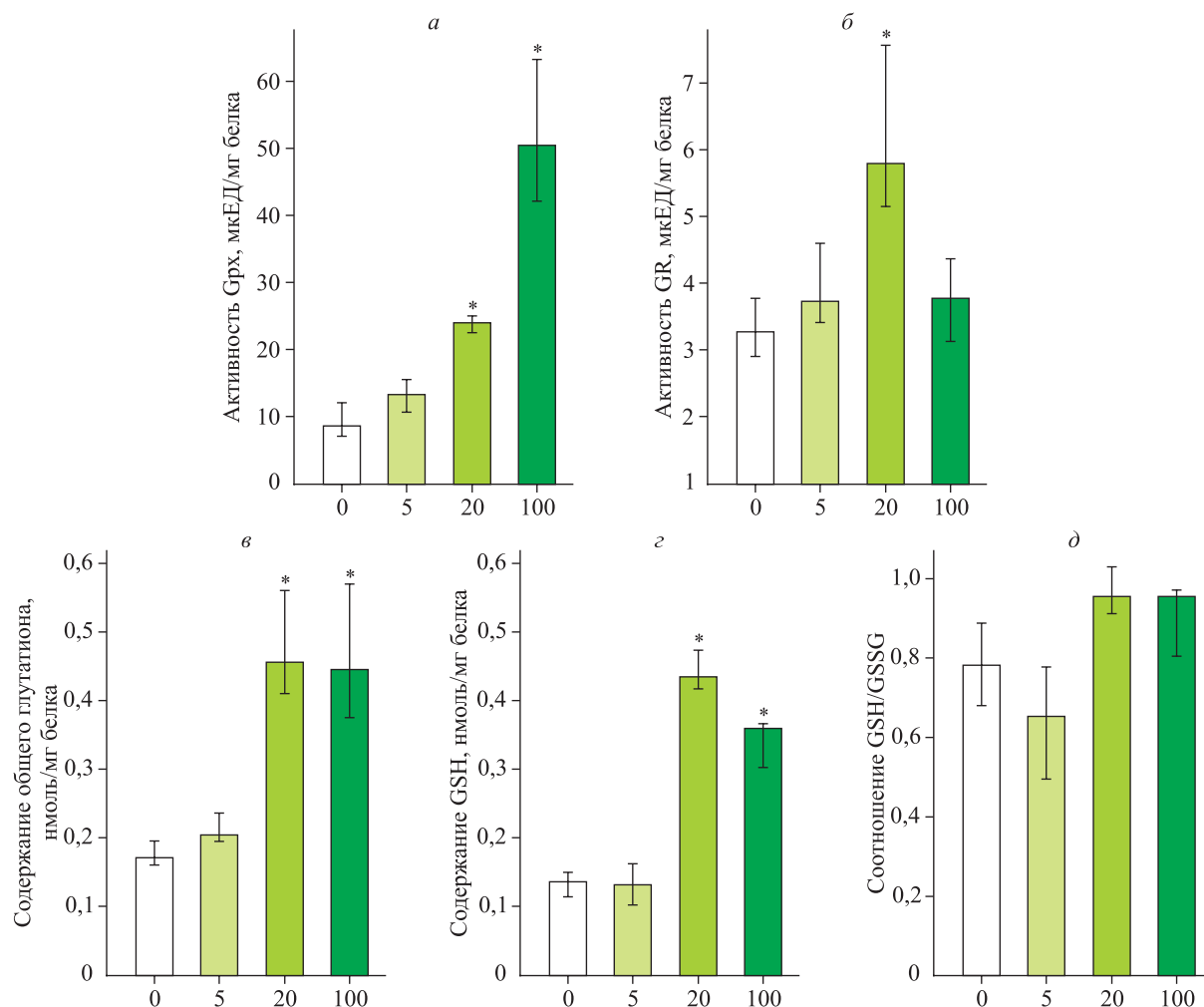


Рис. 4. Влияние TC-13 на активность GPx (а) и GR (б), внутриклеточное содержание общего глутатиона (в) и GSH (г) и соотношение GSH/GSSG (д) в клетках U937

Fig. 4. Effect of TS-13 on GPx (a) and GR activity (б), on intracellular content of total glutathione (в), GSH (г) and on GSH/GSSG ratio (д) in U937 cells

$r_s = 0,60, p = 0,000005$) (рис. 5, б), а при концентрации 100 мкМ транспорт молекулы Nrf2 в ядро уменьшался, что может быть связано с эффектом гормезиса индуктора, активацией исследуемым фенолом конкурирующих сигнальных путей, тормозящих активацию антиоксидант-респонсивного элемента, либо с активацией Nrf2 в данных условиях на более ранних сроках, тогда как через 4 часа после воздействия преобладают уже механизмы инактивации данного сигнального пути.

Таким образом, в настоящей работе показано, что водорастворимые фенольные антиоксиданты существенно различаются по способности активировать NQO1 и GST в клетках моноцитарно-макрофагальной линии U937 в зависимости от своей химической структуры. Наибольшим стимулирующим эффектом обладает несимметрично экранированный фенол TC-13, в то время как укорочение *para*-алкильного заместителя на одно

метиленовое звено (соединение TC-12, рис. 6, а), замена в его структуре бивалентного атома серы на атом селена (соединение SeC-13, рис. 6, б) или удаление (соединение C-13, рис. 6, в), полное экранирование фенольной группы (соединение TC-17, рис. 6, г) приводит к частичной (от умеренной до почти полной) потере биологической активности.

Эти факты свидетельствуют, что для реализации биологической активности исследуемых соединений важно присутствие в структуре *para*-алкильного заместителя атома двухвалентной серы и степень экранирования ОН-группы; наиболее выраженной эффективностью обладает частично экранированный монофенол TC-13. При этом отмечено, что NQO1- и GST-индуцирующие способности тестируемых соединений тесно взаимосвязаны (рис. 7), что указывает на возможность координированной индукции данных

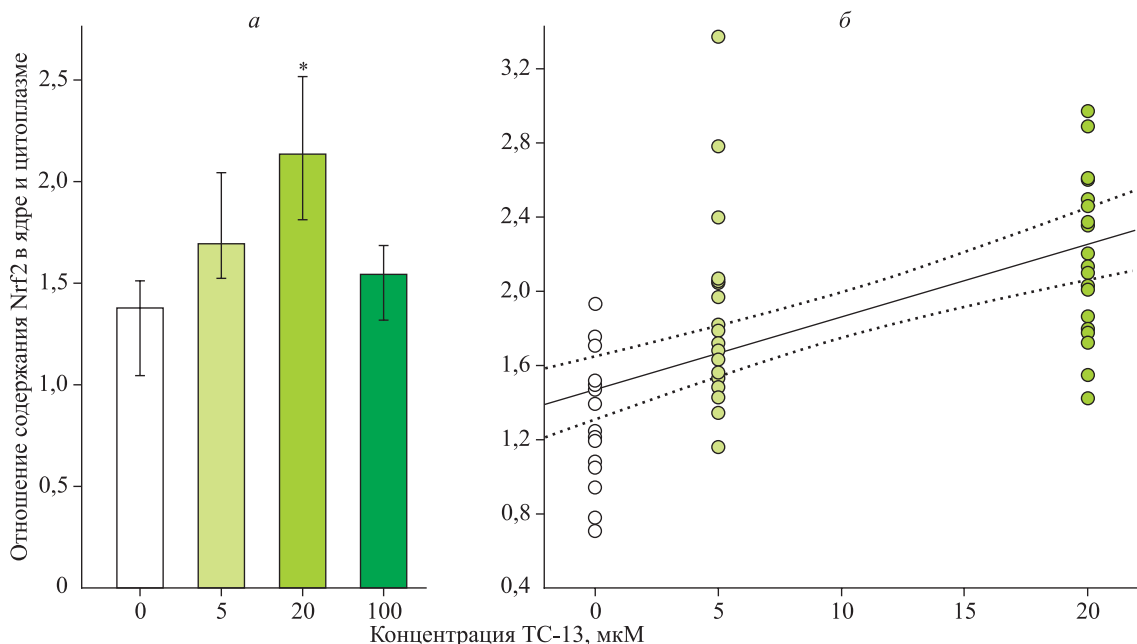


Рис. 5. Влияние ТС-13 на ядерно-цитоплазматическое соотношение содержания Nrf2 в клетках J774: а – медианы значений и разбросы, б – диаграмма рассеяния в диапазоне концентраций ТС-13 от 0 до 20 мкМ (здесь и на рис. 6 кружки – отдельные значения, сплошная линия – линейная аппроксимация, пунктирная – 95%-й доверительный интервал)

Fig. 5. Effect of TS-13 on Nrf2 nuclear/cytoplasm ratio in J774 cells: а – medians and spreads, б – scatter diagram in the range of TS-13 concentrations from 0 to 20 μM (circles – individual values, solid line – linear approximation, dashed line 95% confidence interval)

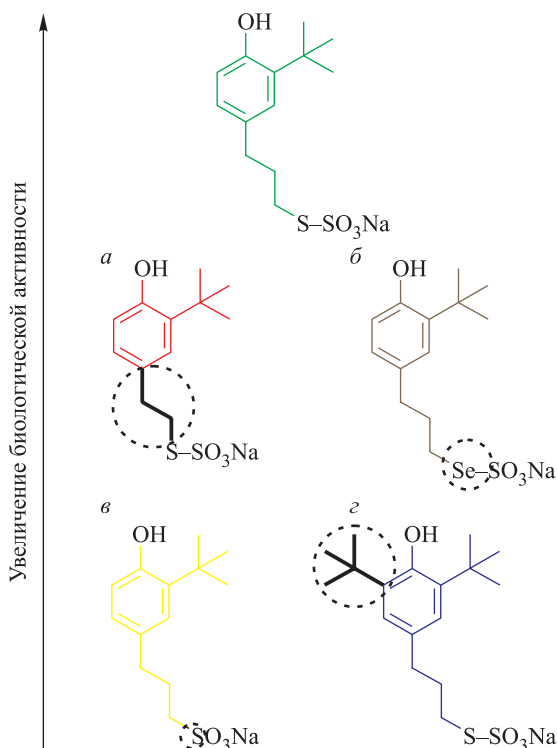


Рис. 6. Схематическое изображение зависимости между структурой соединений и их биологической активностью

Fig. 6. Relationship between compound structure and biological activity (scheme)

ферментов и наличие общей регуляторной системы, обеспечивающей их активацию в ответ на обработку клеток фенольными антиоксидантами. В то же время, помня о прямой антирадикальной активности соединений, нельзя не упомянуть интересный факт: их способность перехватывать радикалы в модельной реакции [10] прямо связана с индукцией NQO1, при исключении из анализа токсичного для клеток СеС-13 коэффициент корреляции Спирмена $r_s = 0,71$ ($p = 0,002740$).

Наиболее вероятным механизмом активации NQO1 и GST фенольными антиоксидантами является усиление экспрессии соответствующих генов, так как через сутки в водных растворах происходит полный гидролиз большинства исследуемых фенолов, что исключает наличие аллостерических эффектов на сами ферменты. Поскольку экспрессия этих генов является ARE-зависимой, а структура соединений отвечает критериям индукторов ARE, можно сделать вывод об их возможном активирующем влиянии на сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE. Об этом свидетельствуют и другие доказательства способности данных соединений влиять на ключевые элементы активации системы Keap1/Nrf2/ARE: повышать экспрессию мРНК гена *GSTP1-1* в клетках гепатокарциномы человека линии HepG2 [19], усиливать транслокацию Nrf2 в ядро (пока-

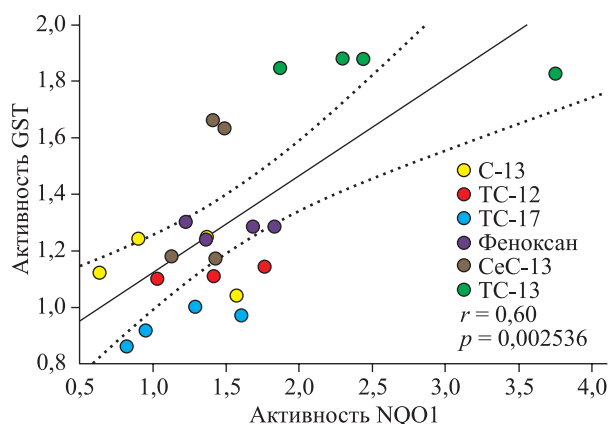


Рис. 7. Корреляция GST- и NQO1-активирующих свойств исследуемых фенольных антиоксидантов (диаграмма рассеяния). Отдельные значения вычислены как отношения медиан активностей ферментов при инкубации клеток U937 с 20 мкМ соответствующего соединения и контроля, %. Приведены коэффициент корреляции Спирмена и его статистическая значимость

Fig. 7. Correlation of GST- and NQO1-activating properties of the studied phenolic antioxidants (scatter diagram). The individual values were calculated as the ratios of ratio of enzyme activity median during incubation of U937 cells with 20 μM corresponding compound to control, (%). Spearman's correlation coefficient and its statistical significance are presented

занное в настоящем исследовании (см. рис. 5) на клетках линии J774 и ранее на клетках аденокарциномы молочной железы человека MCF-7 [20]), *in vivo* увеличивать экспрессию мРНК, содержание белка и активность GSTP1, а также образование комплексов ядерных белков с олигонуклеотидной последовательностью, соответствующей ARE (гель-ретардационный анализ) [21]).

Благодарности

Исследование выполнено с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы».

Список литературы / References

1. Niki E. Oxidative stress and antioxidants: Distress or eustress? *Arch. Biochem. Biophys.* 2016; 595: 19–24. doi: 10.1016/j.abb.2015.11.017
2. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. *Redox Biol.* 2017; 11: 613–619. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035
3. Rolt A., Cox L.S. Structural basis of the anti-ageing effects of polyphenolics: mitigation of oxida-

tive stress. *BMC Chem.* 2020; 14 (1): 50. doi: 10.1186/s13065-020-00696-0

4. Sies H. Oxidative stress: concept and some practical aspects. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9 (9). doi: 10.3390/antiox9090852

5. Tungmunnithum D., Thongboonyou A., Pholboon A., Yangsabai A. Flavonoids and other phenolic compounds from medicinal plants for pharmaceutical and medical aspects: an overview. *Medicines (Basel).* 2018; 5 (3). doi: 10.3390/medicines5030093

6. Jafari H., Bernaerts K.V., Dodi G., Shavandi A. Chitoooligosaccharides for wound healing biomaterials engineering. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 2020; 117: 111266. doi: 10.1016/j.msec.2020.111266

7. Zhou Y.X., Gong X.H., Zhang H., Peng C. A review on the pharmacokinetics of paeoniflorin and its anti-inflammatory and immunomodulatory effects. *Biomed. Pharmacother.* 2020; 130: 110505. doi: 10.1016/j.biopha.2020.110505

8. Zenkov N.K., Kozhin P.M., Chechushkov A.V., Martinovich G.G., Kandalintseva N.V., Mentshchikova E.B. Mazes of Nrf2 regulation. *Biochemistry (Mosc.).* 2017; 82 (5): 556–564. doi: 10.1134/S0006297917050030

9. Олейник А.С., Куприна Т.С., Певнева Н.Ю., Марков А.Ф., Кандалинцева Н.В., Просенко А.Е., Григорьев И.А. Синтез и антиоксидантные свойства S-[3-(гидроксиарил)пропил]тиосульфатов и [3-(гидроксиарил)пропан]-1-сульфонатов натрия. *Изв. РАН. Сер. хим.* 2007; (6): 1094–1101.

Oleynik A.S., Kuprina T.S., Pevneva N.Yu., Markov A.F., Kandalintseva N.V., Prosenko A.E., Grigorev I.A. Synthesis and antioxidant properties of sodium S-[3-(hydroxyaryl)propyl] thiosulfates and [3-(hydroxyaryl)propane]-1-sulfonates. *Russ. Chem. Bull.* 2007. 56 (6). 1135–1143.

10. Гайнутдинов П.И., Кожин П.М., Чечушков А.В., Мартинович Г.Г., Хольшин С.В., Кандалинцева Н.В., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Обратная зависимость между антиоксидантной активностью синтетических монофенолов структурно взаимосвязанного ряда и их токсичностью в отношении опухолевых клеток. *Сиб. науч. мед. журн.* 2018; 38 (1): 22–31. doi: 10.15372/SSMJ20180104

Gainutdinov P.I., Kozhin P.M., Chechushkov A.V., Martinovich G.G., Kholshin S.V., Kandalintseva N.V., Zenkov N.K., Mentshchikova E.B. Inverse relationship between the antioxidant activity of structurally related synthetic monophenols and their toxicity in tumor cells. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2018; 38 (1): 22–31. [In Russian].

11. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248–254. doi: 10.1006/abio.1976.9999

12. Siegel D., Kepa J.K., Ross D. Biochemical and genetic analysis of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1). *Curr. Protoc. Toxicol.* 2007; Chapter 4: Unit4 22. doi: 10.1002/0471140856.tx0422s32
13. Mannervik B., Jemth P. Measurement of glutathione transferases. *Curr. Protoc. Toxicol.* 2001; Chapter 6: Unit6 4. doi: 10.1002/0471140856.tx0604s01
14. Li S., Yan T., Yang J.Q., Oberley T.D., Oberley L.W. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer Res.* 2000; 60 (14): 3927–3939.
15. Rahman I., Kode A., Biswas S.K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* 2006; 1 (6): 3159–3165. doi: 10.1038/nprot.2006.378
16. Satoh T., McKercher S.R., Lipton S.A. Nrf2/ARE-mediated antioxidant actions of pro-electrophilic drugs. *Free Radic. Biol. Med.* 2013; 65: 645–657. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.022
17. Лемза А.Е., Ткачев В.О., Зенков Н.К., Кандалинцева Н.В., Хольшин С.В., Меньщикова Е.Б. Структурно-функциональные особенности влияния новых водорастворимых фенольных антиоксидантов на жизнеспособность клеток. *Сиб. науч. мед. журн.* 2015; (2): 16–22.
18. Lemza A.E., Tkachev V.O., Zenkov N.K., Kandalintseva N.V., Kholshin S.V., Men'shchikova E.B. Effect of novel water-soluble phenolic antioxidants on cell viability: structure-activity relationships. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal.* 2015; (2): 16–22. [In Russian].
19. Kanner J. Polyphenols by generating H₂O₂, affect cell redox signaling, inhibit PTPs and activate Nrf2 axis for adaptation and cell surviving: *in vitro*, *in vivo* and human health. *Antioxidants (Basel).* 2020; 9 (9) doi: 10.3390/antiox9090797
20. Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Kandalintseva N.V., Oleynik A.S., Prosenko A.E., Gusachenko O.N., Shklyayeva O.A., Vavilin V.A., Lyakhovich V.V. Antioxidant and antiinflammatory activity of new water-soluble sulfur-containing phenolic compounds. *Biochemistry (Mosc.).* 2007; 72 (6): 644–651.
21. Menshchikova E.B., Chechushkov A.V., Kozhin P.M., Kholshin S.V., Kandalintseva N.V., Martinovich G.G., Zenkov N.K. Activation of autophagy and Nrf2 signaling in human breast adenocarcinoma MCF-7 cells by novel monophenolic antioxidants. *Cell and Tissue Biology.* 2019; 13 (2): 85–92. doi: 10.1134/s1990519x1902007x
22. Menshchikova E., Tkachev V., Lemza A., Sharikova T., Kandalintseva N., Vavilin V., Safronova O., Zenkov N. Water-soluble phenol TS-13 combats acute but not chronic inflammation. *Inflamm. Res.* 2014; 63 (9): 729–740. doi: 10.1007/s00011-014-0746-0

Сведения об авторах:

Елена Брониславовна Меньщикова, д.м.н., ORCID: 0000-0003-2367-0114, e-mail: lemen@centercem.ru
Николай Константинович Зенков, д.б.н., ORCID: 0000-0003-1476-4098, e-mail: zenkovnk@mail.ru
Пётр Михайлович Кожин, к.м.н., ORCID: 0000-0002-9989-9778, e-mail: kozhinpm@gmail.com
Антон Владимирович Чечушков, к.м.н., ORCID: 0000-0002-0238-4533, e-mail: achechushkov@gmail.com
Владислав Сергеевич Павлов, e-mail: vspavlov@centercem.ru
Лидия Петровна Ромаха, e-mail: lpromakh@centercem.ru
Марина Валерьевна Храпова, к.б.н., ORCID: 0000-0003-3397-8067, e-mail: khrapova@centercem.ru
Анастасия Евгеньевна Серых, e-mail: rasiel1996@yandex.ru
Оксана Борисовна Грицык, к.м.н., e-mail: oks-gritsik@yandex.ru
Наталья Валерьевна Кандалинцева, д.х.н., ORCID: 0000-0001-6022-934X, e-mail: aquaphenol@mail.ru

Information about the authors:

Elena B. Menshchikova, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0003-2367-0114, e-mail: lemen@centercem.ru
Nikolay K. Zenkov, doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0003-1476-4098, e-mail: zenkovnk@mail.ru
Peter M. Kozhin, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-9989-9778, e-mail: kozhinpm@gmail.com
Anton V. Chechushkov, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-0238-4533,
e-mail: achechushkov@gmail.com
Vladislav S. Pavlov, e-mail: vspavlov@centercem.ru
Lidia P. Romakh, e-mail: lpromakh@centercem.ru
Marina V. Khrapova, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0003-3397-8067,
e-mail: khrapova@centercem.ru
Anastasia E. Serykh, e-mail: rasiel1996@yandex.ru
Oksana B. Gritsyk, candidate of medical sciences, e-mail: oks-gritsik@yandex.ru
Natalya V. Kandalintseva, doctor of chemical sciences, ORCID: 0000-0001-6022-934X,
e-mail: aquaphenol@mail.ru

Поступила в редакцию 21.09.2020
После доработки 21.10.2020
Принята к публикации 21.10.2020

Received 21.09.2020
Revision received 21.10.2020
Accepted 21.10.2020