

## Индукторы системы Keap1/Nrf2/ARE не увеличивают устойчивость сердца к длительной ишемии/реперфузии

П.М. Кожин<sup>1</sup>, А.С. Семенцов<sup>2</sup>, С.Е. Храпов<sup>1</sup>, М.В. Храпова<sup>1</sup>, Л.П. Ромах<sup>1</sup>,  
Н.В. Кандалинцева<sup>3</sup>, Е.Б. Меньщикова<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФИЦ фундаментальной и трансляционной медицины

630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2

<sup>2</sup> НИИ кардиологии Томского национального исследовательского медицинского центра РАН

634012, г. Томск, ул. Киевская, 111А

<sup>3</sup> Новосибирский государственный педагогический университет

630126, г. Новосибирск, ул. Вилюйская, 28

### Резюме

В качестве важного механизма повреждения миокарда при ишемии/реперфузии выступает окислительный стресс. С целью рассмотрения возможности восстановления редокс-баланса с помощью «непрямых» антиоксидантных воздействий изучен кардиопротективный эффект индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE при моделировании длительной ишемии/реперфузии *in vivo*. **Материал и методы.** Использовали оригинальный синтетический гидрофильный монофенол 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил)пропилтиосульфат натрия (ТС-13) и препарат сравнения *трет*-бутилгидрохинон (tBHQ). Самцы крыс линии Вистар в течение 7 сут ежедневно получали по 100 мг/кг раствора ТС-13 (с питьевой водой) или tBHQ (внутрибрюшинно), животные групп сравнения – соответствующие растворители. Через 1 сут после последнего приема препаратов *in vivo* моделировали локальную ишемию (45 мин, окклюзия левой коронарной артерии) и реперфузию (120 мин) сердца. В течение всего времени ишемии и во время реперфузии регистрировали ЭКГ, по окончании реперфузии сердце извлекали, определяли зону гипоперфузии и зону некроза. Изменение экспрессии в ткани миокарда мРНК генов *Nfe2l2*, *Nqo1*, *Hmox1*, *Gstp1*, *Rela* и *Nfkb2* определяли методом TaqMan ПЦР в режиме реального времени. **Результаты и их обсуждение.** Установлено, что группы крыс, получавших ТС-13 и tBHQ, по величине зон некроза и количеству нарушений ритма не отличались от соответствующих контрольных групп. Предварительное введение животным tBHQ не изменяло экспрессию исследуемых генов в ткани сердца после длительной ишемии/реперфузии. Назначение ТС-13 сопровождалось увеличением содержания транскриптов гена, кодирующего Nrf2 (в 7,64 раза), и подконтрольных ему генов *Nqo1* (в 6,46 раза) и *Hmox1* (в 3,63 раза); экспрессия генов *Gstp1*, *Rela* и *Nfkb2* не отличалась от соответствующих величин группы контроля; по сравнению с животными, получавшими tBHQ, экспрессия генов *Nfe2l2*, *Nqo1*, *Hmox1*, *Rela* и *Nfkb2* была больше соответственно в 16,23, 4,44, 2,68, 3,17 и 2,64 раза. Полученные результаты ставят под сомнение терапевтическую значимость индукции системы Keap1/Nrf2/ARE при длительной ишемии/реперфузии сердца.

**Ключевые слова:** ишемия, реперфузия, повреждение миокарда, активированные кислородные метаболиты, антиоксиданты, сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование выполнено по Государственному заданию (№ гос. регистрации АААА-А20-120013090021-1).

**Благодарности.** Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы» и «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

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

**Для цитирования:** Кожин П.М., Семенцов А.С., Храпов С.Е., Храпова М.В., Ромах Л.П., Кандалинцева Н.В., Меньщикова Е.Б. Индукторы системы Keap1/Nrf2/ARE не увеличивают устойчивость сердца к длительной ишемии/реперфузии. *Сибирский научный медицинский журнал*. 2022;42(6):35–44. doi: 10.18699/SSMJ20220604

# The Keap1/Nrf2/ARE system activators do not increase cardiac resistance to long-term ischemia/reperfusion

P.M. Kozhin<sup>1</sup>, A.S. Sementsov<sup>2</sup>, S.E. Khrapov<sup>1</sup>, M.V. Khrapova<sup>1</sup>, L.P. Romakh<sup>1</sup>,  
N.V. Kandalintseva<sup>3</sup>, E.B. Menshchikova<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Cardiology Research Institute of Tomsk National Research Medical Center RAS  
634012, Tomsk, Kievskaya str., 111A

<sup>3</sup> Novosibirsk State Pedagogical University  
630126, Novosibirsk, Vilyuiskaya str., 28

## Abstract

Oxidative stress is an important mechanism of myocardial damage during ischemia/reperfusion. To investigate the possibility of restoring the redox balance using “indirect” antioxidant effects, the cardioprotective effect Keap1/Nrf2/ARE system inducers was studied in long-term ischemia/reperfusion *in vivo*. **Material and methods.** We used the original synthetic hydrophilic monophenol sodium 3-(3'-*tert*-butyl-4'-hydroxyphenyl)propyl thiosulfonate (TS-13) and reference drug *tert*-butylhydroquinone (tBHQ). Male Wistar rats received 100 mg/kg of TS-13 solution (with drinking water) or tBHQ (intraperitoneally) daily for 7 days. Animals of the comparison groups received the corresponding solvents. Local ischemia (45 min, occlusion of the left coronary artery) and reperfusion (120 min) of the heart were simulated *in vivo* 1 day after last drug administration. The ECG was recorded during ischemia and reperfusion; at the end of reperfusion, the heart was removed, the zone of hypoperfusion and the zone of necrosis were detected. Changes in the expression of the mRNA of *Nfe2l2*, *Nqo1*, *Hmox1*, *Gstp1*, *Rela*, and *Nfkb2* gene in myocardial tissue were determined by real-time TaqMan PCR. **Results and discussion.** Pretreatment with TS-13 and tBHQ did not influence the infarct size and the incidence of ventricular arrhythmias. Preliminary administration of tBHQ did not change the genes expression of the studied in myocardial tissue after prolonged I/R. TS-13 administration was accompanied by an increase in the content of the transcripts of the gene that encodes Nrf2 (by 7.64 times) and Nrf2-driven genes *Nqo1* (by 6.46 times) and *Hmox1* (by 3.63 times); the expression of the *Gstp1*, *Rela*, and *Nfkb2* genes did not differ from the corresponding values of the control group; compared to animals treated with tBHQ, the expression of the *Nfe2l2*, *Nqo1*, *Hmox1*, *Rela*, and *Nfkb2* genes was 16.23, 4.44, 2.68, 3.17, and 2.64 times higher, respectively. The results obtained cast doubt on the therapeutic importance of the induction of the Keap1/Nrf2/ARE system during prolonged heart ischemia/reperfusion.

**Key words:** ischemia, reperfusion, myocardial injury, reactive oxygen species, antioxidants, Keap1/Nrf2/ARE signaling system.

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

**Financing.** The study was carried out according to the State task (state registration number AAAA-A20-120013090021-1).

**Acknowledgements.** The work was performed using the equipment of the CCU “Modern Optical Systems” and “Proteomic Analysis”, supported by funding from the Russian Ministry of Education and Science (agreement No. 075-15-2021-691).

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

**Citation:** Kozhin P.M., Sementsov A.S., Khrapov S.E., Khrapova M.V., Romakh L.P., Kandalintseva N.V., Menshchikova E.B. The Keap1/Nrf2/ARE system activators do not increase cardiac resistance to long-term ischemia/reperfusion. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal* = *Siberian Scientific Medical Journal*. 2022;42(6):35–44. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20220604

## Введение

Одной из главных причин смертности взрослого трудоспособного населения являются сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ); так, в России по данным Росстата в 2020 г. 938 536 из 2 138 586 человек умерли вследствие болезней системы кровообращения (коды МКБ-10 I00–I99). При этом наибольшая летальность из всех ССЗ приходится

на ишемическую болезнь сердца. Несмотря на усилия, предпринимаемые на всех уровнях, за последние 20 лет она практически не изменилась: общий коэффициент смертности от ССЗ в мире в 2000 и 2019 гг. составлял соответственно 232,6 и 231,7 на 100 000 населения (данные ВОЗ). Таким образом, поиск новых средств терапии и профилактики болезней системы кровообращения чрез-

вычайно актуален. В свое время значительным стимулом к применению с этой целью антиоксидантов стала признанная многими специалистами свободнорадикальная теория атеросклероза, согласно которой в основе его этиопатогенеза лежит модификация липопротеинов низкой плотности активированными кислородными метаболитами (АКМ) [1, 2]. В конце XX в. выполнено несколько клинических трайлов, включавших десятки тысяч людей, с целью исследования возможности профилактики ССЗ с помощью антиоксидантных витаминов ( $\alpha$ -токоферол, аскорбиновая кислота,  $\beta$ -каротин, ликопин, флавоноиды) [3, 4]. Однако такой прямолинейный подход не принес желаемого успеха в борьбе с атеросклерозом и ССЗ, в том числе в связи с тем, что АКМ являются важнейшими регуляторами тонуса сосудов и обменных процессов в организме [5].

Для успешного использования антиоксидантов в качестве вспомогательного средства лечения ССЗ необходимо понимать смысл существующих ограничений, соблюдать ряд условий, к числу наиболее важных можно отнести специализированный отбор включенных в исследование лиц [4, 6], и рассматривать возможность и эффективность «непрямых» антиоксидантных воздействий, в том числе на редокс-чувствительную сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE, регулирующую уровень эндогенных внутриклеточных антиоксидантов. Действительно, многие природные и синтетические активаторы системы Keap1/Nrf2/ARE обладают цитопротективным, кардио-защитным и инфаркт-лимитирующим эффектом, который прямо не связан с их непосредственной антиоксидантной активностью [7–10], при этом высказывается мнение, что антиоксиданты или их метаболиты целесообразно использовать скорее для профилактики, нежели для терапии ССЗ [3].

Работ, посвященных защитному действию индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE при моделировании ССЗ *in vitro* и *in vivo*, довольно много – это и сердечная недостаточность (повреждение кардиомиоцитов, индуцированное гипоксией или  $H_2O_2$ ; индуцированная цитостатиками кардиотоксичность; стеноз аорты или левой коронарной артерии; дисфункция, индуцированная высокожировой диетой, гипобарической гипоксией, эндотоксемией); диабетическая кардиомиопатия (диабет, индуцированный конечными продуктами неферментативного гликирования или стрептозотоцином); инфаркт миокарда (ишемия/реперфузия); гипертрофия сердца (индуцированная ангиотензином II или стенозом аорты, левой коронарной артерии или брюшной аорты) [9, 11–13]. Однако «луч надежды» [13] может оказать-

ся «ложной надеждой» [4]. Так, в экспериментальных исследованиях показано, что у мышей, дефицитных по аро Е и Nrf2 (двойные нокауты аро  $E^{-/-}Nrf2^{-/-}$ ), выраженность атеросклеротических изменений не только не увеличена, но даже снижена [14]. Поэтому вопрос применения регуляторов системы Keap1/Nrf2/ARE при ССЗ во многом остается открытым.

Цель исследования – изучить потенциальный кардиопротективный эффект индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE при моделировании длительной ишемии/реперфузии *in vivo*.

## Материал и методы

Оригинальный гидрофильный монозамещенный фенол 3-(3'-*трет*-бутил-4'-гидроксифенил) пропилтиосульфат натрия (ТС-13) синтезирован из 2,6-ди-*трет*-бутилфенола по последовательности превращений, описанной ранее [15, 16], его строение подтверждали данными элементного анализа, ЯМР-, ИК- и УФ-спектроскопии; в качестве препарата сравнения использовали прототипический индуктор системы Keap1/Nrf2/ARE, монозамещенный фенол *трет*-бутилгидрохинон (tBHQ) [17] (рис. 1).

В настоящем исследовании использовали самцов крыс линии Вистар массой 350–380 г. Уход за экспериментальными животными и их содержание в условиях вивария были стандартными и соответствовали требованиям приказов «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев» № 1045-73 от 06.04.1973, а также № 1179 от 10.10.1983 МЗ СССР, № 267 от 19.06.2003 МЗ РФ, «Правилам по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных», утвержденным МЗ СССР (1977) и МЗ РСФСР (1977), принципам Европейской конвенции (Страсбург, 1986) и Хельсинкской декларации всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996).

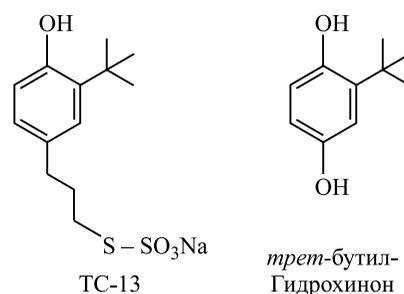


Рис. 1. Строение монофенолов, использованных в настоящем исследовании

Fig. 1. The structure of the monophenols used in the study

Животных случайным образом распределили в 4 группы: 1) К-ТС-13: в течение 7 дней перед выполнением ишемии/реперфузии (И/Р) крысы содержались в стандартных условиях ( $n = 10$ ); 2) К-tВНQ: 20%-й раствор (2-гидроксипропил)- $\beta$ -циклодекстрина (2-ГП- $\beta$ -ЦД) вводили в дозе 100 мг/кг массы тела внутривенно один раз в сутки в одно и то же время в течение 7 дней перед выполнением И/Р ( $n = 10$ ); 3) ТС-13: крысы получали ежедневную дозу 100 мг/кг массы тела ТС-13 с питьевой водой в течение 7 дней перед выполнением И/Р ( $n = 10$ ); 4) tВНQ: tВНQ растворяли в ДМСО, затем в 20%-м растворе 2-ГП- $\beta$ -ЦД и вводили в дозе 100 мг/кг массы тела внутривенно один раз в сутки в одно и то же время в течение 7 дней перед выполнением И/Р ( $n = 11$ ) (рис. 2).

Коронароокклюзию (45 мин) и реперфузию (120 мин) сердца выполняли через 1 сут после последнего приема препаратов [18]. Перед выполнением процедуры коронароокклюзии животные были наркотизированы с помощью  $\alpha$ -хлоралозы (100 мг/кг; Sigma-Aldrich, США) внутривенно. Во время выполнения последующих манипуляций животные находились на искусственной вентиляции атмосферным воздухом (аппарат искусственной вентиляции легких SAR-830 Series Small Animal Ventilator, CWE Inc., США) через интубированную трахею. Грудную клетку вскрывали на уровне V межреберья слева от грудины. Сердце освобождали от перикарда и накладывали лигатуру на левую коронарную артерию в ее верхней трети. Ориентиром для определения места прохождения левой коронарной артерии служила вена, нисходящая вдоль передней перегородки левого желудочка. Контроль наступления ишемии проводился визуально по осветлению

области предполагаемой гипоперфузии и подъему сегмента ST. Реперфузию осуществляли путем освобождения лигатуры, ранее наложенной на левую коронарную артерию, с визуальным контролем возобновления коронарного кровообращения по гиперемии ишемизированной области [19].

Регистрацию ЭКГ осуществляли после стабилизации показателей сердечной деятельности (через 10–15 мин после подключения животного к аппарату искусственной вентиляции легких) по I и II стандартным отведениям путем фиксации электродов на конечностях крысы с помощью усилителя биопотенциалов MP35 (Biopac System Inc., США) в течение 5 мин до коронароокклюзии, в течение всего времени ишемии и во время реперфузии – 10-минутными интервалами, начиная с 1-, 55- и 110-й минуты реперфузии (всего 30 мин) (см. рис. 2). Оценка нарушений сердечного ритма производилась по следующей схеме: 1) множественные желудочковые экстрасистолы (более 16 за 10 мин или 3–4 следующих друг за другом преждевременных сокращения); 2) желудочковая тахикардия (более 4 последовательных желудочковых экстрасистол); 3) желудочковая фибрилляция. Аритмии носили обратимый характер, поэтому у одной крысы обычно регистрировали несколько типов аритмий. Количественную обработку полученных данных осуществляли с помощью программного обеспечения INSTBSL-W (Biopac System Inc.). Коронароокклюзию у крыс всех четырех групп проводили в один день.

По окончании реперфузии сердце извлекали из грудной клетки и промывали через аорту физиологическим раствором с гепарином (в конечной концентрации 125000 МЕ/л). Для выявления

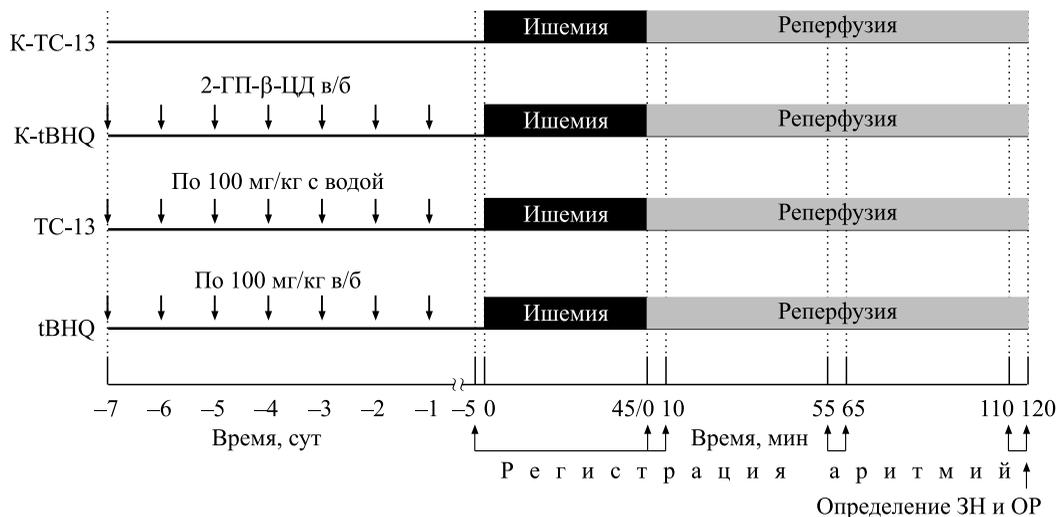


Рис. 2. Дизайн эксперимента  
Fig. 2. Experiment design

зоны гипоперфузии (области риска, ОР) лигатуру, наложенную ранее на левую коронарную артерию, вновь затягивали. Миокард перфузировали через аорту 5%-м раствором перманганата калия, что позволяло выявить ОР, которая перманганатом калия не окрашивалась. После ополаскивания миокарда физиологическим раствором левый желудочек рассекали на срезы толщиной 1 мм перпендикулярно оси сердца, окрашивали 2,3,5-трифенилтетразолия хлоридом (37 °С, 30 минут) для выявления зоны некроза (ЗН) и помещали на 1 сутки в 10%-й раствор нейтрального формалина. Срезы сканировали (Scanjet G2710, HP, США), размер ЗН и ОР определяли планиметрически с помощью прикладной программы ImageJ software (Wayne Rasband, Research Services Branch of the National Institute of Mental Health, NIH). Величину ЗН, выраженную в процентах от размера ОР, использовали для оценивания инфаркт-лимитирующего эффекта введения препаратов.

РНК выделяли с использованием TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию с использованием набора реагентов iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, США) согласно инструкции. Методом TaqMan ПЦР в режиме реального времени на амплификаторе CFX96 (Bio-Rad Laboratories) изучали изменение экспрессии мРНК генов *Nfe2l2*, *Nqo1*, *Hmox1*, *Gstp1*, *Rela*

и *Nfkb2* (табл. 1), кодирующих соответственно Nrf2, NAD(P)H:хиноноксидоредуктазу 1, гемоксигеназу 1, глутатион-S-трансферазу P1, субъединицы p65 и p100 транскрипционного фактора NF-κB. Реакцию амплификации проводили в смеси объемом 20 мкл, содержащей буфер для ПЦР, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ dNTP's, 1,25 е.а. Taq-полимеразы. Амплификацию выполняли согласно следующей программе: 3 мин при 95 °С начальной денатурации, далее 40 циклов: 10 с при 95 °С для денатурации, 20 с при 60 °С для гибридизации праймеров, съём флуоресцентного сигнала, 20 с при 72 °С для элонгации. Экспрессию мРНК генов рассчитывали согласно методу 2<sup>-ΔΔCT</sup> и нормировали относительно референсного гена *Gapdh*. Подобранные пары праймеров и TaqMan-зондов приведены в табл. 1.

Количественные данные на предварительном этапе статистического анализа оценивали на нормальность распределения по критерию Шапиро – Уилка. Непрерывные переменные представлены при нормальном распределении в виде среднего арифметического и ошибки среднего ( $M \pm m$ ), при распределении, отличном от нормального, – в виде медианы и межквартильных интервалов (Me, 25 %; 75 %). Номинальные данные представляли в виде относительных частот объектов исследования ( $n$ , %). Для оценки различий количественных данных использовали критерий Манна – Уитни, для номинальных данных – точный критерий Фишера. Критический уровень

Таблица 1. Подобранные пары прямых (F) и обратных праймеров (R), TaqMan-зондов (Pr)

Table 1. List of forward (F), reverse (R) primer sequences and TaqMan probes (Pr)

Ген	Номер в GenBank	Последовательность праймера
<i>Gapdh</i>	NM_017008.4	F: 5'-TCTGCTCCTCCCTGTTCTA-3' R: 5'-CACCGACSTTACCATCTT-3' Pr: R6G-5'-CAGTGCCAGCCTCGTCTCATAG-3'-Q
<i>Nfe2l2</i>	NM_031789.2	F: 5'-CAAGTTTGGCAGGAGCTATTT-3' R: 5'-CTGTCCATCTCTGTCAGTGT-3' Pr: Fam-5'-AACAAAGCAGCAGGCTGAGACTACC-3'-Q
<i>Nqo1</i>	NM_017000.3	F: 5'-CAGTTCCTTGTATTGGTTTG-3' R: 5'-TGGAAAGCAAGGTCTTCTTATT-3' Pr: Fam-5'-AGGCTGGTTTGAGAGAGTGCTTGT-3'-Q
<i>Hmox1</i>	NM_012580.2	F: 5'-GAGGAACACAAAGACCAGAG-3' R: 5'-TGGGATGAACTAGTGCTGA-3' Pr: Fam-5'-AGACAGAGTTTCTTCGCCAGAGGC-3'-Q
<i>Gstp1</i>	NM_012577.2	F: 5'-TTCGTCTGCGTCTGAGATAC-3' R: 5'-CGAACTGGGAAGTACACAATG-3' Pr: Fam-5'-CAGAGGTGTGGACTCAAAGCTGC-3'-Q
<i>RelA</i>	NM_199267.2	F: 5'-ACCTGGAGCAAGCCATTA-3' R: 5'-GACCGCATTC AAGTCATAGTC-3' Pr: Fam-5'-TTTCAAGTTCCTTCATAGAGGAGCAGCG-3'-Q
<i>Nfkb2</i>	NM_001008349.1	F: 5'-CATCCATGCGGAGAATGAAG-3' R: 5'-CTCGGAAGTTTCTTTGGGTATC-3' Pr: Fam-5'-ACCTCTGGGAGCGATTCAGACTCT-3'-Q

**Таблица 2.** Влияние 7-дневного курсового введения монофенолов на размер инфаркта и частоту возникновения желудочковых аритмий**Table 2.** Effect of monophenol 7-day course administration on infarct size and incidence of ventricular arrhythmias

Показатель	Группа К-ТС-13	Группа К-tBHQ	Группа ТС-13	Группа tBHQ
ЗН/ОР, %, $M \pm m$	48,3±1,6	49,8±2,1	55,3±2,5	47,7±3,6
Наличие аритмий, $n$ (%)				
<b>Ишемия</b>				
без желудочковых экстрасистол	3 (30)	4 (40)	2 (20)	6 (55)
множественные желудочковые экстрасистолы	7 (70)	6 (60)	8 (80)	5 (45)
желудочковая тахикардия	6 (60)	6 (60)	7 (70)	4 (36)
желудочковая фибрилляция	4 (40)	3 (30)	5 (50)	1 (9)
<b>Реперфузия</b>				
без желудочковых экстрасистол	10 (100)	10 (100)	10 (100)	11 (100)
множественные желудочковые экстрасистолы	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
желудочковая тахикардия	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
желудочковая фибрилляция	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)

значимости нулевой статистической гипотезы ( $p$ ) принимали равным 0,05, величину  $0,05 < p < 0,10$  считали тенденцией.

## Результаты

При моделировании 45-минутной ишемии и 120-минутной реперфузии группы животных, получавших ТС-3 и препарат сравнения tBHQ, по величине ЗН и количеству нарушений ритма не отличались от соответствующих контрольных групп (табл. 2).

Предварительное введение животным tBHQ не изменяло экспрессию исследуемых генов в ткани сердца после длительной И/Р (рис. 3). Назначение ТС-13 сопровождалось увеличением содержания транскриптов гена, кодирующего транскрипционный фактор Nrf2, в 7,64 раза (см. рис. 3, а), и подконтрольных ему генов *Nqo1* (в 6,46 раза, см. рис. 3, б) и *Hmox1* (в 3,63 раза, см. рис. 3, в); экспрессия генов *Gstp1*, *Rela* и *Nfkb2* не отличалась от соответствующих величин группы К-ТС-13 (см. рис. 3, г-е). В миокарде крыс группы ТС-13 содержание мРНК генов *Nfe2l2*, *Nqo1*, *Hmox1*, *Rela* и *Nfkb2* было больше, чем у животных группы tBHQ (статистически значимо или на уровне тенденции), соответственно в 16,23; 4,44; 2,68; 3,17 и 2,64 раза.

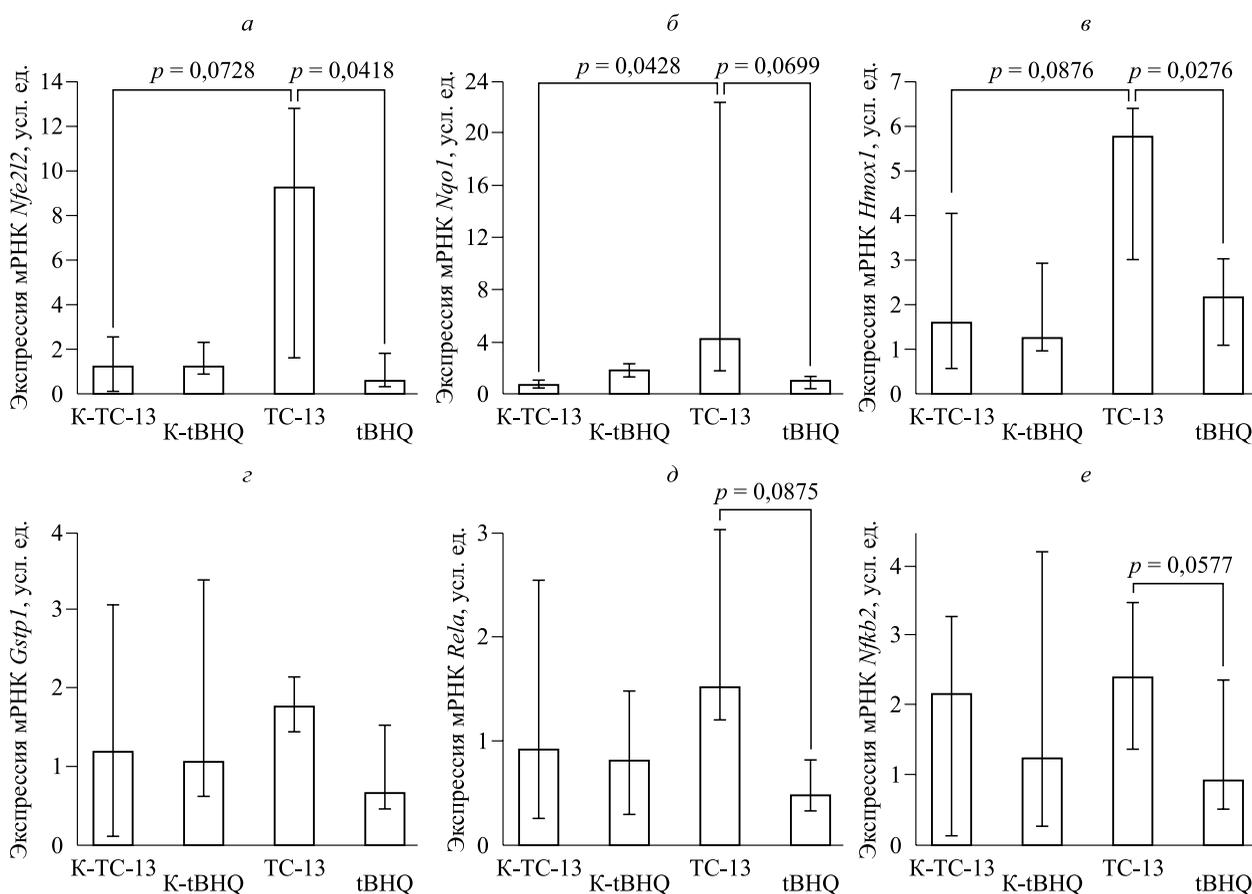
## Обсуждение

При планировании настоящего исследования мы руководствовались рабочей гипотезой о возможности предотвратить или уменьшить пост-ишемическое нарушение функций и структуры

сердца путем индукции системы Keap1/Nrf2/ARE, опираясь на ее универсальность как занимающей центральную роль в регуляции редокс-зависимых, а следовательно, и практически всех других процессов и реакций организма [9, 11, 13].

Система Keap1/Nrf2/ARE находится в динамическом равновесии: в условиях относительного физиологического покоя транскрипционный фактор конститутивно синтезируется и в цитоплазме стабилизируется ингибитором Keap1, способствующим его убиквитинированию и деградации в 26S-протеасомах. В условиях окислительного стресса редокс-чувствительный Keap1 деформируется, давая возможность Nrf2 импортироваться в ядро, где он связывается с *цис*-активирующим элементом ARE (antioxidant responsive element) в составе ДНК и индуцирует синтез мРНК более 500 генов, преимущественно кодирующих белки, которые обеспечивают защиту от окислительного стресса, детоксификацию и цитопротекцию [9, 10]. Nrf2-опосредованные процессы способствуют подавлению воспаления (важного компонента И/Р повреждения), в частности, за счет реципрокных взаимоотношений с NF-κB. В ряде работ продемонстрировано защитное действие индукторов системы Keap1/Nrf2/ARE, в том числе tBHQ, при моделировании И/Р сердца [20], мозга [21], почек [22], легких [23], печени [24].

В многочисленных исследованиях *in vitro* и *in vivo* нами установлено, что ТС-13 обладает способностью индуцировать систему Keap1/Nrf2/ARE: стимулирует транслокацию Nrf2 в ядро (показано на клеточных культурах кератиноцитов человека HaCaT, фибробластов легкого эмбриона человека FLETCH, моноцито/макрофагопо-



**Рис. 3.** Влияние монофенолов на экспрессию в гомогенатах сердца генов, кодирующих *Nrf2*, регулируемые им ферменты и генов воспалительного ответа

**Fig. 3.** Effect of monophenols on the expression of genes encoding *Nrf2*, enzymes regulated by it, and inflammatory response genes in heart homogenates

добных клеток гистиоцитарной саркомы мыши J774, аденокарциномы молочной железы человека MCF-7), повышает экспрессию, содержание и активность ARE-зависимых ферментов (NQO1, глутатионредуктазы, глутатионпероксидазы), усиливает образование комплексов ядерных белков с олигонуклеотидной последовательностью, соответствующей ARE (гель-ретардационный анализ) [25–28].

Мы использовали сервис DIGEP-Pred (<http://www.way2drug.com/ge/>) на основе технологии PASS online (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>), который по структуре соединения позволяет *in silico* прогнозировать его влияние на профиль экспрессии генов. Для TC-13, согласно канонической спецификации SMILES, имеющего формулу  $C=C(C(C=CC=1CCCCSS(O[Na])=O)=O)O)C(C)(C)C$ , установлена высокая вероятность индуцировать ряд генов, в промоторах которых обнаружены функционирующие элементы ARE (табл. 3).

При моделировании 45-минутной ишемии и 120-минутной реперфузии сердца крысы ни TC-

13, ни препарат сравнения tBHQ не оказали значимого антиаритмического и инфаркт-лимитирующего действия. Предварительное назначение животным TC-13 сопровождалось увеличением содержания в миокарде мРНК гена транскрипционного фактора *Nrf2* и регулируемых им генов *Nqo1* и *Hmox1* по сравнению с контролем и с группой tBHQ (статистически значимо или на уровне тенденции). tBHQ не влиял на экспрессию генов *Nfe2l2*, *Nqo1*, *Hmox1*, *Gstp1*, но вызывал некоторое снижение содержания в миокарде мРНК провоспалительных генов *Nfkb2* и *Rela* относительно группы TC-13. Сказанное выше, а также полученные в настоящем исследовании данные, подтверждающие способность TC-13 активировать систему Keap1/Nrf2/ARE, свидетельствуют в пользу предположения, что в данных условиях ее индукция не оказывает защитного эффекта, несмотря на выявленное влияние на экспрессию генов *Nqo1* и *Hmox1*.

В качестве препарата сравнения tBHQ был выбран в силу того, что он обладает схожей с TC-13 структурой, а также известен как индуктор си-

**Таблица 3.** Результаты прогнозирования способности TC-13 индуцировать Nrf2-подконтрольные гены человека**Table 3.** Results of predicting the ability of TS-13 to induce Nrf2-driven human genes

Прогнозирование на основе мРНК			Прогнозирование на основе белка		
Pa	Ген	Кодируемый белок	Pa	Ген	Кодируемый белок
0,829	<i>GCLM</i>	Регуляторная субъединица глутаматцистеинлигазы	0,598	<i>NFE2L2</i>	Nrf2
0,724	<i>NQO1</i>	NAD(P)H:хиноноксидоредуктаза 1	0,569	<i>HMOX1</i>	Гемоксигеназа-1
0,570	<i>ABCA1</i>	АТФ-связывающий кассетный транспортер 1	0,526	<i>TNFRSF1A</i>	Суперсемейства рецепторов TNF член 1A
0,612	<i>ABHD2</i>	2-арахидоноилглицеролгидролаза			
0,579	<i>ALDOA</i>	Альдолаза			
0,562	<i>FTL</i>	Легкая цепь ферритина			
0,509	<i>AKR1B10</i>	Альдозоредуктазного семейства 1 член B10			

**Примечание.** Pa > 0,5 расценивается как высокая вероятность того, что изучаемое соединение принадлежит к подклассу активных соединений); приведены гены, для экспрессии которых доказана зависимость от Nrf2 (кратность усиления > 2) [29].

стемы Keap1/Nrf2/ARE [21, 22, 24]. В то же время показано [30], что tBHQ при аналогичной схеме введения повышает содержание мРНК гена, кодирующего глутатион-S-трансферазу (Nrf2-подконтрольного), но не влияет на экспрессию *Hmox1* и гена каталитической субъединицы глутаматцистеинлигазы, что согласуется с полученными в настоящем исследовании результатами.

Следует также отметить, что наряду с достоинствами выбранного способа имитирования длительной И/Р, к которым относится приближенность к ситуации, наблюдаемой при инфаркте у человека, данная модель не очень удобна для определения антиаритмического эффекта – в частности, реперфузионные аритмии после 45-минутной ишемии возникают крайне редко (что и наблюдается в настоящем исследовании, см. табл. 2).

### Заключение

При моделировании *in vivo* 45-минутной ишемии и 120-минутной реперфузии сердца крысы препарат выбора TC-13 и препарат сравнения tBHQ не оказали значимого защитного действия (антиаритмического и инфаркт-лимитирующего). У животных, в течение 7 дней до И/Р получавших раствор TC-13, в миокарде повышалась экспрессия гена транскрипционного фактора Nrf2 и регулируемых им генов *Nqo1* и *Hmox1* по сравнению с контролем и с группой животных, которым внутривенно вводили tBHQ (статистически значимо или на уровне тенденции). Назначение tBHQ не изменяло экспрессию генов *Nfe2l2*, *Nqo1*, *Hmox1*, *Gstp1*, но вызывало некоторое снижение содержания в миокарде мРНК провоспалительных генов *Nfkb2* и *Rela* относительно крыс, получавших TC-13. Полученные нами ранее и в настоящем исследовании данные, подтверждающие способность TC-13 активировать систему Keap1/Nrf2/ARE, свидетельствуют в пользу предположения, что при моделировании длительной И/Р сердца у крыс *in vivo* ее индукция не оказывает защитного эффекта.

Список литературы / References

### Список литературы / References

1. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Свободнорадикальные процессы при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. *Кардиология*. 2000;40(7):48–61.
2. Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Belenkov Yu.N. Free radical processes in diseases of the cardiovascular system. *Kardiologiya = Cardiology*. 2000;40(7):48–61. [In Russian].
3. Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J. Biol. Chem.* 1997;272(34):20963–20966.
4. Shah A.K., Dhalla N.S. Effectiveness of some vitamins in the prevention of cardiovascular disease: a narrative review. *Front. Physiol.* 2021;12:729255. doi: 10.3389/fphys.2021.729255
5. Goszcz K., Deakin S.J., Duthie G.G., Stewart D., Leslie S.J., Megson I.L. Antioxidants in cardiovascular therapy: Panacea or false hope? *Front. Cardiovasc. Med.* 2015;2:29. doi: 10.3389/fcvm.2015.00029
6. Krylatov A.V., Maslov L.N., Voronkov N.S., Boshchenko A.A., Popov S.V., Gomez L., Wang H., Jaggi A.S., Downey J.M. Reactive oxygen species as intracellular signaling molecules in the cardiovascular system. *Curr. Cardiol. Rev.* 2018;14(4):290–300. doi: 10.2174/1573403X14666180702152436

6. Ланкин В.З., Тихазе А.К., Беленков Ю.Н. Антиоксиданты в комплексной терапии атеросклероза: pro et contra. *Кардиология*. 2004;(2):72–81.
7. Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Belenkov Yu.N. Antioxidants in complex therapy of atherosclerosis: pro et contra. *Kardiologiya = Cardiology*. 2004;(2):72–81. [In Russian].
8. Wang W., Kang P.M. Oxidative stress and antioxidant treatments in cardiovascular diseases. *Antioxidants (Basel)*. 2020;9(12):1292. doi: 10.3390/antiox9121292
9. Jayakumar D., Narasimhan K.K.S., Perianthavan K. Triad role of hepcidin, ferroportin, and Nrf2 in cardiac iron metabolism: From health to disease. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2021;69:126882. doi: 10.1016/j.jtemb.2021.126882
10. Shen Y., Liu X., Shi J., Wu X. Involvement of Nrf2 in myocardial ischemia and reperfusion injury. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019;125:496–502. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.190
11. Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Tkachev V.O. Keap1/Nrf2/ARE redox-sensitive signaling system as a pharmacological target. *Biochemistry (Mosc.)*. 2013;78(1):19–36. doi: 10.1134/S0006297913010033
12. Chen Q.M. Nrf2 for cardiac protection: pharmacological options against oxidative stress. *Trends Pharmacol. Sci.* 2021;42(9):729–744. doi: 10.1016/j.tips.2021.06.005
13. Ucar B.I., Ucar G., Saha S., Buttari B., Profumo E., Saso L. Pharmacological protection against ischemia-reperfusion injury by regulating the Nrf2-Keap1-ARE signaling pathway. *Antioxidants (Basel)*. 2021;10(6):823. doi: 10.3390/antiox10060823
14. Vashi R., Patel B.M. NRF2 in cardiovascular diseases: a ray of hope! *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 2021;14(3):573–586. doi: 10.1007/s12265-020-10083-8
15. Sussan T.E., Jun J., Thimmulappa R., Bedja D., Antero M., Gabrielson K.L., Polotsky V.Y., Biswal S. Disruption of Nrf2, a key inducer of antioxidant defenses, attenuates ApoE-mediated atherosclerosis in mice. *PLoS ONE*. 2008;3(11):e3791. doi: 10.1371/journal.pone.0003791
16. Oleynik A.S., Kuprina T.S., Pevneva N.Y., Markov A.F., Kandalintseva N.V., Prosenko A.E., Grigoriev I.A. Synthesis and antioxidant properties of sodium S-[3-(hydroxyaryl)propyl] thiosulfates and [3-(hydroxyaryl)propane]-1-sulfonates. *Rus. Chem. Bull.* 2007;58(6):1135–1143. doi: 10.1007/s11172-007-0172-3
17. 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. ж.* 2018;38(1):22–31. doi: 10.15372/SSMJ20180104
18. Gaynutdinov P.I., Kozhin P.M., Chechushkov A.V., Martinovich G.G., Kholshin S.V., Kandalintseva N.V., Zenkov N.K., Menshchikova E.B. Inverse relationship between the antioxidant activity of structurally related synthetic monophenols and their toxicity in tumor cells. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2018;38(1):22–31. [In Russian]. doi: 10.15372/SSMJ20180104
19. Guha S., Roy S. Enhanced expression of SLC4A11 by tert-Butylhydroquinone is mediated by direct binding of Nrf2 to the promoter of SLC4A11. *Free Radic. Biol. Med.* 2021;167:299–306. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2021.03.006
20. Maslov L.N., Mukhomedzyanov A.V., Tsibulnikov S.Y., Suleiman M.S., Khaliulin I., Oeltgen P.R. Activation of peripheral delta2-opioid receptor prevents reperfusion heart injury. *Eur. J. Pharmacol.* 2021;907:174302. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174302
21. Neckar J., Ostadal B., Kolar F. Myocardial infarct size-limiting effect of chronic hypoxia persists for five weeks of normoxic recovery. *Physiol. Res.* 2004;53(6):621–628.
22. Xiao C., Xia M.L., Wang J., Zhou X.R., Lou Y.Y., Tang L.H., Zhang F.J., Yang J.T., Qian L.B. Luteolin attenuates cardiac ischemia/reperfusion injury in diabetic rats by modulating Nrf2 antioxidative function. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019;2019:2719252. doi: 10.1155/2019/2719252
23. Chen Y., Zhang X., Yang Y., Zhang L., Cui L., Zhang C., Chen R., Xie Y., He J., He W. Tert-butylhydroquinone enhanced angiogenesis and astrocyte activation by activating nuclear factor-E2-related factor 2/heme oxygenase-1 after focal cerebral ischemia in mice. *Microvasc. Res.* 2019;126:103891. doi: 10.1016/j.mvr.2019.103891
24. Guerrero-Beltran C.E., Tapia E., Sanchez-Gonzalez D.J., Martinez-Martinez C.M., Cristobal-Garcia M., Pedraza-Chaverri J. Tert-Butylhydroquinone pretreatment protects kidney from ischemia-reperfusion injury. *J. Nephrol.* 2012;25(1):84–89. doi: 10.5301/JN.2011.8345
25. Fei L., Jingyuan X., Fangte L., Huijun D., Liu Y., Ren J., Jinyuan L., Linghui P. Preconditioning with rHMGB1 ameliorates lung ischemia-reperfusion injury by inhibiting alveolar macrophage pyroptosis via the Keap1/Nrf2/HO-1 signaling pathway. *J. Transl. Med.* 2020;18(1):301. doi: 10.1186/s12967-020-02467-w
26. Zeng X.P., Li X.J., Zhang Q.Y., Liu Q.W., Li L., Xiong Y., He C.X., Wang Y.F., Ye Q.F. Tert-Butylhydroquinone protects liver against ischemia/reperfusion injury in rats through Nrf2-activating anti-oxidative activity. *Transplant. Proc.* 2017;49(2):366–372. doi: 10.1016/j.transproceed.2016.12.008
27. Zenkov N.K., Menshchikova E.B., Kandalintseva N.V., Oleynik A.S., Prosenko A.E., Gusachenko O.N., Shklyaeva O.A., Vavilin V.A., Lyakhovich V.V. Antioxidant and antiinflammatory activity of new wa-

ter-soluble sulfur-containing phenolic compounds. *Biochemistry (Mosc.)*. 2007;72(6):644–651. doi: 10.1134/S0006297907060077

26. Menshchikova E., Tkachev V., Lemza A., Sharkova 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

27. 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 Tissue Biol.* 2019;13(2):85–92. doi: 10.1134/S1990519X1902007X

28. Menshchikova E.B., Kozhin P.M., Chechushkov A.V., Khrapova M.V., Zenkov N.K. The oral deliv-

ery of water-soluble phenol TS-13 ameliorates granuloma formation in an *in vivo* model of tuberculous granulomatous inflammation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021;2021:6652775. doi: 10.1155/2021/6652775

29. Lacher S.E., Lee J.S., Wang X., Campbell M.R., Bell D.A., Slattery M. Beyond antioxidant genes in the ancient Nrf2 regulatory network. *Free Radic. Biol. Med.* 2015;88(Pt. B):452–465. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.044

30. Silva-Palacios A., Ostolga-Chavarria M., Buelna-Chontal M., Garibay C., Hernandez-Resendiz S., Roldan F.J., Flores P.L., Luna-Lopez A., Konigsberg M., Zazueta C. 3-NP-induced Huntington's-like disease impairs Nrf2 activation without loss of cardiac function in aged rats. *Exp. Gerontol.* 2017;96:89–98. doi: 10.1016/j.exger.2017.06.009

#### Сведения об авторах:

**Пётр Михайлович Кожин**, к.м.н., ORCID: 0000-0002-9989-9778, e-mail: kozhinpm@gmail.com

**Андрей Сергеевич Семенов**, ORCID: 0000-0002-6991-4930, e-mail: hamkot@sibmail.com

**Семен Евгеньевич Храпов**, e-mail: semen.hrapov@gmail.com

**Марина Валерьевна Храпова**, к.б.н., ORCID: 0000-0003-3397-8067, e-mail: khrapova@centercem.ru

**Лидия Петровна Ромаха**, e-mail: lpromakh@centercem.ru

**Наталья Валерьевна Кандалиничева**, д.х.н., ORCID: 0000-0001-6022-934X, e-mail: aquaphenol@mail.ru

**Елена Брониславовна Меньщикова**, д.м.н., ORCID: 0000-0003-2367-0114, e-mail: lemen@centercem.ru

#### Information about the authors:

**Peter M. Kozhin**, candidate of medical sciences, ORCID: 0000-0002-9989-9778, e-mail: kozhinpm@gmail.com

**Andrey S. Sementsov**, ORCID: 0000-0002-6991-4930, e-mail: hamkot@sibmail.com

**Semen E. Khrapov**, e-mail: semen.hrapov@gmail.com

**Marina V. Khrapova**, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0003-3397-8067,

e-mail: khrapova@centercem.ru

**Lidia P. Romakh**, e-mail: lpromakh@centercem.ru

**Natalya V. Kandalintseva**, doctor of chemical sciences, ORCID: 0000-0001-6022-934X, e-mail: aquaphenol@mail.ru

**Elena B. Menshchikova**, doctor of medical sciences, ORCID: 0000-0003-2367-0114, e-mail: lemen@centercem.ru

Поступила в редакцию 20.09.2022

Принята к публикации 14.10.2022

Received 20.09.2022

Accepted 14.10.2022