КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ И ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СРЕДСТВА

УДК 57.053

П.М. Кожин [1], Н.К. Зенков [1], А.В. Чечушков [1], Н.С. Зайцева [1], Н.В. Кандалинцева [2], Е.Б. Меньщикова [1]

РЕДОКС-ЧУВСТВИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА АНТИОКСИДАНТ-РЕСПОНСИВНОГО ЭЛЕМЕНТА КАК НОВАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗА

[1] *ФГБНУ* «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины», Новосибирск, Россия
[2] ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет», Новосибирск, Россия

На модели микобактериального гранулематозного воспаления in vitro исследовано влияние индукции редокс-чувствительной сигнальной системы антиоксидант-респонсивного элемента Keap1/Nrf2/ARE на динамику образования гранулём. Обнаружено, что активация системы Keap1/Nrf2/ARE приводит к ускорению процессов образования гранулём, которые затем сменяются процессами их диссоциации, что позволяет рассматривать систему Keap1/Nrf2/ARE как новую терапевтическую мишень в терапии туберкулеза.

Ключевые слова: гранулематозное воспаление, туберкулез, макрофаги, система Keap1/Nrf2/ARE, TC-13

REDOX-SENSITIVE SYSTEM OF THE ANTIOXIDANT-RESPONSIVE ELEMENT AS A NEW TARGET FOR TUBERCULOSIS TREATMENT

P.M. Kozhin [1], N.K. Zenkov [1], A.V. Chechushkov [1], N.S. Zaytseva [1], N.V. Kandalintseva [2], E.B. Menshchikova [1]

[1] Research Institute of Experimental and Clinical Medicine, Novosibirsk, Russia
[2] Novosibirsk State Pedagogical University, Novosibirsk, Russia

The emergence of drug-resistant TB caused by resistance to antibiotic strains of bacteria, prompted to search for new "organism-oriented" ("host-targeted") adjuvant treatment strategies. Free radical oxidation plays an important role in the development and exacerbation of the pathological process. The main system of cell protection from oxidative stress is the redox-sensitive signaling system of the antioxidant-responsive element of the Keap1/Nrf2/ARE, which includes the transcription factor Nrf2, which is under constant control of a repressor protein Keap1. Nrf2 regulates the expression of genes containing the antioxidant-responsive element ARE in their promoters, Keap1 is a kind of molecular "sensor" of modifications in the intracellular homeostasis. The inextricable link between these molecular structures allows combining them into a single redox-sensitive signaling system Keap1/Nrf2/ARE. Nrf2 modulates resistance of the organism to various infections: activation of Nrf2 prevents the penetration and replication of influenza A virus, contributes to resistance to various bacterial agents (Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa). The aim of this work was to study the influence of induction system Keap1/Nrf2/ARE on the formation of mycobacterial granulomas in vitro. In vitro model was used to study effect of induction of the redox-sensitive signaling system Keap1/Nrf2/ARE in time course of granuloma formation. It was found that the activation of Keap1/Nrf2/ARE system led to acceleration of granuloma formation, which was then replaced by the dissociation process. These data allowed us to consider Keap1/Nrf2/ARE system as a new therapeutic target in the tuberculosis treatment.

Key words: granulomatous inflammation, tuberculosis, macrophages, Keap1/Nrf2/ARE system, TS-13

ВВЕДЕНИЕ

Появление лекарственно устойчивых форм туберкулеза, вызванных резистентными к антибиотикам штаммами микобактерий, заставило начать поиск новых «организм-ориентированных» («host-targeted») адъювантных стратегий лечения [10, 13] и вспомнить о патогенетических средствах, влияющих на иммунный статус и обладающих защитным действием, включая направление репрограммирования макрофагов в области туберкулезной гранулёмы с помощью цитокинов, иммуномодуляторов, а также воздействий на определенные сигнальные системы и факторы транскрипции: NF-κB, PPARγ и Nrf2 [6, 11, 12].

Окислительный стресс является важным атрибутом воспалительных процессов и играет существенную роль в патогенезе многих заболеваний [9]. Главной системой защиты клеток от окислительного стресса служит редокс-чувствительная сигнальная система антиоксидант-респонсивного элемента Keap1/Nrf2/ARE, которая включает фактор транскрипции Nrf2, находящийся под постоянным контролем репрессорного белка Keap1 [1]. Nrf2 регулирует экспрессию генов, содержащих в своих промоторах антиоксидант-респонсивный элемент ARE. Keap1 является своеобразным молекулярным «сенсором» изменения внутриклеточного гомеостаза. Неразрывная связь этих молекулярных структур позволяет

объединить их в единую редокс-чувствительную сигнальную систему Keap1/Nrf2/ARE, главным назначением которой является поддержание внутреннего гомеостаза при различных стрессовых воздействиях. Известна роль Nrf2 в модуляции резистентности организма к различным инфекциям: активация Nrf2 препятствует проникновению и репликации вируса гриппа А, способствует повышению резистентности к различным бактериальным агентам (*Salmonella typhimurium, Pseudomonas aeruginosa) [5]*.

Ранее нами показано, что воздействие индуктора редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE ТС-13 (3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил) пропилтиосульфонат натрия) сопровождается снижением численной плотности и диаметра гранулём в печени мышей в модели микобактериального гранулематозного воспаления *in vivo* [3]. При этом ТС-13 *in vitro* действует синергично со стимуляторами классической активации макрофагов, приводя к увеличению продукции бактерицидных факторов и экспрессии костимулирующих молекул перитонеальными макрофагами [2]. Остается неясным, является ли наблюдаемое угнетение гранулём в экспериментах *in vivo* следствием подавления их образования или разрешением воспалительного процесса с диссоциацией гранулём. Исходя из этого целью работы было изучение влияния индукции системы Keap1/Nrf2/ARE на формирование микобактериальных гранулём *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Водорастворимый фенольный антиоксидант 3-(3'-трет-бутил-4'-гидроксифенил)-пропилтиосульфонат натрия (ТС-13) синтезирован в НИИ химии антиоксидантов (Новосибирск, Россия) [4].

In vitro БЦЖ-гранулёмы моделировали описанным ранее способом [8]. С этой целью получали мононуклеары человека из донорской крови, предоставленной ГБУЗ НСО «Новосибирский центр крови» путем центрифугирования в градиенте фиколла плотностью 1,077 кг/л. Смесь моноцитов и лимфоцитов в концентрации 1 млн клеток на 1 мл инкубировали в 12-луночных планшетах в полной питательной среде RPMI с добавлением микобактерий БЦЖ в соотношении 0,5 бактерий на 1 клетку и, в зависимости от цели эксперимента, ТС-13 (5, 20 или 100 мкМ совместно с микобактериями БЦЖ) на протяжении 7 дней. Образование клеточных агрегатов определяли в течение первых суток с помощью оптической системы Cell-IQ (Chip Man, США, ФИЦ «Институт цитологии и генетики» СО РАН) и на 1-й, 4-й и 7-й день с применением световой микроскопии. Для анализа полученных изображений использовали программу ImageJ (National Institutes of Health (NIH), США), определяли количество гранулём в поле зрения, их площадь и занимаемую площадь (отношение суммарной площади гранулём к площади поля). Для исследования захвата микобактерий БЦЖ клетки в области адгезии гранулём окрашивались акридином оранжевым и анализировались на конфокальном микроскопе LSM710 (Carl Zeiss, Германия).

Данные представлены в виде среднего (*M*) и стандартной ошибки среднего (*m*). Межгрупповые различия оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Фишера и считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате сокультивирования мононуклеаров периферической крови человека с микобактериями БЦЖ инициация гранулемообразования происходит достаточно быстро. Образование гранулемоподобных скоплений клеток (ранние *in vitro* гранулёмы) наблюдается уже в течение нескольких часов. В первые сутки образуется 20–40 гранулём на лунку, их поперечный размер составляет около 50 мкм (табл. 1), «ядро», состоящее из плотно прилегающих друг к другу макрофагов, окружено лимфоцитами. При исследовании с помощью лазерной сканирующей конфокальной микроскопии в макрофагальных клетках «ядра» определяются захваченные микобактерии БЦЖ. Одним из главных атрибутов гранулём являются гигантские многоядерные клетки (ГМК). При инкубировании мононуклеаров периферической крови с микобактерией БЦЖ появление ГМК отмечается уже на 4-е сутки. При последующем культивировании на 10-е сутки наблюдается слияние ранних *in vitro* гранулём с образованием более крупных конгломератов. На этом этапе *in vitro* гранулёмы имеют форму, близкую к округлой, и достигают 1 мм в диаметре.

На протяжении 1–7 суток наблюдается постепенное увеличение количества гранулём и занимаемой ими площади (отношение суммарной площади гранулём к площади поля) (табл. 1). При этом средняя площадь гранулём на 4-е сутки увеличивается (гранулёмы укрупняются), но на 7-е сутки несколько снижается, что может происходить вследствие образования новых мелких гранулём (табл. 1).

Под воздействием ТС-13 на 1-е и 4-е сутки наблюдалось значимое увеличение количества гранулём, по сравнению с клетками, культивируемыми только в присутствии БЦЖ (табл. 1), при этом возрастала их площадь и занимаемая площадь (отношение суммарной площади гранулём к площади поля) (табл. 1). Однако на 7-е сутки воздействие ТС-13 в дозах 5 и 20 мкМ приводило к снижению (5 мкМ) или отсутствию увеличения (20 мкМ) количества гранулём (табл. 1), при этом уменьшалась как занимаемая гранулёмами площадь, так и их средняя площадь (табл. 1). Динамика гранулемогенеза под воздействием ТС-13 в дозе 100 мкМ была такой же, как в контроле, но более выраженной: гранулём образовывалось больше, они имели бóльшую площадь (как индивидуальную, так и суммарную). Наблюдаемые изменения демонстрируют, что под воздействием ТС-13 в дозировках 5 и 20 мкМ процесс гранулёмообразования происходит быстрее, чем в контроле, с образованием большего количества гранулём и большего их размера, и уже к 7-м суткам гранулемогенез сменяется на процесс диссоциации гранулём.

Ускорение процессов гранулемогенеза может быть следствием увеличения фагоцитарной активности макрофагов при активации редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE. Ранее показано уменьшение бактериальной нагрузки

Таблица 1

Динамика формирования микобактериальных in vitro гранулём

Группа	Количество гранулём			Площадь гранулём, отн. ед. [1]			Занимаемая гранулёмами площадь, %		
	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки
БЦЖ	22,7 ± 2,8	35,6 ± 2,3	53,8 ± 4,6*	1,00 ± 0,04	1,21 ± 0,05*	1,12 ± 0,06	1,68 ± 0,24	3,22 ± 0,28	4,50 ± 0,52*
БЦЖ + ТС-13, 5 мкМ	36,5 ± 6#	62,2 ± 4,8*,#	50,3 ± 4,9	1,04 ± 0,04	1,29 ± 0,05*	1,17 ± 0,07	2,83 ± 0,52#	5,94 ± 0,62*,#	4,35 ± 0,51
БЦЖ + ТС-13, 20 мкМ	35,3 ± 5,2	43,7 ± 2,6#	47,5 ± 3,8*	0,92 ± 0,04#	1,38 ± 0,05*	1,17 ± 0,08*	2,40 ± 0,40	4,47 ± 0,42*,#	4,13 ± 0,39*
БЦЖ + ТС-13, 100 мкМ	37 ± 3,5#	48,3 ± 3,3#	72,7 ± 5,4*,#	0,97 ± 0,04	1,31 ± 0,06*	1,28 ± 0,08*	2,65 ± 0,32	4,70 ± 0,48#	6,90 ± 0,82*,#

Примечание. [1] – величины нормализованы на контроль; * – отличие от величины показателя на 1-е сутки статистически значимо при $p < 0,05$; # – отличие от величины показателя в группе БЦЖ статистически значимо при $p < 0,05$.

Pseudomonas aeruginosa при фармакологической активации Nrf2 с помощью сульфорафана в *in vivo* экспериментах на мышах [5] за счет повышения фагоцитарной активности макрофагов. Авторы связывают такой эффект с Nrf2-зависимым увеличением экспрессии скавенджер-рецептора MARCO и усилением захвата бактерий макрофагами. Схожий эффект наблюдается в отношении возбудителя малярии: индукторы Nrf2 приводили к повышению экспрессии скавенджер-рецептора CD36 и к усилению захвата паразита макрофагами [7].

Таким образом, воздействие индуктора редокс-чувствительной сигнальной системы антиоксидант-респонсивного элемента Keap1/Nrf2/ARE ТС-13 приводит к высокому уровню образования гранулём *in vitro* на ранних сроках, что затем сменяется процессами их диссоциации. Полученные результаты показывают, что наблюдаемое нами ранее снижение количества гранулём в экспериментах *in vivo* [3] происходит за счет процессов диссоциации гранулём, а не за счет подавления гранулемообразования. Такой эффект достигается в результате увеличения активности и бактерицидных свойств макрофагов при индукции сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE [2]. Полученные данные позволяют утверждать, что система Keap1/Nrf2/ARE может служить эффективной фармакологической мишенью при терапии туберкулеза.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы» НИИЭКМ, при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №№ 16-34-00898, 14-04-00551а).

ЛИТЕРАТУРА
REFERENCES

1. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Ткачёв В.О. Редокс-чувствительная сигнальная система Keap1/Nrf 2/ARE как фармакологическая мишень // Биохимия. – 2013. – Т. 78, № 1. – С. 27–47.

Zenkov NK, Menshchikova EB, Tkachyov VO (2013). Keap1/Nrf2/ARE redox-sensitive signaling system as a pharmacological target. [Redoks-chuvstvitel'naya signal'naya sistema Kear1/Nrf 2/ARE kak farmakologicheskaya mishen']. *Biokhimiya,* 78 (1), 27-47.

2. Кожин П.М., Зенков Н.К., Лемза А.Е., Чечушков А.В., Зайцева Н.С., Кандалинцева Н.В., Меньщикова Е.Б. Влияние индукции редокс-чувствительной системы Keap1/Nrf2/ARE на классическую активацию макрофагов // Сибирский научный медицинский журнал. – 2015. – № 6. – С. 37–44.

Kozhin PM, Zenkov NK, Lemza AE, Chechushkov AV, Zaytseva NS, Kandalintseva NV, Menshchikova EB (2015). Influence of redox-sensitive system Keap1 / Nrf2 / ARE induction on classical macrophage activation [Vliyanie induktsii redoks-chuvstvitel'noy sistemy Keap1/Nrf2/ARE na klassicheskuyu aktivatsiyu makrofagov]. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*, 35 (6), 37-44.

3. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Чечушков А.В., Кожин П.М., Черданцева Л.А., Шаркова Т.В., Потапова О.В., Любимов Г.Ю., Любимова Г.А., Ягунов С.Е. Участие активированных кислородных метаболитов и редокс-чувствительной сигнальной системы Keap1/Nrf2/ARE в развитии гранулематозного воспаления // Сибирский научный медицинский журнал. – 2015. – № 2. – С. 32–36.

Menshchikova EB, Zenkov NK, Chechushkov AV, Kozhin PM, Cherdantseva LA, Sharkova TV, Potapova OV, Lyubimov GY, Lyubimova GA, Yagunov SE (2015). Participation of activated oxygen metabolites and redox-sensitive signaling system Keap1 / Nrf2 / ARE in the development of granulomatous inflammation [Uchastie aktivirovannykh kislorodnykh metabolitov i redoks-chuvstvitel'noy signal'noy sistemy Keap1/Nrf2/ARE v razvitii granulematoznogo vospaleniya]. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal*, 35 (2), 32-36.

4. Просенко А.Е., Клепикова С.Ю., Кандалинцева Н.В., Дюбченко О.И., Душкин М.И., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Синтез и исследование антиоксидантных свойств новых водорастворимых серосодержащих фенольных соединений // Бюлл. ВСНЦ СО РАМН. – 2001. – № 1. – С. 114–126.

Prosenko AE, Klepikova SY, Kandalintseva NV, Dyubchenko OI, Dushkin MI, Zenkov NK, Menshchikova EB (2001). Synthesis and study of antioxidant properties of new water-soluble sulfur-containing phenolic compounds [Sintez i issledovanie antioksidantnykh svoystv novykh vodorastvorimykh serosoderzhashchikh fenol'nykh soedineniy]. *Bulleten' Vostocno-Sibirskogo naucnogo centra*, (1), 114-126.

5. Harvey CJ, Thimmulappa RK, Sethi S (2011). Targeting Nrf2 signaling improves bacterial clearance by alveolar macrophages in patients with COPD and in a mouse model. *Sci. Transl. Med.*, 3 (78), 78ra32.

6. Lyamina SV, Kruglov SV, Vedenikin TY, Borodovitsyna OA, Suvorova IA, Shimshelashvili ShL, Malyshev IY (2012). Alternative reprogramming of M1/M2 phenotype

of mouse peritoneal macrophages in vitro with interferon-γ and interleukin-4. *Bull. Exp. Biol. Med*., 152 (4), 548-551.

7. Olagnier D, Lavergne RA, Meunier E, Lefevre L, Dardenne C, Aubouy A, Pipy B (2011). Nrf2, a PPARγ alternative pathway to promote CD36 expression on inflammatory macrophages: implication for malaria. *PLoS Pathog.*, 7 (9), e1002254.

8. Puissegur MP, Botanch C, Duteyrat JL, Delsol G, Caratero C, Altare F (2004). An *in vitro* dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interactions between mycobacteria and human host cells. *Cellular microbiology*, 6 (5), 423-433.

9. Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasaiah U, Nishigaki I (2014). Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*, 436, 332-347.

10. Schwegmann A, Brombacher F (2008). Host-directed drug targeting of factors hijacked by pathogens. *Sci. Signal*., 1 (29), re8.

11. Stefanson AL, Bakovic M (2014). Dietary regulation of Keap1/Nrf2/ARE pathway: focus on plant-derived compounds and trace minerals. *Nutrients,* 6 (9), 3777-3801.

12. Tugal D, Liao X, Jain MK (2013). Transcriptional control of macrophage polarization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*., 33 (6), 1135-1144.

13. Zumla A, Nahid P, Cole ST (2013). Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat. Rev. Drug Discov*., 12 (5), 388-404.

Сведения об авторах
Information about the authors

Кожин Петр Михайлович – научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2; тел.: 8 (383) 333-64-56; e-mail: kozhinpm@centercem.ru)
Kozhin Petr Mikhaylovich – Research Officer of the Laboratory of Molecular Mechanisms of Free-Radical Processes of Research Institute of Experimental and Clinical Medicine (630117, Novosibirsk, Timakov str., 2; tel.: +7 (383) 333-64-56; e-mail: kozhinpm@centercem.ru)

Зенков Николай Константинович – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (e-mail: zenkovnk@mail.ru)
Zenkov Nikolay Konstantinovich – Doctor of Biological Sciences, Leading Research Officer of Research Institute of Experimental and Clinical Medicine (e-mail: zenkovnk@mail.ru)

Чечушков Антон Владимирович – научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (e-mail: achechushkov@gmail.com)
Chechushkov Anton Vladimirovich – Research Officer of the Laboratory of Molecular Mechanisms of Free-Radical Processes of Research Institute of Experimental and Clinical Medicine (e-mail: achechushkov@gmail.com)

Зайцева Наталья Сергеевна – научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (e-mail: nszaitseva@gmail.com)
Zaytseva Natalya Sergeevna – Research Officer of the Laboratory of Molecular Mechanisms of Free-Radical Processes of Research Institute of Experimental and Clinical Medicine (e-mail: nszaitseva@gmail.com)

Кандалинцева Наталья Валерьевна – кандидат химических наук, директор Института естественных и социально-экономических наук ФГБОУ ВПО «Новосибирский государственный педагогический университет» (e-mail: aquaphenol@mail.ru)
Kandalintseva Natalya Valeryevna – Candidate of Chemical Sciences, Head of Institute of Natural and Socioeconomic Sciences of Novosibirsk State Pedagogical University (e-mail: aquaphenol@mail.ru)

Меньщикова Елена Брониславовна – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией молекулярных механизмов свободнорадикальных процессов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной и клинической медицины» (e-mail: lemen@centercem.ru)
Menshchikova Elena Bronislavovna – Doctor of Medical Sciences, Head of the Laboratory of Molecular Mechanisms of Free-Radical Processes of Research Institute of Experimental and Clinical Medicine (e-mail: lemen@centercem.ru)