

МОДИФИКАЦИЯ РАДИАЦИОННЫХ ЭФФЕКТОВ

УДК 616-03:615.076:577.121.7:579.25:577.222:539.1.047

ИЗУЧЕНИЕ ПРО- И АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТЕЙ ПРОТИВОЛУЧЕВЫХ СРЕДСТВ С ПОМОЩЬЮ LUX-БИОСЕНСОРОВ

© 2019 г. С. К. Абилев^{1,*}, Д. А. Свиридова¹, А. Н. Гребенюк², Е. В. Игонина¹, С. В. Смирнова¹

¹ Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

² Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

* E-mail: abilev@vigg.ru

Поступила в редакцию 27.09.2018 г.

Изучали влияние 29 веществ, включая известные антиоксиданты, противолучевые средства, аминокислоты и витамины, на интенсивность люминесценции бактериальных клеток *E. coli* K12: MG1655 (pSoxS-lux) и MG1655 (pKatG-lux), индуцированную паракватом и перекисью соответственно. Люминесценция биосенсоров происходит в результате активации промотора генов *soxS* и *kata* в ответ на увеличение концентрации супероксид-радикала и H₂O₂ в клетке. В случае антиоксидантного действия изучаемого вещества интенсивность индуцированной люминесценции снижается, а в случае прооксидантного действия, напротив, она возрастает. Антиоксидантную активность проявили 23 из 29 веществ (79%) на биосенсоре pKatG-lux и 22 из 29 веществ (76%) на биосенсоре pSoxS-lux. Изученные противолучевые средства (10 веществ) проявили разную степень про- и антиоксидантной активности. Дисульфид глутатиона литиевая соль, глутоксим, гинестеин и индралин значительно снижали уровень индуцированной люминесценции у обоих биосенсоров, тогда как дисульфид глутатиона магниевая соль, глутатион восстановленный цинковая соль и моликсан только у pSoxS-lux, а цистами и 5-АЕД только у KatG. Высокую прооксидантную активность среди противолучевых средств на биосенсоре pKatG-lux в низких концентрациях проявили: литиевая и магниевая соли дисульфида глутатиона, цинковая соль восстановленного глутатиона, моликсан и индралин (Б-190); на биосенсоре pSoxS – гинестеин, цистамин и 5-АЕД. Обсуждается применимость lux-биосенсоров для первичной оценки потенциальной антиоксидантной и радиопротекторной активности химических соединений.

Ключевые слова: облучение, антиоксидант, радиопротектор, противолучевые средства, антиоксидантная активность, прооксидантная активность, lux-биосенсор

DOI: 10.1134/S0869803119040039

Антиоксидантами (АО) являются молекулы, которые взаимодействуют со свободными радикалами, генерируемыми в клетках, и прерывают цепную реакцию, приводящую к нарушению функционирования клетки. Характерной особенностью АО является обезвреживание в малых концентрациях свободных радикалов путем изменения субстратного состава окислительных реакций, взаимодействия с вторичными продуктами или обрыва цепных реакций пероксидного окисления липидов. В широком смысле АО является молекула, защищающая биологическую мишень от окислительного разрушения [1, 2]. Известно огромное количество антиоксидантов (АО), различных по происхождению, химической природе и механизму действия. Многие рецептуры радиопротекторов также основаны на антиоксидантных свойствах их компонентов.

Антиоксиданты делятся на две большие группы в зависимости от того, растворяются они в во-

де (гидрофильные) или в липидах (гидрофобные). Водорастворимые антиоксиданты реагируют с окислителями в цитозоле клеток и плазме крови, в то время как жирорастворимые антиоксиданты защищают клеточные мембраны от перекисного окисления липидов [3]. Эти соединения могут быть синтезированы в организме или получены из рациона. Различные антиоксиданты присутствуют в широком диапазоне концентраций в биологических жидкостях и тканях организма, причем некоторые, такие как глутатион или убихинон, в основном присутствуют в клетках, в то время как другие, такие как мочевиная кислота, более равномерно распределены по организму.

Следует отметить, что АО принято делить на прямые и косвенные [4, 5]. Снижение или предотвращение окисления субстрата в тестах *in vitro* в концентрациях, сравнимых с концентрацией окисляемого субстрата, является особенностью АО прямого действия [5]. В случае АО косвенного

действия снижение интенсивности свободно-радикальных реакций происходит в результате активации/реактивации ферментов-антиоксидантов только в биологических объектах. Механизм такого действия объясняется селективной индукцией генов, которые кодируют белковые системы антиоксидантной защиты и нормализацией метаболизма [4].

Методы исследования общей антиокислительной активности (АОА) различаются по типу источника окисления, окисляемого соединения и способа измерения окисленного соединения. Основным подходом для изучения АОА является измерение характеристик протекающей по радикальному механизму модельной реакции (например, окисления) стандартного соединения, по влиянию на которую оценивается АОА тестируемого соединения или смеси. В ряде случаев создаются условия для генерирования свободных радикалов с постоянной скоростью с помощью инициаторов. Для регистрации изменения кинетики реакции, т.е. АОА изучаемого соединения, используются различные методы: волюмометрические, фотометрические, хемилюминесцентные, флуоресцентные, электрохимические и ряд более специфических [6–9]. Полученные результаты с помощью этих методов отражает влияние изучаемого соединения на АОА в реакционной смеси *in vitro*, т.е. когда эффективность их определяется в первую очередь химическим строением вещества, и не всегда отражает реальную АОА *in vivo*, зависящей от общего гомеостаза организма и индукции антиоксидантной системы Nrf2/ARE [10].

В настоящее время для изучения антиоксидантной активности стали чаще применять и биологические тест-системы. Наиболее простым в использовании являются методы, основанные на использовании люминесцирующих микроорганизмов, получивших название Lux-биосенсоры [11–14]. Биолуминесценция бактерий является одной из разновидностей хемилюминесцентной реакции, для осуществления которой необходимы восстановленный флавиномононуклеотид, кислород, длинноцепочечный альдегид и фермент люцифераза, а конечными продуктами являются жирная кислота, вода и видимый свет [15].

Lux-биосенсоры, используемые в генотоксикологических исследованиях (анти- и прооксидантная активности, повреждение и репарация ДНК), представляют собой бактериальную клетку, содержащую гибридную плазмиду, несущую два основных элемента: регуляторный участок (промотор и оператор), избирательно реагирующий на исследуемый фактор, и гены-репортеры, кодирующие белки, образующие светящиеся комплексы. Lux-биосенсоры характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью, что определяется особенностью взаимодействия

белка рецептора с тестируемым химическим веществом.

Для изучения АОА тестируемых соединений чаще всего используют два биосенсора на основе штаммов *E. coli* K12: MG1655 (pSoxS-lux) и MG1655 (pKatG-lux), несущих рекомбинантную плазмиду с lux-опероном люминесцирующей бактерии *Photobacterium luminescens*, слитым с промоторами генов супероксиддисмутазы SoxS и каталазы KatG соответственно [12–14]. Белок-активатор OxyR промотора pKatG специфически реагирует на перекись водорода и другие пероксиды, тогда как белок-активатор SoxR промотора pSoxS специфически реагирует на супероксид анион-радикал. Белки-активаторы в результате реакции с перекисью или супероксидом снимают блок с промоторов генов каталазы или супероксиддисмутазы, что приводит к считыванию их и синтезу ферментов, инактивирующих перекись и супероксид [11]. Обычно эксперимент заключается в том, что в бактериальных клетках индуцируется окислительный стресс с помощью перекиси водорода или параквата, генерирующего в клетке супероксид, в результате которого происходит люминесценция бактерий. При внесении же в инкубационную среду АО происходит снижение уровня люминесценции.

В настоящей работе проведено изучение про- и антиоксидантных свойств различных категорий химических соединений, включая известные противолучевые средства, с помощью бактериальных lux-биосенсоров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДИКА

Бактериальные штаммы и плазмиды. Были использованы два биосенсора на основе штамма *E. coli* K12: MG1655 (pSoxS-lux) и MG1655 (pKatG-lux), несущие рекомбинантную плазмиду с lux-опероном люминесцирующей бактерии *Photobacterium luminescens*, слитым с промоторами генов супероксиддисмутазы SoxS и каталазы KatG соответственно. Биосенсоры предоставлены Г.Б. Завильгельским и И.В. Мануховым (ГосНИИ-генетика, Москва), их генотипы приведены в статье [11].

Питательные среды и условия роста. Бактерии растили в бульоне Луриа–Бертани (LB), содержащем 100 мкг/мл ампициллина. Клетки выращивали в аэрируемых условиях при 37°C до ранней экспоненциальной фазы.

Химические вещества

Антиоксиданты: глутатион восстановленный и биотин (“AppliChemGmbH”, Германия), цистеин, ацетилцистеин, метионин, цистин и ДМСО (“Serva”, Германия), дигидрокверцетин (“abcrGmbH”, Германия), тауфон (таурин) производства ФГУП

“Московский эндокринный завод” (Россия), липоевая (тиоктовая) кислота (“Worwag Pharma”, Германия), аскорбиновая кислота (ФП “Мелиген”, Россия), спермин (“Acros organics”, США), мексидол (“Фармасофт”, Россия), никотиновая кислота (“Обновление”, Россия), пиридоксин (“CSPC Ouyi Pharmaceutical Co. Ltd”, PRC), ликопин и коэнзим (“Эвалар”, Россия), витамин А (“ЛЮМИ”, Россия), витамин Е (“Фармабиофарм”, Россия).

Противолучевые средства: Б-190 (индралин), генистеин синтетический, дисульфид глутатиона магниева соль, дисульфид глутатиона литиевая соль и глутатион восстановленный цинковая соль (НПЦ “Фармзащита”, Россия), препараты глутоксим (динатриевая соль дисульфида глутатиона с платиной в наноконцентрации) и моликсан (комплекс глутоксима с нуклеозидом инозином) производства “ФармаВАМ” (Россия), цистамин (цистамина дигирдохлорид) производства “Фармакон” (Россия), цистамин перекристаллизованный (НИИ военной медицины МО СССР, ныне ГНИИИ военной медицины МО РФ), субстанция 5-андростенедиол (5-АЕД, Hollis-Eden Pharmaceuticals, США).

В качестве индукторов окислительного стресса использовали перекись водорода (H_2O_2 , Ферейн) и паракват (Serva, Германия). Все тест-растворы готовили непосредственно перед их использованием.

Измерение люминесцентной реакции lux-биосенсоров. Ночные культуры биосенсоров *pKatG-lux* и *pSoxS-lux* разводили до концентрации 10^7 кл./мл в свежей среде LB и выращивали с аэрацией при $37^\circ C$ до ранней экспоненциальной фазы. Затем пробы по 160 мкл переносили в ячейки 96-луночного планшета. В контрольный ряд ячеек добавляли по 40 мкл дистиллированной воды, в другие ряды ячеек вносили по 20 мкл раствора тестируемого вещества в различных концентрациях и по 20 мкл раствора перекиси в случае сенсора *pKatG-lux* или параквата в случае *pSoxS-lux* в конечных концентрациях 0.001 и 0.0004 ммоль/л соответственно. Затем планшеты, с заполненными кюветами, подвергали инкубации: *pKatG-lux* – 45 мин, *pSoxS-lux* – 60 мин. Эксперименты проводили не менее трех раз в восьми повторностях.

После завершения описанных процедур проводили измерения люминесценции на микропланшетном ридере StatFax 4400 (Awareness Technology Inc, США). Интенсивность биолюминесценции выражали в условных единицах светового потока (relatively light units – RLU)

Для расчета влияния изучаемых веществ на люминесценцию сенсоров, индуцированную перекисью или паракватом, использовали следующую формулу:

$$AA = \left(1 - \frac{I_a}{I_p}\right) \times 100,$$

где AA – протекторная (антиоксидантная) активность, I_p – интенсивность люминесценции биосенсора, индуцированная перекисью или паракватом, I_a – интенсивность люминесценции биосенсора, индуцированная перекисью или паракватом, в присутствии антиоксиданта.

Данная формула позволяет выявить антиоксидантную (протекторную) или, наоборот (прооксидантную), стимулирующую активность изучаемого соединения.

РЕЗУЛЬТАТЫ

На первом этапе были проведены работы по изучению возможностей биосенсоров в качестве тест-системы для выявления антиоксидантной и прооксидантной активности изучаемых веществ, относящихся к разным группам химических соединений. Были выбраны вещества с известной антиоксидантной активностью: трипептид глутатион восстановленный, ацетилированная аминокислота ацетилцистеин, тетрагерпен ликопин, представляющий собой нециклический изомер каротина, биофлавоноид дигидрохверцетин, дисульфид карбоновой кислоты липоевая кислота и полиамин спермин.

Было определено влияние тестируемых антиоксидантов на интенсивность люминесценции в клетках сенсоров *E. coli* K12: MG1655 (*pSoxS-lux*) и MG1655 (*pKatG-lux*), индуцированная паракватом и перекисью. Так как сенсоры *E. coli* несут *lux*-оперон, то под воздействием индукторов окислительного стресса начинают активно продуцировать люциферин-люциферазный комплекс, что приводит к повышению уровня биолюминесценции. Если тестируемое вещество является антиоксидантом, то интенсивность индуцированной люминесценции снижается. В случае прооксидантного действия тестируемого вещества происходит, наоборот, усиление интенсивности люминесценции. Полученные результаты приведены в табл. 1.

Количественные данные, представленные в табл. 1, для наглядности были пересчитаны в показатели изменения интенсивности люминесценции, выраженные в % и отражающие характер действия тестируемого вещества на индуцированный окислительный стресс (рис. 1–4). Положительные значения этого показателя означают антиоксидантный эффект, отрицательные значения – прооксидантный.

Глутатион восстановленный, ацетилцистеин и спермин проявили высокую антиоксидантную активность на биосенсорах *pKatG-lux* и *pSoxS-lux* при индукции окислительного стресса у них пе-

Таблица 1. Влияние антиоксидантов на интенсивность люминесценции биосенсоров *pKatG-lux* и *pSoxS-lux*, индуцированной перекисью и паракватом**Table 1.** Effect of antioxidants on the luminescence intensity of *pKatG-lux* and *pSoxS-lux* biosensors induced by peroxide and paraquat

Вариант эксперимента	Концентрация, моль/л	<i>pKatG-lux</i>	<i>pSoxS-lux</i>
		Люминесценция, отн. ед.	
Контроль	вода	2709 ± 140	3943 ± 165
Перекись водорода	0.001	51879 ± 6192	—
Паракват	0.00004	—	31008 ± 1381
Глутатион восстановленный	0.001	53173 ± 5001	31949 ± 1199
	0.005	29407 ± 5401	31130 ± 3464
	0.01	2777 ± 1967	19685 ± 5249
	0.015	2927 ± 729	15758 ± 2959
	0.02	796 ± 206	5345 ± 2054
	0.025	2068 ± 1949	2149 ± 830
	0.03	336 ± 211	748 ± 372
Контроль	вода	2786 ± 209	6255 ± 247
Перекись водорода	0.001	73589 ± 6344	—
Паракват	0.00004	—	591900 ± 4655
Липоевая кислота	0.0001	46915 ± 7504	44730 ± 2012
	0.00025	50053 ± 11326	43264 ± 4297
	0.0005	37381 ± 3965	32861 ± 1971
	0.001	38008 ± 4536	29412 ± 1995
	0.003	20688 ± 4439	21089 ± 1773
	0.006	15881 ± 1469	14487 ± 1317
Контроль	вода	3497 ± 251	5041 ± 151
Перекись водорода	0.001	46983 ± 10936	—
Паракват	0.00004	—	31344 ± 3214
Дигидрокверцетин	0.0001	41918 ± 7019	37396 ± 2377
	0.0005	41311 ± 6093	38532 ± 3096
	0.001	37162 ± 7774	38305 ± 2644
	0.0025	35326 ± 4140	35234 ± 3481
	0.005	33679 ± 2638	27572 ± 2643
	0.01	29288 ± 2353	27002 ± 2909
	0.02	23118 ± 6249	20038 ± 858
	0.03	8125 ± 2753	26134 ± 1884
	Контроль	вода	2943 ± 1052
Перекись водорода	0.001	66235 ± 4244	—
Паракват	0.00004	—	29312 ± 2264
Спермин	0.0005	48989 ± 2638	28165 ± 1711
	0.001	26051 ± 1966	16337 ± 1138
	0.0025	5137 ± 1635	7282 ± 516
	0.005	1035 ± 86	5411 ± 399
	0.01	878 ± 73	4661 ± 560
	0.015	1052 ± 212	1761 ± 689
	0.02	668 ± 404	141 ± 107

Таблица 1. Окончание

Вариант эксперимента	Концентрация, моль/л	<i>pKatG-lux</i>	<i>pSoxS-lux</i>
		Люминесценция, отн. ед.	
Контроль	вода	3754 ± 991	3648 ± 247
Перекись водорода	0.001	54717 ± 9277	—
Паракват	0.00004	—	26276 ± 2608
Ацетилцистеин	0.001	49121 ± 6401	29285 ± 5439
	0.005	26647 ± 6332	26498 ± 2880
	0.01	3345 ± 1768	14402 ± 4772
	0.015	2118 ± 1607	6073 ± 3086
	0.02	464 ± 97	1121 ± 236
	0.025	422 ± 216	1634 ± 1142
	0.03	286 ± 157	2080 ± 1598
	Контроль	вода	1829 ± 89
Перекись водорода	0.001	34293 ± 2498	—
Паракват	0.00004	—	17213 ± 2098
Ликопин	0.000025	33415 ± 3623	20651 ± 2253
	0.00005	33457 ± 2667	19217 ± 1855
	0.0001	21534 ± 2492	15952 ± 1870
	0.00025	27221 ± 2272	13937 ± 1797
	0.0005	23335 ± 2136	7491 ± 807
	0.001	8595 ± 2378	3725 ± 1136

рекиью и паракватом соответственно. Наиболее активным был спермин, который блокировал развитие окислительного стресса в бактериальных клетках при более низких концентрациях, чем ацетилцистеин. Последний в низкой концентрации проявил прооксидантную активность на

биосенсоре *pKatG-lux*, т.е. увеличивал или поддерживал уровень перекиси в клетке (рис. 1, 2).

Липовая кислота, дигидрокверцетин и ликопин проявили антиоксидантную активность на обоих биосенсорах, однако дигидрокверцетин, в

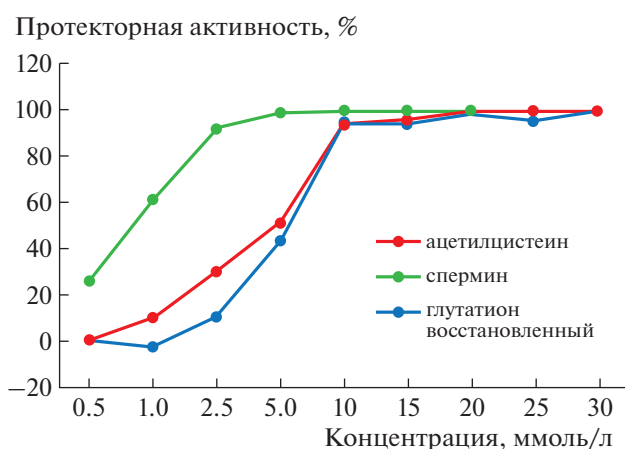


Рис. 1. Защита биосенсора *pKatG-lux* от индуцированного перекисью окислительного стресса в зависимости от концентрации антиоксидантов.

Fig. 1. Protection of the *pKatG-lux* biosensor against peroxide-induced oxidative stress depending on the concentration of antioxidants.

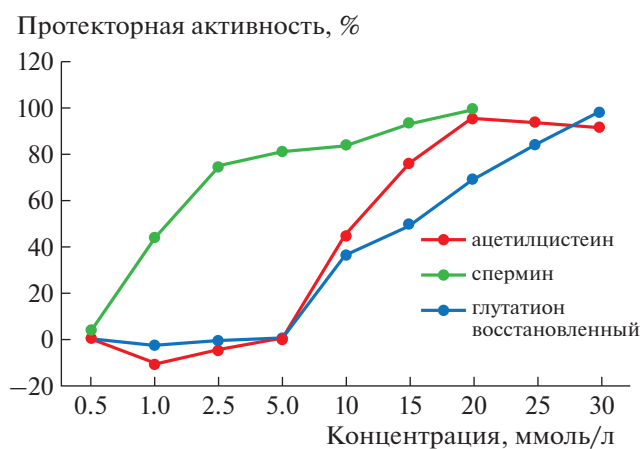


Рис. 2. Защита биосенсора *pSoxS-lux* от индуцированного паракватом окислительного стресса в зависимости от концентрации антиоксидантов.

Fig. 2. Protection of *pSoxS-lux* biosensor against paraquat-induced oxidative stress depending on the concentration of antioxidants.

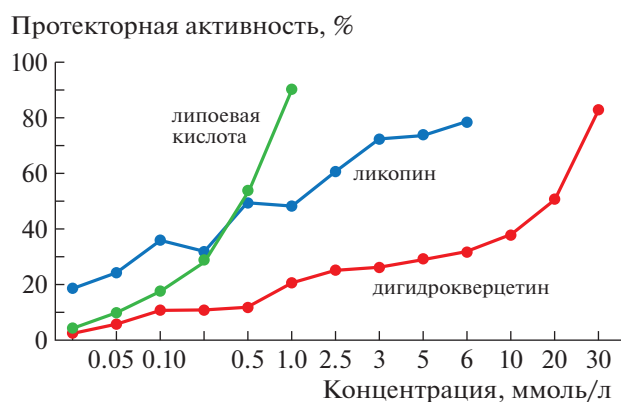


Рис. 3. Защита биосенсора *pKatG-lux* от индуцированного перекисью окислительного стресса в зависимости от концентрации антиоксидантов.

Fig. 3. Protection of the *pKatG-lux* biosensor against peroxide-induced oxidative stress depending on the concentration of antioxidants.

отличие от липоевой кислоты и ликопина, в низких концентрациях проявил еще и прооксидантную активность на биосенсоре *pSoxS-lux*, т.е. увеличивал уровень содержания супероксидного радикала в бактериальной клетке (рис. 3, 4). Липоевая кислота и ликопин на обоих биосенсорах проявили более высокую антиоксидантную активность в низких концентрациях, чем дигидрокверцетин.

В ходе дальнейших исследований были тестированы десять веществ, применяемых в качестве противолучевых средств или рекомендуемых (изучаемых) для этих целей: препарат Б-190, цистамина дигидрохлорид, цистамин перекристаллизованный, глутоксим, моликсан, магниевая и литиевая соли дисульфида глутатиона, цинковая соль восстановленного глутатиона, 5-АЕД и генистеин синтетический. Все эти препараты в экспериментах на животных проявляют радиозащитные свойства при профилактическом и/или лечебном применении [16–18].

В табл. 2 приведены итоговые результаты изучения про- и антиоксидантной активности всех тестированных противолучевых средств на обоих биосенсорах. Результаты представлены в виде максимального значения % протекторной активности, рассчитанной по формуле, указанной в разделе “Материалы и методика”: положительное значение этого показателя означает антиоксидантный эффект, отрицательное значение — прооксидантный (в скобках приведена концентрация вещества в ммоль/л, при которой достигается максимальный прооксидантный или антиоксидантный эффект).

Из табл. 2 видно, что литиевая соль дисульфида глутатиона, генистеин и препарат Б-190 (индралин) проявили высокую антиоксидантную ак-

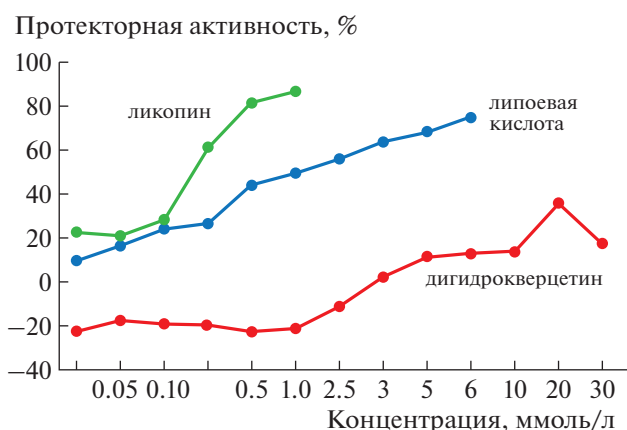


Рис. 4. Защита биосенсора *pSoxS-lux* от индуцированного паракватом окислительного стресса в зависимости от концентрации антиоксидантов.

Fig. 4. Protection of *pSoxS-lux* biosensor against paraquat-induced oxidative stress depending on the concentration of antioxidants.

тивность на обоих биосенсорах *pKatG-lux* и *pSoxS-lux* при индукции окислительного стресса у них перекисью и паракватом соответственно. При этом литиевая соль дисульфида глутатиона и генистеин проявили также прооксидантную активность на биосенсорах *pKatG-lux* и *pSoxS-lux* соответственно. Прооксидантная активность у литиевой соли дисульфида глутатиона регистрировалась в его низких концентрациях, а у генистеина — в высокой концентрации, превышающей в 10 раз его антиоксидантную концентрацию.

Цинковая соль глутатиона восстановленного проявила высокую прооксидантную активность на биосенсоре *pKatG-lux* (усиливала люминесценцию на 80%) и заметную антиоксидантную активность на *pSoxS-lux* (снижала люминесценцию на 35%). Магниевая соль дисульфида глутатиона проявила себя как прооксидант (91%) на *pKatG-lux* и слабый антиоксидант (7%) на *pSoxS-lux*.

Глутоксим и моликсан проявили прооксидантную активность на биосенсоре *pKatG-lux*, усиливая люминесценцию на 8 и 60% соответственно. Глутоксим при более высокой концентрации на этом же биосенсоре проявил антиоксидантную активность, в отличие от моликсана. На биосенсоре *pSoxS-lux*, уровень люминесценции которого зависит от концентрации супероксида, моликсан проявил антиоксидантную активность, в отличие глутоксима, который, наоборот, показал прооксидантную активность.

Препарат 5-АЕД (5-андростенедиол) показал антиоксидантную активность (27%) на биосенсоре *pKatG-lux* и прооксидантную активность (19%) на *pSoxS-lux*.

Цистамин в обеих формах показал себя как антиоксидант на биосенсоре *pKatG-lux* и проокси-

Таблица 2. Про- и антиоксидантная активность исследованных веществ на биосенсорах *pKatG-lux* и *pSoxS-lux* при индукции окислительного стресса перекисью или параquatом
Table 2. Pro- and antioxidant activity of the studied substances on the *pKatG-lux* and *pSoxS-lux* biosensors during induction of oxidative stress by peroxide or paraquat.

№	Вещество	Концентрация, ммоль/л	Протекторная активность на биосенсорах, %			
			<i>pKat-Lux</i>		<i>pSoxS-Lux</i>	
			проокси	антиокси	проокси	антиокси
Антиоксиданты стандартные						
1	Ацетилцистеин	1–30	–	94(10)*	–11(1)	96(20)
2	Глутатион восстановленный	1–30	–	95(10)	–	98(30)
3	Дигидрохверцетин	0.1–30	–	54(10)	–6(5)	46(30)
4	Липоевая кислота	0.1–6	–	72(3)	–	76(6)
5	Спермин	0.5–20	–	92(2.5)	–	100(20)
6	Ликопин	0.025–1	–	91(1)	–	83(0.5)
Противолучевые средства						
7	Дисульфид глутатиона литиевая соль	0.5–10	–21(0.5)	96(5)	–	94(5)
8	Дисульфид глутатиона магниевая соль	0.1–5	–91(5)	–	–	7(0.1)
9	Глутатион восстановленный цинковая соль	0.5–10	–81(5)	–	–	35(5)
10	Глутоксим	0.1–10	–8(0.5)	15(10)	–	16(0.5)
11	Генистеин	0.5–10	–8(0.5)	45(5)	–46(10)	46(0.5)
12	5-АЕД	0.001–0.1	–	27(0.1)	–19(0.1)	–
13	Б-190 (индралин)	0.5–20	–48(0.5)	98(20)	–	100(10)
14	Моликсан	0.5–10	–60(1)	–	–	29(1)
15	Цистамин перекристаллизованный	0.5–10	–11(0.5)	45(10)	–37(2.5)	–
16	Цистамина дигидрохлорид	0.5–10	–	49(10)	–28(0.5)	–
Витамины, аминокислоты						
17	Витамин А	0.1–70	–62(30)	–	–25(2.5)	27(70)
18	Витамин Е	0.1–20	–	32(20)	–19(0.1)	44(20)
19	Витамин В ₆	0.1–30	–12(1)	94(30)	–33(5)	79(30)
20	Витамин РР	0.1–8	–	30(5)	–25(7)	–
21	Биотин	0.1–30	–8(2.5)	13(30)	–47(10)	–
22	Аскорбиновая кислота	0.1–30	–	96(10)	–	92(20)
23	Цистеин	1–30	–24(1)	96(15)	–40(5)	91(20)
24	Метионин	0.1–50	–9(15)	–	–8(1)	30(30)
25	Цистин	1–30	–19(30)	–	–43(1)	–
26	Таурин (тауфон)	0.1–30	–14(30)	16(1)	–28(5)	–
Вещества различного назначения						
27	Мексидол	0.1–36	–	97(36)	–33(5)	96(36)
28	Q10 (коэнзим)	0.1–10	–9(0.1)	18(10)	–	69(10)
29	ДМСО	0.5–100	–6(0.5)	77(100)	–28(0.5)	86(100)

* В скобках приведены концентрации веществ, при которых наблюдались указанные значения про- или антиоксидантной активности в %.

дант на *pSoxS-lux*, за исключением того, что перекристаллизованная форма проявила слабую прооксидантную активность на *pKatG-lux*.

Почти все витамины показали как прооксидантную, так и антиоксидантную активность, за

исключением аскорбиновой кислоты и витамина Е, которые на обоих биосенсорах проявили высокую антиоксидантную активность, т.е. подавляли окислительный стресс в бактериальных клетках, индуцированный перекисью водорода и

паракватом. Аскорбиновая кислота подавляла окислительный стресс в клетках как *pKatG-lux*, так *pSoxS-lux* на 99 и 95% соответственно. Витамин В также подавлял окислительный стресс в клетках обоих биосенсоров. Однако он, в отличие от аскорбиновой кислоты и витамина Е, проявил прооксидантную активность в концентрациях более 10 раз меньших, чем концентрации, при которых регистрируется его антиоксидантная активность.

Витамин А был прооксидантом на *pKatG-lux* и антиоксидантом на *pSoxS-lux*, а витамин РР наоборот. Биотин вел себя в большей степени как прооксидант на обоих биосенсорах, однако проявил слабую антиоксидантную активность на *pKatG-lux*.

Среди аминокислот цистеин показал высокую антиоксидантную активность и подавлял окислительный стресс более чем на 90%. Вместе с тем цистеин в низких концентрациях проявил прооксидантную активность. Метионин, содержащий в своей структуре также сульфгидрильную группу, был антиоксидантом только на *pSoxS-lux* и прооксидантом на обоих биосенсорах, но в разной степени. Активность таурина была сходной с активностью метионина, за исключением того, что его антиоксидантная активность была выявлена на *pKatG-lux*. Цистин, дисульфид цистеина, не проявил антиоксидантной активности, однако был прооксидантом на обоих биосенсорах.

Коэнзим Q10 показал антиоксидантную активность на обоих биосенсорах и был слабым прооксидантом на *pKatG-lux*. Фармакопейный мексидол, защищающий липиды клеточных мембран от перекисного окисления, проявил высокую антиоксидантную активность как на *pKatG-lux*, так и на *pSoxS-lux*. Вместе с тем он в низких концентрациях показал способность генерировать супероксидный радикал в бактериальной клетке. Диметилсульфоксид (ДМСО), применяемый в медицине под названием Димексид в качестве местноанестезирующего и местного противовоспалительного средства при заболеваниях опорно-двигательного аппарата, показал также антиоксидантную активность на обоих биосенсорах, однако в низких концентрациях проявил и прооксидантное свойство на *pSoxS-lux*.

Обращает внимание наличие у ряда соединений, в том числе противолучевых средств, прооксидантной активности. Данный феномен не является исключением. Хорошо известно, что в определенных условиях эксперимента антиоксиданты (тиолы, включая глутатион, аскорбиновая кислота, кверцетин, госсипол, мирецитин и другие) проявляют прооксидантную активность, что приводит к оксидативному повреждению клеток [19, 20]. Здесь важную роль играет редокс-статус питательной среды, использованной для выра-

щения клеточных или бактериальных культур [21, 22].

В целом использованные нами *lux*-биосенсоры проявили высокую эффективность в изучении про- и антиоксидантной активности 29 веществ, относящихся к различным классам химических соединений и имеющих различные назначения.

ОБСУЖДЕНИЕ

Важную роль в антиоксидантной защите организма и поддержании окислительно-восстановительного (редокс) баланса играют легкоокисляющиеся белки и пептиды, в состав которых входят SH-содержащие аминокислоты: цистеин и метионин. Трипептид глутатион, концентрация которого в клетках эукариот достигает миллимолярных значений, является одним из главных водорастворимых антиоксидантов [4]. В организмах животных и человека глутатион присутствует как в восстановленной (GSH), так и в окисленной (GSSG; ~10% общего количества) формах. В условиях развития окислительного стресса антиоксидантный эффект восстановленного глутатиона реализуется следующим образом: глутатион, окисляясь ферментом глутатионпероксидазой, выступает донором атомов водорода для восстановления H_2O_2 , липидных и других перекисей; восстановление окисленного глутатиона осуществляется ферментом глутатионредуктазой с участием НАДФН. Мембраны клеток млекопитающих плохо проницаемы для глутатиона, поэтому основную потребность в нем клетки решают за счет эндогенного синтеза, который осуществляется двумя ферментами — γ -глутамилцистеинсинтетазой (γ GCS) и глутатионсинтазой. Лимитирующим и регулирующим звеном синтеза глутатиона является образование γ -глутамилцистеина из глутамина и цистеина [23]. Эта реакция зависит от наличия L-цистеина и его способности окисляться в L-цистин и негативно регулируется восстановленным глутатионом.

У млекопитающих описано около 20 редокс-чувствительных систем, которые отвечают на изменение соотношения восстановленных и окисленных SH-групп в белках, приводящее к развитию окислительного стресса [10]. Среди таких систем особое место занимает фактор транскрипции Nrf2, активирующий экспрессию генов за счет взаимодействия с цис-регуляторным элементом ARE (antioxidant responsive element), который представляет собой участок ДНК, содержащий последовательность 5'A/GTGAC/TnnnGCA/G3'. С ним связывается фактор транскрипции Nrf2, который входит в семейство белков NF-E2, содержащее, помимо Nrf2, еще пять белков: p45, Nrf1, Nrf3, Bach1 и Bach2. После активации Nrf2 перемещается из цитозоля в ядро и формирует димеры с белками Maf или Jun, которые, связыва-

ясь с ARE, инициируют транскрипцию соответствующих генов [24, 25]. Основным сенсором сигнальной системы Nrf2/ARE служит белок Keap1, в состав которого у мыши и человека входят 25 и 27 остатков цистеина соответственно, и по сути является регулятором активации Nrf2 в цитозоле [26]. Модификация остатков цистеина в Keap1 в результате взаимодействия с веществами, активирующими систему Nrf2/ARE, приводит к снятию блока с Nrf2 и он перемещается в ядро клетки [27, 28]. Активация Nrf2 сопровождается увеличением внутриклеточного содержания восстановленных тиоредоксина и глутатиона, что приводит к “выключению” Nrf2/ARE-зависимого сигнального пути по механизму отрицательной обратной связи. Вероятные биохимические механизмы активации этого транскрипционного фактора и роль различных сопутствующих белков всей системы Keap1/Nrf2/ARE приведены в обзоре [10, 24, 29–31]. На сегодняшний день установлено, что регуляторная система Nrf2/ARE играет ключевую роль в защите клеток от активных форм кислорода и азота в условиях окислительного стресса, а также от эндогенных и экзогенных токсических соединений и канцерогенов [10, 25, 32].

Показано также важное значение Nrf2 в развитии и разрешении воспалительных и других патологических процессов [33, 34]. Активация фактора транскрипции Nrf2 приводит к изменению экспрессии большего числа генов и соответственно активности многих метаболических процессов. Поэтому сигнальная система Nrf2/ARE считается перспективной мишенью для тестирования новых средств, применяемых при различных патологических процессах [35, 36].

ARE участвует в регуляции селеновой глутатионпероксидазы-2, которая способна восстанавливать перекись водорода и гидроперекиси жирных кислот, а также глутатионредуктазы, восстанавливающей окисленный глутатион [37]. Таким образом, глутатионовый цикл находится под контролем системы Nrf2/ARE.

Показано, что способностью активировать Nrf2 обладают тиолсодержащие и ароматические соединения, гидроперекиси, каротиноиды, атомы тяжелых металлов (Cd, Co, Cu, Au, Hg, Pb) и гемовые комплексы [10, 32]. Прямое действие на клетки H_2O_2 , гидроксильных, нитроксильных и других радикалов кислорода, а также радиации и коротковолнового УФ-света также сопровождается активацией Nrf2 и экспрессии ARE-контролируемых генов [10, 32].

Из тестированных нами соединений способностью активировать Nrf2 обладают: N-ацетилцистеин [38], дигидрокверцетин [39], аскорбиновая кислота [40], ликопин [41], спермин [42], генистеин [43], липоевая кислота [44], Q10 [45] и, по-видимому, все препараты окисленного глута-

тиона. Прямых доказательств активации Nrf2 дисульфидами глутатиона нет. Однако активирующее действие окисленного глутатиона на систему Nrf2/ARE может быть связано с изменением баланса GSH/GSSG при введении в организм млекопитающего противолучевых средств на основе дисульфидов глутатиона. Это подтверждается тем, что их биологические эффекты плеiotропны и характерны таковым при активации системы Nrf2/ARE. Так, глутоксим, помимо антиоксидантного действия, проявляет иммуномодулирующую активность широкого спектра действия: стимулирует процессы костномозгового кроветворения, активирует систему фагоцитоза, в том числе в условиях иммунодефицитных состояний, способствует восстановлению уровня нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов в периферической крови и функциональной дееспособности тканевых макрофагов [46]. Применяется в комплексной терапии антибиотикорезистентных форм туберкулеза [47]. Моликсан, представляющий собой композицию дисульфида глутатиона и инозина, также обладает широким спектром фармакологической активности: цитопротекторной способностью, индуцирует синтез ферментов детоксикации, повышает способность гепатоцитов к детоксикации токсичных продуктов метаболизма этанола, активирует реакции их нейтрализации и выделения [48].

Тиоктовая (α -липоевая) кислота представляет собой эндогенный антиоксидант, связывающий свободные радикалы, и ее антиоксидантное действие реализуется посредством активации Nrf2 [44]. Она выполняет функцию коэнзима в комплексе превращения веществ, обладающих выраженным антиоксидантным действием, а также проявляет синергизм по отношению к инсулину, что связано с повышением утилизации глюкозы. У больных сахарным диабетом тиоктовая кислота приводит к снижению симптомной диабетической полиневропатии [49]. Противовоспалительное, антиатерогенное и противотромботическое действие ликопина было показано в различных экспериментах *in vitro* и *in vivo* [50].

Из низкомолекулярных тиолов, применяемых в качестве радиопротекторов, особое место занимает пара цистеин/цистин. Цистеин в клетке играет роль в качестве перехватчика радикалов, и является преобладающим в клетке, а цистин, продукт окислительной димеризации цистеина, накапливается во внеклеточной жидкости. Цистин в использованной нами тест-системе не показал антиоксидантной активности, однако проявил прооксидантный эффект (табл. 2). Цистеин, в отличие от цистина, проявил высокую антиоксидантную активность в высоких концентрациях и умеренную прооксидантную активность в низких. Цистеин является первым радиозащитным средством. Его введение мышам перед воздей-

ствием рентгеновского излучения в летальной дозе предотвращало гибель большого числа животных [51], что положило начало исследованиям по поиску средств с выраженным радиозащитным действием, способных обеспечивать защиту человеческого организма. Цистеин обладает свойствами регуляции в клетке окислительно-восстановительных процессов, а также способностью легко реагировать с H_2O_2 [52]. Он является лимитирующей аминокислотой в синтезе глутатиона. Цистин менее токсичен и более устойчив, чем цистеин. Механизмы его радиозащитного действия в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* достаточно исследованы [53]. Цикл превращения внеклеточного цистина во внутриклеточный цистеин осуществляется цитозольной дисульфид редуктазой в печени и контролируется редокс-сенсорами Nrf2/ARE [54].

Следует обратить внимание на внутриклеточный полиамин спермин. Антиоксидантные функции полиаминов у прокариот изучены на примере *Escherichia coli* [55]. Показано, что в условиях слабых стрессовых воздействий они в основном выполняют функции соединений, улавливающих супероксидные радикалы, тогда как при сильном стрессе полиамины, в первую очередь, играют роль положительных транскрипционных модуляторов генов антиоксидантной защиты [56].

Вышеприведенные примеры являются свидетельством того, что система Nrf2/ARE является универсальной и способна отвечать на действие как прооксидантов, так и антиоксидантов, в том числе SH-содержащих, и тем самым поддерживать баланс этих соединений. Белки многих контролируемых ARE генов относятся к числу выполняющих или непосредственно защитных, или восполняющих уровень расходуемых низкомолекулярных интермедиатов в ситуациях с нарушением клеточного редокс-баланса.

Известно, что важным аспектом биологического действия ионизирующих излучений являются возбуждение и ионизация атомов и молекул с последующим образованием высокоактивных радикалов и перекисей, которые приводят к повреждению клеточных структур. Поэтому связывание свободных радикалов и модификация процессов перекисного окисления липидов могут быть ключевым звеном в противолучевом механизме, что важно учитывать при дальнейшем поиске радиозащитных препаратов [57, 58]. В этой связи имеет большое значение выбор тест-систем для первичного скрининга потенциальных радиопротекторов.

Биологическая тест-система, основанная на использовании бактериальных клеток, может быть лучше, чем физико-химические методы, основанные, по сути, на измерении кинетики химических реакций между активными радикалами

и потенциальным их перехватчиком. Вместе с тем бактериальная клетка не может заменить клетки млекопитающего, в ней нет такой системы как Nrf2/ARE. Однако бактериальная система отличается высокой производительностью, не нуждается в специальных реактивах для проведения биохимических реакций и может быть успешно использована в качестве тест-системы для первичного отбора потенциальных антиоксидантов и радиозащитных препаратов из большого массива химических соединений. Для следующего этапа исследования потенциальных противолучевых средств перспективными могут оказаться клеточные системы, содержащие генетическую конструкцию на основе промоторов индуцибельных генов с несколькими ARE последовательностями. В настоящее время они вошли в практику исследования индукции системы Nrf2/ARE различными классами химических соединений [31, 59, 60]. В таких системах в качестве репортера используются гены флюоресцирующих и люминесцирующих белков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0112-2019-0002.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Меньщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др.* Окислительный стресс – прооксиданты и антиоксиданты. М.: Фирма “Слово”, 2006. 556 с. [*Men'shchikova E.B., Lankin V.Z., Zenkov N.K. et al.* Okislitel'nyj stress – Prooksidanty i antioksidanty. M.: Firma “Slovo”, 2006. 556 s. (in Russian)]
2. *Костюк В.А., Потапович А.И.* Биорадикалы и биоантиоксиданты. Минск: БГУ, 2004. 174 с. [*Kostyuk V.A., Potapovich A.I.* Bioradikaly i bioantioksidanty. Minsk: BGU, 2004. 174 p. (in Russian)]
3. *Papas A.M.* Lipid-Soluble Antioxidants. Biochemistry and Clinical Application. Basel: Birkhauser Verlag, 1992. P. 123–149.
4. *Шахмарданова С.А., Гулевская О.Н., Селецкая В.В. и др.* Антиоксиданты: классификация, фармакотерапевтические свойства, использование в практической медицине // Журн. фонд. мед. и биол. 2016. № 3. С. 3–15. [*Shahmardanova S.A., Gulevskaya O.N., Seleckaya V.V. et al.* Antioksidanty: klassifikaciya, farmakoterapevticheskie svoystva, ispol'zovanie v prakticheskoy medicine // Zhurn. fund. med. i biol. 2016. № 3. P. 3–15. (in Russian)]
5. *Зайцев В.Г., Островский О.В., Закревский В.И.* Связь между химическим строением и мишенью действия как основа классификации антиоксидантов прямого действия // Эксперим. и клин. фармакол. 2003. Т. 66. № 4. С. 66–70. [*Zajcev V.G., Ostrovskij O.V., Zakrevskij V.I.* Svyaz' mezhdru himicheskim stroeniem i mishen'yu dejstviya kak osnova klassifikacii antioksidantov pryamogo dejstviya //

- Ehksperim. i klin. farmakol. 2003. V. 66. №4. P. 66–70. (in Russian)]
6. *Хасанов В.В., Рыжова Г.Л., Мальцева Е.В.* Методы исследования антиоксидантов // Химия растительного сырья. 2004. № 3. С. 63–75. [*Hasanov V.V., Ryzhova G.L., Mal'tseva E.V.* Metody issledovaniya antioksidantov // Himiya rastitel'nogo syr'ya. 2004. № 3. P. 63–75. (in Russian)]
 7. *Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Измайлов Д.Ю.* Кинетическая хемилуминесценция как метод изучения реакций свободных радикалов // Биофизика. 2011. Т. 56. № 6. С. 1081–1090. [*Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmajlov D.Yu.* Kineticheskaya hemilyuminescenciya kak metod izucheniya reakcij svobodnyh radikalov // Biofizika. 2011. V. 56. № 6). P. 1081–1090. (in Russian)]
 8. *Yang B., Kotani A., Arai K., Kusu F.* Estimation of the antioxidant activities of flavonoids from their oxidation potentials // *Analyt. Sci.* 2001. V. 17. № 3. P. 599–604.
 9. *Gupta D.* Methods for determination of antioxidant capacity: A review // *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2015. V. 6. № 2. P. 546–566.
 10. *Ляхович В.В., Вавилин В.А., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б.* Активная защита при окислительном стрессе. Антиоксидант-респонсивный элемент (обзор) // Биохимия. 2006. Т. 71. № 9. С. 1183–1198. [*Lyahovich V.V., Vavilin V.A., Zenkov N.K., Men'shchikova E.B.* Aktivnaya zashchita pri okislitel'nom stresse. Antioksidant-responsivnyj ehlement (obzor) // Biohimiya. 2006. V. 71. № 9. P. 1183–1198. (in Russian)]
 11. *Котова В.Ю., Манухов И.В., Завильгельский Г.Б.* Лух-биосенсоры для детекции SOS-ответа, теплового шока и окислительного стресса // Биотехнология. 2009. № 6. С. 16–25. [*Kotova V.YU., Manuhov I.V., Zavil'gel'skij G.B.* Lux-biosensory dlya detekcii SOS-otveta, teplovogo shoka i okislitel'nogo stressa // Biotekhnologiya. 2009. №6. P. 16–25 (in Russian)]
 12. *Игонина Е.В., Марсова М.В., Абилев С.К.* Лух-биосенсоры: скрининг биологически активных соединений на генотоксичность // Экол. генетика. 2016. Т. 9. № 4. С. 52–62. [*Igonina E.V., Marsova M.V., Abilev S.K.* Lux-biosensory: skrininig biologicheskii aktivnyh soedinenij na genotoksichnost' // Ekol. genetika. 2016. V. 9. № 4. P. 52–62. (in Russian)]
 13. *Marsova M., Abilev S., Poluektova E., Danilenko V.* A bioluminescent test system reveals valuable antioxidant properties of lactobacillus strains from human microbiota // *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 34. P. 1–9.
 14. *Prazdnova E.V., Chistyakov V.A., Churilov M.N. et al.* DNA-protection and antioxidant properties of fermentates from *Bacillus amyloliquefaciens* B-1895 and *Bacillus subtilis* KATMIRA 1933 // *Lett. Appl. Microbiol.* 2015. V. 61. P. 549–554.
 15. *Гителъзон И.И., Родичева Э.К., Медведева С.Е. и др.* Светящиеся бактерии // Светящиеся бактерии. Новосибирск: Наука, 1984. 298 с. [*Gitel'zon I.I., Rodicheva E.H.K., Medvedeva S.E. et al.* Svet'yashchiesya bakterii // Svet'yashchiesya bakterii. Novosibirsk: Nauka, 1984. 298 p. (in Russian)]
 16. *Гребенюк А.Н., Зацепин В.В., Назаров В.Б., Влащенко Т.Н.* Современные возможности медикаментозной профилактики и ранней терапии радиационных поражений // Воен.-мед. журн. 2011. Т. 332. № 2. С. 13–17. [*Grebenyuk A.N., Zacepin V.V., Nazarov V.B., Vlasenko T.N.* Sovremennye vozmozhnosti medikamentoznoj profilaktiki i rannej terapii radiacionnyh porazhenij // Voен.-med. zhurn. 2011. V. 332. № 2. P. 13–17. (in Russian)]
 17. *Гребенюк А.Н., Легеца В.И.* Перспективы использования радиопротекторов для повышения эффективности медицинской противорадиационной защиты Вооруженных Сил // Воен.-мед. журн. 2013. Т. 334. № 7. С. 46–50. [*Grebenyuk A.N., Legeza V.I.* Perspektivny ispol'zovaniya radioprotektorov dlya povysheniya ehffektivnosti medicinskoj protivoradiacionnoj zashchity Vooruzhennyh Sil // Voен.-med. zhurn. 2013. V. 334. № 7. P. 46–50. (in Russian)]
 18. *Гребенюк А.Н., Легеца В.И., Тарумов Р.А.* Радиомитигаторы: перспективы использования в системе медицинской противорадиационной защиты // Воен.-мед. журн. 2014. Т. 335. № 6. С. 39–43. [*Grebenyuk A.N., Legeza V.I., Tarumov R.A.* Radiomitigatory: perspektivy ispol'zovaniya v sisteme medicinskoj protivoradiacionnoj zashchity // Voен.-med. zhurn. 2014. V. 335. № 6. P. 39–43. (in Russian)]
 19. *Misra H.P.* Generation of superoxide free radical during the autoxidation of thiols // *J. Biol. Chem.* 1974. V. 249. P. 2151–2155.
 20. *Munday R.* Toxicity of thiols and disulphides: involvement of free-radical species. // *Free Radic. Biol. Med.* 1989. V. 7. P. 659–673.
 21. *Long L.H., Halliwell B.* Oxidation and generation of hydrogen peroxide by thiol compounds in commonly used cell culture media // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 286. P. 991–994.
 22. *Соловьева М.Е., Соловьев В.В., Фашутдинова А.А. и др.* Прооксидантное и цитотоксическое действие N-ацетилцистеина и глутатиона в сочетаниях с витамином В12 // Цитология. 2007. Т. 49. № 1. С. 70–78. [*Solov'eva M.E., Solov'ev V.V., Fashutdinova A.A. et al.* Prooksidantnoe i citotoksicheskoe dejstvie N-acetilcisteina i glutatiiona v sochetaniyah s vitaminom V12 // Citologiya. 2007. V. 49. № 1. P. 70–78. (in Russian)]
 23. *Калинина Е.В., Чернов Н.Н., Новичкова М.Д.* Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов // Успехи биол. химии. 2014. Т. 54. С. 299–348. [*Kalinina E.V., Chernov N.N., Novichkova M.D.* Rol' glutatiiona, glutatjontransferazy i glutaredoksina v regulyacii redoks-zavisimyh processov // Uspekhi biologicheskoy himii. 2014. V. 54. P. 299–348. (in Russian)]
 24. *Tebay T.E., Robertson H., Durant S.T. et al.* Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. V. 88. P. 108–146.
 25. *Osburn W.O., Kensler T.W.* Nrf2 signaling: an adaptive response pathway for protection against environmental toxic insults // *Mutat. Res.* 2008. V. 659. P. 31–39.
 26. *Kensler T.W., Wakabayashi N., Biswal S.* Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007. V. 47. P. 89–116.

27. *Taguchi K., Motohashi H., Yamamoto M.* Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution // *Genes to Cells*. 2011. V. 16. P. 123–140.
28. *Ma Q., He X.* Molecular Basis of Electrophilic and Oxidative Defense: Promises and Perils of Nrf2 // *Pharmacol. Rev.* 2012. V. 64. P. 1055–1081.
29. *Ткачев В.О., Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К.* Механизм работы сигнальной системы Nrf2/Keap1/ARE // *Биохимия*. 2011. Т. 76. № 4. С. 502–519. [*Tkachev V.O., Men'shchikova E.B., Zenkov N.K.* Mekhanizm raboty signal'noj sistemy Nrf2/Keap1/ARE // *Biokhimiya*. 2011. V. 76. № 4. P. 502–519. (in Russian)]
30. *Giudice A., Arra C., Turco M.C.* Review of molecular mechanisms involved in the activation of the Nrf2–ARE signaling pathway by chemopreventive agents // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 647. P. 37–74.
31. *Raghunath A., Sundarraja R., Nagarajan R. et al.* Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications // *Redox Biol.* 2018. V. 17. P. 297–314.
32. *Ma Q.* Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity // *Annu. Rev. Pharm. Toxicol.* 2013. V. 53. P. 401–426.
33. *Меньщикова Е., Ткачев В.О., Зенков Н.К.* Редокс-чувствительная сигнальная система Nrf2/ARE и ее роль при воспалении // *Молек. биология*. 2010. Т. 44. № 3. С. 389–404. [*Men'shchikova E., Tkachev V.O., Zenkov N.K.* Redoks-chuvstvitel'naya signal'naya sistema Nrf2/ARE i ee rol' pri vospalenii // *Molekulyarnaya biologiya*. 2010. V. 44. № 3. P. 389–404. (in Russian)]
34. *Ahmed S.M.U., Luo L., Namani A.* Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation // *Biochim. Biophys. Acta*. 2017. V. 863. P. 585–597.
35. *Lu M.C., Ji J.A., Jiang Z.Y., You Q.D.* The Keap1–Nrf2–ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target: An Update // *Med. Res. Rev.* 2016. V. 36. № 5. P. 924–63.
36. *Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Ткачев В.О.* Редокс-чувствительная сигнальная система Keap1/Nrf2/ARE как фармакологическая мишень // *Биохимия*. 2013. Т. 78. № 1. С. 27–47. [*Zenzkov N.K., Men'shchikova E.B., Tkachev V.O.* Redoks-chuvstvitel'naya signal'naya sistema Keap1/Nrf2/ARE kak farmakologicheskaya mishen' // *Biokhimiya*. 2013. V. 78. № 1. P. 27–47. (in Russian)]
37. *Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T.* The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism // *Trends Biochem. Sci.* 2014. V. 39. № 4. P. 199–216.
38. *Cai Z., Lou Q., Wang F. et al.* N-acetylcysteine protects against liver injure induced by carbon tetrachloride via activation of the Nrf2/HO-1 pathway // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. V. 8. № 7. P. 8655–8662.
39. *Ajit D., Simonyi A., Li R. et al.* Phytochemicals and botanical extracts regulate NF- κ B and Nrf2/ARE // *Neurochem. Int.* 2016. V. 97. P. 49–56.
40. *Smith R.E., Tran K., Smith C.C.* The Role of the Nrf2/ARE Antioxidant System in Preventing Cardiovascular Diseases // *Diseases*. 2016. V. 4. P. 1–20.
41. *Ben-Dor A., Steiner M., Gheber L. et al.* Carotenoids activate the antioxidant response element transcription system // *Mol. Cancer Ther.* 2005. V. 4. № 1. P. 177–186.
42. *Cao W., Xu X., Jia G. et al.* Roles of spermine in modulating the antioxidant status and Nrf2 signalling expression in the thymus and spleen of suckling piglets – new insight // *Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 2018. V. 102. P. e183–e192.
43. *Zhai X., Lin M., Zhang F. et al.* Dietary flavonoid genistein induces Nrf2 and phase II detoxification gene expression via ERKs and PKC pathways and protects against oxidative stress in Caco-2 cells // *Mol. Nutr. Food Res.* 2013. V. 57. № 2. P. 249–59.
44. *Pilar Valdecantos M., Prieto-Hontoria P.L., Pardo V. et al.* Essential role of Nrf2 in the protective effect of lipoic acid against lipoapoptosis in hepatocytes // *Free Radic. Biol. Med.* 2015. V. 84. P. 263–278.
45. *Li L., Du J., Lian Y. et al.* Protective Effects of Coenzyme Q10 Against Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress in PC12 Cell: The Role of Nrf2 and Antioxidant Enzymes // *Cell Mol. Neurobiol.* 2016. V. 36. № 1. P. 103–111.
46. *Михайленко А.А., Базанов Г.А., Покоровский В.И., Коненков В.И.* Профилактическая иммунология. М.: Тверь, ООО “Триада”, С. 272–278. [*Mihajlenko A.A., Bazanov G.A., Pokorovskij V.I., Konenkov V.I.* Profilakticheskaya immunologiya. M.: Tver', ООО “Triada”. 272–278 p. (in Russian)]
47. *Соколова Г.В., Сеницын М.Б., Кожмякин Л.А., Перельман М.И.* Глутоксим в комплексной терапии туберкулеза // *Антибиотики и химиотерапия*. 2002. № 7. С. 20–23. [*Sokolova G.V., Sinicyn M.B., Kozhemyakin L.A., Perel'man M.I.* Glutoksim v kompleksnoj terapii tuberkuleza // *Antibiotiki i himioterapiya*. 2002. № 7. P. 20–23. (in Russian)]
48. *Гребенюк А.Н., Рейнюк В.Л., Антушевич А.Е. и др.* Эффективность нейропептида и гепатопротекторов пептидной и непептидной природы в терапии острых крайне тяжелых отравлений этиловым спиртом // *Вест. Рос. воен.-мед. академии*. 2014. Т. 45. № 1. С. 136–145. [*Grebennyuk A.N., Rejnyuk V.L., Antushevich A.E. et al.* EHffektivnost' nejropeptida i gepatoprotektorov peptidnoj i nepetidnoj prirody v terapii ostryh krajne tyazhelyh otravlenij ehtilovym spirtom // *Vest. Ros. voen.-med. akademii*. 2014. V. 45. №1. P. 136–145. (in Russian)]
49. *Бакулин И.С., Захарова М.Н.* Липоевая кислота в патогенетической терапии диабетической полиневропатии: обзор экспериментальных и клинических исследований // *Нервные болезни*. 2017. № 2. С. 3–9. [*Bakulin I.S., Zaharova M.N.* Lipoevaya kislota v patogeneticheskoy terapii diabeticheskoy polinevropatii: obzor ehksperimental'nyh i klinicheskikh issledovanij // *Nervnye bolezni*. 2017. № 2. P. 3–9. (in Russian)]
50. *Böhm V.* Lycopene and heart health // *Mol. Nutr. Food Res.* 2012. V. 56. № 2. P. 296–303.
51. *Patt H.M., Tyree E.B., Straube R.L.* Cysteine protection against X-irradiation // *Science*. 1949. V. 110. P. 213–214.
52. *D'Autr'eaux B., Toledano M.B.* ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis // *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2007. V. 8. № 10. P. 813–824.

53. *Milvy P.* On the Mechanism of Radioprotection by Cysteine and Cysteamine: ESR Studies of Irradiated Binary and Ternary Systems of DNA and TMP // *Radiat. Res.* 1971. V. 48. № 2. P. 206–215.
54. *Schmidt E.E.* Interplay between cytosolic disulfide reductase systems and the Nrf2/Keap1 pathway // *Biochem. Society Transactions.* 2015. V. 43. № 4. P. 632–638.
55. *Ткаченко А.Г., Федотова М.В.* Зависимость защитных функций полиаминов *Escherichia coli* от стрессорных воздействий супероксидных радикалов // *Биохимия.* 2007. Т. 72. № 1. С. 128–136. [*Tkachenko A.G., Fedotova M.V.* Zavisimost' zashchitnykh funkcij poliaminov *Escherichia coli* ot stressornykh vozdeystvij superoksidnykh radikalov // *Biohimiya.* 2007. V. 72. № 1. P. 128–136. (in Russian)]
56. *Кузнецов В.В., Радюкина Н.Л., Шевякова Н.И.* Полиамины при стрессе: биологическая роль, метаболизм и регуляция // *Физиология растений.* 2006. Т. 53. С. 658–683. [*Kuznetsov V.V., Radyukina N.L., Shevyakova N.I.* Poliaminy pri stresse: biologicheskaya rol', metabolizm i regulyaciya // *Fiziologiya rastenij.* 2006. V. 53. P. 658–683. (in Russian)]
57. *Weiss J.F., Landauer M.R.* Protection against ionizing radiation by antioxidant nutrients and phytochemicals // *Toxicology.* 2003. V. 189. № 1–2. P. 1–20.
58. *Тарумов Р.А., Башарин В.А., Гребенюк А.Н.* Противолучевые свойства современных антиоксидантов // *Рентгенология и радиология.* 2012. Т. 13. С. 682–700. [*Tarumov R.A., Basharin V.A., Grebenyuk A.N.* Protivoluchevye svojstva sovremennykh antioksidantov // *Rentgenologiya i radiologiya.* 2012. V. 13. P. 682–700. (in Russian)]
59. *Motahari M., Sadeghizadeh M., Behmanesh M et al.* Generation of stable ARE- driven reporter system for monitoring oxidative stress // *DARU J. Pharm. Sci.* 2015. V. 23. P. 1–7.
60. *Wang X.J., Hayes J.D., Wolf C.R.* Generation of a Stable Antioxidant Response Element–Driven Reporter Gene Cell Line and Its Use to Show Redox–Dependent Activation of Nrf2 by Cancer Chemotherapeutic Agents // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 15. P. 10983–10994.

Study of the Prooxidant and Antioxidant Activity of Anti-radiation Agents with lux-Biosensors

S. K. Abilev^{a,#}, D. A. Sviridova^a, A. N. Grebenyuk^b, E. V. Igonina^a, and S. V. Smirnova^a

^aVavilov Institute General Genetics, Moscow, Russia

^bPavlov First Saint Petersburg State Medical University, Saint Petersburg, Russia

[#]E-mail: abilev@vigg.ru

Effects of 29 substances, including known antioxidants, antiradiation agents, amino acids and vitamins, on the luminescence intensity of *E. coli* K12: MG1655 (pSoxS-lux) and MG1655 (pKatG-lux) bacterial cells induced by paraquat and peroxide, respectively, have been studied. Luminescence of biosensors occurs as a result of activation of the soxS and katA gene promoters in response to an increase in the concentration of superoxide radical and H₂O₂ in the cell. In the case of the antioxidant effect exerted by the substance under study, the intensity of the induced luminescence decreases, and in the case of a prooxidant effect, the luminescence intensity increases. Antioxidant activity was demonstrated by 23 of 29 substances (79%) on the pKatG-lux biosensor and 22 of 29 substances (76%) on the pSoxS-lux biosensor. The studied antiradiation agents (10 substances) showed different degrees of pro- and antioxidant activity. Glutathione disulfide, lithium salt, glutoxim, genistein and indraline (B-9) significantly reduced the level of induced luminescence in both biosensors, whereas magnesium salt of glutathione disulfide, zinc salt of reduced glutathione, and molixane – only in pSoxS-lux biosensor, cistamine and AED-5 – in pKatG-lux biosensor. Among anti-radiation agents, a high prooxidant activity on the pKatG-lux biosensor at low concentrations was shown by lithium and magnesium salts of glutathione disulfide, zinc salt of reduced glutathione, molixane and indralin (B-190); on the pSoxS biosensor – genistein, cystamine and 5-AED. The applicability of lux-biosensors for primary evaluation of the potential antioxidant and radioprotective activity of chemical compounds is discussed.

Keywords: irradiation, antioxidant, radioprotector, antiradiation agents, antioxidant activity, prooxidant activity, lux-biosensor