

ЛАБИЛЬНОСТЬ ЗАЩИТНОЙ СИСТЕМЫ КЛЕТКИ Nrf2/Keap1/ARE В РАЗЛИЧНЫХ МОДЕЛЯХ КЛЕТОЧНОГО СТАРЕНИЯ И ВОЗРАСТНЫХ ПАТОЛОГИЯХ

Обзор

© 2022 Г.А. Шиловский^{1,2,3}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, 119991 Москва, Россия;
электронная почта: gregory_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия

³ Институт проблем передачи информации РАН, 127051 Москва, Россия

Поступила в редакцию 11.11.2021

После доработки 10.12.2021

Принята к публикации 10.12.2021

Известно, что с возрастом в организме растёт уровень окислительного стресса. Накопление повреждений, приводящее к нарушению целостности генома, может быть причиной развития многих возрастных заболеваний и появления фенотипических и физиологических признаков старения. В связи с этим большой интерес вызывает система Nrf2, регулирующая экспрессию многочисленных ферментов, ответственных за антиоксидантную защиту и детоксикацию. В обзоре обобщены и проанализированы данные, касающиеся изменений системы Nrf2 при старении *in vivo* и *in vitro* в различных органах и тканях. Анализ литературы позволяет сделать вывод, что способность Nrf2 к активации (запускаемая повышенным уровнем окислительного стресса) неуклонно снижается с возрастом. В то же время динамика активности Nrf2, измеряемая в бесстрессовых условиях, такой чёткой направленности не имеет: во многих работах приведённые различия статистически недостоверны, хотя точно известно, что при старении уровень окислительного стресса неуклонно повышается. В обзоре рассматривается роль существующих в клетке систем регуляции, ограничивающих способность Nrf2 реагировать на окислительный стресс. Стареющие клетки уязвимы к окислительному повреждению из-за нарушения передачи сигналов Nrf2, и активация пути Nrf2 является перспективной мишенью для новых фармакологических или генетических терапевтических стратегий. Супрессоры экспрессии Nrf2, такие как Keap1, с-Mus, Gsk3 и Bach1, могут способствовать возрастному нарушению индуцибельности Nrf2-регулируемых антиоксидантных генов. Понимание механизмов взаимодействия регуляторных каскадов, связывающих программы поддержания гомеостаза и ответа клетки на окислительный стресс, способствует выяснению молекулярных механизмов, лежащих в основе старения и долголетия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Nrf2, Keap1, старение, продолжительность жизни, окислительный стресс, возрастные нарушения, антиоксиданты.

DOI: 10.31857/S0320972522010067

ВВЕДЕНИЕ

Продолжительность жизни (ПЖ) является такой же устойчивой видовой характеристикой, как размеры тела или плодовитость. Её длительность, а также механизмы, её обеспечивающие, должны быть хотя бы частично запрограммиро-

ваны в геноме [1–3], несмотря на то что, с эволюционной точки зрения, первоочередной эволюционной «задачей» для живых организмов является не долголетие как таковое, а проблемы адаптации к окружающей среде, связанные с нуждами выживания, обеспечения пищи и размножения. К внутренним факторам, опреде-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ПЖ – продолжительность жизни; УКП – удвоение клеточной популяции; ARE – антиоксидант-респонс(ив)ный элемент (antioxidant response element); Bach1 – белок BTV domain and CNC homolog 1; Gcl – глутаматцистеинлигаза; Gclc – каталитическая субъединица глутаматцистеинлигазы (glutamate-cysteine ligase catalytic); Gclm – регуляторная субъединица глутаматцистеинлигазы (glutamate-cysteine modifier); GSK3 – киназа гликогенсинтазы 3; Ho-1 – гемоксигеназа 1; Keap1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок-1 (Kelch-like ECH-associated protein 1); NIHL – потеря слуха, вызванная шумом (noise-induced hearing loss); Nqo1 – NAD(P)H:хиноноксидоредуктаза 1; Nrf2 – транскрипционный фактор 2 семейства NFE (nuclear factor erythroid 2-related factor 2); NSPC – предшественники стволовых нервных клеток (neural stem progenitor cells); RPE – пигментный эпителий сетчатки; VSMC – гладкомышечные клетки сосудов (vascular smooth muscle cells).

ляющим ПЖ и форму кривых выживания (*pace and shape of aging*), относятся программы старения и антистарения, представляющие собой, по современным представлениям, совокупность сигнальных генных каскадов [4]. Регуляция поддержания гомеостаза и репарации представляет собой сложную сеть взаимосвязанных реакций, а эффективность этих процессов ухудшается с возрастом [1–6]. Nrf2 (nuclear erythroid 2-related factor 2) является ключевым фактором транскрипции, участвующим в поддержании окислительно-восстановительного баланса клеток и передаче сигналов, и играет центральную роль в снижении внутриклеточного окислительного стресса, замедлении старения клеток и предотвращении возрастных заболеваний [4–9].

Nrf2, кроме всего прочего, является основным регулятором клеточного гомеостаза, который контролирует поддержание стабильности генома. Он регулирует экспрессию более 1% генов человека, связанных с реакциями биотрансформации, редокс-гомеостазом, энергетическим метаболизмом, репарацией ДНК и протеостазом, а также регуляцией транскрипции антиоксидантных и детоксицирующих ферментов, которые в совокупности представляют собой мощную защитную систему клетки [4, 5]. Общей характеристикой таких генов является наличие последовательности(-ей) ARE (antioxidant response element) в промоторном участке. Активность Nrf2 оказывает огромное влияние на самые разные физиологические и патологические процессы, поэтому он подвергается строгой регуляции в основном на уровне стабильности белка. Nrf2 активируется окислительными стрессорами и электрофильными агентами. Продукты его генов-мишеней регулируют множество защитных функций, в том числе – детоксикацию лекарств, пентозофосфатный шунт и аутофагию [7]. Nrf2 регулирует синтез глутатиона, а также ферментов, участвующих в его гомеостазе, а именно: каталитическую (Gclc) и регуляторную глутаматцистеинмодифицирующую (Gclm) субъединицы глутаматцистеинлигазы (Gcl), которые, объединяясь, образуют гетеродимер Gcl. Nrf2 также опосредует индукцию некоторых других классов антиоксидантных белков (например, тиоредоксина, пероксиредоксина, сульфиредоксина, ферритина, металлотионеина и гемоксигеназы 1 (Ho-1)) и опосредует индукцию ферментов, метаболизирующих лекарственные средства фазы I и фазы II (например, альдо-кеторедуктазы, глутатион-S-трансферазы и NAD(P)H:хинооксидоредуктазы 1 (Nqo1)) [10]. Также Nrf2 непосредственно ингибирует индуцированную экспрес-

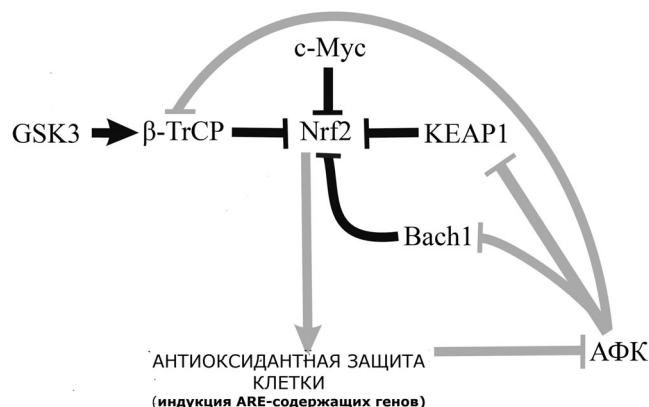


Рис. 1. Схема регуляции транскрипционного фактора Nrf2, управляющего экспрессией более чем 200 цитопротекторных ферментов, ответственных за детоксикацию и антиоксидантную защиту. Активация Nrf2 вызывается действием активных форм кислорода (АФК). В то же время активируемая многими сигнальными путями киназа гликогенсинтазы 3 (GSK3) оказывает подавляющее действие, ингибируя транскрипционный фактор Nrf2. Светлыми линиями обозначены эффекты, стимулирующие активность Nrf2 (и последующую экспрессию антиоксидантных ферментов); темными линиями – ингибиторов Nrf2. Стрелкой обозначено прямое стимулирующее воздействие, включая катализ; линией с тупым концом обозначено ингибирующее действие. АФК – активные формы кислорода; Bach1 – белок BTB domain and CNC homolog 1; GSK3 – киназа гликогенсинтазы 3; Keap1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1); Nrf2 – NFE2-related factor 2 (транскрипционный фактор 2 семейства NFE); β-TrCP – белок, содержащий β-трансдуциновые повторы (β-transducin repeat containing protein)

сию различных генов, связанных с воспалением, посредством связывания с их проксимальными регуляторными областями [11]. Всё это позволяет считать его компонентом особой антивозрастной программы – хранителем периода здоровой жизни и долголетия [5]. Согласно Skulachev et al. [4], транскрипционный фактор Nrf2 является представителем одной из наиболее явных клеточных программ антистарения (рис. 1).

В предыдущем обзоре [9] мы уделили внимание защитной системе Nrf2/Keap1/ARE и её регуляции со стороны системы циркадных биоритмов. Целью данной работы является анализ данных о возрастных изменениях защитной системы Nrf2/Keap1/ARE в контексте программ старения и антистарения.

С возрастом происходит ухудшение работы антиоксидантных систем клетки, в том числе и пути Nrf2/ARE, что приводит к снижению уровня экспрессии генов-мишеней Nrf2 [5, 8, 12–17]. Это приводит к повышению уровня активных форм кислорода (АФК) в тканях, истощению глутатиона и повышенному окислитель-

ному повреждению белков, ДНК и липидов [12, 13]. Наряду с этим растёт уровень экспрессии генов-мишеней NF-κB, таких как молекула межклеточной адгезии 1 (ICAM-1) и интерлейкин-6 (IL-6) [14, 18].

Активация пути Nrf2 состоит из нескольких стадий, включая экспрессию и синтез белка Nrf2, его транспорт в ядро, связывание с элементом ARE соответствующего гена-мишени (в том числе и самого Nrf2), а затем экспрессии гена-мишени и синтеза соответствующего белка. Предлагаемый в настоящей работе количественный анализ возрастной динамики активности различных компонентов пути Nrf2 в различных органах и тканях позволит выявить наиболее чувствительные к возрастным изменениям стадии этого процесса и позволит предположить, какие ткани и при каких условиях эксперимента наиболее устойчивы к окислительному стрессу за счёт индукции экспрессии генов-мишеней Nrf2, а также оценить степень компенсации возрастных нарушений работы этого пути за счёт различных препаратов-активаторов Nrf2.

Большое число работ посвящено сравнению уровня экспрессии мРНК и белка Nrf2 и способности его к активации в ответ на окислительный (электрофильный) стресс в препаратах, полученных из различных тканей линейных крыс (Fischer и Sprague-Dawley) и мышей (C57BL/6J) разного возраста [5, 8, 12–15, 17]. Этот показатель, по существу, определяет уровень активных антиоксидантных ферментов, борющихся с окислительным стрессом, усиливающимся в клетках при старении *in vitro* и *in vivo*. Обычно в качестве свидетельства активации Nrf2 судят по активности трёх антиоксидантных ферментов: Nqo1, Ho-1 и двух субъединиц Gcl (Gclc и Gclm). Ещё одной характеристикой функциональной активации Nrf2 является увеличение количества белка Nrf2, перемещённого в ядро.

Ниже мы приводим обзор работ, посвящённый возраст-зависимой экспрессии белка и мРНК Nrf2 и его генов-мишеней в различных органах и тканях. Обсуждаемые здесь исследования на грызунах охватывают различные возрастные периоды жизни, которые обычно составляют 28–32 мес. Важно, что животные, называемые «старыми», могут сильно различаться по возрасту в разных работах. Для мышей возрастные изменения можно представить как период созревания (2–5 мес.) и период «среднего возраста» (12–24 мес.), которые характеризуются низким уровнем смертности и заболеваемости раком, гломерулонефритом и другими дегенеративными заболеваниями. В возрасте

24–26 мес. хронические дегенеративные заболевания и смертность резко возрастают [16]. Поэтому более старых мышей исследуют редко, чтобы свести к минимуму возможное влияние на общее состояние организма развившейся острой/хронической патологии того или иного органа. Считается, что при здоровом старении (healthy aging) по физиологическому возрасту 6-месячная мышь эквивалентна 30-летнему человеку, в то время как 21-месячная мышь эквивалентна 60-летнему человеку [16]. Также отметим, что практически все приведённые в литературе данные по изменению активности и экспрессии Nrf2 являются результатами не лонгитудинальных, а поперечных (cross-sectional) исследований, поэтому, хотя мы, следуя сложившейся в литературе традиции, и будем пользоваться термином «изменение активности и экспрессии Nrf2 с возрастом», надо подчеркнуть, что речь идёт о сравнении этого показателя у животных разного возраста.

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА И мРНК Nrf2 И ЕГО ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ В РАЗЛИЧНЫХ ОРГАНАХ И ТКАНЯХ

Печень. Shih и Yen [19] изучали уровень экспрессии Nrf2 (с помощью Вестерн-блоттинга), уровень окислительного стресса, а также активность и уровень экспрессии Nrf2 в экстрактах печени 2-, 12- и 18–24-мес. крыс линии Sprague-Dawley. Эти исследования особенно интересны, так как печень характеризуется наиболее высоким уровнем антиоксидантных и детоксифицирующих ферментов, экспрессия которых находится под контролем Nrf2. С возрастом увеличивается уровень окислительного стресса: карбонилирование белка становится в 1,5 раза выше у 12-мес. крыс и в 3 раза – у 18–24-мес. крыс, тогда как показатель перекисного окисления липидов (уровень TBARS [thiobarbituric acid reactive substances]) выше в 1,5 раза в возрасте 18–24 мес. по сравнению с 2-мес. крысами. При этом активность Nqo1 монотонно снижается с возрастом и составляет ~5000 нмоль/мин/мг белка у 2-мес. крыс, ~3000 – у 12-мес. крыс и ~1000 – у 18–24-мес. крыс ($p < 0,05$). Активность каталазы не различается у 2- и 12-мес. крыс (~20 нмоль/мин/мг белка), а у 18–24-мес. составляет ~15 нмоль/мин/мг белка; ($p < 0,05$). При этом у 2- и 12-мес. крыс уровень экспрессии антиоксидантных ферментов не отличается достоверно, но у 18–24-мес. крыс он составляет 53%, 60%, 62%, 69% и 72% (для глутатионпероксидазы, глутатионредуктазы, Nqo1 и каталазы соответственно) по сравнению с 2-мес. крысами

($p < 0,05$). При этом уровень экспрессии Nrf2 в печени также *не различается* у 2- и 12-мес. крыс; а для крыс 18–24 мес. – более чем в 2 раза *ниже* по сравнению с 2-мес. животными ($p < 0,05$).

Сходные результаты получены в работе Suh et al. [12], показавшими (Вестерн-блоттинг) снижение общего уровня Nrf2 (на 56,2%, $p < 0,001$) с одновременным сопоставимым снижением ядерного (т.е. транскрипционно активного) (на 51,7%, $p < 0,0001$) уровня Nrf2 у старых крыс Fischer 344 (24–28 мес.) по сравнению с молодыми (2–5 мес.). Связывание Nrf2 с консенсусной последовательностью ARE в ядерных экстрактах печени старых крыс также было *ниже* (примерно на 40%), чем у молодых животных (анализ гель-шифт). Снижение транскрипционной активности Nrf2 вызывает снижение синтеза глутатиона [12].

В одном из самых объёмных исследований, проведённом Xu et al. [17], изучали изменение работы системы Nrf2 в образцах печени крыс Sprague-Dawley, собранных в 11 возрастных точках (пренатальные (–2), а также 1, 7, 14, 21, 28, 35, 60, 180, 540 и 800 сут. после рождения). Показали, что экспрессия мРНК, определяемая RT-PCR этих генов (*Gclm*, *Nqo1*, *Ho-1*), равно как и Nrf2 и Kelch-подобного ECH-ассоциированного белка-1 (Keap1), была высокой в печени плода, снижалась при рождении, достигала первого пика в семидневном возрасте и затем постепенно снижалась до 6-месячного возраста ($p < 0,001$). Экспрессия всех этих генов оставалась на высоком уровне до возраста 18 мес., но затем снижалась до возраста 26 мес. Экспрессия белков (Вестерн-блоттинг) Nrf2, Nqo1, Ho-1, Gclc и Gclm изменялась сходным образом.

Smith et al. [20] показали, что в культивируемых гепатоцитах молодых (4–6 мес.) и старых (24–28 мес.) крыс Fischer 344 нет различий в уровне мРНК *Nrf2* ($p > 0,05$). При этом содержание белка Nrf2 и базальная и индуцированная анетолтретионом (АЗТ) экспрессия Nrf2-зависимых генов была *ниже* в гепатоцитах старых животных. И, наоборот, сверхэкспрессия Nrf2 в клетках старых животных восстанавливала индукцию генов. Дополнительная серия экспериментов позволила выявить шесть микроРНК, содержание которых увеличивается с возрастом более чем в 2 раза ($p < 0,05$). Предполагается, что одна из них, miRNA-146a, связывает мРНК Nrf2. Трансфекция гепатоцитов молодых крыс-миметиком miRNA-146a вызывала ослабление трансляции Nrf2 на 55%, что соответствовало возрастной потере Nrf2 [20].

Спинальный мозг. Duan et al. [8] изучали возрастные изменения экспрессии белков Nrf2, Ho-1, Nqo1 с использованием моделей *in vitro* и *in vivo*.

Уровень белка Nrf2, а также белка Ho-1 (определяемых с помощью Вестерн-блоттинга) в астроцитах спинного мозга у 13-мес. мышей C57Bl6/J был вдвое *ниже*, чем у 1-мес. животных ($p < 0,05$). При этом не было выявлено различий в этих показателях у 1- и 5-мес. животных. Также не было выявлено достоверных различий в уровне экспрессии Nqo1 во всех исследованных возрастах. Кроме того, сравнивали уровни экспрессии этих белков в стационарной культуре астроцитов спинного мозга после 14, 30 и 60 сут. культивирования (с заменой среды 2 раза в неделю). Уровень экспрессии белка Nrf2 (а также белка Nqo1) в 60-сут. астроцитах был вдвое *ниже*, чем в 14-сут. клетках ($p < 0,05$). При этом достоверных различий в этих показателях в 14- и 30-сут. клетках выявлено не было. В отличие от Nqo1, уровень экспрессии белка Ho-1 в 30- и 60-сут. астроцитах был в 2,3 и 4 раза *ниже*, чем в 14-сут. клетках ($p < 0,05$).

Бронхи. Используя (видимо, впервые) первичные эпителиальные клетки бронхов человека от доноров разных возрастов, Zhou et al. [21] подтвердили предыдущие исследования других авторов, проведённые на животных, и показали, что базальная экспрессия белка NRF2 *ниже* у пожилых людей (60–69 лет), чем у молодых (25–29 лет). В то же время базальная экспрессия трёх репрезентативных генов-мишеней NRF2 (*GCLC*, *GCLM* и *NQO1*) была *выше* у пожилых, чем у молодых [21].

Мышцы. С возрастом у крыс Fischer 344 накапливаются дефектные митохондрии с повреждением митохондриальных крист, набуханием и образованием внутримитохондриальных вакуолей [22]. Уровень АФК был в 1,36 раза выше в ткани языка у старых крыс (22 мес.), чем у молодых (7 мес.), $p = 0,001$, а уровень белка Nrf2 (Вестерн-блоттинг) – в 1,75 раза *ниже* у старых животных (22 мес.) по сравнению с молодыми (7 мес.), $p = 0,021$ [22].

Сердечно-сосудистая система. С возрастом уменьшается активность связывания Nrf2–ARE в сердце [23]. Вестерн-блоттинг выявил почти трехкратное снижение уровня Nrf2 с возрастом ($1,0 \pm 0,18$ в ядерных экстрактах миокарда молодых мышей C57/Bl6/SJ (2 мес.) по сравнению с $0,35 \pm 0,12$ у старых (>23 мес.)). Также в сердце на 40% снижена экспрессия антиоксидантных генов-мишеней [23].

Возрастная дисфункция Nrf2 в эндотелиальных клетках изменяет передачу сигналов и способствует развитию сосудистых заболеваний [24]. Индукция программ старения в мозговых артериях связана с активацией широкого спектра воспалительных цитокинов и хемокинов, вносящих вклад в развитие ассоциированного

со старением секреторного фенотипа (SASP). Уровень экспрессии молекулярных маркеров старения (p16INK4a, p21) выше в мозговых артериях старых (24 мес.) мышей C57BL/6J, по сравнению с молодыми (3 мес.) [25].

Ungvari et al. [14] сравнивали уровень экспрессии мРНК и белка Nrf2 и его генов-мишеней в аорте 3-, 12-, 18-, 24- и 28-месячных крыс Fischer 344x Brown Norway (F344xBN). Анализ интенсивности ядерной флуоресценции с помощью редокс-чувствительного флуоресцентного красителя дигидроэтидия (dihydroethidium, DHE) показал значительное возрастное увеличение продукции O_2^- в аорте крыс. Показали, что в сосудах старых крыс наблюдается преимущественно цитоплазматическое окрашивание на Nrf2, тогда как окрашивание на Nrf2 в ядре гораздо менее выражено, и этот показатель сходен в артериях молодых и старых животных (3 мес.). Таким образом, с возрастом сокращается именно ядерная фракция Nrf2, ответственная за связывание с ARE и активацию транскрипции ферментов антиоксидантной защиты и II фазы детоксикации. Уровень связывания Nrf2 с ARE (определяемый ELISA) в ядерных экстрактах артерий был вдвое *ниже* у 12-мес. крыс по сравнению с 3-мес. и сохранялся на этом уровне во всех исследованных возрастах ($p < 0,05$). Содержание ядерного Nrf2 в аорте снижается с возрастом параллельно со снижением общего (цитоплазма + ядро) уровня Nrf2, однако достоверное ($p < 0,05$) снижение мРНК (70% от уровня, характерного для 3-мес. крыс) и белка Nrf2 (30% от уровня, характерного для 3-мес. крыс) наблюдается лишь начиная с возраста 24 мес. Сходную возрастную динамику экспрессии мРНК (RT-PCR) и белка (Вестерн-блоттинг) наблюдали и для генов-мишеней Nrf2. У 24-мес. крыс по сравнению с 3-мес. крысами уровень экспрессии мРНК Gclc снижен до 60% ($p < 0,05$). Снижение уровня экспрессии мРНК Nqo1 и Ho1 до 70% и 60% соответственно было достоверным уже для 12-мес. животных ($p < 0,05$ по сравнению с 3-мес. крысами). Уровень экспрессии белка Gclc был снижен до ~70%, а Nqo1 — до 25% у 24-мес. крыс по сравнению с 3-мес. [14]. Ungvari et al. наблюдали, что базальный уровень мРНК Gclc в сегменте аорты оставался стабильным с 3 до 18 мес. и начинал снижаться с 24 мес. и индуцировался в ответ на H_2O_2 у молодых (3 мес.), но не старых (24 мес.) крыс.

В другом исследовании, проведенном в этой же лаборатории и с использованием тех же подходов, обнаружили значительное увеличение с возрастом уровня окислительного стресса [15]. В сонных артериях старых ($22,2 \pm 1,7$ года) ма-

как-резус *Macaca mulatta* по сравнению с молодыми ($10,5 \pm 0,9$ года) в 6 раз выше содержание 8-изо-PGF2 α (8-изопростагландин F2 α , биомаркера перекисного окисления липидов). Также у них в 1,8 раза выше уровень 4-HNE (4-гидрокси-2-ноненаль [окисленный вторичный продукт, который образует стабильный аддукт с белками]) и усилено воспаление (повышена активность NF- κ B). Уровень антиоксидантов глутатиона и аскорбата при этом ниже соответственно в 4 и 8 раз у старых животных, чем у молодых. Однако это возрастное усиление окислительного стресса не вызывало активации Nrf2 (отсутствовали достоверные различия в уровне мРНК и белка Nrf2 и его генов-мишеней (Nqo1, Gclc и Ho-1). Возможно, это является следствием возраста сравниваемых животных (обезьяны, названные старыми, прожили лишь около половины своей видовой ПЖ) [15].

Основные данные по возрастному изменению активности Nrf2 приведены в таблице (см. далее). Видно, что, несмотря на данные промежуточных возрастов (возрастную динамику) и различия в выбранных возрастах [самых] молодых и старых животных, с возрастом практически во всех исследованных тканях имеет место снижение экспрессии мРНК и белка Nrf2 (и его генов-мишеней) в 2–4 раза. Наибольшее снижение показано для мышц, что соответствует их статусу наиболее метаболически активной ткани. Наиболее устойчивыми к уменьшению уровня Nrf2 оказываются, по всей видимости, клетки сосудистого эндотелия (таблица). Примечательно, что при получении из тканей разного возраста первичных культур (т.е. смены окружения) результаты могут быть прямо противоположными (см., например, [13, 21, 26–28]). В клетках, полученных из тканей старых животных, уровень мРНК и белка Nrf2 будет *выше*, чем в клетках от молодых животных, что согласуется с тем представлением, что Nrf2 активируется (а большинство регулирующих его систем в клетке инактивируются) окислительным стрессом (рис. 1). Аналогично, более высокому уровню окислительного стресса должны соответствовать и более высокий уровень Nrf2, и более высокий уровень продуктов индуцируемых им генов антиоксидантной защиты. Ещё одним интересным примером влияния окружения на систему Nrf2 являются физические упражнения. Так, в работе Safdar et al. [13] показано, что у пожилых (~70 лет) людей, ведущих активный образ жизни, уровень белка NRF2 не только не снижается по сравнению с таковым у взрослых, но даже повышается. Аналогичные данные получены для получающих физическую нагрузку крыс [26].

ВОЗРАСТНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ СПОСОБНОСТИ СИСТЕМЫ Nrf2/ARE К АКТИВАЦИИ ПОД ВЛИЯНИЕМ ЭКЗОГЕННОГО И ЭНДОГЕННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

Культивирование клеток на среде с глюкозой.

С возрастом меняется способность клеток реагировать на окислительный стресс и способность к активации Nrf2 (как главного регулятора высокоскоординированного антиоксидантного ответа). В упомянутой выше работе Ungvari et al. [15], в культивируемых на ранних (четвёртом-пятом) пассажах клетках гладких мышц сосудов (vascular smooth muscle cells, VSMC) из молодых ($10,5 \pm 0,9$ года) *Macaca mulatta*, обработка глюкозой в высокой концентрации (30 мМ) или H_2O_2 (14–100 мкМ) значительно увеличивает транскрипционную активность Nrf2 и усиливает экспрессию генов-мишеней Nrf2. Напротив, в культивируемых клетках гладких мышц сосудов, полученных от старых макаков ($22,2 \pm 1,7$ года), индуцированная H_2O_2 и глюкозой в высокой концентрации, активность Nrf2 и экспрессия генов-мишеней Nrf2 не выражена. Это говорит о сниженной способности клеток старых животных реагировать на окислительный стресс. Ungvari et al. [14] изучали индукцию Nqo1 в аорте в ответ на H_2O_2 и глюкозу и обнаружили, что индукция Nqo1 снижалась в аорте старых крыс (24 мес. против 3 мес.). Также они продемонстрировали, что, хотя уровень экспрессии Nqo1 не изменялся, её индукция в ответ на H_2O_2 была невелика в сонной артерии и VSMC у старых (20 лет) по сравнению с молодыми макаками-резус (10 лет).

В VSMC, полученных от старых (24 мес.) крыс Fischer 344, уровень белка Nrf2 в ядре (но не в цитоплазме) был *выше*, чем в VSMC молодых (6 мес.) [27]. Это справедливо как для VSMC, выращенных в обычной среде (содержащей 5 мМ глюкозы) ($p = 0,02$), так и в среде с высоким содержанием глюкозы (12,5 мМ, $p = 0,01$). В VSMC, подвергнутых воздействию глюкозы (25 мМ, 24 ч), связывание Nrf2 с ARE было на $54,5 \pm 14,1\%$ *выше* в VSMC старых крыс; в то время как в контрольных VSMC (выращенных на 5 мМ глюкозе) оно было на $33,5 \pm 17,4\%$ *выше* в старом возрасте, приводя к более высокому уровню экспрессии гена *Gclc* [27]. Таким образом, у старых животных снижается как базальный ядерный уровень Nrf2, так и индукция в ответ на H_2O_2 и глюкозу.

Окислительный стресс в пигментном эпителии сетчатки (RPE). Моделирование возрастных дегенеративных изменений сетчатки важно для изучения роли окислительного стресса в патогенезе

возрастной дегенерации жёлтого пятна, одного из наиболее распространённых возрастных глазных заболеваний [28]. Sachdeva et al. [28] сравнивали RPE молодых (2 мес.) и старых (15 мес.) мышей C57Bl6/J в бесстрессовых и стрессовых (йодат натрия ($NaIO_3$, 5 мг/кг)) условиях. В бесстрессовых условиях в RPE старых (15 мес.) мышей уровень экспрессии (определяемый RT-qPCR) генов-мишеней Nrf2 (*Nqo1* и *Ho-1*) был соответственно в 11 и 10 раз *выше*, чем у молодых (2 мес.) ($p < 0,05$). Это указывает на возрастное усиление базального окислительного стресса и показывает, что RPE старых мышей более уязвимы к окислительному повреждению из-за нарушения передачи сигналов Nrf2. В RPE молодых мышей обработка $NaIO_3$ индуцировала 2,2-кратное увеличение уровня мРНК Nrf2 и соответствующее увеличение уровня транскриптов *Gclm*, *Ho-1* и *Nqo1* (в 2, 9 и 10 раз соответственно). Тем не менее $NaIO_3$ не стимулировал индукцию мРНК Nrf2 в RPE у старых мышей (15 мес.) ($p < 0,05$) [28]. Кроме того, в RPE старых мышей, подвергшихся воздействию йодата натрия, наблюдали более высокий уровень супероксид-аниона и малонового диальдегида, чем у молодых, что в совокупности свидетельствует о недостаточной защите от окислительного повреждения. Наоборот, сверхэкспрессия Nrf2 в RPE сохраняет морфологию клеток и улучшает выживаемость у мышей в моделях дегенерации сетчатки и является потенциальным терапевтическим средством для лечения заболеваний, связанных с дегенерацией RPE [29].

Компенсация возрастных изменений активаторами Nrf2. Одним из общепринятых способов компенсации такого рода снижения является применение веществ, активирующих Nrf2. Обычно это достигается за счёт применения соединений, взаимодействующих с тиольными группами цистеинов главного ингибитора Nrf2, Keap1 [7, 10, 30].

Липоевая кислота. Показано, что (R)-альфа-липоевая кислота индуцирует активацию Nrf2 *in vitro* и повышает уровень глутатиона *in vivo*, видимо, за счёт образования липоил-цистеинильных смешанных дисульфидов на ингибиторе Nrf2, Keap1, препятствующих его связыванию с Nrf2. Ещё одним предполагаемым механизмом является опосредованная через фосфорилирование протеинкиназой C активация Nrf2 [10]. У старых (24–28 мес.) крыс Fischer 344 липоевая кислота (40 мг/кг внутривенно) увеличивала уровень ядерного Nrf2, связывание Nrf2 с ARE и соответствующее повышение уровня *Gclc* (в 1,7 раза) (в то время как *Gclm* не индуцировалась), а также и активности *Gcl* (че-

рез 24 ч после введения) до уровня, наблюдаемого у молодых (2–5 мес.) животных [12].

Сульфорафан. Ещё один активатор Nrf2, содержащийся в крестоцветных изотиоцианат сульфорафан (в пище в течение 12 недель), вчетверо повышает уровень экспрессии мРНК Nrf2 (RT-qPCR) в сердце у старых мышей C57BL/6 (21–22 мес.) ($0,17 \pm 0,06$ и $0,67 \pm 0,13$; $p < 0,001$), а у молодых мышей — в 6 раз ($0,35 \pm 0,04$ и $2,12 \pm 0,50$; $p < 0,0001$), а в скелетных мышцах — в 2 раза у молодых мышей ($0,90 \pm 0,37$ и $1,77 \pm 0,82$; $p < 0,01$) и почти в 3,5 раза у старых мышей ($0,26 \pm 0,07$ и $0,90 \pm 0,40$; $p < 0,05$). Интересно отметить, что при этом уровень экспрессии Nrf2 у старых мышей, получавших сульфорафан с пищей, в 2 раза превышает (в сердце) и равен (в скелетных мышцах) уровню экспрессии Nrf2 у молодых здоровых мышей, не получавших сульфорафан. Связывание Nrf2/ARE (определяемое с помощью Nrf2-DNA-binding ELISA kit) *ниже* в 2,1 раза в сердце и в 1,9 раз в скелетных мышцах у старых мышей по сравнению с молодыми ($p < 0,001$). Сульфорафан улучшает также связывание Nrf2/ARE в 1,225 и в 1,17 раза ($p < 0,05$) у молодых мышей (в сердце и скелетных мышцах соответственно). Интересно, что, хотя уровень связывания Nrf2 у старых мышей, получавших с пищей сульфорафан, увеличился в 1,67 раза в сердце ($p < 0,01$) и в 2,08 раза в скелетных мышцах ($p < 0,001$), он не достиг уровня, характерного для молодых здоровых мышей, не получавших сульфорафан. Кроме того, сульфорафан улучшает общее физическое состояние организма: сердечную функцию, способность к физической нагрузке, митохондриальную функцию, толерантность к глюкозе и активацию/дифференцировку сателлитных клеток скелетных мышц до уровня, характерного для молодых (2 мес.) мышей [31].

Трет-бутилгидрохинон. Тем не менее эффективность активации Nrf2 также зависит от возраста. Время, в течение которого Nrf2 остаётся активным, зависит от стимула, генерируемого индуктором, а также от возраста животных. Так, трет-бутилгидрохинон (tBHQ) способствует связыванию Nrf2 с ARE лишь в течение 30 мин в первичных астроцитах, полученных от старых крыс Wistar (24 мес.). В то же время астроциты, выделенные из молодых (9 мес.) крыс, поддерживают этот ответ до 180 мин [32].

Инактивация Nrf2 в моделях возрастных патологий. Miller et al. [33] показали, что уровни мРНК и белка Nqo1 были резко ($p < 0,001$) снижены в скелетных мышцах у двухмесячных мышей *Nfe2l2*^{-/-} (далее обозначаемых *Nrf2*^{-/-}) по сравнению с мышами C57/BL6х дикого типа.

У старых мышей (>24 мес.) наблюдалось значительное повышение уровня АФК, а также снижение уровня глутатиона в скелетных мышцах у *Nrf2*^{-/-} по сравнению с молодыми. Кроме того, признаки окислительного стресса (уровень АФК, HNE-позитивных белков, убиквитинирования и проапоптотических сигналов) указывают на то, что скелетная мускулатура старых мышей гораздо более уязвима к нарушению регуляции пути Nrf2. Kitaoaka et al. [34] продемонстрировали, что митохондриальные маркёры окислительного стресса (гидроксиноненаль и белковые карбонилы) были значительно повышены у старых мышей с нокаутом Nrf2 (*Nrf2*^{-/-}) из-за снижения экспрессии антиоксидантных генов Nrf2-мишеней. Митохондриальное дыхание снижалось с возрастом; однако не было различий между мышами *Nrf2*^{-/-} и дикого типа соответствующего возраста. Точно так же активность цитохромоксидазы *c* была ниже у старых мышей дикого типа и *Nrf2*^{-/-} по сравнению с молодыми мышами дикого типа. Продукция АФК митохондриями в расчёте на потребляемый кислород была увеличена у старых мышей *Nrf2*^{-/-}. Тем не менее нокаут *Nrf2* не влиял на возрастное снижение мышечной массы, приведённой к массе тела. Эти результаты предполагают, что дефицит Nrf2 усугубляет возрастной окислительный стресс митохондрий, но не влияет на снижение дыхательной функции в скелетных мышцах [34].

Возрастные нарушения слуха. Иммунореактивность Nrf2 обнаруживается у человека преимущественно в апикальной, медиальной и базальной областях, во внутренних и внешних волосковых клетках и поддерживающих клетках кортиева органа в улитке [35, 36]. Для изучения возможных возрастных различий иммунореактивности Nrf2 в кортиевом органе у людей 18–92 лет, разделённых на группу взрослых (<70 лет) и пожилых (70–92 года). Для каждого образца средние значения площади иммунореагировавшей области усредняли и подвергали одностороннему повторному анализу измерений (ANOVA). Показали, что иммунореактивность Nrf2 в кортиевом органе сохраняется и у самого старого человека в рассмотренной группе (92 года), но снижена на 20% у пожилых (в группе старше 70 лет, $p \leq 0,0372$) [36]. Потеря слуха, вызванная шумом (noise-induced hearing loss, NIHL), является одним из наиболее распространённых нейросенсорных нарушений слуха. Патогенез NIHL тесно связан с ишемическим реперфузионным повреждением улитки, которое вызвано уменьшением кровотока и выработкой свободных радикалов из-за чрезмерного шума [35]. Повреждение и потеря волосковых клеток, вызванные окислительным стрес-

сом, считаются важными причинами потери слуха и тесно связаны с антиоксидантным статусом клетки и Nrf2 [35, 36]. Нокаут *Nrf2* делает органы слуха (и волосковые клетки, в частности) гораздо более чувствительными к воздействию шума [37]. Нарушение слуха через 7 дней после воздействия были значительно больше у мышей *Nrf2*^{-/-}, чем у мышей дикого типа. Активатор Nrf2, CDDO-Im (2-циано-3,12-диоксоолеана-1,9-диен-28-имидазол), при применении до, но не после воздействия шума, сохранял целостность волосковых клеток и улучшал уровень слуха после воздействия у мышей дикого типа, но не оказывал воздействия у мышей *Nrf2*^{-/-}. Это подтверждает эффективность активации Nrf2 для предотвращения NIHЛ за счёт защиты улитки от повреждений, вызванных шумом [38].

Valcarcel-Ares et al. [39] показали, что подавление сигнального пути Nrf2 (нокдаун siRNA Nrf2 или сверхэкспрессия ингибитора Nrf2 — Keap1) нарушает ангиогенные процессы в культивируемых коронарных артериях эндотелиальных клеток человека, вызывает нарушение пролиферации и адгезии к гликопротеину витронектину и коллагену в эндотелиальных клетках коронарных артерий. Нарушение передачи сигналов Nrf2 также снижает клеточную миграцию и нарушает способность эндотелиальных клеток коронарных артерий формировать капилляроподобные структуры [39].

Клеточное старение и экспрессия молекулярных маркеров старения. Kapeta et al. [40] изучали функцию Nrf2 в модели репликативного старения фибробластов лёгких человека HFL-1. Кратко, фибробласты пересевали (1 : 2) по достижении монослоя и через определенное число удвоений клеточной популяции (УКП, определяемое по формуле $\ln(N_f/N_i)/\ln 2$, где N_f — конечное количество клеток после посева, а N_i — начальное количество посеянных жизнеспособных клеток) становятся репликативно старыми (неспособными за определенный срок удвоить свою численность). В репликативно старых фибробластах HFL-1 (42 УКП) был выше уровень окислительного стресса и признаков старения (процент клеток, окрашиваемых на ассоциированную со старением β -галактозидазу, и уровень экспрессии белков-маркеров старения (p16INK4a, p21)) [40]. Также в HFL-1 снижены уровень белка (~65%) и мРНК (45%) Nrf2 по сравнению с молодыми, а также уровень экспрессии *Nqo1*, гена-мишени Nrf2. В дополнительной серии экспериментов показали, что молодые фибробласты HFL-1, обработанные индуктором Nrf2, тритерпеноидом 18-глициретиновой кислотой, не становятся

сенесцентными (в отличие от контрольных). Действие этого вещества опосредуется системой Nrf2/Keap1, втрое повышая уровень Nrf2 и втрое понижая уровень Keap1 [40].

В соответствии с этим, *Nrf2*^{-/-}-фибробласты имеют короткую ПЖ [41]. Кроме того, Judar et al. [41] показали, что *Nrf2*^{-/-} эмбриональные фибробласты мыши (MEF) склонны к иммортализации после 15 УКП. Напротив, показано, что селективные активаторы Nrf2, такие как рапамицин [42], предотвращают клеточное старение и даже увеличивают ожидаемую ПЖ в нормальных MEF [43]. Регулируемые Nrf2 ферменты, такие как супероксиддисмутаза 1 (Sod1), также способны предотвращать старение и воспаление в некоторых условиях [44]. Сенесцентные клетки, в свою очередь, способствуют возрастной патологии и потере функции, а их избирательное удаление улучшает физиологическую функцию и увеличивает ПЖ [42]. В мозговых артериях 24-месячных мышей уровень экспрессии p16INK4a и p21 повышен по сравнению с таковым у молодых контрольных животных [25].

Corenblum et al. [45] показали, что, хотя функция предшественников стволовых нервных клеток (neural stem progenitor cells, NSPC) постоянно снижается с возрастом у крыс Fisher 344, существует критический период времени в среднем возрасте (13–15 мес.), когда происходит резкое снижение выживаемости и регенерации NSPC. Этот специфический временной паттерн ухудшения NSPC сопровождается снижением экспрессии Nrf2 ($p < 0,05$), после чего (как и до этого возраста) не наблюдается значимых изменений этого показателя, до возраста 26 мес. При подавлении экспрессии Nrf2 в «молодых» NSPC (с помощью коротких интерферирующих РНК) выживание и регенерация NSPC значительно нарушается. Напротив, сверхэкспрессия Nrf2 в «старых» NSPC делает их похожими на «молодые», и они демонстрируют повышенную выживаемость и регенерацию. Кроме того, пролиферативный и нейрогенный потенциал NSPC также нарушен у мышей *Nrf2*^{-/-} [45].

В ещё одной модели старения, вызванного окислительным стрессом (SIPS, stress-induced premature senescence), признаки клеточного старения были менее выражены (по сравнению с контролем) при инактивации ещё одного ингибитора Nrf2, кавеолина-1, препятствующего перемещению Nrf2 в ядро (с увеличением в 2 раза уровня экспрессии Nrf2). Интересно, что угнетающее действие кавеолина-1 на Nrf2 не опосредуется активностью Keap1 [46].

Связь активности Nrf2 с продолжительностью жизни и долголетием. Nrf2 является важным ре-

гулятором ПЖ [47–50]. Предполагается, что долгоживущие виды имеют активный цитопро-тективный путь Nrf2. Сверхэкспрессия ниже-лежащих компонентов сигнального пути Nrf2 продлевает ПЖ дрозофилы [48]. Долгоживущие модели *Caenorhabditis elegans* также демонстрируют повышенную экспрессию Skn-1, гомолога Nrf2 [49]. Активность Nrf2 является важным регулятором ПЖ и у позвоночных [50]. Тем не менее общий белок Nrf2 не обязательно уменьшается с возрастом. Так, например, уровень белка Nrf2 (и его транслокация в ядро) были сходными в сердце у взрослых и старых крыс в отсутствие окислительного стресса (однако эффективность связывания Nrf2–ARE была нарушена, снижая экспрессию основных антиоксидантных ферментов-мишеней (Ho-1, Gst и Gcl) [51].

Также и содержание Nrf2 у долгоживущего голубого землекопа *Heterocephalus glaber* было сопоставимым с таковым у других видов грызунов с меньшей видовой ПЖ [5]. Lewis et al. [5] предположили, что защитная функция зависит не столько от содержания Nrf2, сколько от его активности. Важным событием в этом случае является снижение уровня Keap1, позволяющее избежать убиквитинирования Nrf2 и последующей протеасомной деградации. Кроме того, они также предположили важную роль двух других регуляторов Nrf2: p62/SQSTM1 (белка, связанного с аутофа-

гией и противодействующего протеасомной деградации Nrf2) и β -TrCP (E3 убиквитинлигазы), способствующего протеасомной деградации Nrf2 [5] (см. далее). Из других физиологических адаптаций, связанных с Nrf2, можно отметить повышение в 1,5 раза у 13-полосного суслика *Spermophilus tridecemlineatus* конститутивного уровня Nrf2, а также нижележащих компонентов пути Nrf2 при подготовке к спячке, и возвращение этих показателей к нормальному уровню после возвращения к активному образу жизни [52].

Основные данные по возрастному изменению уровня белка Nrf2 приведены на рис. 2. Видно, что, несмотря на данные промежуточных возрастов (возрастную динамику) и различия в выбранных возрастах [самых] молодых и старых животных, с возрастом снижение белка Nrf2 выражено в меньшей степени в печени (основном месте антиоксидантной защиты и детоксикации организма), причём содержание белка не падает *ниже* 50% от исходного уровня. Постоянным снижением характеризуется содержание белка Nrf2 в сердечно-сосудистой системе, тогда как органы нервной системы занимают промежуточное положение.

Далее мы сопоставили эти данные с изменением других этапов активации Nrf2 (включая уровень экспрессии гена *Nfe2l2*, кодирующего Nrf2, и его генов-мишеней, а также связывание Nrf2 с ARE). Результаты собраны в итоговой таблице.

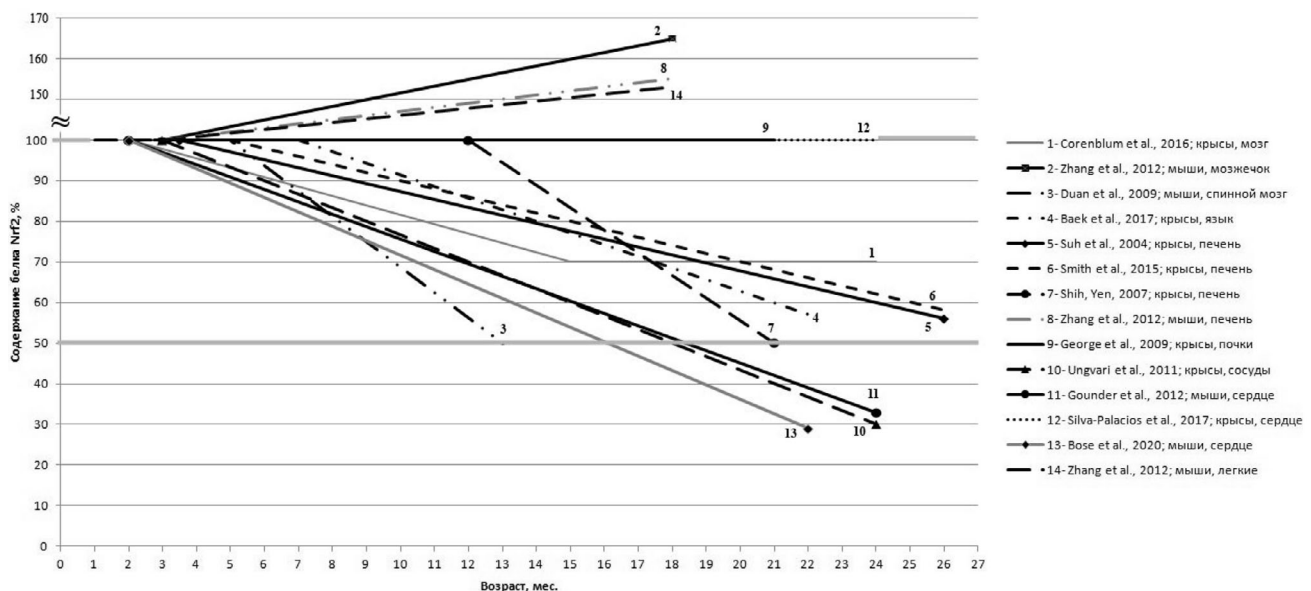


Рис. 2. Возрастные изменения содержания белка Nrf2 у лабораторных крыс и мышей. За 100% принят уровень белка Nrf2 у молодых животных. Представлены данные следующих работ: 1 — Corenblum et al. [45], мозг; 2 — Zhang et al. [67], мозг (мозжечок); 3 — Duan et al. [8], спинной мозг; 4 — Baek et al. [22], язык; 5 — Suh et al. [12], печень; 6 — Smith et al. [20], печень; 7 — Shih and Yen [19], печень; 8 — Zhang et al. [67], печень; 9 — George et al. [26], почки; 10 — Ungvari et al. [14], сосуды; 11 — Gounder et al. [23], сердце; 12 — Silva-Palacios et al. [51], сердце; 13 — Bose et al. [31], сердце; 14 — Zhang et al. [67], лёгкие

Возрастные изменения экспрессии Nrf2 и его генов-мишеней

Орган/(объект)	Молодые, мес.	Старые, мес.	Уровень белка и мРНК Nrf2 (у старых животных по сравнению с молодыми)	Уровень экспрессии генов-мишеней Nrf2 (у старых животных по сравнению с молодыми)	Ссылка
Печень (крысы Fischer 344)	4–6	24–28	уровень белка Nrf2 <i>ниже</i> на 42%; нет различий в уровне мРНК	уровень мРНК Gclc, Gclm и Gst2a <i>ниже</i> на 19,6%, 31,4% и 40% соответственно	[20]
Печень (крысы Fischer 344)	2–5	24–28	уровень белка Nrf2 <i>ниже</i> в 1,79 раза для общего белка Nrf2 и в 2 раза – для его ядерной фракции	связывание Nrf2 с ARE <i>ниже</i> на ~40%	[12]
Печень (крысы Sprague-Dawley)	2	18–24	уровень белка Nrf2 <i>ниже</i> в 2 раза	уровень экспрессии составлял 60%, 62%, 69% для глутатионредуктазы, Nqo1 и каталазы соответственно	[19]
Печень (крысы Sprague-Dawley)	2–5	24–28		связывание Nrf2 с ARE Gclc <i>ниже</i> (50 ± 17% от такового у молодых)	[68]
Печень (крысы Sprague-Dawley)	6	26	уровень экспрессии гена Nrf2 <i>не различается</i> у 6-мес. и 26-мес. крыс	экспрессия генов Gclm, Nqo1, Gclc, Ho-1 <i>не различается</i> у 6-мес. и 26-мес. крыс	[17]
Скелетные мышцы (крысы Fischer 344)	7	22	уровень белка Nrf2 <i>ниже</i> в 1,75 раза		[22]
Скелетные мышцы и сердце (мыши C57BL/6)	2	22	уровень мРНК Nrf2 в 3,5 раза <i>ниже</i> в мышцах и в 2 раза в сердце	связывание Nrf2/ARE <i>ниже</i> в 2,1 раза в сердце и в 1,9 раз – в скелетных мышцах; в сердце уровень мРНК Gclc <i>ниже</i> в 2 раза, Gclm – <i>ниже</i> в 1,5 раза; в скелетных мышцах уровень Gclc <i>не менялся</i> , Gclm – <i>ниже</i> в 1,5 раза	[31]
Сердце (мыши C57BL/6/SJ)	2	23	уровень белка Nrf2 <i>ниже</i> в 3 раза	связывание Nrf2/ARE <i>ниже</i> в 1,65 раза	[23]
Сердце (крысы Wistar)	9	24	уровень белка Nrf2 <i>не менялся</i>		[51]
Сосуды (макака-резус)	126	264	<i>нет возрастных различий</i> в уровне мРНК и белка Nrf2	<i>нет возрастных различий</i> в уровне мРНК и белка генов-мишеней Nrf2 (Nqo1, Gclc и Ho-1)	[15]
Сосуды (крысы F344xBN)	3	24	уровень мРНК Nrf2 в 1,4 раза <i>ниже</i> ; уровень белка Nrf2 в 3,3 раза <i>ниже</i>	уровень связывания Nrf2 с ARE вдвое <i>ниже</i> у старых крыс	[14]
Сосуды (крысы Fischer 344)	6	24	в первичной культуре эндотелия сосудов старых крыс уровень белка Nrf2 в 1,5 раза <i>выше</i> в ядре (но не в цитоплазме)	в первичной культуре эндотелия сосудов старых крыс связывание Nrf2 с ARE <i>выше</i> на 33,5 ± 17%	[27]
Спинальный мозг (мыши ICR)	5	13	уровень белка Nrf2 вдвое <i>ниже</i>	уровень белка Ho-1 в спинном мозге вдвое <i>ниже</i> , у Nqo1 изменений нет	[8] [28]
Пигментный эпителий сетчатки (мыши C57Bl6/J)	2	15		в первичной культуре эпителия сетчатки уровень экспрессии Nqo1 и Ho-1 соответственно в 11 и 10 раз <i>выше</i>	
Бронхи (человек)	21–29*	60–69*	уровень белка Nrf2 в первичной культуре бронхиального эпителия в 1,34 раза <i>ниже</i>	уровень белка в 1,8, 2,2 и 2,5 раза <i>выше</i> (для GCLC, GCLC и NQO1 соответственно)	[21]

Примечание. ARE – антиоксидант-респонс(ив)ный элемент (antioxidant response element); Gclc – каталитическая субъединица глутаматцистеинлигазы; Gclm – регуляторная субъединица глутаматцистеинлигазы; Ho-1 – гемоксигеназа 1; Nqo1 – NAD(P)H:хиноноксидоредуктаза 1.

* Лет.

Регуляторы пути Nrf2. Системы, подавляющие активность Nrf2, представляют собой компоненты программы старения [4]. Наиболее известными из них, как уже отмечалось, являются редокс-зависимая система Keap1 и редокс-независимая система белка, содержащего β -трансдуциновые повторы и киназы гликогенсинтазы 3 (GSK3) (рис. 1). Кроме того, ещё одним белком, подавляющим действие Nrf2, является с-Мус [53] (рис. 1). Белок Bach1, не являясь прямым ингибитором Nrf2, конкурирует с ним за связывание с последовательностью ARE [10]. Кроме упомянутого выше, воздействие и других киназ (например, Gyn-киназы), может приводить к инактивации Nrf2 и его экспорту из ядра [54].

Keap1. Keap1 является основным регулятором активности Nrf2 [54]. Хотя сообщалось, что мыши *Keap1*^{-/-} нежизнеспособны и умирают в течение первых 3-х недель жизни [55], подавление Keap1 повышает устойчивость к токсинам и в некоторых случаях увеличивает ПЖ у таких видов, как *Drosophila melanogaster* [56]. Интересно, что у наиболее эволюционно продвинутой части птиц (таксон Neaves) Keap1 подвергся столь серьёзным перестройкам, что практически утратил способность ингибировать Nrf2 [57]. Получившаяся в результате конститутивная активация Nrf2 (и индуцируемых им антиоксидантных ферментов) очень важна для животных со столь быстрым метаболизмом [57, 58]. Также уровень белка Keap1 не различается у быстро стареющих мышей SAMP8 и «устойчивых к старению» мышей SAMR1 [18]. Не было выявлено возрастных изменений уровня мРНК Keap1 у 10–50-дневных дрозофил [58]. Сообщается, что избыточный уровень Keap1 пагубно влияет на клеточный гомеостаз, и наоборот, в моделях преждевременного старения уровень Keap1 увеличивается [59–61]. Palsamy et al. [61] продемонстрировали, что ответ на несвёрнутые белки, стимулированный стрессорами и оксидантами эндоплазматического ретикулума, вызывал потерю метилирования промотора Keap1 и повышал экспрессию Keap1, тем самым снижая экспрессию генов-мишеней NRF2 и NRF2 в эпителии хрусталика человека. При этом метилирование промотора Keap1 снижается в хрусталике при старении, достигая самого низкого уровня в возрасте около 75 лет, создавая, таким образом, предпосылки для роста уровня экспрессии Keap1 с возрастом [61]. Тем не менее в работах Safdar et al. [13] и Xu et al. [17] не наблюдали возрастного повышения уровня Keap1.

Кроме того, Keap1 может быть критическим регулятором клеточного цикла и независимо от Nrf2. Истощённые по Nrf2 клетки обнаруживают существенное нарушение регуляции мито-

хондриального гомеостаза из-за Keap1-обусловленной деградации белка Miro2 [62]. Также показано, что Keap1 негативно регулирует пролиферацию эндотелиальных клеток и вызывает их старение [59, 60]. В дополнительной серии экспериментов в упоминавшейся выше работе Sachdeva et al. [28] изучали последствия генетической инактивации Keap1 в RPE у молодых (2 мес.) и среднего возраста (15 мес.) мышей C57Bl6/J в бесстрессовых и стрессовых (йодат натрия, 5 мг/кг) условиях [28]. Сравнивали индуцируемый окислительным стрессом уровень экспрессии Nrf2 и его генов-мишеней у мышей с трансгеном рекомбиназы Cre, индуцируемый тамоксифеном (Tam-Cre; Keap1loxP) и мышей того же возраста Keap1loxP, экспрессирующими уровни Keap1 дикого типа [28]. Тамоксифен снижал экспрессию Keap1 на 50% (как было определено с помощью количественной RT-qPCR у мышей Tam-Cre Keap1loxP по сравнению с мышами Keap1loxP, у которых отсутствовал трансген рекомбиназы Cre, индуцируемый тамоксифеном). Обработка NaIO₃ индуцировала в 2,5 раза более высокий уровень экспрессии гена-мишени Nrf2 *Nqo1* у старых (15 мес.) мышей по сравнению с молодыми ($p < 0,05$), что свидетельствует о частичном восстановлении нарушенного ответа Nrf2 на окислительный стресс в RPE. Транскрипты *Gclm* и *Ho-1* не были изменены при нокдауне Keap1 у 15-мес. мышей. У старых мышей с уровнем Keap1, характерным для дикого типа (Keap1loxP), обработка NaIO₃ не вызывала экспрессию *Nqo1*, что согласуется с данными, приведёнными выше. При этом индукция пути Nrf2 в ответ на йодат натрия была частично восстановлена в RPE старых (15 мес.) мышей C57Bl6/J с помощью нокдауна Nrf2-негативного регулятора Keap1 (Tam-Cre; Keap1loxP) по сравнению с мышами Keap1loxP. Эти данные показывают, что старые RPE более уязвимы к окислительному повреждению из-за нарушения сигнального пути Nrf2, активация которого представляется многообещающим способом для новых фармакологических или генетических терапевтических стратегий [28]. Клиническое значение дисбаланса Nrf2/Keap1 может быть связано с возрастными заболеваниями [60].

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РОЛИ ОТДЕЛЬНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ СИСТЕМЫ Nrf2/ARE В МЕХАНИЗМАХ ВОЗРАСТНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ, СТАРЕНИЯ И ДОЛГОЛЕТИЯ

Говоря о принадлежности того или иного белка к участникам «программы старения» или

«программы антистарения», обычно имеют в виду следующие его свойства: увеличение содержания (активности) с возрастом, участие в развитии возрастных патологий и противодействие клеточным процессам репарации и антиоксидантной защиты (для Keap1 таким действием является связывание с Nrf2 с последующей протеасомной деградацией последнего). При этом (сверх)активация Keap1 приводит к ухудшению работы антиоксидантной системы клетки. Кроме того, хотя для Keap1 и показана возможность импорта/экспорта из ядра [62], подавляющая часть активности Keap1 приходится на цитоплазму. Вместе с тем из анализа работ видно, что чаще всего возрастному снижению в большей степени подвержена не цитоплазматическая, а ядерная фракция Nrf2.

Таким образом, можно сделать вывод, что Keap1, несмотря на то что он является наиболее мощным ингибитором Nrf2 и (вследствие этого) главной мишенью для фармакологического вмешательства [30], не может быть в полной мере признан белком «программы старения». В качестве таковых, видимо, следует рассматривать белки, ответственные за транспорт Nrf2 в ядро и за его активность в качестве фактора транскрипции.

Bach1 и с-Мус. Предполагается, что ARE-опосредованная экспрессия генов зависит от ядерного баланса между Nrf2 и Bach1 [63]. Bach1 подавляет экспрессию генов, конкурируя с Nrf2 за связывание с сайтом ARE в промоторе регулируемых генов, что, в частности, приводит к потере индуцибельности некоторых из Nrf2-регулируемых генов [64]. Уровень гема влияет на внутриклеточное распределение Bach1, его экспорт из ядра и активацию экспрессии Ho-1 [65]. Остатки C557 и C574 в Bach1 участвуют в диссоциации комплекса ARE/Ho-1, что указывает на зависимости активности Bach1 от окислительно-восстановительного статуса клетки [66]. Уровень Bach1 увеличивается с возрастом: у старых мышей C57BL/6J (21 мес.) он *выше*, чем у молодых (6 мес.) [67]. Аналогично в клетках бронхиального эпителия пожилых людей (67–69 лет) содержание BACH1 также *выше*, чем у молодых (28–29 лет) [21]. Shenvi et al. [68] обнаружили, что связывание Nrf2 с ARE Gclc значительно *ниже* ($50 \pm 17\%$, $p \leq 0,05$) у старых (24–28 мес.) крыс Fischer 344 по сравнению с молодыми (2–5 мес.) и что активность транскрипционного ответа ARE снижается при старении в присутствии Bach1. Кроме того, показано увеличение уровня базального белка с-Мус и Bach1 с возрастом во всех тканях: с-Мус повышался на 170% в мозжечке, на 87% в печени и на 90% в лёгких; Bach1 был увеличен на 80% в мозжечке,

на 50% в печени и на 150% в лёгких. Хроническое воздействие частиц выхлопного газа (nPM) увеличивало уровень с-Мус в тканях 6-месячных мышей, но не у более старых. Напротив, Bach1 не был увеличен nPM в тканях 6-месячных мышей, но был индуцирован nPM у более старых мышей [67].

p62. Белок p62/sequestosome1 (SQSTM1), адаптер, который связывает и доставляет в аутофагосомы убиквитинированные белки во время аутофагии и имеет сходный (STGE) мотив с Keap1-взаимодействующим мотивом ETGE в Neh2-домене Nrf2. Этот мотив делает возможным прямое взаимодействие между p62 и Keap1, вследствие чего p62 секвестрирует Keap1 в аутофагосомы для его последующей деградации [69]. Видимо, аутофагия может быть ещё одной критической точкой для регуляции Nrf2 при старении. Известно, что экспрессия p62 снижается с возрастом [70] и что потеря и/или уменьшение этого белка ведёт к уменьшению ПЖ [71]. У мышей *p62*^{-/-} наблюдается ускоренное развитие старческого фенотипа, в тканях этих мышей создаётся прооксидантная среда из-за нарушения транспорта электронов в митохондриях.

GSK3β. Фосфорилирование киназой GSK3β зачастую приводит к последующему убиквитинированию модифицированного белка и опосредуемой соответствующими адаптерами (например, F-box-белками) протеасомной деградации. Активность GSK3β увеличивается с возрастом *in vivo* и *in vitro*. Так, базальный уровень неактивного белка GSK3 у старых (18 мес.) сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) намного *ниже*, чем у молодых (1–3 мес.) [72]. Доля неактивной изоформы также вдвое *ниже* у самок в возрасте 1,5 года, чем у трёхнедельных [73]. Кроме того, в возрасте 10 мес. активность Akt и GSK3β значительно *выше* в печени мышей SAMP8, чем у SAMR. Предполагается, что вызванное повышением активности GSK3β уменьшение транслокации Nrf2 в ядро может приводить к увеличению окислительного стресса у мышей SAMP8 [18]. Показано, что в стационарной культуре первичных нейронов коры головного мозга мыши при практически неизменном общем уровне GSK3β доля фосфорилированной по S9 (т.е. неактивной) формы GSK3β снижалась с более чем 30% через 3 сут. культивирования без пересева до 15% — через 12 сут. [73]. «Старые» фибробласты человека WI-38 (диапазон числа удвоений клеточной популяции, УКП — 58–64), в отличие от клеток «среднего возраста» (УКП 38–41) и «молодых» (диапазон УКП — 26–30), проявляют признаки, типичные для старения, включая увеличенный размер, уплотнённую форму и повышенный уровень ак-

тивности ассоциированной со старением β -галактозидазы, которые практически отсутствуют в клетках «молодого» и «среднего возраста». В отличие от «молодых» и клеток «среднего возраста», в ядрах «старых» клеток повышен уровень обеих изоформ GSK3 – GSK3 α и GSK3 β [74]. Ещё одним подтверждением участия GSK3 β в программе старения можно считать изменение её активности при возрастных заболеваниях. В нейронах она избирательно фосфорилирует тау-белок в участках, которые являются гиперфосфорилированными в мозге при болезни Альцгеймера (БА) [75]. В ткани мозга пациентов с БА уровень белка GSK3 β повышен на 50% [75]. Ингибирование GSK3 β уменьшает когнитивные дефициты, ассоциированные с БА и другими вышеупомянутыми заболеваниями. Активность GSK3 β увеличена в клеточной (при депривации ростовых факторов) и животной (церебральная ишемия) моделях нейродегенерации [76]. Провоспалительный эффект GSK3 β обусловлен стимуляцией продукции IL- β , IFN- γ , IL-6, IL-12 и подавлением синтеза IL-10 [77]. Интерес к этой киназе в рамках нашей статьи продиктован её регуляторным влиянием на Nrf2, осуществляемым по меньшей мере тремя способами: i) GSK3 (с участием адаптера β TrCP) напрямую связана с деградацией Nrf2, способствуя его убиквитинированию и протеасомной деградации (а не просто инактивации, как другие киназы); ii) GSK3 управляет ультрадианными ритмами Nrf2: фосфорилирует Gyp-киназу, которая перемещается в ядро, модифицирует там Nrf2, после чего Nrf2 удаляется из ядра; и iii) GSK3 фосфорилирует белки положительной ветви регуляции циркадных биоритмов Vm11 и Clock, также вызывая их протеасомную деградацию, что снижает экспрессию Nrf2 (следует отметить, что в промоторах как генов негативных регуляторов биоритмов *Cry1*, *Cry2* и *Rev-erba*, так и в самом гене *Nfe2l2*, кодирующем Nrf2, содержится E-box, вследствие чего их транскрипция позитивно регулируется комплексом Clock/Vm11 [9, 78]). Все вышеперечисленное косвенно подтверждает предложенную роль GSK3 β как явного представителя программы старения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Старение связано с увеличением производства АФК и повышенным окислительным стрессом с одновременным снижением активности основных антиоксидантов (супероксиддисмутаза, каталазы, глутатиона), что способствует развитию широкого спектра заболева-

ний [24]. Эволюционно консервативный путь антиоксидантного ответа, опосредуемый Nrf2, поддерживает клеточный окислительно-восстановительный гомеостаз и способствует сохранению молодого клеточного фенотипа, регулируя транскрипцию ряда цитопротекторных генов. Уровень экспрессии Nrf2 снижается с возрастом как *in vivo*, так и *in vitro*, что ведёт к усилению окислительного стресса. Возрастные изменения могут приводить к нарушению уровня экспрессии генов-мишеней Nrf2 (*Nqo1*, *Ho-1*, *Gcl*) вследствие снижения общего уровня мРНК и белка, уменьшения его содержания в ядре, ухудшения связывания Nrf2 с элементом антиоксидантного ответа (ARE), негативной регуляцией экспрессии, опосредованной Nrf2. Таким образом, нарушение работы системы антиоксидантной защиты у старых животных из-за дефицита Nrf2 может привести к пагубному накоплению АФК [22]. Генетическая инактивация Nrf2 усиливает возрастную индукцию маркеров старения и воспалительных факторов SASP [25] и ускоряет клеточное старение, вызывая хроническое воспаление [25, 79, 80]. У Nrf2-дефицитных мышей также повышена чувствительность к ряду фармакологических и экологических токсичных веществ [81]. Недостаточная активность пути Nrf2 играет важную роль в возникновении и развитии ряда токсических и хронических заболеваний, связанных с окислительным стрессом. Животные с дефицитом Nrf2 более уязвимы к развитию возрастных заболеваний, таких как болезни сердца [82], атрофия скелетных мышц [83], рак [46], нарушение зрения [84], наряду с сокращением ПЖ и преждевременным старением [46]. Так, возрастное снижение синтеза основного антиоксиданта клетки, глутатиона, может быть вызвано нарушением регуляции ARE-опосредованной экспрессии генов, но нацеленные на Keap1 хемопротекторные агенты, такие как липоевая кислота, сульфорафан и другие известные активаторы Nrf2, могут лишь (с возрастом всё хуже и хуже) компенсировать эту потерю [30, 85–92], подавляя опосредованный Keap1 путь деградации, но не предотвратить её. Наиболее вероятными претендентами на роль «серого кардинала», исподволь определяющего возрастное снижение функции Nrf2, претендует тройка c-Myc, GSK3 β и Bach1.

Таким образом, помимо сравнения работы защитных систем у коротко- и долгоживущих видов [2, 5, 6, 57, 93–98] и поиска новых антиоксидантов [99–101] и активаторов Nrf2 [30, 85–89], ещё одним перспективным направлением биogerонтологических исследований может быть конструирование и синтез веществ, обладающих множественным действием. Известны,

например, вещество, являющееся гибридом сульфорафана (активатора Nrf2) и мелатонина (регулятора биоритмов) [102], а также вещества, являющиеся одновременно ингибиторами GSK3 β и активаторами Nrf2 (2,4-дигидропирано[2,3-с]пиразолы) [103] или разных путей инактивации Nrf2 (GSK3 β , FYN, и DYRK1A) [104]. То. сигнальный путь Nrf2 (как главного регулятора высокоскоординированного антиоксидантного ответа) может быть потенциальной терапевтической мишенью для защиты клеток от возрастного накопления АФК путём восстановления окислительно-восстановительного гомеостаза для предотвращения возрастных патологий. Кроме того, будущие исследования передачи сигналов Nrf2 у людей и способности

различных веществ, активирующих путь Nrf2, предотвращать хронические возрастные заболевания, связанные со старением, позволят глубже понять роль активации Nrf2 как возможного вмешательства, способствующего долголетию.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-13037).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. В данной работе не было никаких исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди или животные.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Skulachev, M. V., Severin, F. F., and Skulachev, V. P. (2015) Aging as an evolvability-increasing program which can be switched off by organism to mobilize additional resources for survival, *Curr. Aging Sci.*, **8**, 95-109, doi: 10.2174/1874609808666150422122401.
- Skulachev, V. P., Holtze, S., Vysokikh, M. Y., Bakeeva, L. E., Skulachev, M. V., et al. (2017) Neoteny, prolongation of youth: From naked mole rats to “naked apes” (humans), *Physiol. Rev.*, **97**, 699-720, doi: 10.1152/physrev.00040.2015.
- Skulachev, V. P. (2019) Phenoptosis as a phenomenon widespread among many groups of living organisms including mammals (Commentary to the paper by E. R. Galimov, J. N. Lohr, and D. Gems (2019), *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1433-1437), *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1438-1441, doi: 10.1134/S0006297919120022.
- Skulachev, V. P., Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Popov, N. A., Markov, A. V., et al. (2020) Perspectives of *Homo sapiens* lifespan extension: focus on external or internal resources? *Aging (Albany NY)*, **12**, 5566-5584, doi: 10.18632/aging.102981.
- Lewis, K. N., Wason, E., Edrey, Y. H., Kristan, D. M., Nevo, E., et al. (2015) Regulation of Nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 3722-3727, doi: 10.1073/pnas.1417566112.
- Vysokikh, M. Y., Holtze, S., Averina, O. A., Lyamzaev, K. G., Panteleeva, A. A., et al. (2020) Mild depolarization of the inner mitochondrial membrane is a crucial component of an anti-aging program, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 6491-6501, doi: 10.1073/pnas.1916414117.
- Cuadrado, A. (2015) Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3/ β -TrCP, *Free Radic. Biol. Med.*, **88**, 147-157, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.04.029.
- Duan, W. S., Zhang, R. Y., Guo, Y. S., Jiang, Y. F., Huang, Y. L., et al. (2009) Nrf2 activity is lost in the spinal cord and its astrocytes of aged mice, *In vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, **45**, 388-397, doi: 10.1007/s11626-009-9194-5.
- Shilovsky, G. A., Putyatina, T. S., Morgunova, G. V., Seliverstov, A. V., Ashapkin, V. V., et al. (2021) A crosstalk between the biorhythms and gatekeepers of longevity: dual role of glycogen synthase kinase-3, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 433-448, doi: 10.1134/S0006297921040052.
- Tebay, L. E., Robertson, H., Durant, S. T., Vitale, S. R., Penning, T. M., et al. (2015) 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.*, **88**, 108-146, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.021.
- Kobayashi, E. H., Suzuki, T., Funayama, R., Nagashima, T., Hayashi, M., et al. (2016) Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription, *Nat. Commun.*, **7**, 11624, doi: 10.1038/ncomms11624.
- Suh, J. H., Shenvi, S. V., Dixon, B. M., Liu, H., Jaiswal, A. K., et al. (2004) Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3381-3386, doi: 10.1073/pnas.0400282101.
- Safdar, A., deBeer, J., and Tarnopolsky, M. A. (2010) Dysfunctional Nrf2-Keap1 redox signaling in skeletal muscle of the sedentary old, *Free Radic. Biol. Med.*, **49**, 1487-1493, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.08.010.
- Ungvari, Z., Bailey-Downs, L., Sosnowska, D., Gautam, T., Koncz, P., et al. (2011) Vascular oxidative stress in aging: a homeostatic failure due to dysregulation of NRF2-mediated antioxidant response, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **301**, 363-372, doi: 10.1152/ajpheart.01134.2010.
- Ungvari, Z., Bailey-Downs, L., Gautam, T., Sosnowska, D., Wang, M., et al. (2011) Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF- κ B activation in the nonhuman primate *Macaca mulatta*, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **66**, 866-875, doi: 10.1093/gerona/ glr092.
- Zhang, H., Davies, K. J. A., and Forman, H. J. (2015) Oxidative stress response and Nrf2 signaling in aging, *Free Radic. Biol. Med.*, **88** (Pt B), 314-336, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.05.036.
- Xu, S. F., Ji, L. L., Wu, Q., Li, J., and Liu, J. (2018) Ontogeny and aging of Nrf2 pathway genes in livers of rats, *Life Sci.*, **203**, 99-104, doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.018.
- Tomobe, K., Shinozuka, T., Kuroiwa, M., and Nomura, Y. (2012) Age-related changes of Nrf2 and phosphorylated GSK-3 β in a mouse model of accelerated aging (SAMP8), *Arch. Gerontol. Geriatr.*, **54**, 1-7, doi: 10.1016/j.archger.2011.06.006.
- Shih, P. H., and Yen, G. C. (2007) Differential expressions of antioxidant status in aging rats: the role of transcriptional factor Nrf2 and MAPK signaling pathway, *Biogerontology*, **8**, 71-80, doi: 10.1007/s10522-006-9033-y.

20. Smith, E. J., Shay, K. P., Thomas, N. O., Butler, J. A., Finlay, L. F., et al. (2015) Age-related loss of hepatic Nrf2 protein homeostasis: potential role for heightened expression of miR-146a, *Free Radic. Biol. Med.*, **89**, 1184-1191, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.11.003.
21. Zhou, L., Zhang, H., Davies, K. J. A., and Forman, H. J. (2018) Aging-related decline in the induction of Nrf2-regulated antioxidant genes in human bronchial epithelial cells, *Redox Biol.*, **14**, 35-40, doi: 10.1016/j.redox.2017.08.014.
22. Baek, M. K., Lee, H., Kim, K. O., Kwon, H. J., Chung, M. H., et al. (2017) Age-related changes in nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and reactive oxygen species and mitochondrial structure in the tongues of Fischer 344 rats, *Clin. Exp. Otorhinolaryngol.*, **10**, 357-362, doi: 10.21053/ceo.2016.01095.
23. Gounder, S. S., Kannan, S., Devadoss, D., Miller, C. J., Whitehead, K. J., et al. (2012) Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training, *PLoS One*, **7**, e45697, doi: 10.1371/journal.pone.0045697.
24. Ungvari, Z., Tarantini, S., Kiss, T., Wren, J. D., Giles, C. B., et al. (2018) Endothelial dysfunction and angiogenesis impairment in the ageing vasculature, *Nat. Rev. Cardiol.*, **15**, 555-565, doi: 10.1038/s41569-018-0030-z.
25. Fulop, G. A., Kiss, T., Tarantini, S., Balasubramanian, P., Yabluchanskiy, A., et al. (2018) Nrf2 deficiency in aged mice exacerbates cellular senescence promoting cerebrovascular inflammation, *GeroScience*, **40**, 513-521, doi: 10.1007/s11357-018-0047-6.
26. George, L., Lokhandwala, M. F., and Asghar, M. (2009) Exercise activates redox-sensitive transcription factors and restores renal D1 receptor function in old rats, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, **297**, 1174-1180, doi: 10.1152/ajprenal.00397.2009.
27. Li, M., Liu, R. M., Timblin, C. R., Meyer, S. G., Mossman, B. T., et al. (2006) Age affects ERK1/2 and Nrf2 signaling in the regulation of GCLC expression, *J. Cell Physiol.*, **206**, 518-525.
28. Sachdeva, M. M., Cano, M., and Handa, J. T. (2014) Nrf2 signaling is impaired in the aging RPE given an oxidative insult, *Exp. Eye Res.*, **119**, 111-114, doi: 10.1016/j.exer.2013.10.024.
29. Wu, D. M., Ji, X., Ivanchenko, M. V., Chung, M., Piper, M., et al. (2021) Nrf2 overexpression rescues the RPE in mouse models of retinitis pigmentosa, *JCI Insight*, **6**, e145029, doi: 10.1172/jci.insight.145029.
30. Robledinos-Antón, N., Fernández-Ginés, R., Manda, G., and Cuadrado, A. (2019) Activators and inhibitors of NRF2: a review of their potential for clinical development, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 9372182, doi: 10.1155/2019/9372182.
31. Bose, C., Alves, I., Singh, P., Palade, P. T., Carvalho, E., et al. (2020) Sulforaphane prevents age-associated cardiac and muscular dysfunction through Nrf2 signaling, *Aging Cell*, **19**, e13261, doi: 10.1111/acel.13261.
32. Alarcón-Aguilar, A., Luna-López, A., Ventura-Gallegos, J. L., Lazzarini, R., Galván-Arzate, S., et al. (2014) Primary cultured astrocytes from old rats are capable to activate the Nrf2 response against MPP+ toxicity after tBHQ pretreatment, *Neurobiol Aging*, **35**, 1901-1912, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.143.
33. Miller, C. J., Gounder, S. S., Kannan, S., Goutam, K., Muthusamy, V. R., et al. (2012) Disruption of Nrf2/ARE signaling impairs antioxidant mechanisms and promotes cell degradation pathways in aged skeletal muscle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1822**, 1038-1050, doi: 10.1016/j.bbadis.2012.02.007.
34. Kitaoka, Y., Tamura, Y., Takahashi, K., Takeda, K., Takemasa, T., et al. (2019) Effects of Nrf2 deficiency on mitochondrial oxidative stress in aged skeletal muscle, *Physiol. Rep.*, **7**, e13998, doi: 10.14814/phy2.13998.
35. Li, D., Zhao, H., Cui, Z. K., and Tian, G. (2021) The role of Nrf2 in hearing loss, *Front. Pharmacol.*, **12**, 620921, doi: 10.3389/fphar.2021.620921.
36. Hosokawa, K., Hosokawa, S., Ishiyama, G., Ishiyama, A., and Lopez, I. A. (2018) Immunohistochemical localization of Nrf2 in the human cochlea, *Brain Res.*, **1700**, 1-8, doi: 10.1016/j.brainres.2018.07.004.
37. Hoshino, T., Tabuchi, K., Nishimura, B., Tanaka, S., Nakayama, M., et al. (2011) Protective role of Nrf2 in age-related hearing loss and gentamicin ototoxicity, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **415**, 94-98, doi: 10.1016/j.bbrc.2011.10.019.
38. Honkura, Y., Matsuo, H., Murakami, S., Sakiyama, M., Mizutani, K., et al. (2016) Nrf2 is a key target for prevention of noise-induced hearing loss by reducing oxidative damage of cochlea, *Sci. Rep.*, **6**, 19329, doi: 10.1038/srep19329.
39. Valcarcel-Ares, M. N., Gautam, T., Warrington, J. P., Bailey-Downs, L., Sosnowska, D., et al. (2012) Disruption of Nrf2 signaling impairs angiogenic capacity of endothelial cells: implications for microvascular aging, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **67**, 821-829, doi: 10.1093/geronol/glr229.
40. Kapeta, S., Chondrogianni, N., and Gonos, E. S. (2010) Nuclear erythroid factor 2-mediated proteasome activation delays senescence in human fibroblasts, *J. Biol. Chem.*, **285**, 8171-8184, doi: 10.1074/jbc.M109.031575.
41. Jódar, L., Mercken, E. M., Ariza, J., Younts, C., González-Reyes, J. A., et al. (2011) Genetic deletion of Nrf2 promotes immortalization and decreases life span of murine embryonic fibroblasts, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **66**, 247-256, doi: 10.1093/geronol/glr181.
42. Wang, R., Yu, Z., Sunchu, B., Shoaf, J., Dang, I., et al. (2017) Rapamycin inhibits the secretory phenotype of senescent cells by a Nrf2-independent mechanism, *Aging Cell*, **16**, 564-574, doi: 10.1111/acel.12587.
43. Lerner, C., Bitto, A., Pulliam, D., Nacarelli, T., Konigsberg, M., et al. (2013) Reduced mammalian target of rapamycin activity facilitates mitochondrial retrograde signaling and increases life span in normal human fibroblasts, *Aging Cell*, **12**, 966-977, doi: 10.1111/acel.12122.
44. Zhang, Y., Unnikrishnan, A., Deepa, S. S., Liu, Y., Li, Y., et al. (2017) A new role for oxidative stress in aging: The accelerated aging phenotype in Sod1^{-/-} mice is correlated to increased cellular senescence, *Redox Biol.*, **11**, 30-37, doi: 10.1016/j.redox.2016.10.014.
45. Corenblum, M. J., Ray, S., Remley, Q. W., Long, M., et al. (2016) Reduced Nrf2 expression mediates the decline in neural stem cell function during a critical middle-age period, *Aging Cell*, **15**, 725-736, doi: 10.1111/acel.12482.
46. Volonte, D., Liu, Z., Musille, P. M., Stoppani, E., Wakabayashi, N., et al. (2013) Inhibition of nuclear factor-erythroid 2-related factor (Nrf2) by caveolin-1 promotes stress-induced premature senescence, *Mol. Biol. Cell*, **24**, 1852-1862, doi: 10.1091/mbc.E12-09-0666.
47. Kubben, N., Zhang, W., Wang, L., Voss, T. C., Yang, J., et al. (2016) Repression of the antioxidant Nrf2 pathway in premature aging, *Cell*, **165**, 1361-1374, doi: 10.1016/j.cell.2016.05.017.
48. Orr, W. C., Radyuk, S. N., Prabhudesai, L., Toroser, D., Benes, J. J., et al. (2005) Overexpression of glutamate-cysteine ligase extends life span in *Drosophila melanogaster*, *J. Biol. Chem.*, **280**, 37331-37338, doi: 10.1074/jbc.M508272200.

49. Jasper, H. (2008) SKNy worms and long life, *Cell*, **132**, 915-916, doi: 10.1016/j.cell.2008.03.002.
50. Bruns, D. R., Drake, J. C., Biela, L. M., Peelor, F. F. 3rd, Miller, B. F., et al. (2015) Nrf2 signaling and the slowed aging phenotype: evidence from long-lived models, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 732596, doi: 10.1155/2015/732596.
51. Silva-Palacios, A., Ostolga-Chavarría, M., Buelna-Chontal, M., Garibay, C., Hernández-Reséndiz, S., et al. (2017) 3-NP-induced Huntington's-like disease impairs Nrf2 activation without loss of cardiac function in aged rats, *Exp. Gerontol.*, **96**, 89-98, doi: 10.1016/j.exger.2017.06.009.
52. Morin, P. Jr, Ni, Z., McMullen, D. C., and Storey, K. B. (2008) Expression of Nrf2 and its downstream gene targets in hibernating 13-lined ground squirrels, *Spermophilus tridecemlineatus*, *Mol. Cell. Biochem.*, **312**, 121-129, doi: 10.1007/s11010-008-9727-3.
53. Levy, S., and Forman, H. J. (2010) C-Myc is a Nrf2-interacting protein that negatively regulates phase II genes through their electrophile responsive elements, *IUBMB Life*, **62**, 237-246, doi: 10.1002/iub.314.
54. Jain, A. K., and Jaiswal, A. K. (2007) GSK3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2, *J. Biol. Chem.*, **282**, 16502-16510, doi: 10.1074/jbc.M611336200.
55. Wakabayashi, N., Itoh, K., Wakabayashi, J., Motohashi, H., Noda, S., et al. (2003) Keap1-null mutation leads to postnatal lethality due to constitutive Nrf2 activation, *Nat. Genet.*, **35**, 238-425, doi: 10.1038/ng1248.
56. Sykiotis, G. P., and Bohmann, D. (2010) Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease, *Sci. Signal.*, **3**, re3, doi: 10.1126/scisignal.3112re3.
57. Castiglione, G. M., Xu, Z., Zhou, L., and Duh, E. J. (2020) Adaptation of the master antioxidant response connects metabolism, lifespan and feather development pathways in birds, *Nat. Commun.*, **11**, 2476, doi: 10.1038/s41467-020-16129-4.
58. Rahman, M. M., Sykiotis, G. P., Nishimura, M., Bodmer, R., and Bohmann, D. (2013) Declining signal dependence of Nrf2-MafS-regulated gene expression correlates with aging phenotypes, *Aging Cell*, **12**, 554-562, doi: 10.1111/ace1.12078.
59. Kopacz, A., Klóska, D., Proniewski, B., Cysewski, D., Personnic, N., et al. (2020) Keap1 controls protein S-nitrosation and apoptosis-senescence switch in endothelial cells, *Redox Biol.*, **28**, 101304, doi: 10.1016/j.redox.2019.101304.
60. Kloska, D., Kopacz, A., Cysewski, D., Aepfelbacher, M., Dulak, J., et al. (2019) Nrf2 sequesters Keap1 preventing podosome disassembly: a quintessential duet moonlights in endothelium, *Antioxid. Redox Signal*, **30**, 1709-1730, doi: 10.1089/ars.2018.7505.
61. Palsamy, P., Bidasee, K. R., Ayaki, M., Augusteyn, R. C., Chan, J. Y., et al. (2014) Methylglyoxal induces endoplasmic reticulum stress and DNA demethylation in the Keap1 promoter of human lens epithelial cells and age-related cataracts, *Free Radic. Biol. Med.*, **72**, 134-148, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.04.010.
62. Cloer, E. W., Goldfarb, D., Schrank, T. P., Weissman, B. E., and Major, M. B. (2019) NRF2 activation in cancer: from DNA to protein, *Cancer Res.*, **79**, 889-898, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-2723.
63. Dhakshinamoorthy, S., Jain, A. K., Bloom, D. A., and Jaiswal, A. K. (2005) Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants, *J. Biol. Chem.*, **280**, 16891-16900, doi: 10.1074/jbc.M500166200.
64. Tian, X., Cong, F., Guo, H., Fan, J., Chao, G., and Song, T. (2019) Downregulation of Bach1 protects osteoblasts against hydrogen peroxide-induced oxidative damage *in vitro* by enhancing the activation of Nrf2/ARE signaling, *Chem. Biol. Interact.*, **309**, 108706, doi: 10.1016/j.cbi.2019.06.019.
65. Yamaoka, M., Shimizu, H., Takahashi, T., Omori, E., and Morimatsu, H. (2017) Dynamic changes in Bach1 expression in the kidney of rhabdomyolysis-associated acute kidney injury, *PLoS One*, **12**, e0180934, doi: 10.1371/journal.pone.0180934.
66. Meng, D., Wang, X., Chang, Q., Hitron, A., Zhang, Z., et al. (2010) Arsenic promotes angiogenesis *in vitro* via a heme oxygenase-1-dependent mechanism, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **244**, 291-299, doi: 10.1016/j.taap.2010.01.004.
67. Zhang, H., Liu, H., Davies, K. J., Sioutas, C., Finch, C. E., et al. (2012) Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments, *Free Radic. Biol. Med.*, **52**, 2038-2046, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.042.
68. Shenvi, S. V., Smith, E., and Hagen, T. M. (2012) Identification of age-specific Nrf2 binding to a novel antioxidant response element locus in the Gclc promoter: a compensatory means for the loss of glutathione synthetic capacity in the aging rat liver? *Aging Cell*, **11**, 297-304, doi: 10.1111/j.1474-9726.2011.00788.x.
69. Jiang, T., Harder, B., Rojo de la Vega, M., Wong, P. K., Chapman, E., et al. (2015) p62 links autophagy and Nrf2 signaling, *Free Radic. Biol. Med.*, **88** (Pt B), 199-204, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.014.
70. Kwon, J., Han, E., Bui, C. B., Shin, W., Lee, J., et al. (2012) Assurance of mitochondrial integrity and mammalian longevity by the p62-Keap1-Nrf2-Nqo1 cascade, *EMBO Rep.*, **13**, 150-156, doi: 10.1038/embor.2011.246.
71. Bitto, A., Lerner, C. A., Nacarelli, T., Crowe, E., Torres, C., et al. (2014) P62/SQSTM1 at the interface of aging, autophagy, and disease, *Age (Dordr.)*, **36**, 9626, doi: 10.1007/s11357-014-9626-3.
72. Iwahana, E., Hamada, T., Uchida, A., and Shibata, S. (2007) Differential effect of lithium on the circadian oscillator in young and old hamsters, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **354**, 752-756, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.042.
73. Krishnankutty, A., Kimura, T., Saito, T., Aoyagi, K., Asada, A., et al. (2017) *In vivo* regulation of glycogen synthase kinase 3 β activity in neurons and brains, *Sci. Rep.*, **7**, 8602, doi: 10.1038/s41598-017-09239-5.
74. Zmijewski, J. W., and Jope, R. S. (2004) Nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 during replicative senescence of human fibroblasts, *Aging Cell*, **3**, 309-317, doi: 10.1111/j.1474-9728.2004.00117.x.
75. Hoshi, M., Takashima, A., Noguchi, K., Murayama, M., Sato, M., et al. (1996) Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3 β in brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 2719-2723, doi: 10.1073/pnas.93.7.2719.
76. Salcedo-Tello, P., Ortiz-Matamoros, A., and Arias, C. (2011) GSK3 function in the brain during development, neuronal plasticity, and neurodegeneration, *Int. J. Alzheimer's Dis.*, **11**, 1-12, doi: 10.4061/2011/189728.
77. Iitaka, C., Miyazaki, K., Akaike, T., and Ishida, N. (2005) A role for glycogen synthase kinase-3 β in the mammalian

- circadian clock, *J. Biol. Chem.*, **280**, 29397-29402, doi: 10.1074/jbc.M503526200.
78. Early, J. O., Menon, D., Wyse, C. A., Cervantes-Silva, M. P., Zaslona, Z., et al. (2018) Circadian clock protein BMAL1 regulates IL-1 β in macrophages via NRF2, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **115**, 8460-8468, doi: 10.1073/pnas.1800431115.
 79. Hiebert, P., Wietecha, M. S., Cangkrama, M., Haertel, E., Mavrogonatou, E., et al. (2018) Nrf2-mediated fibroblast reprogramming drives cellular senescence by targeting the matrisome, *Dev. Cell*, **46**, 145-161.e10, doi: 10.1016/j.devcel.2018.06.012.
 80. Yuan, H., Xu, Y., Luo, Y., Wang, N. X., and Xiao, J. H. (2021) Role of Nrf2 in cell senescence regulation, *Mol. Cell. Biochem.*, **476**, 247-259, doi: 10.1007/s11010-020-03901-9.
 81. Kensler, T. W., Wakabayashi, N., and Biswal, S. (2007) Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **47**, 89-116, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046.
 82. Shanmugam, G., Narasimhan, M., Conley, R. L., Sairam, T., Kumar, A., et al. (2017) Chronic endurance exercise impairs cardiac structure and function in middle-aged mice with impaired Nrf2 signaling, *Front. Physiol.*, **8**, 268, doi: 10.3389/fphys.2017.00268.
 83. Ahn, B., Pharaoh, G., Premkumar, P., Huseman, K., Ranjit, R., et al. (2018) Nrf2 deficiency exacerbates age-related contractile dysfunction and loss of skeletal muscle mass, *Redox Biol.*, **17**, 47-58, doi: 10.1016/j.redox.2018.04.004.
 84. Nakagami, Y. (2016) Nrf2 is an attractive therapeutic target for retinal diseases, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2016**, 7469326, doi: 10.1155/2016/7469326.
 85. Vnukov, V. V., Gutsenko, O. I., Milutina, N. P., Kornienko, I. V., Ananyan, A. A., et al. (2015) Influence of SkQ1 on expression of Nrf2 gene, are-controlled genes of antioxidant enzymes and their activity in rat blood leukocytes under oxidative stress, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 1598-1605, doi: 10.1134/S0006297915120081.
 86. Vnukov, V. V., Gutsenko, O. I., Milyutina, N. P., Kornienko, I. V., Ananyan, A. A., et al. (2017) SkQ1 regulates expression of Nrf2, ARE-controlled genes encoding antioxidant enzymes, and their activity in cerebral cortex under oxidative stress, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 942-952, doi: 10.1134/S0006297917080090.
 87. Cuadrado, A., Manda, G., Hassan, A., Alcaraz, M. J., Barbas, C., et al. (2018) Transcription factor NRF2 as a therapeutic target for chronic diseases: a systems medicine approach, *Pharmacol. Rev.*, **70**, 348-383, doi: 10.1124/pr.117.014753.
 88. Brandes, M. S., and Gray, N. E. (2020) NRF2 as a therapeutic target in neurodegenerative diseases, *ASN Neuro*, **12**, 1759091419899782, doi: 10.1177/1759091419899782.
 89. Cui, L., Zhou, Q., Zheng, X., Sun, B., and Zhao, S. (2020) Mitoquinone attenuates vascular calcification by suppressing oxidative stress and reducing apoptosis of vascular smooth muscle cells via the Keap1/Nrf2 pathway, *Free Radic. Biol. Med.*, **161**, 23-31, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.028.
 90. Zinovkin, R. A., and Grebenchikov, O. A. (2020) Transcription factor Nrf2 as a potential therapeutic target for prevention of cytokine storm in COVID-19 patients, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 833-837, doi: 10.1134/S0006297920070111.
 91. Hushpulian, D. M., Ammal Kaidery, N., Ahuja, M., Poloznikov, A. A., Sharma, S. M., et al. (2021) Challenges and limitations of targeting the Keap1-Nrf2 pathway for neurotherapeutics: Bach1 de-repression to the rescue, *Front. Aging Neurosci.*, **13**, 673205, doi: 10.3389/fnagi.2021.673205.
 92. Ulasov, A. V., Rosenkranz, A. A., Georgiev, G. P., and Sobolev, A. S. (2021) Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation, *Life Sci.*, **291**, 120111, doi: 10.1016/j.lfs.2021.120111.
 93. Farré, X., Molina, R., Barteri, F., Timmers, P. R. H. J., Joshi, P. K., et al. (2021) Comparative analysis of mammal genomes unveils key genomic variability for human life span, *Mol. Biol. Evol.*, **38**, 4948-4961, doi: 10.1093/molbev/msab219.
 94. Holtze, S., Gorshkova, E., Braude, S., Cellerino, A., Dammann, P., et al. (2021) Alternative animal models of aging research, *Front. Mol. Biosci.*, **8**, 660959, doi: 10.3389/fmolb.2021.660959.
 95. Miskevich, D., Chaban, A., Dronina, M., Abramovich, I., Gottlieb, E., et al. (2021) Comprehensive analysis of 13C6 Glucose fate in the hypoxiatolerant blind mole rat skin fibroblasts, *Metabolites*, **11**, 734, doi: 10.3390/metabo11110734.
 96. Miskevich, D., Chaban, A., Dronina, M., Abramovich, I., Gottlieb, E., et al. (2021) Glutamine homeostasis and its role in the adaptive strategies of the blind mole rat, *Spalax*, *Metabolites*, **11**, 755, doi: 10.3390/metabo11110755.
 97. Omotoso, O., Gladyshev, V. N., and Zhou, X. (2021) Lifespan extension in long-lived vertebrates rooted in ecological adaptation, *Front. Cell Dev. Biol.*, **9**, 704966, doi: 10.3389/fcell.2021.704966.
 98. Podder, A., Raju, A., and Schork, N. J. (2021) Cross-species and human inter-tissue network analysis of genes implicated in longevity and aging reveal strong support for nutrient sensing, *Front. Genet.*, **12**, 719713, doi: 10.3389/fgene.2021.719713.
 99. Dontsov, A. E., Sakina, N. L., Yakovleva, M. A., Bastrakov, A. I., Bastrakova, I. G., et al. (2020) Ommochromes from the compound eyes of insects: Physicochemical properties and antioxidant activity, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 668-678, doi: 10.1134/S0006297920060048.
 100. Omran, B., and Baek, K. H. (2021) Nanoantioxidants: pioneer types, advantages, limitations, and future insights, *Molecules*, **26**, 7031, doi: 10.3390/molecules26227031.
 101. Ushakova, N. A., Brodsky, E. S., Tikhonova, O. V., Dontsov, A. E., Marsova, M. V., et al. (2021) Novel extract from beetle *Ulomoides dermestoides*: a study of composition and antioxidant activity, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 1055, doi: 10.3390/antiox10071055.
 102. Egea, J., Buendia, I., Parada, E., Navarro, E., Cuadrado, P., et al. (2015) Melatonin-sulforaphane hybrid ITH12674 induces neuroprotection in oxidative stress conditions by a "drug-prodrug" mechanism of action, *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 1807-1821, doi: 10.1111/bph.13025.
 103. Gameiro, I., Michalska, P., Tenti, G., Cores, Á., Buendia, I., et al. (2017) Discovery of the first dual GSK3 β inhibitor/Nrf2 inducer. A new multitarget therapeutic strategy for Alzheimer's disease, *Sci. Rep.*, **7**, 45701, doi: 10.1038/srep45701.
 104. Demuro, S., Di Martino, R. M. C., Ortega, J. A., and Cavalli, A. (2021) GSK-3 β , FYN, and DYRK1A: Master regulators in neurodegenerative pathways, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 9098, doi: 10.3390/ijms22169098.

LABILITY OF THE Nrf2/Keap/ARE CELL PROTECTIVE SYSTEM IN DIFFERENT MODELS OF CELL AGING AND AGE-RELATED PATHOLOGIES

Review

G. A. Shilovsky^{1,2,3}

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; e-mail: gregory_sh@list.ru, grgerontol@gmail.com*

² *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia*

³ *Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences, 127051 Moscow, Russia*

It is known that the level of oxidative stress in the organism increases with age. Accumulation of damage leading to disruption of the genome integrity can be the cause of the development of many age-related diseases and the appearance of phenotypic and physiological signs of aging. In this regard, the Nrf2 system, which regulates the expression of numerous enzymes responsible for antioxidant protection and detoxification, is of great interest. The review summarizes and analyzes data on changes in the Nrf2 system during aging *in vivo* and *in vitro* in various organs and tissues. Analysis of the literature suggests that the ability of Nrf2 to activate (triggered by an increased level of oxidative stress) steadily decreases with age. At the same time, the dynamics of Nrf2 activity measured under stress-free conditions does not have such a clear direction: in many studies, the above differences are statistically insignificant, although it is known for sure that the level of oxidative stress steadily increases with aging. This review examines the role of regulatory systems existing in the cell that limit the ability of Nrf2 to respond to oxidative stress. Senescent cells are vulnerable to oxidative damage due to impaired Nrf2 signaling, and activation of the Nrf2 pathway is a promising target for new pharmacological or genetic therapeutic strategies. Suppressors of Nrf2 expression, such as Keap1, Gsk3, c-Myc and Bach1, may contribute to age-related impairment of the inducibility of Nrf2-regulated antioxidant genes. Understanding the mechanisms of interaction of regulatory cascades linking programs for maintaining homeostasis and the cell's response to oxidative stress contributes to the elucidation of the molecular mechanisms underlying aging and longevity.

Keywords: Nrf2, Keap1, aging, lifespan, oxidative stress, age-related disorders, antioxidants