

ДОЗОЗАВИСИМОЕ ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА NRF2 *IN VITRO*

Ю.В. Абаленихина

к.б.н., доцент,
кафедра биологической химии с курсом КЛД ФДПО,
Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова (г. Рязань)
E-mail: abalenihiina88@mail.ru

А.В. Шулькин

к.м.н., доцент,
кафедра фармакологии с курсом фармации ФДПО,
Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова (г. Рязань)

П.Д. Ерохина

студентка,
Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова (г. Рязань)

И.В. Черных

к.б.н., зав. кафедрой фармацевтической химии,
Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова (г. Рязань)

Е.Н. Якушева

д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО,
Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова (г. Рязань)

Актуальность. Одним из важных факторов защиты клеток от свободных радикалов является Nrf2 (NF-E2-related factor 2) – редокс-чувствительный транскрипционный фактор, синтез которого регулируется соотношением восстановленных и окисленных SH-групп в белках.

Цель исследования. Оценка дозозависимого действия пероксида водорода на уровень Nrf2 в клетках *in vitro*.

Материал и методы. Исследование выполнено на линии клеток Caco-2. Пероксид водорода (H₂O₂) добавляли в питательную среду до концентрации 0,1; 0,5; 1; 5; 10 и 50 мкМ и инкубировали в течение 3, 24 и 72 ч. В конце эксперимента в клетках оценивали уровень белковых и небелковых тиоловых SH-групп, а также уровень Nrf2.

Результаты. Пероксид водорода во всех исследуемых концентрациях при инкубировании с клетками линии Caco-2 в течение 3 ч достоверно не влиял на концентрацию белковых и небелковых SH-групп и уровень Nrf2. При увеличении длительности воздействия до 24 ч H₂O₂ в концентрациях 0,1–1 мкМ вызывал снижение уровня восстановленных белковых тиолов, что приводило к повышению содержания Nrf2, который в свою очередь активировал антиоксидантную систему клеток и восстанавливал свободно-радикальный статус клеток к третьим суткам наблюдения. Увеличение концентрации H₂O₂ до 10 и 50 мкМ усиливало окислительный стресс, что проявлялось снижением содержания восстановленных белковых SH-групп не только к 24 ч, но и к 72 ч эксперимента, а также повышало уровень Nrf2 только к третьим суткам.

Вывод. Пероксид водорода стимулирует образование Nrf2, причем эффект прооксиданта зависит от его концентрации и продолжительности воздействия.

Ключевые слова: Nrf2, окислительный стресс, пероксид водорода, тиоловые группы, клеточная линия Caco-2.

Для цитирования: Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Ерохина П.Д., Черных И.В., Якушева Е.Н. Дозозависимое влияние пероксида водорода на уровень транскрипционного фактора NRF2 *in vitro*. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2020;23(10):12–17. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-10-02>

Гиперпродукция активных форм кислорода индуцирует реакции свободнорадикального окисления, которые, в свою очередь, стимулируют окислительное повреждение липидов, белков, нуклеиновых кислот и участвуют в патогенезе широкого спектра заболеваний [1, 2]. В физиологических условиях, благодаря многокомпонентной антиоксидантной защите, процессы свободнорадикального окисления протекают сбалансировано.

Одним из важных факторов защиты клеток от свободных радикалов является редокс-чувствительный транскрипционный фактор Nrf2 (NF-E2-related factor 2, эритроидный фактор 2), активность которого зависит от соотношения восстановленных и окисленных SH-групп в белках. Экспрессия Nrf2 повышается при развитии окислительного стресса и направлена на защиту клетки от воздействия свободных радикалов (рис. 1) [3].



Рис. 1. Участие Nrf2 в экспрессии ферментов и белков [4, 5]

В настоящее время Nrf2 можно рассматривать в качестве перспективной терапевтической мишени для коррекции окислительного стресса. Для успешного применения индукторов Nrf2 необходимо детальное изучение экспрессии данного транскрипционного фактора в условиях окислительного стресса.

Цель исследования – оценить дозозависимое влияние пероксида водорода на уровень Nrf2 в клетках *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в шестилуночных планшетах в течение 21 суток, так как именно при данном сроке происходит спонтанная дифференцировка клеток в энтероциты тонкого кишечника [6]. Окислительный стресс моделировали добавлением в питательную среду H_2O_2 в концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5; 10 и 50 μM в течение 3, 24 и 72 ч. На каждый эксперимент было по три повторения. После окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА («Sigma-Aldrich», Германия). Клетки лизировали трехкратным циклом замораживания/размораживания при $-20^\circ C$. В полученном лизате методом ИФА определяли количество Nrf2 коммерческим набором (Human Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 ELISA kit, «Bluegene», Китай). Светопоглощение измеряли при 450 нм на спектрофотометре для планшетов

StatFax 2100 («Awareness Technology», США). Концентрацию белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, «Thermo Fisher», США). Количество Nrf2 выражали в нанogramмах на миллиграмм белка.

Анализ содержания SH-групп в лизате клеток проводили по методу Элмана с 5,5'-дителиобис(2-нитро)бензоатомом (DTNB) [7]. Для определения содержания небелковых SH-групп пробу предварительно смешивали с охлажденной 5%-ной трихлоруксусной кислотой [8]. Содержание SH-групп определяли по оптической плотности при 412 нм на спектрофотометре для планшетов StatFax 2100 («Awareness Technology», США). Концентрацию SH-групп рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции $\epsilon_{412} = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и выражали в миллимолях.

Полученные результаты анализировали с помощью программ «Stat Soft Statistica 13.0». Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена–Кейлса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили, используя критерий Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Окислительный стресс в исследовании моделировали добавлением к клеткам пероксида водорода (H_2O_2) – источника активных форм кислорода, которые образуются преимущественно по реакции Фентона $Fe^{2+} + H_2O_2 = OH^- + Fe^{3+} + OH\cdot$.

Наиболее чувствительным к окислению является цистеин, который входит в состав белков (белковые тиолы) и небелковых сульфгидрилов (небелковые тиолы). Небелковые тиолы в основном представлены глутатионом [9]. Поэтому в представленной работе для характеристики степени выраженности окислительного стресса проводили оценку концентрации белковых и небелковых SH-групп в лизате клеток линии Сасо-2.

Воздействие H_2O_2 в течение 3 ч не приводило к статистически значимому изменению уровня белковых (рис. 2) и небелковых (рис. 3) SH-групп по сравнению с показателем контроля. Стабильность тиолового статуса внутри клетки свидетельствует об отсутствии окислительного стресса. Скорее всего, инкубации в течение 3 ч недостаточно для индукции окислительного стресса. При

этом уровень Nrf2 также достоверно не изменялся (таблица).

Воздействие H_2O_2 в течение 24 ч в концентрациях 0,1; 0,5 и 1 мкМ приводило к снижению уровня восстановленных белковых тиолов (рис. 2) и увеличению небелковых SH-групп (рис. 3) относительно значений контрольной группы. При концентрациях H_2O_2 5, 10 и 50 мкМ уровень восстановленных белковых (рис. 2) и небелковых (рис. 3) тиолов снижался относительно контрольных значений, что свидетельствует об усугублении окислительного стресса. Количество транскрипционного фактора Nrf2 статистически значимо возрастало при концентрациях пероксида водорода 0,1; 0,5 и 1 мкМ и не изменялось относительно контрольных значений при действии H_2O_2 на протяжении 24 ч в концентрациях 5, 10 и 50 мкМ (таблица).

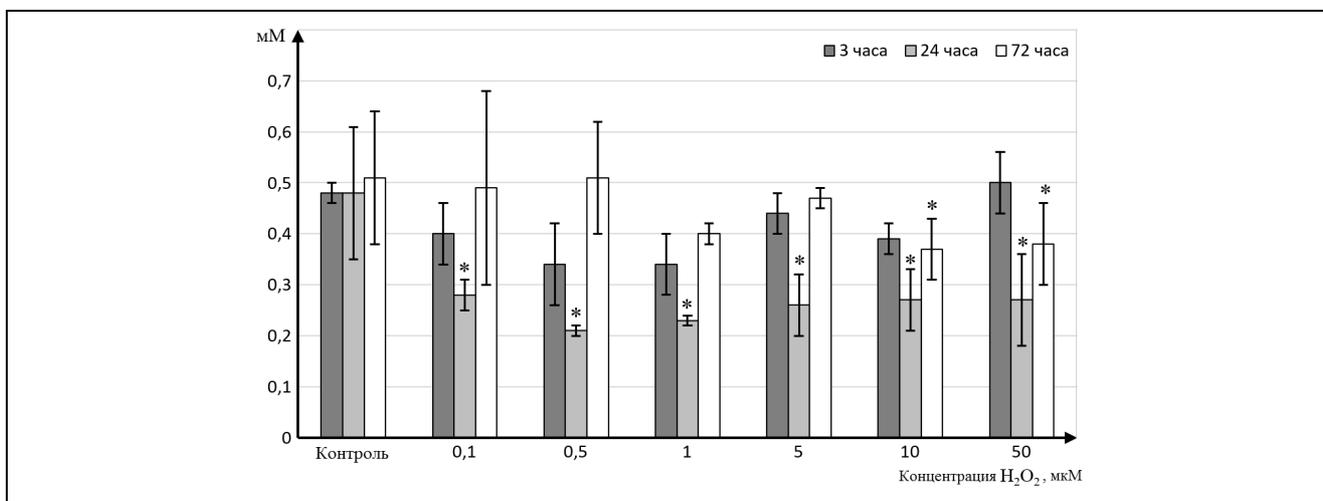


Рис. 2. Концентрация белковых SH-групп в лизате клеток линии Сасо-2 при действии H_2O_2 в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$); * – статистически значимые отличия от контроля ($p < 0,05$)

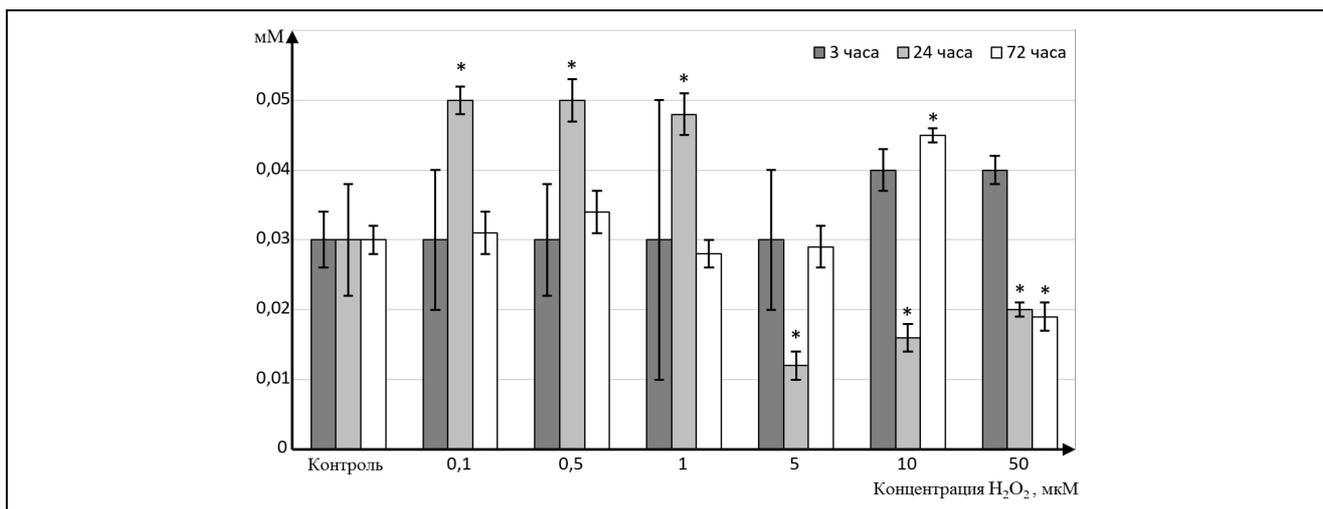


Рис. 3. Концентрация небелковых SH-групп в лизате клеток линии Сасо-2 при действии H_2O_2 в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$); * – статистически значимые отличия от контроля ($p < 0,05$)

Таблица. Количество Nrf2 (нг/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при действии H₂O₂ в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 3, 24, и 72 ч (M±SD, n=3)

Концентрация H ₂ O ₂ , мкМ	3 ч	24 ч	72 ч
Контроль	0,37±0,03	0,34±0,04	0,39±0,09
0,1	0,39±0,07	1,69±0,39*	0,40±0,07
0,5	0,43±0,19	1,41±0,31*	0,49±0,10
1	0,48±0,11	0,92±0,24*	0,40±0,07
5	0,42±0,08	0,55±0,06	0,56±0,19
10	0,32±0,07	0,44±0,23	1,61±0,25*
50	0,50±0,17	0,47±0,1	1,35±0,32*

Примечание: * – статистически значимые отличия от контроля ($p < 0,05$).

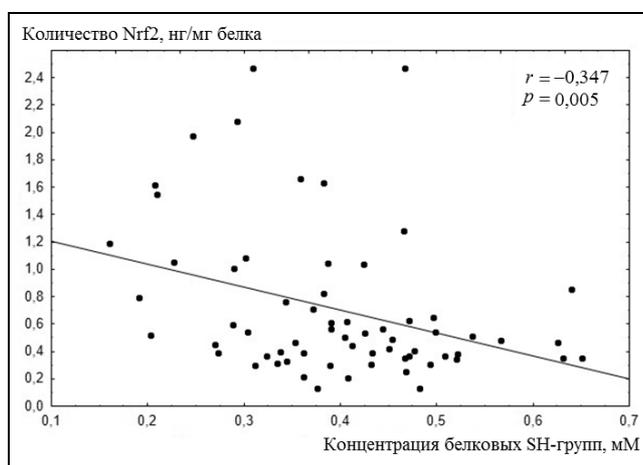


Рис. 4. Корреляционная зависимость между количеством Nrf2 и концентрацией белковых SH-групп при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч

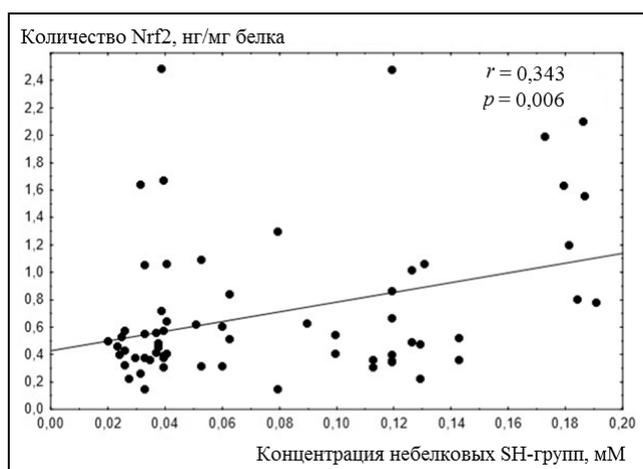


Рис. 5. Корреляционная зависимость между количеством Nrf2 и концентрацией небелковых SH-групп при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч

Синтез глутатиона из составляющих его аминокислот включает две ферментативные стадии, идущие с затратой АТФ: образование γ -глутамилцистеина из глутамата и цистеина, а также образование глутатиона из γ -глутамилцистеина и глицина [10]. Необходимые для синтеза глутатиона аминокислоты в условиях окислительного стресса способны высвобождаться из модифицированных белков в процессе протеасомной деградации, что может объяснить повышение уровня небелковых SH-групп при воздействии H₂O₂.

Усиление окислительного стресса приводило к дальнейшему окислению как белковых, так и вновь образованных SH-групп, что проявлялось в снижении данных показателей.

Уровень белковых тиоловых SH-групп при воздействии H₂O₂ в течение 72 ч в концентрации 10 и 50 мкМ снижался, а при концентрациях пероксида водорода 0,1; 0,5; 1 и 5 мкМ не изменялся относительно значений контрольной группы (рис. 2). Концентрация небелковых тиоловых групп статистически значимо возрастала при действии H₂O₂ в концентрации 10 мкМ и снижалась при концентрации 50 мкМ, а при концентрациях 0,1; 0,5; 1 и 5 мкМ не изменялась (рис. 3). Количество Nrf2 в клетках линии Сасо-2 повышалось под действием H₂O₂ в течение 72 ч в концентрациях 10 и 50 мкМ по сравнению с контролем, а при остальных концентрациях прооксиданта достоверно не изменялось (таблица).

При этом при инкубации клеток Сасо-2 с пероксидом водорода в концентрациях 0,1–50 мкМ количество Nrf2 было обратно пропорционально концентрации белковых SH-групп: $r = -0,373$, $p = 0,005$ (рис. 4) и прямо пропорционально уровню небелковых тиолов (рис. 5).

Таким образом, при воздействии H_2O_2 в течение 24 ч в концентрациях 0,1–1 мкМ происходит снижение уровня восстановленных белковых тиолов, что приводит к повышению содержания Nrf2, который, в свою очередь, активирует антиоксидантную систему клеток и восстанавливает свободнорадикальный статус клеток к третьим суткам наблюдения. Увеличение концентрации H_2O_2 до 10 и 50 мкМ усиливает окислительный стресс, что проявляется снижением содержания восстановленных белковых SH-групп не только к 24 ч, но и к 72 ч эксперимента, а также повышает уровень Nrf2 только к третьим суткам.

Полученная корреляционная связь между содержанием белковых SH-групп и уровнем Nrf2 демонстрирует, что образование внутримолекулярных дисульфидов способствует активации транскрипционного фактора Nrf2 и имеет регуляторное значение при действии H_2O_2 . Известно, что в физиологических условиях активность Nrf2 подавляется супрессором Keap1 (Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1), который связан с цитоскелетом и способствует убиквитин-опосредованной деградации Nrf2. Ковалентная модификация остатков цистеинав Keap1 приводит к его убиквитин-зависимой деградации и вследствие этого активации Nrf2 [2]. Кроме этого, в цитоплазме активация Nrf2 происходит в результате синтеза *de novo* [11]. Можно предположить, что при воздействии низких концентраций H_2O_2 (0,1; 0,5; 1 и 5 мкМ) происходит быстрое (к 24 ч эксперимента) повышение уровня Nrf2, за счет его посттрансляционной стабилизации, а при воздействии высоких концентраций прооксиданта (10, 50 мкМ) увеличение содержания Nrf2 к третьим суткам эксперимента осуществляется в основном за счет синтеза *de novo*.

Корреляционная зависимость между количеством Nrf2 и концентрацией небелковых SH-групп при индукции окислительного стресса пероксидом водорода свидетельствует о возможной индукции антиоксидантных генов [12].

Выводы

Показано, что пероксид водорода стимулирует образование Nrf2. При этом эффект прооксиданта зависит от его концентрации и продолжительности воздействия.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-1856.2020.7.

ЛИТЕРАТУРА

1. Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. Clin. Interv. Aging. 2018; 13: 757–772.
2. Калинин П.Е., Сучков И.А., Максаев Д.А. Эндотелиальная дисфункция у пациентов с вторичной лифедемой и способы ее коррекции (обзор литературы). Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2019; 7(2): 283–293.
3. Kim K.M., Ki S.H. Nrf2: a key regulator of redox signaling in liver diseases liver. Pathophysiology: therapies and antioxidants. 2017; 28: 355–374.
4. Ляхович В.В., Вавилин В.А., Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б. Активная защита при окислительном стрессе. Антиоксидант-респонсивный элемент (обзор). Биохимия. 2006; 71(9): 1183–1198.
5. Kensler T.W., Wakabayashi N. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? Carcinogenesis. 2010; 31(1): 90–99.
6. Ерохина П.Д., Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Черных И.В., Попова Н.М. Слепнев А.А., Якушева Е.Н. Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-P *in vitro*. Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2020; 28(2): 135–142.
7. Boschi-Muller S., Azza S., Sanglier-Cianferani S. et al. A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from Escherichia Coli. J. Biol. Chem. 2000; 275(46): 35908–35913.
8. Яковлев А.А., Гуляева Н.В. Определение тиоловых групп в ткани мозга при помощи THIOLGLO-1. Биомедицинская химия. 2004; 50(4): 390–397.
9. Nagy L., Nagata M., Szabo S. Protein and non-protein sulfhydryls and disulfides in gastric mucosa and liver after gastrotoxic chemicals and sucralfate: Possible new targets of pharmacologic agents. World J. Gastroenterol. 2007; 13(14): 2053–2060.
10. Shelly C., Lu M.D. Glutathione synthesis. Biochim. Biophys. Acta. 2013; 1830(5): 3143–3153.
11. Covas G., Marinho H.S., Cyrne L., Antunes F. Activation of Nrf2 by H_2O_2 : De Novo Synthesis Versus Nuclear Translocation. Methods in Enzymology. 2013; 528: 157–171.
12. Steele M.L., Fuller S., Patel M., et al. Effect of Nrf2 activators on release of glutathione, cysteinylglycine and homocysteine by human U373 astroglial cells. Redox. Biol. 2013; 1(1): 441–445.

Поступила 3 августа 2020 г.

DOSE-DEPENDENT EFFECT OF HYDROGEN PEROXIDE ON THE LEVEL OF TRANSCRIPTION FACTOR NRF2 *IN VITRO*

© Authors, 2020

Yu.V. Abalenikhina

Ph.D. (Biol.), Associate Professor,
Ryazan State Medical University (Ryazan)
E-mail: abalenikhina88@mail.ru

A.V. Shchulkin

Ph.D. (Med.), Associate Professor,
Ryazan State Medical University (Ryazan)

P.D. Erokhina

Student,
Ryazan State Medical University (Ryazan)

I.V. Chernykh

Ph.D. (Biol.), Associate Professor,
Ryazan State Medical University (Ryazan)

E.N. Yakusheva

Dr.Sc. (Med.), Professor,
Ryazan State Medical University (Ryazan)

Introduction. Nrf2 (NF-E2-related factor 2) is a redox-sensitive transcription factor whose synthesis is regulated by the ratio of reduced and oxidized SH groups in proteins.

The aim of the study was to evaluate the dose-dependent effect of hydrogen peroxide on Nrf2 level *in vitro*.

Materials and methods. The study was performed on the cell line Caco-2. Hydrogen peroxide (H₂O₂) was added to the culture medium to concentrations 0.1; 0.5; 1; 5; 10 and 50 μM and cells were incubated for 3, 24 and 72 hours. At the end of the experiment the level of protein and protein-free thiol (SH-) groups, as well as the level of Nrf2 were evaluated in the cells.

Results. H₂O₂ during incubation with Caco-2 cells for 3 hours did not significantly affect the concentration of protein and protein-free SH-groups and the level of Nrf2 in all concentrations. When the duration of exposure was increased to 24 hours H₂O₂ at concentrations 0.1–1 μM caused a decrease in the level of reduced protein thiols, which led to an increase in the content of Nrf2, which in turn activated the antioxidant system of cells and restored the free radical status of cells after 3 days of incubation. Increased concentrations of H₂O₂ (10 and 50 μM) induced oxidative stress, which was manifested by a depletion of reduced protein SH-groups not only after 24 hours, but also after 72 hours of the experiment. The level Nrf2 was elevated only after 3 days.

Conclusion. Hydrogen peroxide stimulates the formation of Nrf2 in the time- and concentration-dependent manner.

Key words: Nrf2, oxidative stress, hydrogen peroxide, thiol groups, Caco-2 cell line.

For citation: Abalenikhina Yu.V., Shchulkin A.V., Erokhina P.D., Chernykh I.V., Yakusheva E.N. Dose-dependent effect of hydrogen peroxide on the level of transcription factor NRF2 *in vitro*. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2020;23(10):12–17. <https://doi.org/10.29296/25877313-2020-10-02>

REFERENCES

- Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clin. Interv. Aging.* 2018; 13: 757–772.
- Kalinin R.E., Suchkov I.A., Maksaev D.A. Jendotelial'naja disfunkcija u pacientov s vtorichnoj lifedemoj i sposoby ee korekcii (obzor literatury). *Nauka molodyh (Eruditio Juvenium)*. 2019; 7(2): 283–293.
- Kim K.M., Ki S.H. Nrf2: a key regulator of redox signaling in liver diseases liver. *Pathophysiology: therapies and antioxidants*. 2017; 28: 355–374.
- Ljahovich V.V., Vavilin V.A., Zenkov N.K., Men'shnikova E.B. Aktivnaja zashhita pri oksilitel'nom stresse. *Antioxidant-responsivnyj jelement (obzor)*. *Biohimija*. 2006; 71(9): 1183–1198.
- Kensler T.W., Wakabayashi N. Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis*. 2010; 31(1): 90–99.
- Erokhina P.D., Abalenikhina Ju.V., Shhul'kin A.V., Chernyh I.V., Popova N.M. Slepnev A.A., Jakusheva E.N. Izuchenie vlijanija progesterona na aktivnost' glikoproteina-R in vitro. *Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova*. 2020; 28(2): 135–142.
- Boschi-Muller S., Azza S., Sanglier-Cianferani S. et al. A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.* 2000; 275(46): 35908–35913.
- Jakovlev A.A., Guljaeva N.V. Opredelenie tiolovyh grupp v tkani mozga pri pomoshhi THIOLGLO-1. *Biomedicinskaja himija*. 2004; 50(4): 390–397.
- Nagy L., Nagata M., Szabo S. Protein and non-protein sulfhydryls and disulfides in gastric mucosa and liver after gastrotoxic chemicals and sucralfate: Possible new targets of pharmacologic agents. *World J. Gastroenterol.* 2007; 13(14): 2053–2060.
- Shelly C., Lu M.D. Glutathione synthesis. *Biochim. Biophys. Acta*. 2013; 1830(5): 3143–3153.
- Covas G., Marinho H.S., Cyrne L., Antunes F. Activation of Nrf2 by H₂O₂: De Novo Synthesis Versus Nuclear Translocation. *Methods in Enzymology*. 2013; 528: 157–171.
- Steele M.L., Fuller S., Patel M., et al. Effect of Nrf2 activators on release of glutathione, cysteinylglycine and homocysteine by human U373 astroglial cells. *Redox. Biol.* 2013; 1(1): 441–445.