

УДК 577.121.7

DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ105574>

Внутриклеточная локализация и функция ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro*

Ю. В. Абаленихина✉, П. Д. Ерохина, А. А. Сеидкулиева, О. А. Завьялова,
А. В. Шулькин, Е. Н. Якушева

Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Рязань, Российская Федерация

АННОТАЦИЯ

Введение. Ядерный фактор эритроидного происхождения 2 (англ.: *nuclear factor E2-related factor 2*, Nrf2) является членом семейства *cap'n'collar* (CNC) подсемейства факторов транскрипции лейциновой молнии, который регулирует клеточную защиту от воздействия токсичных веществ и окислителей.

Цель. Определить локализацию, механизм активации и роль Nrf2 в условиях окислительного стресса *in vitro*.

Материалы и методы. Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2). Окислительный стресс (ОС) моделировали добавлением в питательную среду пероксида водорода (H₂O₂) в концентрациях 0,1–100 мкМ и инкубацией 24 и 72 ч. При оценке функции Nrf2 к клеткам добавляли его ингибитор — АЕМ1 — в концентрации 5 мкМ. Степень развития ОС определяли фотометрическими методами по концентрации белковых SH-групп и карбонильных производных белков, активности супероксиддисмутазы (СОД). Жизнеспособность клеток оценивали по результатам цитотоксического теста (МТТ-тест), количество Nrf2 в цитоплазме и ядре определяли методом гетерогенного иммуноферментного анализа.

Результаты. При инкубации клеток линии Caco-2 с H₂O₂ происходило снижение уровня белковых SH-групп и увеличение концентрации карбонильных производных белков. Активность СОД возрастала при инкубации с H₂O₂ в течение 24 ч 0,1–10 мкМ и 72 ч 10 мкМ. При концентрациях H₂O₂ 50 и 100 мкМ (24 и 72 ч) происходило снижение активности СОД и жизнеспособности клеток. Воздействие H₂O₂ приводило к транслокации Nrf2 из цитоплазмы в ядро. Была выявлена прямая корреляционная зависимость между концентрацией белковых SH-групп и количеством Nrf2 в цитоплазме при инкубации с H₂O₂ 24 ч ($r = 0,44$, $p = 0,03$), 72 ч ($r = 0,34$, $p = 0,05$). Количество Nrf2 в ядре положительно коррелировало с активностью СОД в цитоплазме при воздействии H₂O₂ 24 ч ($r = 0,77$, $p = 0,0001$) и 72 ч ($r = 0,36$, $p = 0,06$). При ингибировании Nrf2 в условиях воздействия H₂O₂ жизнеспособность клеток снижалась в большей степени.

Вывод. Пероксид водорода индуцирует ядерную транслокацию Nrf2, что способствует активации антиоксидантного фермента СОД и сохраняет жизнеспособность клеток в условиях ОС *in vitro*.

Ключевые слова: ядерный фактор эритроидного происхождения 2 (Nrf2); супероксиддисмутаза; окислительный стресс; клетки линии Caco-2

Для цитирования:

Абаленихина Ю.В., Ерохина П.Д., Сеидкулиева А.А., Завьялова О.А., Шулькин А.В., Якушева Е.Н. Внутриклеточная локализация и функция ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2022. Т. 30, № 3. С. 295–304. DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ105574>

DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ105574>

Intracellular Location and Function of Nuclear Factor of Erythroid Origin 2 (Nrf2) in Modeling Oxidative Stress *in vitro*

Yuliya V. Abalenikhina✉, Pelageya D. Erokhina, Adamiana A. Seidkuliyeva, Ol'ga A. Zav'yalova, Aleksey V. Shchul'kin, Elena N. Yakusheva

Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation

ABSTRACT

INTRODUCTION: Nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) is a member of cap'n'collar (CNC) family of subfamily of leucine zipper transcription factors that regulates cell protection against toxic substances and oxidants.

AIM: To determine location, mechanism of activation and role of Nrf2 in conditions of oxidative stress *in vitro*.

MATERIALS AND METHODS: The study was performed on human colon adenocarcinoma cell line (*Caco-2*). Oxidative stress (OS) was modeled by adding hydrogen peroxide (H_2O_2) at concentrations of 0.1 μM –100 μM to the nutritive medium and incubation for 24 and 72 hours. In assessment of Nrf2 function, its inhibitor — AEM1 — was added to cells at a concentration of 5 μM . The extent of OS development was determined using photometric methods by the concentration of protein SH-groups and carbonyl derivatives of protein, and the activity of superoxide dismutase (SOD). Viability of cells was assessed by the results of cytotoxic test (MTT assay), the amount of Nrf2 in the cytoplasm and nucleus was determined by heterogenous ELISA method.

RESULTS: Incubation of *Caco-2* cells with H_2O_2 resulted in decrease in the level of protein SH-groups and increase in the concentration of carbonyl derivatives of protein. In incubation with H_2O_2 at concentrations of 0.1 μM –10 μM for 24 hours and 10 μM for 72 hours, the activity of SOD increased. At concentrations of H_2O_2 of 50 μM and 100 μM (24 hour and 72 hour), SOD activity and viability of cells decreased. Exposure to H_2O_2 led to translocation of Nrf2 from the cytoplasm into nucleus. Direct correlation dependence was revealed between concentration of protein SH-groups and the amount of Nrf2 in the cytoplasm in incubation with H_2O_2 for 24 hour ($r = 0.44$, $p = 0.03$), 72 hour ($r = 0.34$, $p = 0.05$). The amount of Nrf2 in the nucleus positively correlated with SOD activity in the cytoplasm on exposure to H_2O_2 for 24 hour ($r = 0.77$, $p = 0.0001$) and 72 hour ($r = 0.36$, $p = 0.06$). In inhibition of Nrf2 in conditions of exposure to H_2O_2 , the viability of cells decreased to a larger extent.

CONCLUSION: Hydrogen peroxide induces the nuclear translocation of Nrf2, which promotes activation of antioxidant enzyme SOD and preserves viability of cells of OS conditions *in vitro*.

Keywords: nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2); superoxide dismutase; oxidative stress; *Caco-2* line cells

For citation:

Abalenikhina YuV, Erokhina PD, Seidkuliyeva AA, Zav'yalova OA, Shchul'kin AV, Yakusheva EN. Intracellular Location and Function of Nuclear Factor of Erythroid Origin 2 (Nrf2) in Modeling Oxidative Stress *in vitro*. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2022;30(3):295–304. DOI: <https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ105574>

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК — активная форма кислорода
ДТНБ — 5,5'-ди-тиобис(2-нитро)-бензойная кислота
МТТ — 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия бромид
ОП — оптическая плотность
ОС — окислительный стресс
СОД — супероксиддисмутаза
ARE — antioxidant respons(ive) element (элемент антиоксидантного ответа)
Cul3 — cullin 3 (куллин 3)

keap1 — kelch-like ECH associated protein 1 (келч-подобный ассоциированный с ECH белок 1)
Maf — musculoaponeurotic fibrosarcoma (мышечно-апоневротическая фибросаркома)
Nrf2 — nuclear factor E2-related factor 2 (ядерный фактор эритроидного происхождения 2)
Ub — ubiquitin (убиквитин)
AEM1 — antioxidant respons(ive) element expression modulator (модулятор экспрессии элемента антиоксидантного ответа)

ВВЕДЕНИЕ

Активные формы кислорода (АФК) постоянно образуются в организме в результате внутриклеточного метаболизма или внешнего воздействия прооксидантов. АФК, образующиеся в ответ на физиологические изменения, действуют как важные сигнальные молекулы, регулируя такие процессы, как *деление клеток, воспаление, иммунная реакция, аутофагия и ответ на стресс* [1]. Гиперпродукция свободных радикалов, сопровождающаяся снижением антиоксидантной активности клетки, приводит к развитию окислительного стресса (ОС), который ухудшает клеточные функции и способствует развитию многих патологий [2].

Механизм сигнального действия АФК осуществляется через активацию транскрипционных факторов, которые, в свою очередь, связываясь с промоторами генов, запускают экспрессию ряда белков [1].

Ядерный фактор эритроидного происхождения 2 (англ.: *nuclear factor E2-related factor 2*, Nrf2) является членом семейства *cap'n'collar* (CNC) подсемейства факторов транскрипции лейциновой молнии (bZIP) [3]. Nrf2 представляет собой транскрипционный фактор, который регулирует клеточную защиту от воздействия токсичных веществ и окислителей [4].

Доказано, что Nrf2 стимулирует индукцию ферментов (глутатион S-трансфераза и NAD(P)H-дегидрогеназа, оксидоредуктаза и др.), участвующих в метаболизме ксенобиотиков, что приводит к биотрансформации и выведению экзогенных и эндогенных химических веществ [5]. В этом случае Nrf2 функционирует как активированный ксенобиотиком рецептор (англ.: *xenobiotic-activated receptors*, XAR) [4]. Тем не менее основной функцией Nrf2 является его роль, определяющая устойчивость клетки к ОС.

Известно, что нокаут Nrf2 у мышей повышал их чувствительность к широкому спектру химических веществ и патологиям, связанным с ОС [6]. Отмечено, что повышение активности Nrf2 под действием химических веществ защищает животных от ОС [7, 8].

Таким образом, Nrf2, индуцируя экспрессию антиоксидантных ферментов и сигнальных белков, проявляет защитные эффекты при воздействии токсичных веществ

и развитии патологических состояний, протекающих на фоне ОС, поэтому выяснение протективных механизмов Nrf2 является актуальным направлением исследований, т. к. позволит определить пути адаптации к ОС и избежать негативного воздействия АФК.

Цель — определить локализацию, механизм активации и роль Nrf2 в условиях окислительного стресса *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (*Caco-2*, ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5% содержания CO₂ в инкубаторе WS-189C (World Science, Корея) в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4 500 мг/л) с добавлением L-глутамин (4 мМ), 15% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ед/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (все составляющие производства Sigma-Aldrich, Германия) соответственно. Клетки культивировали в течение 21 сут, поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки [9].

ОС моделировали добавлением в питательную среду пероксида водорода (H₂O₂, Sigma-Aldrich, Германия) в концентрациях 0,1, 0,5, 1, 10, 50, 100 мкМ и инкубацией 24 и 72 ч. К контрольным клеткам в эквивалентном объеме прибавляли воду для инъекций (растворитель H₂O₂).

При оценке участия Nrf2 в адаптационных механизмах защиты клетки в условиях ОС в питательную среду за 30 мин до добавления H₂O₂ вносили ингибитор ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) — N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин (англ.: *antioxidant respons(ive) element expression modulator*, AEM1, Sigma Aldrich, Германия) в концентрации 5 мкМ [10].

Для исследования жизнеспособности клетки высевали в 96-луночный планшет (Corning, США), для изучения влияния H₂O₂ на количество Nrf2, концентрацию

белковых SH-групп и карбонильных производных белков, активность Cu,Zn-супероксиддисмутазы (СОД) клетки культивировали в 6-луночных планшетах (Corning, США).

Цитотоксический тест (МТТ-тест). Клетки засеивали в 96-луночный планшет из расчета 10^4 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут, затем добавляли питательную среду с H_2O_2 . После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0,5% раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1% раствора диметилсульфоксида (ПанЭко, Российская Федерация) [11]. Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

Жизнеспособность клеток *Caco-2* в присутствии H_2O_2 рассчитывали по формуле:

$$\text{Жизнеспособность} = \frac{\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}}{\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}} \times 100\%$$

где ОП — оптическая плотность.

Получение цитоплазматической и ядерной фракций клеточных лизатов для анализа. Клетки засеивали в 6-луночные планшеты из расчета 10^5 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут, затем добавляли культуральную среду с H_2O_2 . После окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, Sigma-Aldrich, Германия). Клетки в количестве 1×10^6 трехкратно промывали фосфатным буфером pH 7,4 (ПанЭко, Российская Федерация) и разделяли на цитоплазматическую и ядерную фракции коммерческим набором (Protein extraction kit (cytoplasmic/nuclear), BioRad, США). Полученные лизаты использовали для количественного определения Nrf2 в цитоплазме и ядре.

Количественный анализ содержания Nrf2 в клетках линии Caco-2. В лизате клеток методом гетерогенного иммуноферментного анализа определяли количество Nrf2 коммерческим набором (Human Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 ELISA Kit, Bluegene, Китай). Светопоглощение измеряли при 450 нм на иммуноферментном планшетном анализаторе Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

Приготовление тотальных клеточных лизатов для определения активности СОД, концентрации карбонильных производных белков и белковых SH-групп. Клетки снимали с 6-луночных планшетов после экспозиции с H_2O_2 раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, Sigma-Aldrich, Германия), трехкратно промывали фосфатным буфером pH 7,4 (ПанЭко, Российская Федерация) и лизировали ледяным буфером для лизиса, содержащим 50 мМ трис-HCl (pH 7,4), 150 мМ KCl, 0,5% тритон X-100 и ингибиторы протеиназ (4-(2-аминоэтилбензенсульфонил) флуорида гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ, апротинин 0,3 мкМ, бестатин 130 мкМ, ЭДТА 1 мМ, транс-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(-гуанидино)

бутан (E-64) 14 мкМ, лейпептин 1 мкМ, Sigma-Aldrich, Германия), встряхивали на шейкере. Клетки инкубировали на льду в течение 10 мин, после чего центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g (СМ-50, Eppendorf, Германия) для осаждения ядер. Супернатант использовали для выполнения биохимических анализов.

Метод определения карбонильных производных белков основан на их взаимодействии с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрировали при длине волны 375 нм. Концентрацию карбонильных производных белков рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции $\epsilon_{375} = 22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [12]. Анализ выполняли на иммуноферментном планшетном анализаторе Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

Определение концентрации белковых SH-групп. Концентрацию белковых тиоловых групп определяли по разнице между уровнем общих и низкомолекулярных SH-групп. Анализ содержания общих SH-групп в лизате клеток проводили по методу Элмана с 5,5'-ди-тиобис(2-нитро)-бензойной кислотой (ДТНБ) [13]. К 100 мкл образца добавляли 100 мкл 2 мМ ДТНБ (Serva, Германия) в 1 М Tris-HCl буфере (pH 8,0) и 1000 мкл дистиллированной воды. После 30 мин экспозиции количественно оценивали содержание 5-тио-2-нитробензойной кислоты при 412 нм на Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США). Концентрацию SH-групп рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции $\epsilon_{412} = 13,6 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [14]. Для определения содержания низкомолекулярных SH-групп пробу предварительно смешивали с охлажденной 5%-ной трихлоруксусной кислотой (Химмед, Российская Федерация), инкубировали на льду 15 мин, затем центрифугировали при 11 000 g (СМ450, Eppendorf, Германия) 5 мин при 4°C. Полученный супернатант нейтрализовали с помощью 1%-ного NaOH (Химмед, Российская Федерация) и использовали для определения низкомолекулярных SH-групп по реакции с ДТНБ.

Активность СОД оценивали по регистрации степени торможения реакции окисления кверцетина, фиксируемой по изменению оптической плотности реакционной смеси при длине волны $\lambda = 406$ нм. Определение процента ингибирования окисления кверцетина за 3 мин проводили по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = \Delta D_x - \Delta D_0 / \Delta D_x \times 100\%$$

где ΔD_x — изменение оптической плотности при 406 нм за 3 мин в контрольной пробе, без СОД; ΔD_0 — изменение оптической плотности при 406 нм за 3 мин в опытной пробе, содержащей СОД [15].

За одну условную единицу действия (Ед) принимали 50%-ное ингибирование. Активность фермента выражали в Ед/мг белка.

Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, ThermoFisher, США).

Полученные результаты анализировали с помощью программ Statistica 13.0 (Stat Soft Inc., США) и Excel (Microsoft, США). Результаты представлены в виде средней (M) и стандартного отклонения (SD). Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена–Кейлса. Корреляционный анализ проводили с помощью критерия Пирсона. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка степени развития окислительного стресса и антиоксидантной защиты при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1–100

мкМ в клетках линии *Caco-2* in vitro. Степень развития ОС оценивали по концентрации белковых SH-групп и уровню карбонильных производных белков, степень антиоксидантной защиты — по активности СОД.

При инкубации клеток линии *Caco-2* в течение 24 ч содержание белковых SH-групп в клетках статистически значимо снижалось относительно значений контроля при воздействии H_2O_2 во всем диапазоне изученных концентраций:

0,1 мкМ — на 46,6% ($p = 0,0003$),
0,5 мкМ — на 53,0% ($p = 0,0002$),
1 мкМ — на 62,6% ($p = 0,0002$),
5 мкМ — на 51,3% ($p = 0,0002$),
10 мкМ — на 41,4% ($p = 0,0002$),
50 мкМ — на 27,2% ($p = 0,0036$),
100 мкМ — на 36,4% ($p = 0,0009$, рис. 1а).

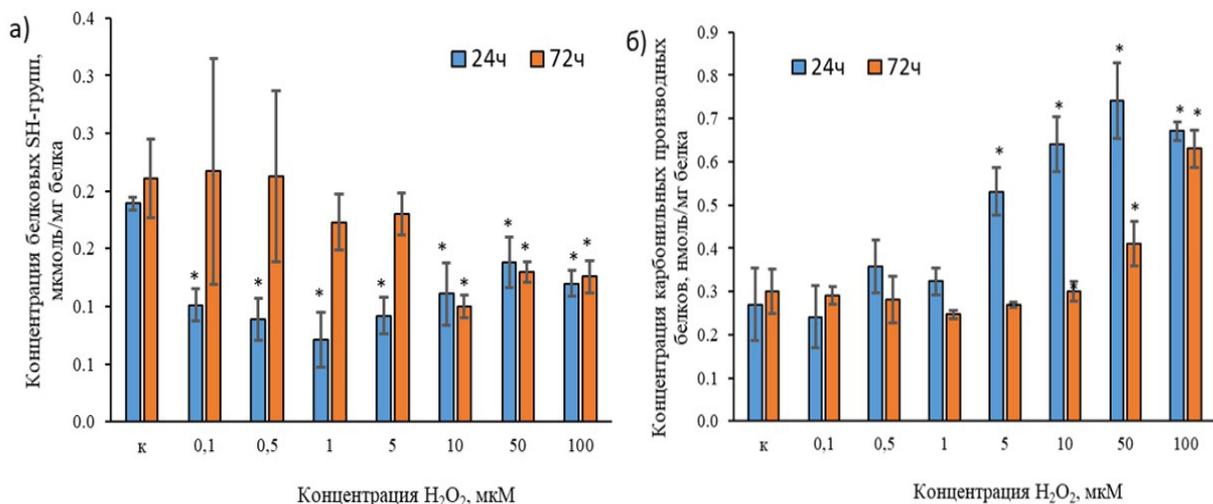


Рис. 1. Оценка развития окислительного стресса в клетках линии *Caco-2* при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1–100 мкМ в течение 24 и 72 часов: концентрация белковых SH-групп (а), концентрация карбонильных производных белков (б). *Примечание:* * — статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$ (критерий Ньюмена–Кейлса).

Увеличение времени инкубации до 72 ч вызывало статистически значимое снижение содержания белковых SH-групп в клетках при воздействии H_2O_2 в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ на 52,4% ($p = 0,02$), 38,1% ($p = 0,02$) и 40,4% ($p = 0,02$) соответственно по сравнению с данными контрольной группы (рис. 1а).

Инкубация клеток линии *Caco-2* в течение 24 ч привела к значимому повышению относительно контрольных значений уровня карбонильных производных белков при воздействии H_2O_2 в концентрациях 5, 10, 50 и 100 мкМ на 96,3% ($p = 0,03$), 137,1% ($p = 0,003$), 174,1% ($p = 0,001$) и 148,1% ($p = 0,003$) соответственно (рис. 1б).

При воздействии в течение 72 ч H_2O_2 в концентрации 50 мкМ уровень карбонильных производных белков существенно возрастал на 36,7% ($p = 0,001$), а в концентрации — 100 мкМ на 110% ($p = 0,001$) по сравнению

с контролем. В остальных концентрациях прооксидант не оказывал статистически значимого влияния на изученный показатель (рис. 1б).

При воздействии H_2O_2 в течение 24 ч в концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5 и 10 мкМ активность СОД возрастала на 216,1% ($p = 0,0002$), 187,4% ($p = 0,0002$), 206,7% ($p = 0,0002$), 86,9% ($p = 0,03$) и 78,9% ($p = 0,03$) соответственно относительно значений контрольной группы (рис. 2).

Воздействие H_2O_2 длительностью 72 ч в диапазоне 0,1–5 мкМ не оказывало влияния на активность СОД, а в концентрации 10 мкМ приводило к увеличению активности СОД на 111,8% ($p = 0,006$) в сравнении с контрольной группой (рис. 2). При концентрациях H_2O_2 50 и 100 мкМ и времени инкубации 24 ч и 72 ч отмечалась тенденция к снижению активности СОД.

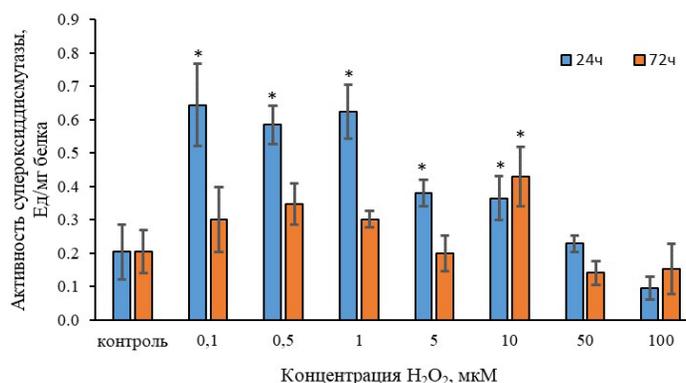


Рис. 2. Активность супероксиддисмутазы в клетках линии *Caco-2* при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1–100 мкМ в течение 24 и 72 часов.

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

Количественная оценка ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) в клетках линии *Caco-2* in vitro при воздействии H₂O₂ в концентрациях 0,1–100 мкМ. При воздействии H₂O₂ в концентрациях 0,1; 0,5 и 1 мкМ в течение 24 ч на клетки линии *Caco-2* количество Nrf2 в цитоплазме снижалось на 56,5% ($p = 0,03$), 48,6% ($p = 0,02$) и 51,7% ($p = 0,03$) и возрастало в ядре на 55,2% ($p = 0,003$), 38,1% ($p = 0,001$) и 37,0% ($p = 0,001$) соответственно относительно значений контрольной группы (рис. 3а). При концентрации H₂O₂

100 мкМ количество Nrf2 в цитоплазме не изменялось и снижалось в ядре на 80,6% ($p = 0,001$).

При инкубации клеток с H₂O₂ в течение 72 ч и концентрациях 10 и 50 мкМ количество Nrf2 снижалось на 58,8% ($p = 0,009$) и 64,7% ($p = 0,009$) соответственно в цитоплазме и возрастало на 47,7% ($p = 0,003$) и 25,8% ($p = 0,05$) соответственно в ядре. H₂O₂ в концентрации 100 мкМ при длительности воздействия 72 ч вызывала снижение уровня Nrf2 в цитоплазме на 55,6% ($p = 0,005$) и в ядре на 85,1% ($p = 0,0002$) в сравнении с группой контроля (рис. 3б).

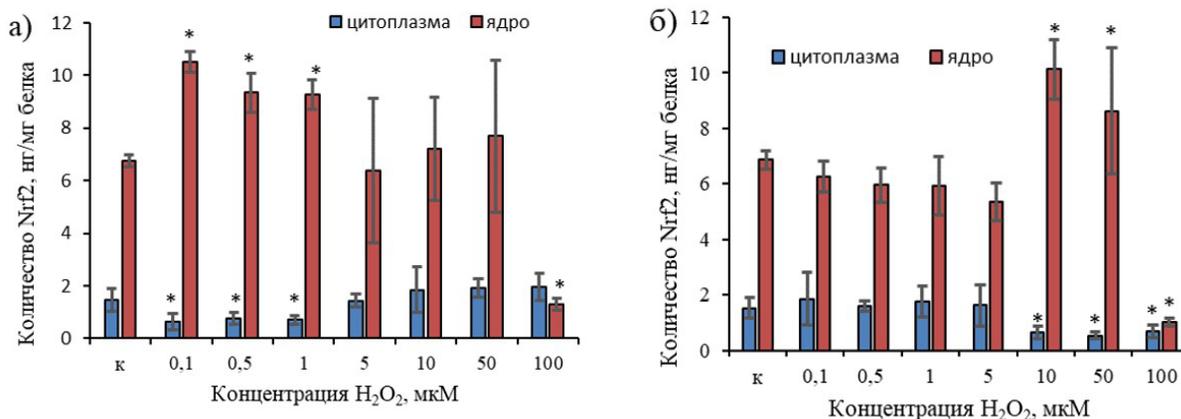


Рис. 3. Количество ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) в цитоплазме и ядре клеток линии *Caco-2* in vitro при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1–100 мкМ в течение 24 часов (а) и 72 часов (б).

Примечание: к — контроль; * — статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$ (критерий Ньюмена–Кейлса).

При проведении корреляционного анализа была выявлена прямая зависимость между концентрацией белковых SH-групп и количеством Nrf2 в цитоплазме клеток при их инкубации с H₂O₂ длительностью 24 ч ($r = 0,44$; $p = 0,03$), 72ч ($r = 0,34$; $p = 0,05$). В свою очередь, количество Nrf2 в ядре положительно коррелировало

с активностью СОД в клетках при воздействии H₂O₂ в течение 24 ч ($r = 0,77$; $p = 0,0001$) и 72 ч ($r = 0,36$; $p = 0,06$).

Защитную функцию Nrf2 оценивали по жизнеспособности клеток линии *Caco-2* при воздействии H₂O₂ и при воздействии H₂O₂ в присутствии ингибитора Nrf2 — АЕМ1.

Инкубация клеток с H_2O_2 в концентрациях 50 мкМ и 100 мкМ в течение 24 и 72 ч привела к статистически значимому снижению жизнеспособности клеток относительно контроля на 45,9% ($p = 0,001$) и 41,2% ($p = 0,02$), на 73,2% ($p = 0,0003$) и на 65,7% ($p = 0,002$) соответственно (рис. 4). При внесении в питательную среду ингибитора Nrf2 (AEM1, 5 мкМ) за 30 мин

до инкубации с прооксидантом жизнеспособность клеток статистически значимо снижалась при концентрациях H_2O_2 — 0,1–10 мкМ (инкубация 24 ч) и 0,5–10 мкМ (инкубация 72 ч) относительно значений жизнеспособности клеток, которые инкубировали только с H_2O_2 , что указывает на защитную роль Nrf2 в условиях ОС (рис. 4).

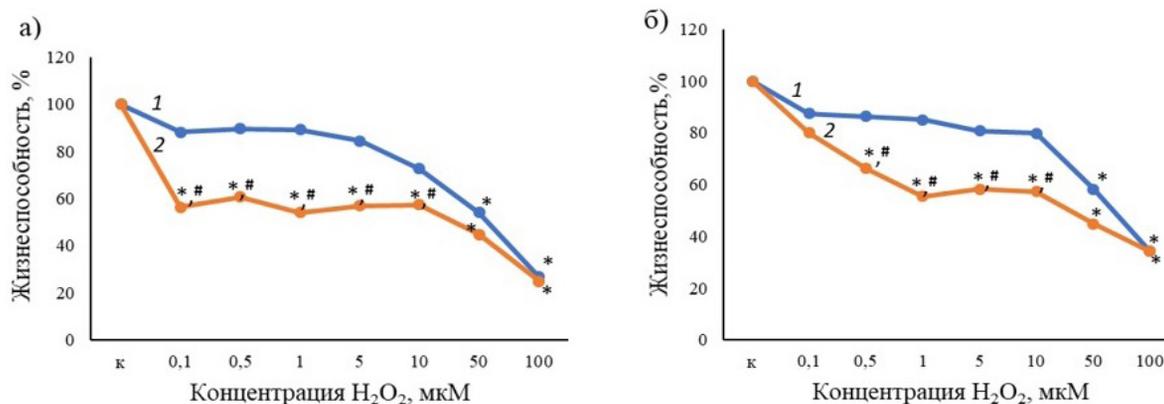


Рис. 4. Жизнеспособность клеток линии *Caco-2* при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1–100 мкМ в течение 24 часов (а) и 72 часов (б) самостоятельно (1) и в условиях ингибирования синтеза Nrf2 (2).

Примечание: к — контроль; * — статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$ (критерий Ньюмена–Кейлса); # — статистически значимые отличия от группы H_2O_2 , $p < 0,05$ (критерий Ньюмена–Кейлса).

ОБСУЖДЕНИЕ

Гиперпродукция АФК при сниженной емкости антиоксидантной защиты клетки приводит к повреждению макромолекул (белков, липидов, нуклеиновых кислот) [16, 17]. Наиболее чувствительными к действию прооксидантов являются остатки цистеина в белковых молекулах. Реакционноспособные сульфгидрильные (SH) группы — это регуляторные центры, которые являются молекулярными переключателями активности белков [18].

На изменение соотношения восстановленных и окисленных SH-групп в белках реагирует Nrf2-редокс-чувствительный транскрипционный фактор. Его экспрессия повышается при развитии ОС и направлена на защиту клетки от воздействия свободных радикалов [19]. В нормальных условиях данный транскрипционный фактор находится в комплексе с белком-репрессором Keap1, их связывание регулируется рядом протеинкиназ. Keap1, с одной стороны, способствует убиквитинированию и протеосомной деградации Nrf2 (необходимым условием для этого процесса является наличие двух остатков цистеина в молекуле Keap1), а с другой — предотвращает его проникновение из цитоплазмы в ядро (рис. 5) [20].

После активации комплекс Keap1–Nrf2 диссоциирует, и Nrf2 транслицируется в ядро, где связывается с элементами антиоксидантного ответа (англ.: *antioxidant*

responsive element, ARE) и активирует транскрипцию защитных ферментов [20].

Полученные результаты демонстрируют, что при развитии ОС под действием H_2O_2 происходит диссоциация Keap1–Nrf2 за счет окисления белковых SH-групп и транслокация Nrf2 в ядро (рис. 5), что подтверждается корреляционной взаимосвязью изученных показателей.

Антиоксидантные ферменты играют важную роль в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза и защите клеток от повреждения и апоптоза, особенно при воздействии прооксидантов. Супероксиддисмутаза (КФ 1.15.1.1) является ключевым ферментом антиокислительных систем всех аэробных организмов, катализирующим превращение анион-радикала кислорода (O_2^-) в перекись водорода и молекулярный кислород.

Увеличение количества Nrf2 в ядре приводит к возрастанию активности СОД, что подтверждается положительной корреляционной взаимосвязью при действии H_2O_2 (рис. 5).

При воздействии прооксиданта в течение 72 ч статистически значимой корреляционной взаимосвязи между активностью СОД и количеством Nrf2 в ядре получено не было. Вероятно, при длительном воздействии H_2O_2 (72 ч) защитный механизм Nrf2, направленный на сохранение жизнеспособности клеток, реализуется не только через активацию СОД, но и другие

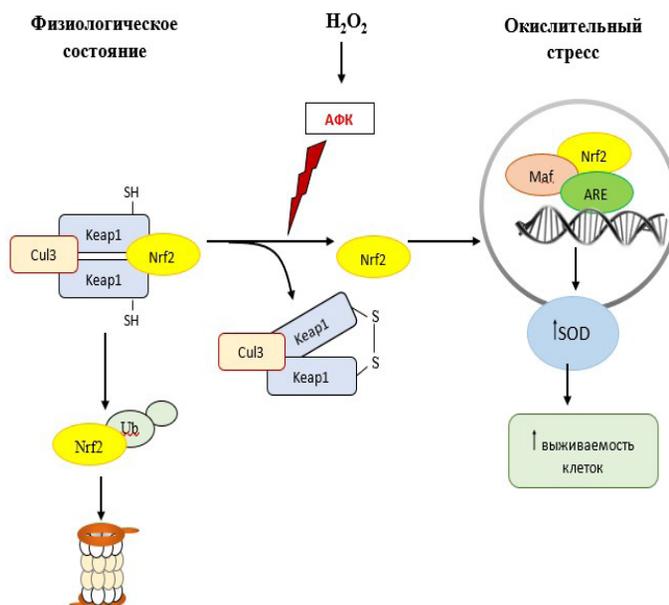


Рис. 5. Механизм защитного действия транскрипционного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) в условиях окислительного стресса, индуцируемого пероксидом водорода в концентрациях 0,1–100 мкМ *in vitro*.

Примечания: АФК — активные формы кислорода; ARE — antioxidant respons(ive) element (элемент антиоксидантного ответа); Cul3 — cullin 3; keap1 — kelch-like ECH associated protein 1 (келч-подобный ассоциированный с ECH белок 1); Maf — musculoaroneurotic fibrosarcoma (мышечно-апоневротическая фибросаркома); Nrf2 — nuclear factor E2-related factor 2 (ядерный фактор эритроидного происхождения 2); SOD — супероксиддисмутаза; Ub — белок убиквитин.

антиоксидантные ферменты, в индукции которых участвует Nrf2.

Описанный каскад биохимических процессов имеет важное значение для сохранения жизнеспособности клеток в условиях ОС. При воздействии на клетки линии *Caco-2* H₂O₂ в концентрациях 0,1–10 мкМ длительностью 24 ч и в концентрациях 0,5–10 мкМ длительностью 72 ч жизнеспособность клеток поддерживалась за счет транскрипционного фактора Nrf2, что подтверждается значимым снижением процента выживших клеток в условиях ингибирования Nrf2 с помощью АЕМ1.

ВЫВОД

Пероксид водорода при определенном диапазоне концентраций и длительности воздействия индуцирует ядерную транслокацию Nrf2, что способствует активации антиоксидантного фермента СОД и сохранению жизнеспособности клеток линии *Caco-2* в условиях ОС *in vitro*.

ДОПОЛНИТЕЛЬНО

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Вклад авторов: *Абаленихина Ю. В.* — проведение основных этапов эксперимента, анализ и интерпретация данных, написание статьи; *Ерохина П. Д.* — культивирование клеток и проведение основных этапов эксперимента; *Сеидкулиева А. А.* — культивирование клеток и проведение биохимических анализов; *Завьялова О. А.* — проведение биохимических анализов; *Щулькин А. В.* — разработка концепции и дизайна, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи; *Якушева Е. Н.* — анализ и интерпретация данных, проверка критически важного интеллектуального содержания. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Funding. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interests. The authors declare no conflicts of interests.

Contribution of the authors: *Yu. V. Abalenikhina* — conducting the main stages of the experiment, analyzing and interpreting data, writing an article; *P. D. Erokhina* — cell cultivation and conducting the main stages of the experiment; *A. A. Seidkuliyeva* — cell cultivation and biochemical analyses; *O. A. Zav'yalova* — conducting biochemical analyses; *A. V. Shchul'kin* — concept and design development, verification of critical intellectual content, final approval for publication of the manuscript; *E. N. Yakusheva* — data analysis and interpretation, verification of critical intellectual content. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2020. Vol. 21, № 7. P. 363–383. doi: [10.1038/s41580-020-0230-3](https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3)
2. Jakubczyk K., Dec K., Kałduńska J., et al. Reactive oxygen species — sources, functions, oxidative damage // *Polski Merkuriusz Lekarski*. 2020. Vol. 48, № 284. P. 124–127.
3. Moi P., Chan K., Asunis I., et al. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NFE2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994. Vol. 91, № 21. P. 9926–9930. doi: [10.1073/pnas.91.21.9926](https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.9926)
4. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2013. Vol. 53. P. 401–426. doi: [10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320](https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320)
5. Casalino E., Calzaretto G., Landriscina M., et al. The Nrf2 transcription factor contributes to the induction of alpha-class GST isoenzymes in liver of acute cadmium or manganese intoxicated rats: comparison with the toxic effect on NAD(P)H:quinone reductase // *Toxicology*. 2007. Vol. 237, № 1–3. P. 24–34. doi: [10.1016/j.tox.2007.04.020](https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.04.020)
6. Ekuban F.A., Zong C., Takikawa M., et al. Genetic ablation of Nrf2 exacerbates neurotoxic effects of acrylamide in mice // *Toxicology*. 2021. Vol. 456. P. 152785. doi: [10.1016/j.tox.2021.152785](https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152785)
7. Kim E.N., Lim J.H., Kim M.Y., et al. Resveratrol, an Nrf2 activator, ameliorates aging-related progressive renal injury // *Aging (Albany NY)*. 2018. Vol. 10, № 1. P. 83–99. doi: [10.18632/aging.101361](https://doi.org/10.18632/aging.101361)
8. Lin X., Bai D., Wei Z., et al. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway // *PLoS One*. 2019. Vol. 14, № 5. P. e0216711. doi: [10.1371/journal.pone.0216711](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216711)
9. Sambuy Y., De Angelis I., Ranaldi G., et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics // *Cell Biology and Toxicology*. 2005. Vol. 21, № 1. P. 1–26. doi: [10.1007/s10565-005-0085-6](https://doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6)
10. Bollong M.J., Yun H., Sherwood L., et al. A small molecule inhibits deregulated NRF2 transcriptional activity in cancer // *ACS Chemical Biology*. 2015. Vol. 10, № 10. P. 2193–2198. doi: [10.1021/acschembio.5b00448](https://doi.org/10.1021/acschembio.5b00448)
11. Калинин П.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., и др. Сравнение цитотоксичности синтетических сосудистых протезов in vitro // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*. 2020. Т. 28, № 2. С. 183–192. doi: [10.23888/PAVLOVJ2020282183-192](https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2020282183-192)
12. Weber D., Davies M.J., Grune T. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: focus on sample preparation and derivatization conditions // *Redox Biology*. 2015. Vol. 5. P. 367–380. doi: [10.1016/j.redox.2015.06.005](https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.005)
13. 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* // *The Journal of Biological Chemistry*. 2000. Vol. 275, № 46. P. 35908–35913. doi: [10.1074/jbc.M006137200](https://doi.org/10.1074/jbc.M006137200)
14. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959. Vol. 82, № 1. P. 70–77. doi: [10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
15. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // *Вопросы медицинской химии*. 1990. Т. 36, № 2. С. 88–91.
16. Матвеева Е.Л., Спиркина Е.С., Чегуров О.К., и др. Профиль липопероксидации в синовиальной жидкости суставов у пациентов с гонартрозом, сопровождающимся дефектами суставных поверхностей // *Наука молодых (Eruditio Juvenium)*. 2020. Т. 8, № 1. С. 70–75. doi: [10.23888/HMJ20208170-75](https://doi.org/10.23888/HMJ20208170-75)
17. Radak Z., Zhao Z., Goto S., et al. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA // *Molecular Aspects of Medicine*. 2011. Vol. 32, № 4–6. P. 305–315. doi: [10.1016/j.mam.2011.10.010](https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.010)
18. Космачевская О.В., Шумаев К.Б., Топунов А.Ф. Карбонильный стресс: от бактерий до человека. Петрозаводск: ИП Марков Н.А.; 2018.
19. Kang K.A., Hyun J.W. Oxidative stress, Nrf2, and epigenetic modification contribute to anticancer drug resistance // *Toxicological Research*. 2017. Vol. 33, № 1. P. 1–5. doi: [10.5487/TR.2017.33.1.001](https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.1.001)
20. Wen Zh., Liu W., Li X., et al. A Protective Role of the NRF2-Keap1 Pathway in Maintaining Intestinal Barrier Function // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019. Vol. 2019. P. e1759149. doi: [10.1155/2019/1759149](https://doi.org/10.1155/2019/1759149)

REFERENCES

1. Sies H., Jones D.P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 2020;21(7):363–83. doi: [10.1038/s41580-020-0230-3](https://doi.org/10.1038/s41580-020-0230-3)
2. Jakubczyk K., Dec K., Kałduńska J., et al. Reactive oxygen species — sources, functions, oxidative damage. *Polski Merkuriusz Lekarski*. 2020;48(284):124–7.
3. Moi P., Chan K., Asunis I., et al. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NFE2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994;91(21):9926–30. doi: [10.1073/pnas.91.21.9926](https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.9926)
4. Ma Q. Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 2013;53:401–26. doi: [10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320](https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-011112-140320)
5. Casalino E., Calzaretto G., Landriscina M., et al. The Nrf2 transcription factor contributes to the induction of alpha-class GST isoenzymes in liver of acute cadmium or manganese intoxicated rats: comparison with the toxic effect on NAD(P)H:quinone reductase. *Toxicology*. 2007;237(1–3):24–34. doi: [10.1016/j.tox.2007.04.020](https://doi.org/10.1016/j.tox.2007.04.020)
6. Ekuban FA, Zong C, Takikawa M, et al. Genetic ablation of Nrf2 exacerbates neurotoxic effects of acrylamide in mice. *Toxicology*. 2021;456:152785. doi: [10.1016/j.tox.2021.152785](https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152785)
7. Kim EN, Lim JH, Kim MY, et al. Resveratrol, an Nrf2 activator, ameliorates aging-related progressive renal injury. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(1): 83–99. doi: [10.18632/aging.101361](https://doi.org/10.18632/aging.101361)
8. Lin X, Bai D, Wei Z, et al. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. *PLoS One*. 2019;14(5):e0216711. doi: [10.1371/journal.pone.0216711](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216711)

9. Sambuy Y, De Angelis I, Ranaldi G, et al. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*. 2005;21(1):1–26. doi: [10.1007/s10565-005-0085-6](https://doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6)
10. Bollong MJ, Yun H, Sherwood L, et al. A small molecule inhibits deregulated NRF2 transcriptional activity in cancer. *ACS Chemical Biology*. 2015;10(10):2193–8. doi: [10.1021/acscchembio.5b00448](https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00448)
11. Kalinin RE, Suchkov IA, Mzhavanadze ND, et al. Comparison of cytotoxicity of vascular prostheses in vitro. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*. 2020;28(2):183–92. (In Russ). doi: [10.23888/PAVLOVJ2020282183-192](https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2020282183-192)
12. Weber D, Davies MJ, Grune T. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: focus on sample preparation and derivatization conditions. *Redox Biology*. 2015;5:367–80. doi: [10.1016/j.redox.2015.06.005](https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.005)
13. 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*. *The Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(46):35908–13. doi: [10.1074/jbc.M006137200](https://doi.org/10.1074/jbc.M006137200)
14. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959;82(1):70–7. doi: [10.1016/0003-9861\(59\)90090-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6)
15. Kostiuk VA, Potapovich AI, Kovaleva ZhV. A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation. *Voprosy Meditsinskoj Khimii*. 1990;36(2):88–91. (In Russ).
16. Matveeva EL, Spirikina ES, Chegurov OK, et al. Lipid peroxidation profile of synovial fluid in patients with gonarthrosis accompanied by defects of articular surface. *Science of the young (Eruditio Juvenium)*. 2020;8(1):70–5. (In Russ). doi: [10.23888/HMJ20208170-75](https://doi.org/10.23888/HMJ20208170-75)
17. Radak Z, Zhao Z, Goto S, et al. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA. *Molecular Aspects of Medicine*. 2011;32(4–6):305–15. doi: [10.1016/j.mam.2011.10.010](https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.010)
18. Kosmachevskaya OV, Shumayev KB, Topunov AF. *Karbonil'nyy stress: ot bakterij do cheloveka*. Petrozavodsk: IP Markov N.A.; 2018. (In Russ).
19. Kang KA, Hyun JW. Oxidative stress, Nrf2, and epigenetic modification contribute to anticancer drug resistance. *Toxicological Research*. 2017;33(1):1–5. doi: [10.5487/TR.2017.33.1.001](https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.1.001)
20. Wen Zh, Liu W, Li X, et al. A Protective Role of the NRF24 Keap1 Pathway in Maintaining Intestinal Barrier Function. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019;2019:e1759149. doi: [10.1155/2019/1759149](https://doi.org/10.1155/2019/1759149)

ОБ АВТОРАХ

***Абаленихина Юлия Владимировна**, к.б.н., доцент;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0427-0967>;
eLibrary SPIN: 4496-9027; e-mail: abalenikhina88@mail.ru

Ерохина Пелагея Дмитриевна;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4802-5656>;
eLibrary SPIN: 1480-6854; e-mail: erokhina.pelageya96@yandex.ru

Сеидкулиева Адамиана Аманмамедовна;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4434-8415>;
eLibrary SPIN: 2431-6897; e-mail: adamiana@inbox.ru

Завьялова Ольга Алексеевна;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9010-385X>;
eLibrary SPIN: 7590-9135; e-mail: olga.zavyalova.1999@mail.ru

Шулькин Алексей Владимирович, д.м.н., доцент;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>;
eLibrary SPIN: 2754-1702; e-mail: aleksejshulkin@rambler.ru

Якушева Елена Николаевна, д.м.н., профессор;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>;
eLibrary SPIN: 2865-3080; e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

AUTHOR'S INFO

***Yuliya V. Abalenikhina**, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0427-0967>;
eLibrary SPIN: 4496-9027; e-mail: abalenikhina88@mail.ru

Pelageya D. Erokhina;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4802-5656>;
eLibrary SPIN: 1480-6854; e-mail: erokhina.pelageya96@yandex.ru

Adamiana A. Seidkuliyeva;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4434-8415>;
eLibrary SPIN: 2431-6897; e-mail: adamiana@inbox.ru

Ol'ga A. Zav'yalova;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9010-385X>;
eLibrary SPIN: 7590-9135; e-mail: olga.zavyalova.1999@mail.ru

Aleksey V. Shchul'kin, MD, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1688-0017>;
eLibrary SPIN: 2754-1702; e-mail: aleksejshulkin@rambler.ru

Elena N. Yakusheva, MD, Dr. Sci. (Med.), Professor;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6887-4888>;
eLibrary SPIN: 2865-3080; e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author