

УДК 546.172.6:576.32/.36:616-006.6

ВЛИЯНИЕ S-НИТРОЗОГЛУТАТИОНА НА КОЛИЧЕСТВО И АКТИВНОСТЬ ЭРИТРОИДНОГО ЯДЕРНОГО ФАКТОРА Nrf2 В КЛЕТКАХ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ КАРЦИНОМЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2025 г. Ю. В. Абаленихина^{1,*}, О. Н. Сучкова¹, Е. В. Костюкова¹,
А. В. Шулькин¹, А. Ф. Топунов²

¹Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Рязань, 390026 Россия

²Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: abalenihipina88@mail.ru

Поступила в редакцию 02.12.2024 г.

После доработки 25.12.2024 г.

Принята к публикации 10.01.2025 г.

S-нитрозоглутатион (GSNO) является эндогенным донором оксида азота (NO), который, в свою очередь, может выступать как в качестве сигнальной молекулы, так и токсического агента, образуя активные формы азота (АФА). Целью данного исследования было изучение механизма участия NO в регуляции функционирования эритроидного ядерного фактора 2 (Nrf2), являющегося редокс-чувствительным транскрипционным фактором. Показано, что при воздействии GSNO на клетки линии гепатоцеллюлярной карциномы человека (HepG2) уровень внутриклеточного NO дозозависимо возрастал при инкубации в течение 24 и 72 ч. Максимальное увеличение уровня NO при концентрации 100 мкМ приводило к снижению уровня небелковых SH-групп, максимальному возрастанию уровня 3-нитротирозина и дитирозина, что способствовало снижению жизнеспособности клеток. Донор NO — S-нитрозоглутатион при экспозиции в течение 24 ч активировал Nrf2, скорее всего, за счет нитрозилирования белка Keap1, а при воздействии в течение 72 ч не только активировал Nrf2, но и приводил к повышению его количества. Этот процесс осуществлялся через NO-цГМФ-сигнальный путь. Активация Nrf2 является ключевым фактором в обеспечении защиты клеток от токсического воздействия продуктов нитрозативного стресса.

Ключевые слова: нитрозоглутатион, оксид азота, эритроидный ядерный фактор Nrf2, 3-нитротирозин, дитирозин, клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2

DOI: 10.31857/S0555109925030021 EDN: FNJZAS

S-нитрозоглутатион (GSNO) является S-нитрозилированным производным глутатиона и считается эндогенным донором оксида азота (II) (NO). Внутриклеточная концентрация NO как *in vivo*, так и *in vitro*, варьирует от 100 нМ до 1 мкМ [1]. Известно, что NO может проявлять двойственную природу и выступать как в качестве сигнальной молекулы, так и токсического агента. Так, при низких концентрациях NO индуцирует образование цГМФ и регулирует многочисленные физиологические процессы: вазодилатацию, нейротрансмиссию, апоптоз и т.д. [2, 3]. При этом более высокие концентрации NO способствуют образованию активных форм азота (АФА), кото-

рые вызывают нитрозилирование белков и ДНК, что может сопровождаться повреждением клеток [4]. Для адаптации к данному патологическому воздействию клетки активируют образование защитных белков через систему транскрипционных факторов.

Связанный с фактором транскрипции эритроидный ядерный фактор 2 (Nrf2) регулирует экспрессию генов, которые защищают клетки от окислительного повреждения [5]. Действие окислительного стресса приводит к активации Nrf2. Nrf2 удерживается в цитоплазме посредством одновременного взаимодействия с репрессорным белком Keap1, который также является рецептором

электрофильных соединений [6], и с активным цитоскелетом. Белок Keap1 выступает как отрицательный регулятор передачи сигналов от Nrf2 в физиологических условиях. Электрофильные соединения действуют на активные тиольные группы Keap1 и подавляют его способность ингибировать Nrf2 [6]. Благодаря наличию высококонсервативных редокс-чувствительных цистеинов, Keap1 способен распознавать различные классы индукторов, включая NO, электрофильные соединения, тяжелые металлы и алкилирующие агенты [7–9]. В частности, доказано, что высокореактивный Cys-151 отвечает за распознавание NO [7, 8], а диссоциация Keap1 от молекулы Nrf2 может происходить за счет окислительной модификации, нитрозилирования и гуанилирования остатков цистеина в Keap1 [10].

Модификации сигнальных тиоловых групп в Keap1 приводят к диссоциации комплекса Keap1–Nrf2 и транслокации Nrf2 в ядро, где он функционирует как сильный транскрипционный активатор генов, в промоторе которых находится элемент антиоксидантного ответа (ARE) и кодирующих такие ферменты, как гемоксигеназа 1 (КФ 1.14.99.3), NAD(P)H: хиноноксидоредуктаза 1 (КФ 1.6.5.5), глутаматцистеинлигаза (КФ 6.3.2.2) и глутатионтрансфераза (КФ 2.5.1.18) [11].

В связи с тем, что Nrf2 участвует в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза, ведутся исследования процесса его активации, что рассматривается в качестве пути коррекции состояния клеток и тканей при окислительном стрессе, например, при воспалении, онкологических заболеваниях и метаболических нарушениях [12, 13].

Nrf2 играет важную роль в онкогенных и цитопротекторных процессах в раковых клетках, выполняя как супрессорную, так и онкогенную роль [14, 15]. Во многих злокачественных новообразованиях его экспрессия повышена, и связана с агрессивностью опухоли, прогрессированием и терапевтической устойчивостью [16]. Было показано, что повышенная экспрессия Nrf2 наблюдается при гепатоцеллюлярной карциноме — наиболее распространенной первичной злокачественной опухоли печени [17]. Для изучения механизмов развития этого заболевания у человека используют клеточную линию HepG2. Клетки HepG2 являются наиболее часто изучаемыми линиями клеток печени, на долю которых приходится 76% всех исследований гепатоцеллюлярного ответа [18].

Таким образом, сигнализация Nrf2 стимулирует пролиферацию клеток, инициирует ангиогенез и инвазию, придает лекарственную устойчивость, что указывает на критическую регуляторную роль Nrf2 при многих патологиях, в том числе и гепатоцеллюлярной карциномы человека. Однако на сегодняшний день неизвестно, приводит ли взаимодействие NO с Keap1 к активации Nrf2

и какая роль данного процесса в жизнедеятельности клеток. Цель настоящей работы — оценить влияние GSNO на эритроидный ядерный фактор Nrf2, изучить механизм данного процесса и роль транскрипционного фактора в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2.

МЕТОДИКА

Объект исследования. Исследования проводили на культуре клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 (из коллекции Института цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия).

Культивирование клеток. Клетки HepG2 культивировали при 37°C и 5%-ном содержании CO₂ на среде Игла, в модификации Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), 4 mM L-глутамином, 10%-ной фетальной бычьей сывороткой, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все компоненты “Merck”, Германия).

Для проведения МТТ-теста клетки культивировали в 96-луночных планшетах, а для выполнения биохимических анализов в 6-луночных планшетах (“Corning”, США).

Были сформированы четыре экспериментальные группы клеток.

1. Контроль — в культуральную среду в качестве тестируемого вещества в эквивалентном объеме добавляли воду для инъекций, которая в опытных группах была растворителем GSNO.

2. Для моделирования дополнительного образования NO к культуральной среде в качестве донора NO добавляли GSNO (“Merck”, Германия) в концентрациях 1, 10, 50, 100 мкМ, инкубировали 24 и 72 ч.

3. Для выявления влияния GSNO на функционирование Nrf2 через NO-цГМФ-сигнальный путь клетки культивировали с ингибитором растворимой гуанилатциклазы (pГЦ) 1H-[1,2,4] оксадиазоло-[4,3-а]хиноксалин-1-ОН’ом (ODQ, “Sigma-Aldrich”, Германия). ODQ в концентрации 10 мкМ [19] добавляли в питательную среду за 30 мин до культивирования с GSNO.

4. Для оценки роли ARE в механизмах регуляции функционирования Nrf2 и жизнеспособности клеток использовали ингибитор ARE: N-(1,3-бензодиоксол-5-ил-метил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин (AEM1, “Sigma-Aldrich”, Германия). Клетки инкубировали с AEM1 в концентрации 5 мкМ в течение 30 мин по методу [20], после чего в питательную среду вносили GSNO.

Определение уровня оксида азота в клетках линии HepG2. Уровень оксида азота определяли с помощью флуоресцентных зондов DAF-FM (“Invitrogen”, США). DAF-FM — флуоресцентный реагент, использующийся для обнаружения и количествен-

ного определения низких концентраций NO [21]. DAF-FM при взаимодействии с NO образует флуоресцирующий бензотриазол, по интенсивности флуоресценции которого можно судить об уровне NO в клетке. Визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа 74 Olympus CKX-53 ("Olympus", Япония). Затем клетки снимали с лунок, лизировали с помощью 0.2%-ного Triton X-100 ("Sigma-Aldrich", Германия). Количественную оценку уровня NO в лизате клеток определяли по степени флуоресценции (длина волны возбуждения $\lambda_{\text{ext}} = 495$ нм, длина волны испускания $\lambda_{\text{em}} = 515$ нм) на спектрофлуориметре Shimadzu RF-6000 ("Shimadzu", Япония) и пересчитывали на количество клеток с помощью счетчика и анализатора жизнеспособности клеток "Countess 3 Automated Cell Counter" ("Thermo Fisher Scientific", США). Полученные значения выражали в ед. фл./ 10^6 кл.

Тест на цитотоксичность (МТТ-тест). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста [22]. Анализ проводили на микропланшетном анализаторе Stat Fax 2100 ("Awareness Technology", США) при длине волны 530 нм. Полученные результаты выражали в % от значений контроля, принятого за 100%.

Получение клеточных лизатов для проведения биохимических анализов. Для проведения флуориметрических (определение концентрации дитиروزина) и фотометрических (определение концентрации небелковых SH-групп и активности глутатионтрансферазы) методов исследования клетки культивировали в 6-луночных планшетах. После окончания экспозиции с GSNO клетки удаляли из лунок раствором трипсин-ЭДТА ("Sigma-Aldrich", Германия). Клетки в количестве 3×10^6 промывали изотоническим раствором NaCl ("Медпро", Россия) и далее лизировали с помощью детергента тритон X-100 с добавлением ингибиторов протеиназ ("Sigma-Aldrich", Германия), встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем образцы центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g (CM-50, "Eppendorf", Германия). Цитоплазматическую (экстраядерную) фракцию переносили в отдельные пробирки и использовали для биохимических исследований.

Определение уровня белка в клеточных лизатах проводили методом Бредфорда с использованием коммерческого набора Coomassie Plus (Bradford) AssayKit ("Thermo Fisher Scientific", США).

Определение концентрации дитиروزина. Дитиروزин определяли по методу [23] с модификациями. Образование дитиروزина регистрировали по интенсивности флуоресценции в К-фосфатном буфере (рН 7.4) при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{ext}} = 325$ нм и длине волны испускания $\lambda_{\text{em}} = 415$ нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-6000 ("Shimadzu", Япония). Полученные результаты выражали в нмоль/мг белка.

Определение концентрации тиоловых (SH-) групп. Для осаждения общего белка пробу смешивали с 5%-ной трихлоруксусной кислотой ("Химмед", Россия), инкубировали 15 мин, затем 5 мин центрифугировали при 11000 g на центрифуге CM-50 ("Eppendorf", Германия). Супернатант отбирали в отдельные пробирки, для нейтрализации смешивали с 1%-ным NaOH ("Химмед", Россия) и использовали для анализа. Низкомолекулярные (небелковые) SH-группы детектировали по реакции с 5,5'-дитиобис(2-нитро)-бензоатом [24]. Анализ проводили при 412 нм на спектрофотометре Stat Fax 1904 ("Awareness Technology", США). Концентрацию SH-групп рассчитывали, исходя из коэффициента молярной экстинкции $\epsilon_{412} = 13.6 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ и выражали в мкмоль/мг белка.

Определение активности глутатионтрансферазы. Активность фермента анализировали по увеличению оптической плотности опытного образца при 346 нм в результате реакции конъюгации глутатиона и 1-хлор-2,4-динитробензолом (ХДНБ) и выражали в нмоль ХДНБ/мин/мг белка [25].

Приготовление клеточных лизатов для вестерн-блот анализа. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах. По окончании экспозиции клетки лизировали в буфере RIPA ("Servicebio", Китай) с добавлением ингибиторов протеиназ ("Sigma-Aldrich", Германия) в течение 30 мин при 4°C и постоянном перемешивании. Клеточный лизат центрифугировали при 5000 g в течение 10 мин (CM-50, "Eppendorf", Германия). Для определения 3-нитротирозина использовали полученный супернатант. Для выделения ядерной и цитоплазматической фракции гомогената использовали набор Protein Extraction Kit (Cytoplasmic Nuclear), ("Bio-Rad", США).

Определение относительного количества белков методом вестерн-блот анализа. Для проведения электрофореза использовали акриламидные гели 7.5% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit ("Bio-Rad", США) в буферной системе по Laemmli ("BioRad", США). Образцы смешивали с буфером Laemmli, содержащим 50 мМ β -меркаптоэтанол ("BioRad", США) в соотношении 1 : 3, инкубировали 10 мин при температуре 70°C. Для электрофореза проводили загрузку белков супернатанта клеточного лизата (20 мкг) и подвергали электрофорезу при 100 В в течение 90 мин. Далее белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose, "Bio-Rad", США) с использованием Mini Trans-Blot ("Bio-Rad", США) в течение 10 мин при 25 В и 1.3 А. Белки на мембране блокировали 1%-ным раствором EveryBlot Blocking Buffer ("Bio-Rad", США), содержащим 0.1% Tween-20 ("Sigma", Германия), при инкубации в течение 1 ч и комнатной температуре.

Детекцию 3-нитротирозина и Nrf2 (ядерная и цитоплазматическая фракция) проводили с использованием первичных мышиных моноклональных антител (Nrf2 “Affinity”, Китай; 3-Nitrotyrosine “Affinity”, Китай) в концентрации 1 : 1000 в блокирующем растворе в течение 2 ч при 37°C. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”, США) в разведении 1 : 4000 и инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре. Результаты электрофореза и блоттинга, в том числе хемилюминесценцию полос, фиксировали с помощью системы гель-документирования ChemiDocXRS+ (“Bio-Rad”, США). Интенсивность полученных полос анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (“Bio-Rad”, США). Молекулярную массу белков определяли путем сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision Plus Protein Standards Dual Color, “Bio-Rad”, США).

Содержание 3-нитротирозина и Nrf2 в цитоплазме оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) с помощью первичных антител против GAPDH — Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 (“Affinity”, Китай). Nrf2 в ядре определяли относительно белка Laminin B1 (“Affinity”, Китай). Первичные антитела разводили в соотношении 1 : 1000, в качестве вторичных антител использовали кроличьи антитела Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (“Invitrogen”, США), в разведении 1 : 4.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты проводили не менее чем в трех повторностях. Полученные результаты анализировали с помощью программ StatSoft Statistica 13.0, Microsoft Excel, GraphPad Prism8. Статистическую значимость различий оценивали дисперсионным анализом (ANOVA), парные сравнения с контролем выполняли с помощью теста Даннетта, множественные сравнения — по критерию Тьюки. Результаты в таблицах и на графиках приведены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$, на рисунках обозначены как “*”.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение уровня NO, небелковых SH-групп, продуктов нитрозилирования и жизнеспособности клеток линии HepG2 при действии GSNO. GSNO — S-нитрозилированное производное наиболее распространенного клеточного тиола — глутатиона. Образование S-нитрозотиолов, таких, как GSNO, является неотъемлемой частью физиологических функций оксида азота. GSNO рассматривается как источник NO, а также как важный компонент

NO-зависимой передачи сигнала [26]. В настоящем исследовании было показано, что GSNO повышает уровень NO в клетке.

Содержание NO при инкубации клеток линии HepG2 с GSNO в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ в течение 24 ч возрастало на 46, 124, 117 и 170% соответственно относительно контрольных значений. Изменения носили дозозависимый характер при сравнении GSNO в концентрациях 1 мкМ и 100 мкМ, между концентрациями 10 и 50 мкМ статистически значимых различий не наблюдалось (рис. 1а, 2а).

При воздействии GSNO в течение 72 ч при тех же концентрациях уровень NO в клетках линии HepG2 возрастал на 70, 105, 143 и 212% соответственно по сравнению с контролем. Изменения носили дозозависимый характер (рис. 1б, 2б).

Для косвенной оценки внутриклеточного глутатиона определяли количество небелковых SH-групп. Их уровень снижался на 56% при действии GSNO в концентрации 100 мкМ и времени воздействия 24 ч (рис. 3а), и на 52% при времени инкубации 72 ч (рис. 3б). Воздействие GSNO в концентрациях 1–50 мкМ в течение 24 и 72 ч не влияло на уровень небелковых SH-групп внутри клеток HepG2 (рис. 3).

Полученные результаты согласуются с данными литературы. В частности, ранее было показано, что GSNO не проникает в клетки напрямую, однако его добавление вызывает повышение внутриклеточных уровней S-нитрозотиолов [27]. Предполагается, что GSNO диссоциирует во внеклеточном пространстве с высвобождением NO, который затем может диффундировать через клеточную мембрану. Описан и механизм проникновения NO внутрь клеток с нитрозогруппой [28]. Нитрозогруппа от GSNO переносится на цистеин с образованием S-нитрозоцистеина, который способен проникать внутрь клеток через систему транспортеров аминокислот. S-нитрозоцистеин внутри клеток может либо вновь нитрозилировать глутатион с образованием GSNO, либо непосредственно нитрозилировать белковые тиолы и запускать сигнальные каскады.

Повышение уровня NO внутри клеток запускало процесс нитрозилирования. Так, при воздействии GSNO в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ при экспозиции клеток в течение 24 ч уровень 3-нитротирозина возрастал на 12, 25, 21 и 39% соответственно (рис. 4а, в). Изменения носили дозозависимый характер и были аналогичны изменению уровня NO.

При инкубации клеток в течение 72 ч при тех же концентрациях GSNO наблюдалось снижение уровня 3-нитротирозина на 43, 31 и 37% соответственно (рис. 4б, г), что связано с активацией перехода 3-нитротирозина в дитирозин (рис. 4). При концентрации GSNO 100 мкМ уровень 3-нитротирозина возрастал на 23%.

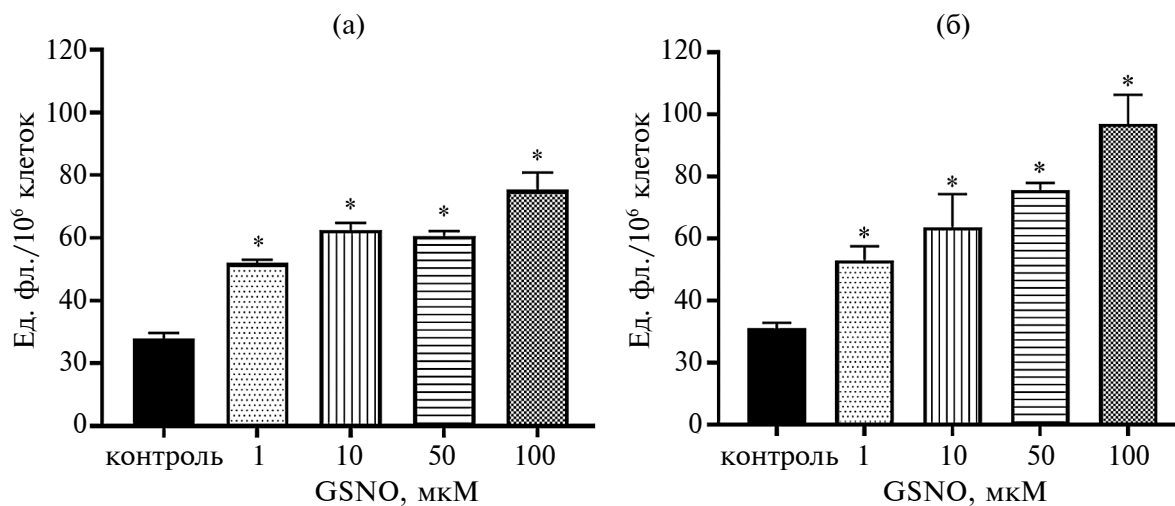


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции (Ед. фл.) в лизате клеток HepG2 после воздействия GSNO в течение 24 ч (а) и 72 ч (б) при окраске DAF-FM.

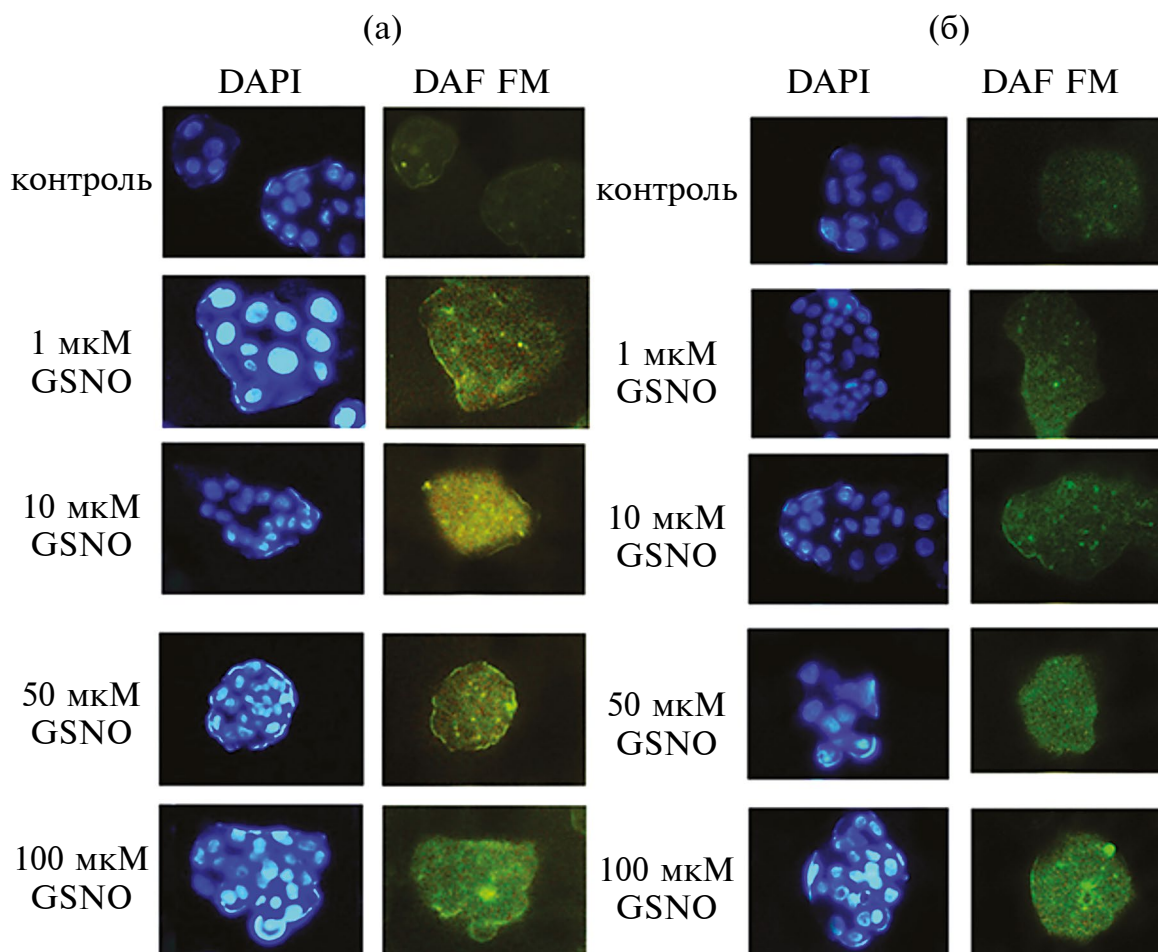


Рис. 2. Изменение уровня NO в клетках линии HepG2 при воздействии GSNO в течение 24 ч (а) и 72 ч (б). Окрашивание клеток с помощью DAF-FM, окрашивание ядер с помощью DAPI. Визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа Olympus CKX-53 ("Olympus", Япония), увеличение $\times 400$.

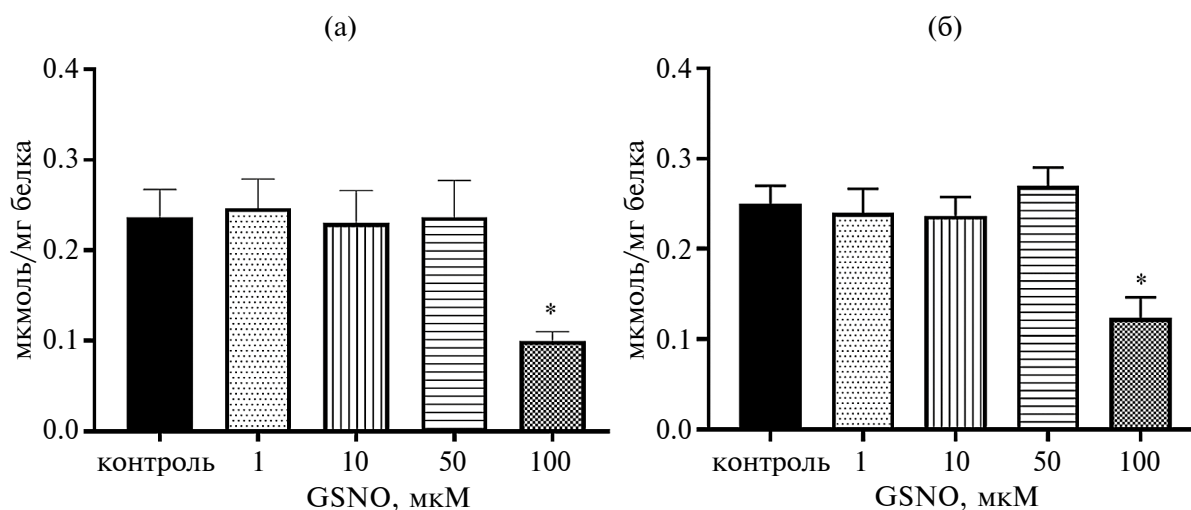


Рис. 3. Концентрация небелковых SH-групп (мкмоль/мг белка) внутри клеток HepG2 после воздействия GSNO в течение 24 (а) и 72 ч (б).

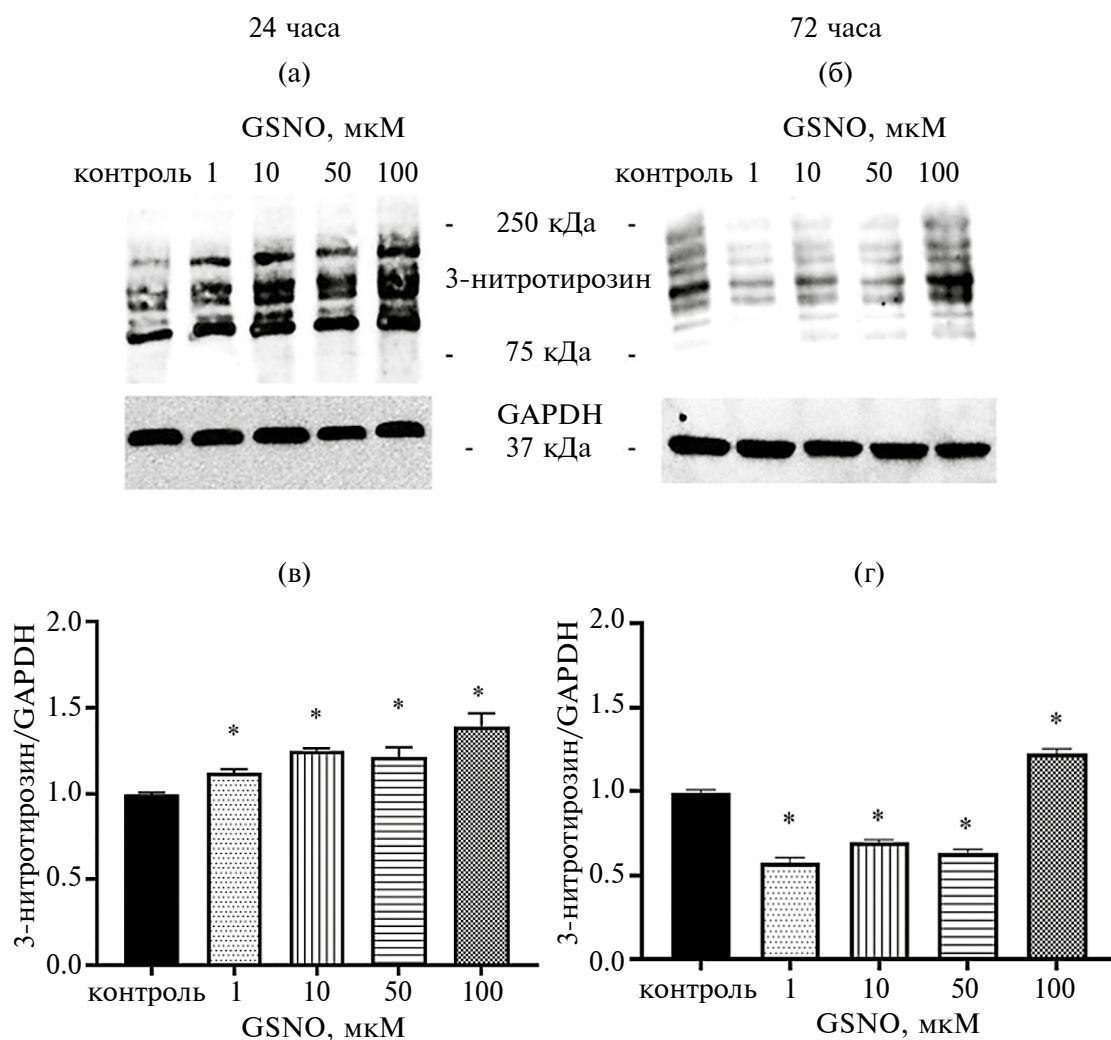


Рис. 4. Влияние GSNO в течение 24 ч (а, в) и 72 ч (б, г) на относительное количество 3-нитротирозина в белковых молекулах клеток линии HepG2: а, б — результаты блоттинга; в, г — результаты денситометрического анализа.

При воздействии GSNO в течение 24 ч и в концентрациях 1–50 мкМ уровень дитиозина статистически значимо не изменялся, а при 100 мкМ возрастал на 26% относительно контрольной группы (рис. 5а). При воздействии GSNO в течение 72 ч и концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ уровень дитиозина возрастал на 37, 31, 39 и 77% соответственно (рис. 5б).

Нитрозилирование тирозина является наиболее специфичной модификацией тирозина при развитии нитрозативного стресса. Нитротирозин частично диссоциирует до фенолята, но основное его количество конденсируется до 3,3-дитиозина (дитиозина) [29]. Доказано, что образование дитиозина превалирует над нитротирозином при длительном воздействии и/или более высоком уровне АФА, что позволяет рассматривать его в качестве маркера нитрозативного стресса [30].

При воздействии GSNO в течение 24 ч (рис. 6а) и 72 ч (рис. 6б) в концентрациях 1–50 мкМ жизне-

способность клеток не изменялась, а при 100 мкМ снижалась на 9 и на 16% соответственно относительно контроля.

Таким образом, максимальное увеличение уровня NO при концентрации 100 мкМ приводило к снижению уровня небелковых SH-групп, максимальному возрастанию уровней 3-нитротирозина и дитиозина, что в свою очередь приводило к снижению жизнеспособности клеток.

Оценка относительного количества Nrf2 в ядре и цитоплазме клеток линии НерG2 при воздействии S-нитрозоглутатиона. При изучении функционирования Nrf2 при действии GSNO были получены следующие результаты. При воздействии GSNO в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ в течение 24 ч наблюдалось увеличение относительного количества Nrf2 в ядерной фракции клеточного лизата на 209, 211 и 126% соответственно (рис. 7а, в). При тех же концентрациях GSNO в цитоплазматической

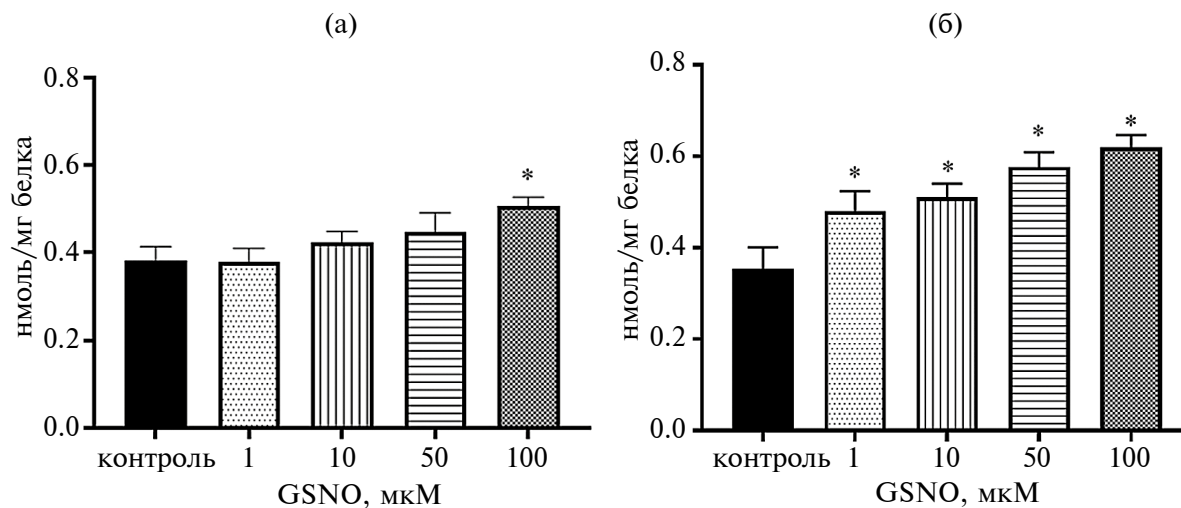


Рис. 5. Концентрация дитиозина (нмоль/мг белка) в клетках линии НерG2 при воздействии GSNO в течение 24 ч (а) и 72 ч (б).

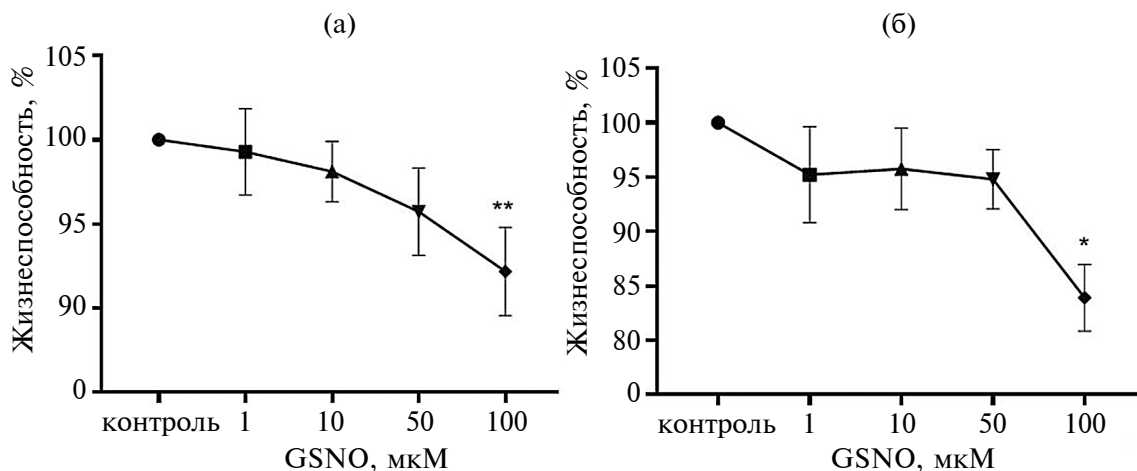


Рис. 6. Изменение жизнеспособности (%) клеток НерG2 при воздействии GSNO в течение 24 ч (а) и 72 ч (б).

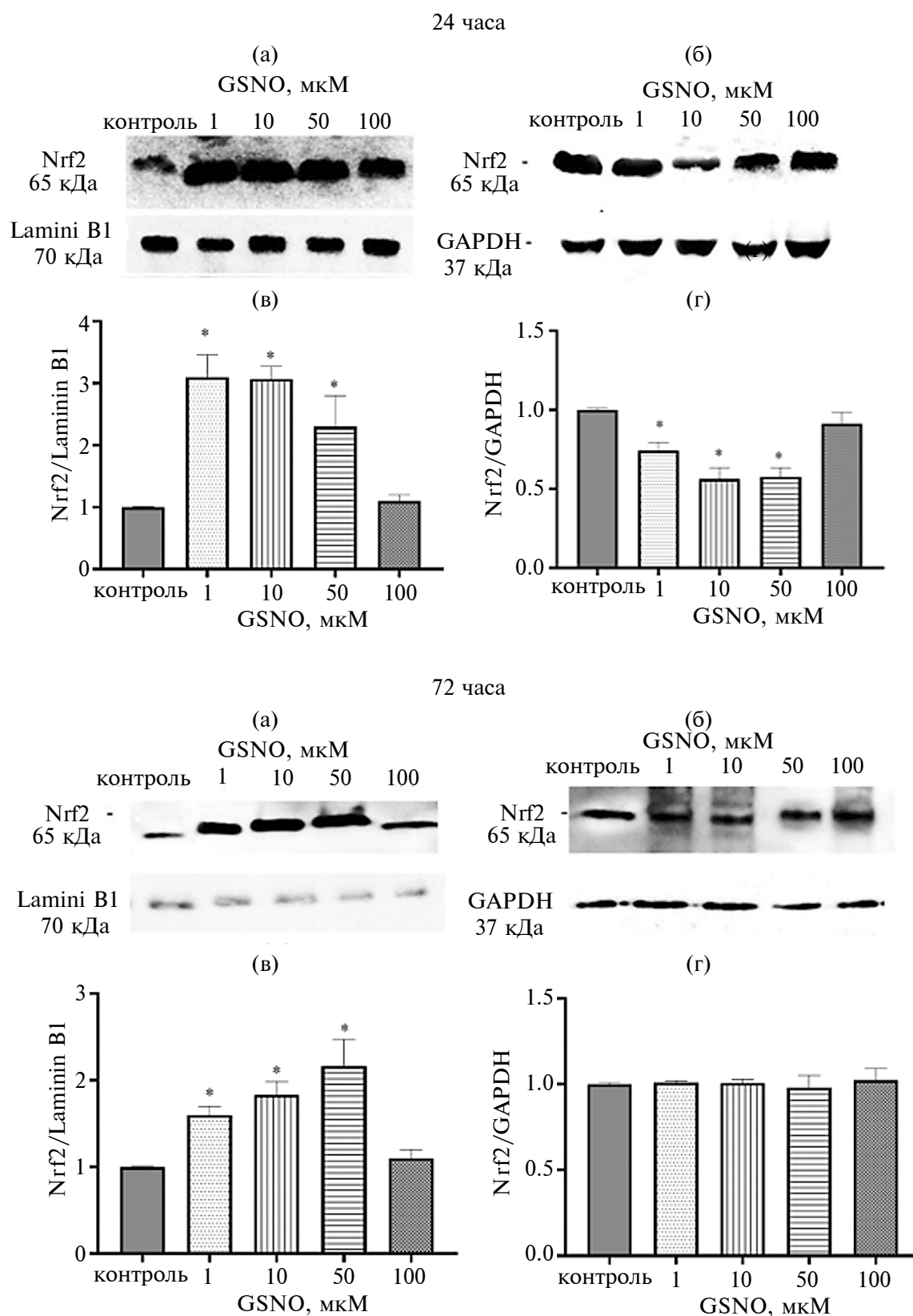


Рис. 7. Влияние GSNO в течение 24 ч и 72 ч на относительное количество Nrf2 в ядре (а, в) и цитоплазме (б, г) в клетках линии НерG2: а, б — результаты блоттинга; в, г — результаты денситометрического анализа.

фракции лизата было снижение относительного количества Nrf2 на 29, 46 и 50% соответственно (рис. 7б, г). При концентрации GSNO 100 мкМ изменения относительного количества Nrf2 не было отмечено ни в ядре, ни в цитоплазме. Соотношение относительного количества Nrf2 в ядерной и цитоплазматической фракциях гомогената при концентрациях GSNO 1, 10 и 50 мкМ составило 4.19, 5.53 и 4.01 соответственно, что превышало контрольные значения, принятые за единицу. При 100 мкМ GSNO это соотношение составило 1.21, что было ближе к контролю.

При воздействии GSNO в концентрациях 1, 10, 50 мкМ на клетки линии HepG2 в течение 72 ч

уровень Nrf2 в ядерной фракции клеточного лизата возрастал на 43, 60 и 79% соответственно, а при концентрации 100 мкМ не менялся относительно значений контрольной группы (рис. 7а, в). В цитоплазматической фракции относительное количество Nrf2 не менялось (рис. 7б, г). Соотношение относительного количества Nrf2 в ядерной и цитоплазматической фракциях гомогената при этих концентрациях GSNO составило 1.58, 1.82 и 2.21 соответственно, что также превышало контрольные значения, взятые за единицу, а при 100 мкМ было 1.08 и практически не отличалось от контроля.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что при 24 ч экспозиции, скорее всего, происхо-

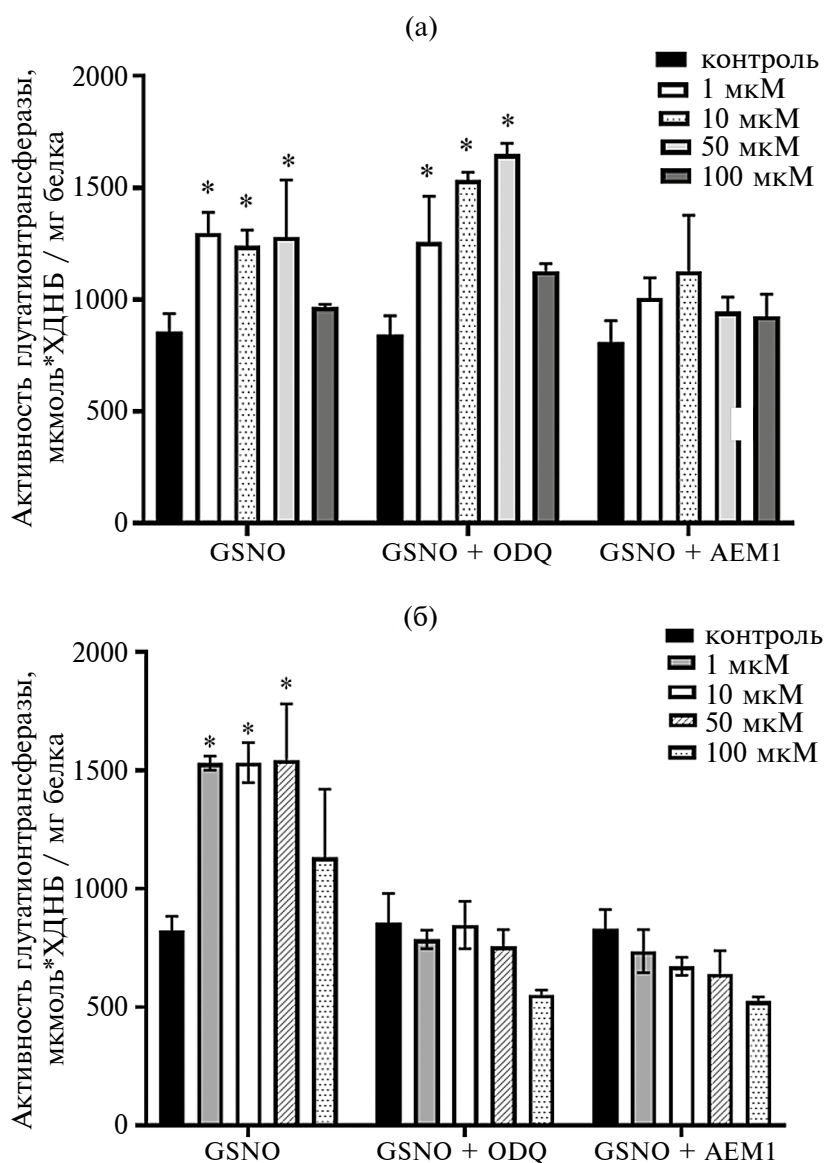


Рис. 8. Активность глутатионтрансферазы (мкмоль*ХДНБ/мг белка) в клетках линии HepG2 при воздействии GSNO и в сочетании с ингибиторами рГЦ (ODQ) и элемента антиоксидантного ответа (AEM1) в течение 24 ч (а) и 72 ч (б).

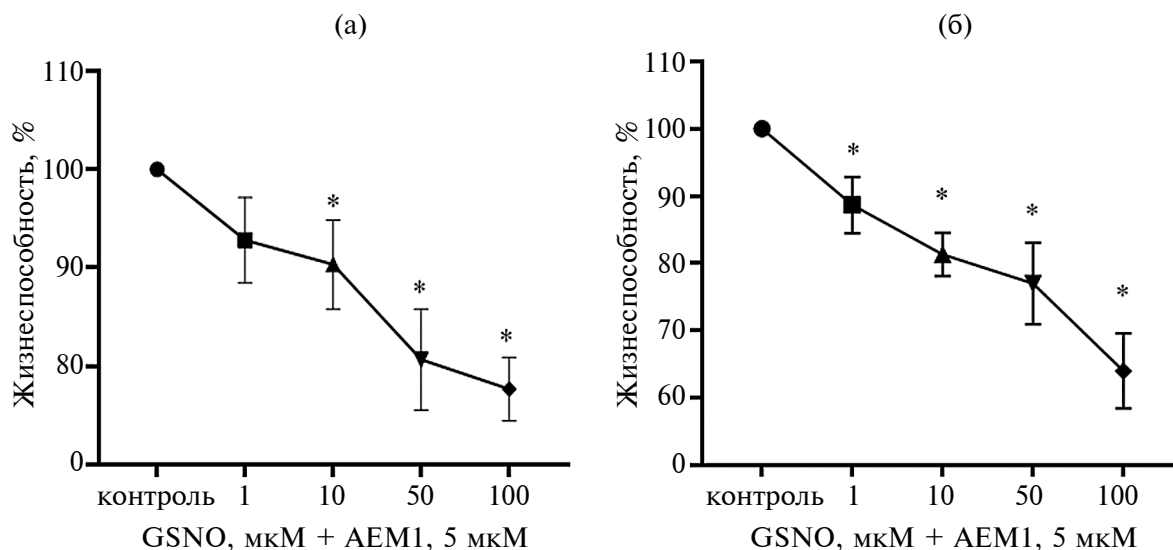


Рис. 9. Жизнеспособность клеток линии HepG2 после воздействия GSNO совместно с ингибитором элемента анти-оксидантного ответа (AEM1) в течение 24 ч (а) и 72 ч (б).

дит простая активация Nrf2, из-за диссоциации от Keap1 и его транслокации в ядро, в результате чего снижается уровень Nrf2 в цитоплазме, а повышается в ядре. При 72 ч воздействия происходит повышение экспрессии Nrf2, так как повышение его содержания в ядре не приводит к снижению в цитоплазме. Одним из возможных механизмов активации Keap 1 под действием GSNO может быть его нитрозилирование [9].

Следует отметить, что при воздействии высоких концентраций GSNO (100 мкМ) уровень Nrf2 достоверно не изменялся при любой длительности эксперимента, что, скорее всего, связано с повреждением клеток и подтверждается снижением их жизнеспособности.

Активность глутатион-S-трансферазы в клетках линии HepG2 при действии GSNO и при его сочетании с ODQ и AEM1. Активация Nrf2 (его транслокация в ядро) под действием GSNO в концентрациях 1–50 мкМ при 24 и 72 ч воздействия сопровождалась повышением активности антиоксидантного фермента глутатион-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18), экспрессия которого регулируется данным транскрипционным фактором [31].

При воздействии GSNO в концентрациях 1, 10, 50 мкМ и времени инкубации 24 ч активность глутатионтрансферазы возрастала на 52, 45 и 50% соответственно (рис. 8а). При инкубации в течение 72 ч активность глутатионтрансферазы при тех же концентрациях GSNO возрастала на 86–87%. При 100 мкМ GSNO активность глутатионтрансферазы не изменялась в обоих случаях (рис. 8б).

Для уточнения механизмов активации Nrf2 под действием GSNO были выполнены эксперименты с ингибитором NO-цГМФ сигнального пути — ODQ и ингибитором ARE — AEM1. При совместном ис-

пользовании GSNO в концентрациях 1, 10, 50 мкМ и ODQ (10 мкМ) и экспозиции 24 ч активность глутатионтрансферазы возрастала на 49, 82 и 96% соответственно относительно контроля (рис. 8а), а при воздействии совместно с AEM1 — не изменялась. При времени инкубации 72 ч при совместном применении GSNO с ODQ и AEM1 активность глутатионтрансферазы не изменялась (рис. 8б).

Полученные результаты подтвердили предположение, что активация Nrf2 под действием GSNO при воздействии в течение 24 ч обусловлена нитрозилированием Keap1 и транслокацией Nrf2 в ядро, а в течение 72 ч — повышением экспрессии Nrf2, что реализуется через NO-цГМФ сигнальный путь.

На завершающем этапе исследования была проведена оценка клинической значимости индукции Nrf2 под действием GSNO.

При ингибировании ARE с помощью AEM1 и инкубации клеток в течение 24 ч с GSNO в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ наблюдали снижение жизнеспособности клеток на 8, 10, 19 и 22% соответственно (рис. 9а). При применении AEM1 и GSNO в тех же концентрациях в течение 72 ч жизнеспособность клеток снижалась на 11, 19, 23 и 36% соответственно относительно контроля, принятого за 100% (рис. 9б).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что Nrf2 участвует в защите клеток от воздействия избыточного количества NO. Таким образом, выработка NO влияет на окислительно-восстановительный гомеостаз, контролируемый Nrf2, а индукция глутатионтрансферазы является внутриклеточным ответом на повышение уровня NO, защищая клетки от продуктов нитрозилирования и окислительного повреждения.

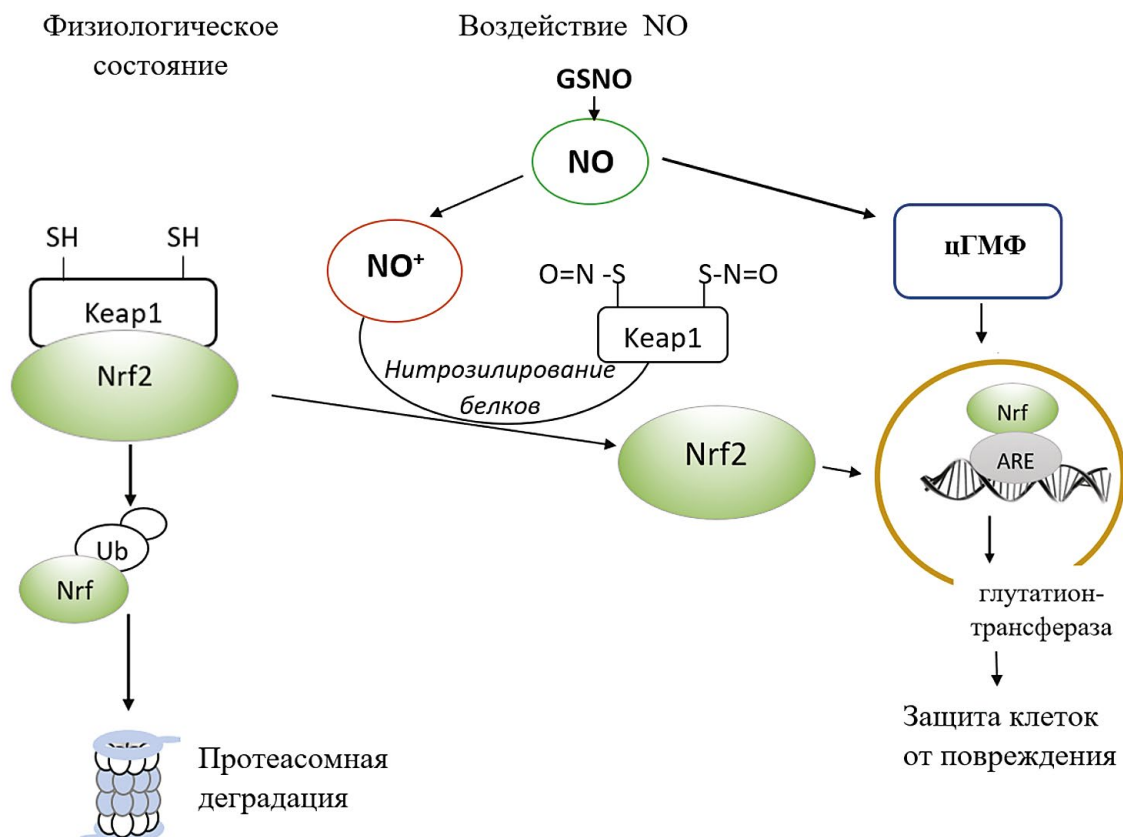


Рис. 10. Механизм активации Nrf2 и глутатионтрансферазы в клетках линии НерG2 при воздействии GSNO.

Ранее аналогичные эффекты были показаны на клетках линии Сасо-2 (аденокарцинома толстого кишечника человека) при окислительном стрессе. В клетках происходила транслокация Nrf2 в ядро, активация супероксиддисмутазы и сохранение жизнеспособности клеток при действии пероксида водорода [32].

Таким образом, в настоящей работе было установлено, что донор NO — GSNO при экспозиции в течение 24 ч активирует Nrf2, скорее всего, за счет нитрозилирования Keap1, а при воздействии в течение 72 ч, не только активирует Nrf2, но и приводит к повышению его количества, что реализуется через NO-цГМФ сигнальный путь. Активация Nrf2 играет важную роль в защите клеток от токсического воздействия продуктов нитрозативного стресса (рис. 10). Полученные в работе результаты были статистически значимыми, за исключением случаев, специально отмеченных в тексте.

Полученные результаты могут иметь и практическое значение для медицины и фармакологии. Ранее было показано, что в опухолевых клетках повышена продукция NO [33], что может являться одним из механизмов повышения количества Nrf2 при онкологических заболеваниях. Это показывает, что продукция NO индуцирует систему Nrf2/

глутатионтрансфераза, что позволяет предположить защитную функцию описанного выше пути. С этих позиций целесообразно применение ингибиторов NO для снижения резистентности клеток к воздействию активных форм азота и кислорода.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа не поддерживалась внешними источниками финансирования и грантами.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В данной работе отсутствуют исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thomas D.D., Ridnour L.A., Isenberg J.S., Flores-Santana W., Switzer C.H., Donzelli S. et al. // Free Radic. Biol. Med. 2008. V. 45. № 1. P. 18–31. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.020>

2. Сучкова О.Н., Абаленихина Ю.В., Костюкова Е.В., Шулькин А.В., Кочанова П.Д., Гаджиева Ф.Т. и др. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2024. Т. 9. № 27. С. 50–56.
<https://doi.org/10.29296/25877313-2024-09-07>
3. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Короткова Н.В., Климентова Э.А., Поваров В.О. // Наука молодых (Eruditio Juvenium). 2021. Т. 9. № 3. С. 407–414.
<https://doi.org/10.23888/HMJ202193407-414>
4. Abalenikhina Yu.V., Kosmachevskaya O.V., Topunov A.F. // Appl. Biochem. Microbiol. 2020. V. 56. № 6. P. 611–623.
<https://doi.org/10.1134/S0003683820060022>
5. He F., Ru X., Wen T. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 13. e4777.
<https://doi.org/10.3390/ijms21134777>
6. Турнаев К.Т. // Биохимия. 2013. Т. 78. № 2. С. 147–166
7. McMahon M., Lamont D.J., Beattie K.A., Hayes J.D. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 44. P. 18838–18843.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1007387107>
8. Fourquet S., Guerois R., Biard D., Toledano M.B. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. № 11. C. 8463–8471.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.051714>
9. Um H.-C., Jang J.-H., Kim D.-H., Lee C., Surh Y.-J. // Nitric Oxide. 2011. V. 25. № 2. P. 161–168.
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.06.001>
10. Cortese-Krott M.M., Pullmann D., Feelisch M. // Pharmacol. Res. 2016. V. 113. Pt. A. P. 490–499.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.09.022>
11. Sun Z., Zhang S., Chan J.Y., Zhang D.D. // Mol. Cell. Biol. 2007. V. 27. № 18. P. 6334–6349.
<https://doi.org/10.1128/MCB.00630-07>
12. Kim S.-R., Seong K.-J., Kim W.-J., Jung J.-Y. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. № 7. e4004.
<https://doi.org/10.3390/ijms23074004>
13. Gorska-Arcisz M., Popeda M., Braun M., Piasecka D., Nowak J.I., Kitowska K. et al. // Cell. Mol. Biol. Lett. 2024. V. 29. № 1. e71.
<https://doi.org/10.1186/s11658-024-00586-6>
14. Menegon S., Columbano A., Giordano S. // Trends Mol. Med. 2016. V. 22. № 7. P. 578–593.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.05.002>
15. Gjorgieva Ackova D., Maksimova V., Smilkov K., Buttari B., Arese M., Saso L. // Pharmaceuticals. 2023. V. 16. № 6. e850.
<https://doi.org/10.3390/ph16060850>
16. Kryszczuk M., Kowalczyk O. // Arch. Biochem. Biophys. 2022. V. 15. № 730. e109417.
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2022.109417>
17. Kalantari L., Ghotbabadi Z.R., Gholipour A., Ehyamayed H.M., Najafiyani B., Amirlou P. et al. // Cell. Commun. Signal. 2023. V. 21. № 1. e318.
<https://doi.org/10.1186/s12964-023-01351-6>
18. Song Y., Lu Q., Jiang D., Lan X. // Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 2023. V. 50. № 3. P. 639–641.
<https://doi.org/10.1007/s00259-022-06043-w>
19. Hwang T.L. // Br. J. Pharmacol. 1998. V. 125. № 6. P. 1158–1163.
20. Bollong M.J., Yun H., Sherwood L., Woods A.K., Lairson L.L., Schultz P.G. // ACS Chem. Biol. 2015. V. 10. № 10. P. 2193–2198.
<https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b00448>
21. Balcerczyk A., Soszynski M., Bartosz G. // Free Radic. Biol. Med. 2005. V. 39. № 3. P. 327–335.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.03.017>
22. Kumar P., Nagarajan A., Uchil P.D. // Cold Spring Harb. Protoc. 2018. V. 2018. № 6.
<https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
23. Kosmachevskaya O.V., Nasybullina E.I., Shumaev K.B., Novikova N.N., Topunov A.F. // Int. J. Mol. Sci. 2021. V. 22. № 24. e13649.
<https://doi.org/10.3390/ijms222413649>
24. Kojima S., Nakayama K., Ishida H. // J. Radiat. Res. 2024. V. 45. № 1. P. 33–39.
<https://doi.org/10.1269/jrr.45.33>
25. Pravkin S.K., Yakusheva E.N., Uzbekova D.G. // Bull. Exp. Biol. Med. 2013. V. 156. № 2. P. 220–223.
<https://doi.org/10.1007/s10517-013-2315-x>
26. Li W., Wang D., Lao K.U., Wang X. // ACS Biomater. Sci. Eng. 2023. V. 13. № 9. P. 1694–1705.
<https://doi.org/10.1021/acsbomaterials.2c01284>
27. Broniowska K.A., Diers A.R., Hogg N. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1830. № 5. P. 3173–3181.
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.004>
28. Ramachandran N., Root P., Jiang X.-M., Hogg P.J., Mutus B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 17. P. 9539–9544.
29. Ferrer-Sueta G., Campolo N., Trujillo M., Bartsaghi S., Carballal S., Romero N. et al. // Chem. Rev. 2018. V. 118. № 3. P. 1338–1408.
30. Boer T.R., Palomino R.I., Mascharak P.K. // Med. One. 2019. V. 4. e190003.
<https://doi.org/10.20900/mo.20190003>
31. Yu J., Zhao Y., Li B., Sun L., Huo H. // J. Biochem. Mol. Toxicol. 2012. V. 26. № 7. P. 264–269.
<https://doi.org/10.1002/jbt.21417>
32. Абаленихина Ю.В., Ерохина П.Д., Сеидкулиева А.А., Завьялова О.А., Шулькин А.В., Якушева Е.Н. // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. 2022. Т. 30. № 3. С. 295–304.
<https://doi.org/10.17816/PAVLOVJ105574>
33. Xu W., Liu L.Z., Loizidou M., Ahmed M., Charles I.G. // Cell. Res. 2002. V. 12. № 5–6. P. 311–320.
<https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290133>

The Effect of S-Nitrosoglutathione on the Amount and Activity of Erythroid Nuclear Factor Nrf2 in Human Hepatocellular Carcinoma Cells

Yu. V. Abalenikhina^{a, *}, O. N. Suchkova^a, E. V. Kostyukova^a, A. V. Shchulkin^a, and A. F. Topunov^b

^aRyazan State Medical University named after Academician I.P. Pavlov, Ryazan, 390026 Russia

^bBach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

*e-mail: abalenikhina88@mail.ru

S-nitrosoglutathione (GSNO) is an endogenous donor of nitric oxide (NO), which, at the same time, can act both as a signaling molecule and a toxic agent, forming active forms of nitrogen. The purpose of this work was to study the mechanism of NO participation in the regulation of erythroid nuclear factor 2 (Nrf2) functioning, which is a redox-sensitive transcription factor. It was shown that when GSNO was exposed to human hepatocellular carcinoma cells (HepG2), the level of intracellular NO increased dose-dependently during incubation for 24 and 72 hours. The maximum increase of NO level at 100 mM concentration led to decrease of the amount of non-protein SH groups, to maximum increase of 3-nitrotyrosine and bityrosine levels, which contributed to the decline of cell viability. The NO donor — S-nitrosoglutathione activated Nrf2 during exposure for 24 hours, most likely due to nitrosylation of Keap1 protein, and at 72 hours not only activated Nrf2, but also led to an increase in its amount. This process was carried out through NO-cGMP signaling pathway. Activation of Nrf2 is a key factor in protecting cells from the toxic effects of nitrosative stress products.

Keywords: nitrosoglutathione, nitric oxide, erythroid nuclear factor Nrf2, nitrotyrosine, bityrosine, human hepatocellular carcinoma cells HepG2