

МОДЕЛИРОВАНИЕ И ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ ЭКЗОГЕННОГО И ЭНДОГЕННОГО ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА *IN VITRO*

Ю.В. Абаленихина

к.б.н., доцент, доцент кафедры биологической химии с курсом КЛД ФДПО, ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России (г. Рязань, Россия)
E-mail: abalenihiina88@mail.ru

С.К. Правкин

к.м.н., доцент, доцент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО, ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России (г. Рязань, Россия)

А.В. Шулькин

д.м.н., доцент, профессор кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО, ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России (г. Рязань, Россия)

Е.Д. Рокунов

студент, лечебный факультет, ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России (г. Рязань, Россия)

Д.С. Немтинов

студент, лечебный факультет, ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России (г. Рязань, Россия)

Е.П. Васильева

студентка, педиатрический факультет, ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России (г. Рязань, Россия)

Е.Н. Якушева

д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО, ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России (г. Рязань, Россия)

Актуальность. Влияние прооксидантов на клетку может вызывать разные эффекты в зависимости от дозы и длительности воздействия, поэтому для изучения данных процессов необходимы адекватные экспериментальные модели окислительного стресса (ОС) *in vitro*.

Цель исследования – изучить динамику развития ОС при эндогенной и экзогенной его моделях *in vitro*.

Материал и методы. Исследование выполнено на линии клеток Сасо-2. Пероксид водорода (H₂O₂) и DL-бутионинсульфоксимин (БСО) добавляли к клеткам в концентрациях 0,1-100 мкМ и 1-500 мкМ соответственно в течение 3, 24 и 72 ч. По окончании экспозиции определяли процент жизнеспособных клеток (МТТ-тест), уровень активных форм кислорода (MitoTracker Red CM-H2 XRos), количество ядерного фактора эритроидного происхождения (Nrf2) и глутатионпероксидазы (ИФА), концентрацию карбонильных производных белков (фотометрический метод).

Результаты. Показано, что H₂O₂ в концентрациях 5, 10, 50 мкМ и БСО – 10, 50, 100 мкМ вызывают повышение уровня карбонильных производных белков, уровня транскрипционного фактора Nrf2 и антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы при сроке воздействия 24 и 72 ч. Концентрации H₂O₂ 100 мкМ и БСО 500 мкМ являются токсичными для линии клеток Сасо-2. Срок инкубации 3 ч не вызывает развитие ОС.

Выводы. Пероксид водорода в концентрациях 5, 10, 50 мкМ и БСО – 10, 50, 100 мкМ при сроках воздействия 24 и 72 ч вызывают развитие компенсированного окислительного стресса (эустресса), а H₂O₂ в концентрации 100 мкМ и БСО – 500 мкМ являются токсичными для клеток линии Сасо-2 (дистресс).

Ключевые слова: окислительный стресс, пероксид водорода, D,L-бутионинсульфоксимин, глутатионпероксидаза, Nrf-2, карбонильные производные белков.

Для цитирования: Абаленихина Ю.В., Правкин С.К., Шулькин А.В., Рокунов Е.Д., Немтинов Д.С., Васильева Е.П., Якушева Е.Н. Моделирование и динамика развития экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2022;25(12):10-17. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-12-02>

Концепция окислительного стресса (ОС) была сформулирована в 1985 г., под которым понимали «нарушение прооксидантно-антиоксидант-

ного баланса в пользу первого» [1]. В то время основное внимание в научных исследованиях уделялось окислительному повреждению клеток и орга-

нов, изучению различных прооксидантов и антиоксидантов [2]. В последующие десятилетия произошёл ряд фундаментальных открытий в понимании окислительно-восстановительной регуляции, окислительно-восстановительной сигнализации и окислительно-восстановительного восприятия. Это потребовало обновления концепции ОС [3] и формирования представления о нем как «дисбалансе между оксидантами и антиоксидантами в пользу оксидантов, что приводит к нарушению окислительно-восстановительной сигнализации и контроля и/или молекулярному повреждению» [4]. Из данного определения следует, что ОС можно классифицировать по интенсивности, причем шкала интенсивности варьирует от физиологического ОС (эустресс) до токсической окислительной нагрузки, повреждающей биомолекулы (дистресс) [5]. Низкоинтенсивное воздействие используется для передачи окислительно-восстановительных сигналов путем воздействия на специфические мишени, тогда как высокоинтенсивное – приводит к нарушению регуляторных механизмов и/или повреждению клеток [5].

Основными сигнальными путями, участвующими в передаче, окислительно-восстановительных сигналов, являются системы Nrf2/Keap1 [6] и NF-κB/IκB [7]. Так, Nrf2 после транслокации в ядро активирует набор защитных ферментов. Аналогичным образом NF-κB после транслокации в ядро активирует экспрессию генов, участвующих в воспалительных, иммунных и острофазовых реакциях. В свою очередь, развитие окислительного дистресса играет важную роль в патогенезе широкого спектра заболеваний: сердечно-сосудистых, онкологических, бронхолегочных, офтальмологических и т.д.

Таким образом, воздействие прооксидантов может вызывать разные эффекты в зависимости от дозы и длительности воздействия, поэтому для изучения данных процессов необходимы адекватные экспериментальные модели.

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я – изучить динамику развития ОС при эндогенной и экзогенной его моделях *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 6-луночных планшетах в течение 21 сут, так как при данном сроке происходит их спонтанная дифферен-

цировка в клетки подобные энтероцитам тонкого кишечника.

Экзогенный ОС моделировали добавлением в питательную среду H₂O₂ в концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5; 10, 50 и 100 мкМ. Эндогенный ОС воспроизводили с помощью ингибитора синтеза глутатиона – DL-бутионинсульфоксимиона (БСО, ингибитор γ-глутамилцистеинсинтетазы) в конечных концентрациях в питательной среде 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ. Экспозицию проводили в течение 3, 24 и 72 ч (смена питательной среды каждые 24 ч), на каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения.

Цитотоксическое действие H₂O₂ и БСО оценивали по результатам МТТ-теста. Для этого клетки засеивали в 96-луночный планшет из расчета 10⁴ клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут, затем добавляли питательную среду с H₂O₂ и БСО и проводили тест [8].

Жизнеспособность клеток Caco-2 рассчитывали по следующей формуле:

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

где ОП – оптическая плотность.

Для детекции уровня свободных радикалов, генерируемых в клетках при воздействии H₂O₂/БСО, клетки культивировали в 24-луночных планшетах. После инкубации с H₂O₂/БСО в течение 3 и 24 ч уровень внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) оценивали с помощью окраски клеток MitoTracker Red CM-H2 XROS («Invitrogen», США). Восстановленный дигидроксирозамин проникает в живые клетки и окисляется АФК до флуоресцентного зонда, который связывается с тиоловыми группами в митохондриях. Таким образом, по интенсивности флуоресценции можно оценивать уровень АФК в клетке. Визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа Olympus CKX-53 («Olympus», Япония). Затем клетки снимали с лунок, лизировали с помощью 0,2% Triton X-100 («Sigma-Aldrich», Германия). Количественную оценку уровня свободных радикалов в лизате клеток определяли по степени флуоресценции ($\lambda_{\text{ext}} = 579$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 599$ нм) с помощью спектрофлуориметра («Shimadzu RF-6000», Япония) и пересчитывали на количество клеток (счетчик и анализатор жизнеспособности клеток Countess 3 Automated Cell Counter).

Для оценки уровня продуктов свободно-радикального окисления и экспрессии Nrf2 и глу-

татинпероксидазы, клетки культивировали в 6-луночных планшетах.

После окончания экспозиции с тестируемыми веществами клетки снимали с лунок раствором трипсин–EDTA (0,25% трипсина и 0,2% EDTA, «Sigma-Aldrich», Германия). Клетки в расчете 2×10^6 трехкратно промывали фосфатным буфером pH 7,4 («ПанЭко», Россия) и лизировали трехкратным циклом замораживания/размораживания в 200 мкл фосфатного буфера при $-20\text{ }^\circ\text{C}$, далее полученный лизат использовали для иммуноферментного анализа.

Клетки из расчета 1×10^6 промывали изотоническим солевым раствором хлорида натрия («Медпро», Россия) и ресуспендировали в 150 мкл ледяного буфера для лизиса (50 mM трис-HCl, pH 7,4, 150 mM KCl, 0,5% тритон X-100, смесь ингибиторов протеиназ, встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g (CM-50, Eppendorf, Германия). Цитоплазматическую фракцию переносили в отдельные пробирки и использовали для определения концентрации карбонильных производных белков.

Определение количества транскрипционного фактора Nrf2 и глутатионпероксидазы в клетках линии Saso-2 проводили методом гетерогенного иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора («Human Nuclear factor ery-throid 2-related factor 2» и «Glutathione peroxidase» ELISA kit, Blue gene, Китай). Оптическую плотность измеряли при 450 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Brad-

ford) Assay Kit, ThermoFisher, США) [9]. Определение концентрации карбонильных производных белков выполняли с помощью коммерческого набора (Protein Carbonyl Content Assay Kit, «Sigma-Aldrich», Германия).

Полученные результаты анализировали с помощью программ «StatSoft 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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате выполнения МТТ-теста показано, что при всех сроках эксперимента (3, 24 и 72 ч) токсическими для клеток являются концентрации H_2O_2 50 и 100 мкМ. В то же время БСО не влиял на жизнеспособность клеток при экспозиции в течение 3 ч и снижал ее при инкубации в течение 24 и 72 ч в концентрации 500 мкМ.

Экспозиция клеток линии Saso-2 с H_2O_2 в концентрациях 50 и 100 мкМ в течение 3 ч приводила к повышению интенсивности флюоресценции клеток после окраски Mito tracker Red CM H_2XROS на 63,3% ($p < 0,0001$) и 85,6% ($p = 0,0003$) соответственно. При этом увеличение срока воздействия до 24 ч сопровождалось снижением флюоресценции на 25,3% ($p = 0,03$) и 36,3% ($p = 0,01$) (рис. 2).

Напротив, воздействие БСО в течение 3 ч достоверно не влияло на интенсивность флюоресценции. При увеличении концентрации БСО до 10, 50 и 100 мкМ интенсивность флюоресценции клеток возрастала на 38,8% ($p = 0,001$), 46,5% ($p = 0,0004$) и 70,2% ($p = 0,0001$) соответственно (рис. 2).

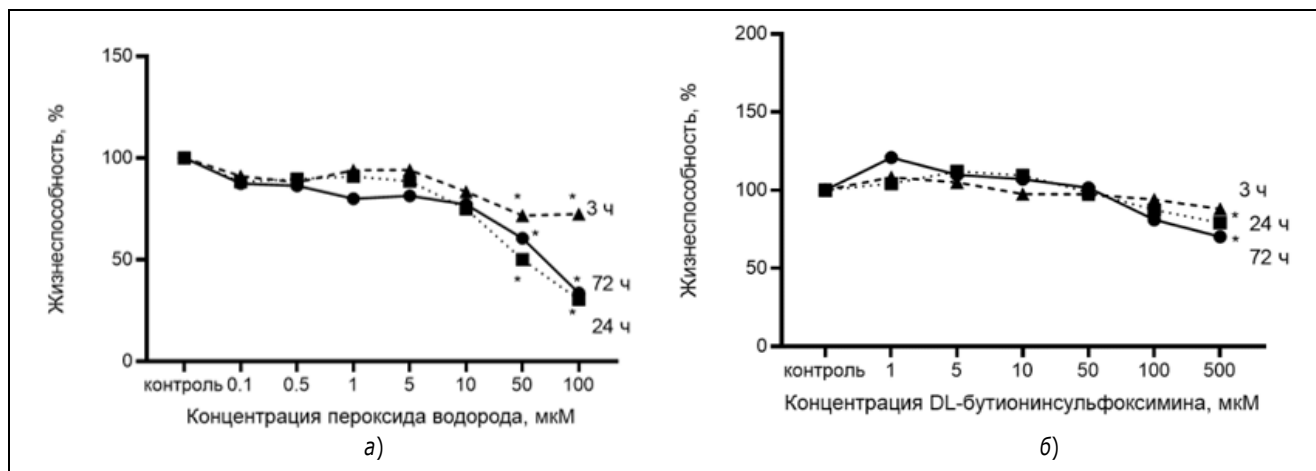


Рис. 1. Жизнеспособность клеток линии Saso-2 при воздействии пероксида водорода (а) и DL-бутионинсульфоксимины (б) в течение 3, 24 и 72 ч ($M, n = 3$).

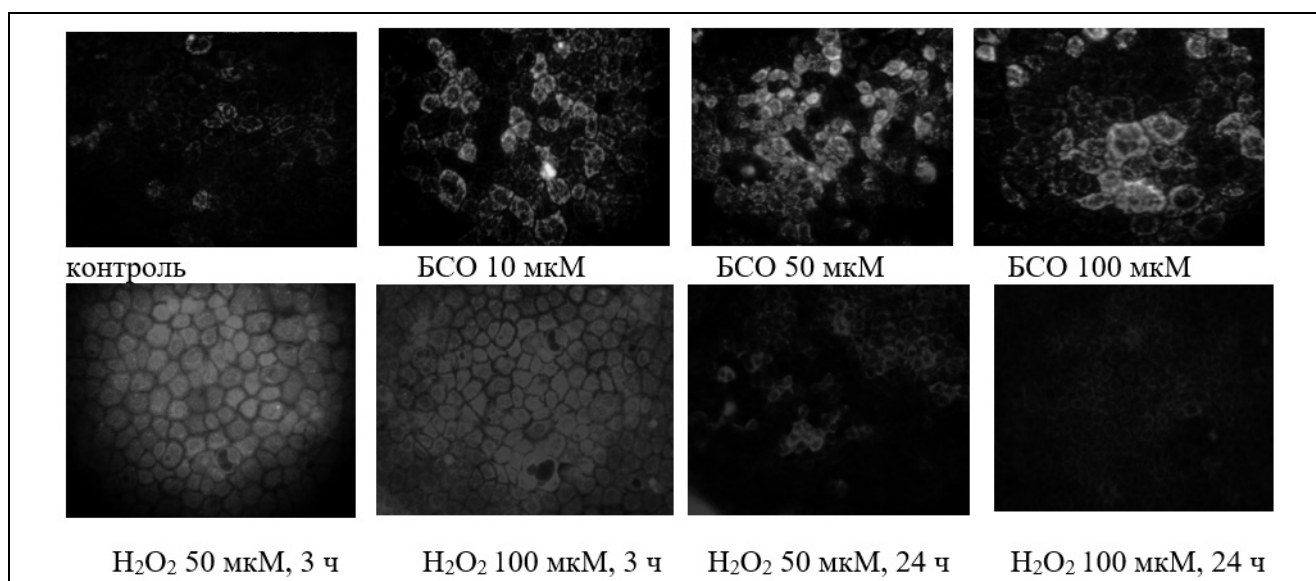


Рис. 2. Изменение уровня активных форм кислорода под действием пероксида водорода (H_2O_2) и D,L-бутионинсульфоксими́на (БСО) в клетках линии Caco-2: окрашивание с помощью MitoTracker Red CM-H2XRos, $\times 400$

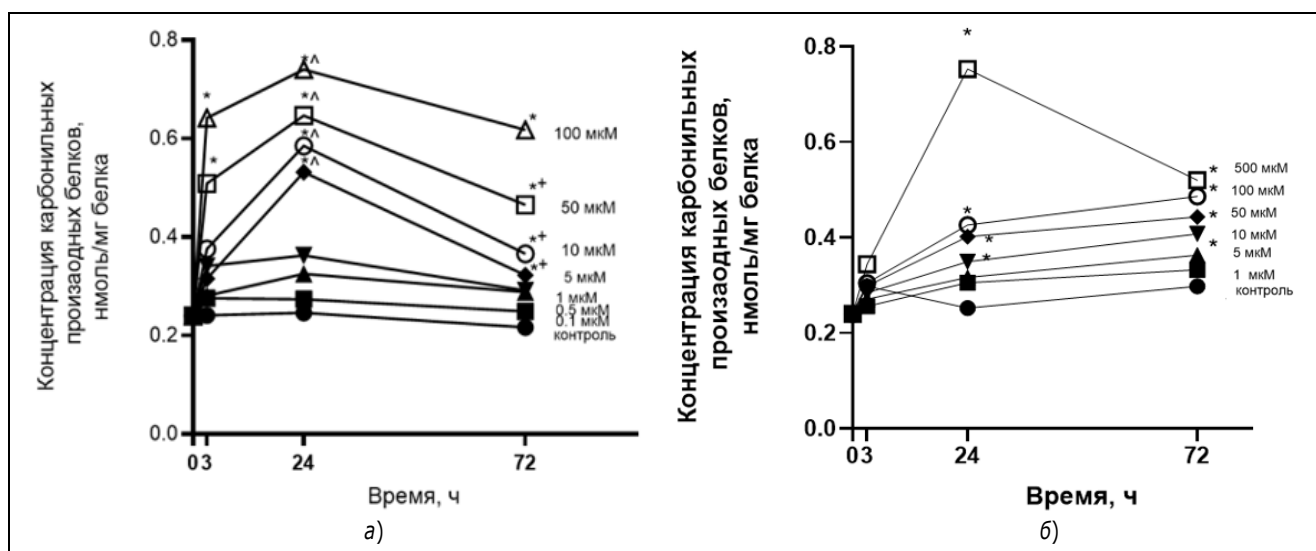


Рис. 3. Концентрация карбонильных производных белков в цитоплазматической фракции гомогената при воздействии пероксида водорода (а) в концентрациях 0,1–100 мкМ и при воздействии D,L-бутионинсульфоксими́на (б) в концентрациях 1–500 мкМ и сроке воздействия 3, 24 и 72 ч ($M, n = 3$); $p < 0,05$ по сравнению с *контролем; ^ сроком инкубации 3 ч; + сроком инкубации 24 ч (критерий Ньюмана–Кейсла)

Воздействие пероксида водорода в течение 3 ч повышало концентрацию карбонильных производных белков в клетках линии Caco-2 в концентрациях 50 и 100 мкМ на 87,3% ($p = 0,005$) и 130,4% ($p = 0,001$) соответственно по сравнению со значениями контрольной группы (рис. 3). При увеличении длительности воздействия прооксиданта до 24 ч уровень карбонильных производных белков повышался по сравнению со значениями контроля при концентрациях H_2O_2 5, 10, 50 и 100 мкМ на 74,8% ($p = 0,01$), 97,1% ($p = 0,01$), 150,5% ($p = 0,001$) и 189,3%

($p = 0,0005$) соответственно (рис. 3). При сроке инкубации 72 ч содержание карбонильных производных увеличивалось при концентрациях 50 и 100 мкМ H_2O_2 на 36,7% ($p = 0,001$) и 110,0% ($p = 0,001$) соответственно (рис. 3).

При инкубации клеток с БСО в концентрациях 1–500 мкМ уровень карбонильных производных белков не изменялся при сроке экспозиции 3 ч. Инкубация клеток линии Caco-2 с БСО в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ в течение 24 и 72 ч приводила к увеличению уровня карбониль-

ных производных белков на 15,5% ($p = 0,01$) и 36,6% ($p = 0,004$); 19,8% ($p = 0,003$) и 37,6% ($p = 0,005$); 21,2% ($p = 0,002$) и 63,1% ($p = 0,0002$); 150,0% ($p = 0,0002$) и 69,1% ($p = 0,0002$) соответственно (рис. 3).

При воздействии пероксида водорода во всех протестированных концентрациях в течение 3 ч на клетки линии Сасо-2 количество транскрипционного фактора Nrf2 не изменялось. Увеличение срока инкубации до 24 ч способствовало повышению количества Nrf2 при концентрациях H_2O_2 0,1, 0,5 и 1 мкМ на 394,1% ($p = 0,006$), 311,7% ($p = 0,01$) и 214,7% ($p = 0,03$) соответственно относительно значений контроля (рис. 4). При увеличении срока экспозиции до 72 ч количество Nrf2 в клетках линии Сасо-2 повышалось по сравнению с контролем под действием H_2O_2 в концентрациях 10 мкМ и

50 мкМ на 302,5% ($p = 0,02$) и 237,5% ($p = 0,03$) соответственно, а при остальных концентрациях прооксиданта – достоверно не изменялось (рис. 4).

В условиях воздействия БСО в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3 ч количество транскрипционного фактора Nrf2 не изменялось. При воздействии БСО в течение 24 ч и концентрациях 1, 5 и 500 мкМ количество Nrf2 также не изменялось, но возрастало при концентрации 10 мкМ на 157,8% ($p = 0,005$), 50 мкМ – на 146,7% ($p = 0,0003$), 100 мкМ – на 164,4% ($p = 0,006$) соответственно. Воздействие БСО в течение 72 ч приводило к увеличению количества Nrf2 при концентрации ингибитора 50 мкМ на 195,7% ($p = 0,001$), 100 мкМ – на 210,8% ($p = 0,001$), а при концентрациях 1, 5, 10 и 500 мкМ статистически значимого эффекта не оказывало (рис. 4).

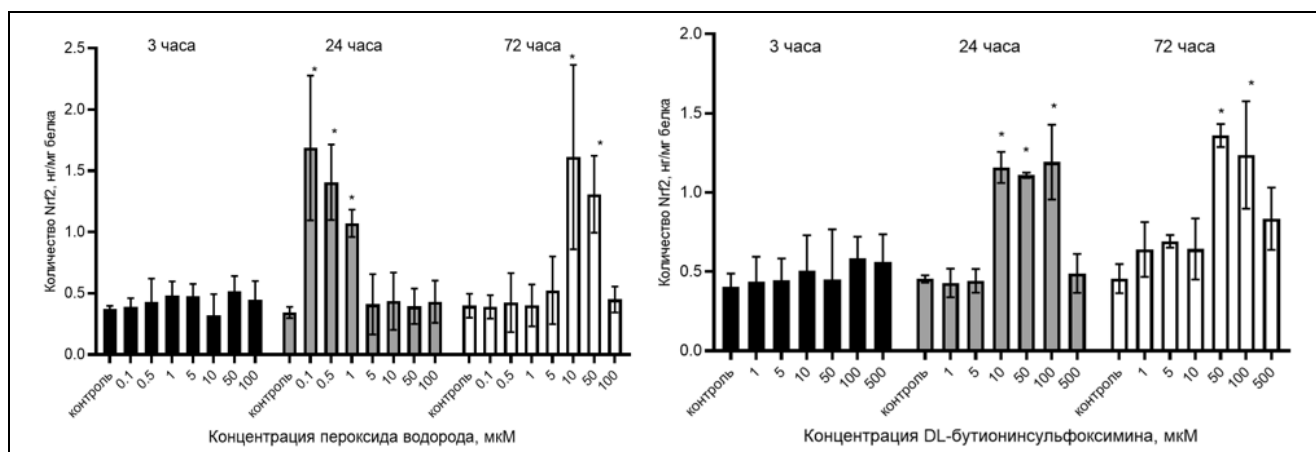


Рис. 4. Количество Nrf2 в цитоплазматической фракции лизата клеток линии Сасо-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 1–500 мкМ (слева) и DL-бутионинсульфоксимином в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Таблица. Изменение количества глутатионпероксидазы в клетках линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода и DL-бутионинсульфоксимином ($M \pm SD$, $n = 3$)

| Вариант опыта | H_2O_2 | | | БСО | | | |
|---------------|-----------|-----------|-----------|---------------|----------|-----------|-----------|
| | 3 ч | 24 ч | 72 ч | Вариант опыта | 3 ч | 24 ч | 72 ч |
| Контроль | 30,1±1,4 | 30,8±1,9 | 30,1±1,5 | Контроль | 33,5±2,9 | 33,5±2,9 | 33,4±2,9 |
| 0,1 мкМ | 29,7±1,6 | 36,1±0,2* | 32,2±1,8 | 1 мкМ | 34,2±3,1 | 39,5±1,6* | 30,2±1,4 |
| 0,5 мкМ | 31,3±1,9 | 40,4±6,6* | 28,9±3,3 | 5 мкМ | 32,3±2,4 | 45,3±1,6* | 37,6±3,1 |
| 1 мкМ | 28,7±2,1 | 36,1±1,9* | 29,1±1,6 | 10 мкМ | 31,9±3,1 | 51,1±3,2* | 40,3±2,8* |
| 5 мкМ | 30,8±1,7 | 31,5±0,6 | 36,7±3,2 | 50 мкМ | 32,5±2,7 | 57,3±1,9* | 38,8±3,8* |
| 10 мкМ | 30,9±1,8 | 31,2±0,8 | 53,8±6,2* | 100 мкМ | 32,7±2,1 | 55,1±1,1* | 34,8±4,4 |
| 50 мкМ | 31,6±1,9 | 31,3±0,9 | 34,1±3,3 | 500 мкМ | 29,7±3,6 | 30,1±0,4 | 28,2±1,3* |
| 100 мкМ | 21,3±1,1* | 31,1±1,2 | 28,5±2,3 | | | | |

Воздействие H_2O_2 в течение 3 ч и концентрации 100 мкМ снижало количество глутатионпероксидазы на 29,2% ($p = 0,01$), а в течение 24 ч и концентрациях 0,1; 0,5 и 1 мкМ повышало ее на 19,9% ($p = 0,002$), 34,2% ($p = 0,003$) и 19,9% ($p = 0,01$) по сравнению с контролем соответственно (табл.). При экспозиции 72 ч H_2O_2 в концентрации 10 мкМ количество фермента возрастало на 78,7% ($p = 0,0001$).

При воздействии БСО в течение 24 ч в концентрациях 1, 5, 10, 50 и 100 мкМ экспрессия глутатионпероксидазы увеличивалась на 17,9% ($p = 0,003$), 35,2% ($p = 0,0002$), 52,4% ($p = 0,00019$), 71,1% ($p = 0,0002$) и 64,6% ($p = 0,0002$) соответственно, а при инкубации в течение 72 ч и концентрациях 10 и 50 мкМ на 20,3% ($p = 0,006$) и 15,7% ($p = 0,012$) соответственно и снижалась при 500 мкМ на 15,8% ($p = 0,02$) (табл. 1).

В ходе настоящего исследования оценивалась динамика развития окислительного стресса при эндогенной и экзогенной его экспериментальных моделях *in vitro*.

Экзогенный окислительный стресс моделировали добавлением к клеткам линии Сасо-2 пероксида водорода. Период распада пероксида водорода составляет от миллисекунд до секунд, что позволяет ему проникать в клетку сквозь мембрану и оказывать внутриклеточное воздействие. H_2O_2 является стабильным и малореактивным агентом, вследствие чего может действовать как вторичный внутриклеточный посредник [10]. В то же время неконтролируемое взаимодействие пероксида водорода с переходными металлами (Fe^{2+} или Cu^+) по реакции Фентона приводит к образованию АФК [11]. В свою очередь АФК могут быть нейтрализованы антиоксидантными системами или накапливаться в клетках, вызывая ОС, что приводит к повреждению белков, липидов, ДНК, мутагенезу и гибели клеток.

Эндогенный окислительный стресс воспроизводили инкубированием клеток с БСО, который ингибирует фермент γ -глутамилцистеинсинтетаза, играющий ключевую роль в синтезе и поддержании клеточного уровня глутатиона. Глутатион – тиолсодержащий трипептид, обладающей собственной антиоксидантной активностью, а также необходимый для функционирования антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы). Снижение уровня эндогенного глутатиона уменьшает емкость эндогенной антиоксидантной системы, что приводит к развитию ОС.

Разный механизм развития ОС подтвержден в нашем исследовании при детекции АФК по интенсивности флуоресценции Mito tracker Red CM H_2XROS . При воздействии H_2O_2 повышении АФК наблюдалось уже через 3 ч, в то время как воздействие БСО повышало концентрацию АФК только к 24 ч экспозиции, когда происходило истощение эндогенного пула глутатиона.

Повышение уровня АФК под действием H_2O_2 приводило к развитию ОС, о чем свидетельствует повышение концентрации карбонильных производных белков начиная с 3 ч эксперимента. Максимальной выраженности окислительный стресс достигал через 24 ч, и начинал снижаться к 72 ч.

Снижение выраженности окислительного стресса к 72 ч, скорее всего, связано с активацией защиты клетки от окислительного стресса, о чем свидетельствует повышение уровня Nrf2 и антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы (при воздействии в течение 24 ч в концентрациях 0,1–1 мкМ, при воздействии в течение 72 ч – в концентрации 10–50 мкМ).

Nrf2 – редокс-чувствительный транскрипционный фактор, реагирующий на изменение соотношения восстановленных и окисленных SH-групп в белках. Его экспрессия повышается при развитии ОС и направлена на защиту клетки от воздействия свободных радикалов. В условиях нормы данный транскрипционный фактор находится в комплексе с белком-репрессором Keap1 (их связывание регулируется рядом протеинкиназ), который, с одной стороны, способствует убиквитированию и протеосомальной 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. После активации комплекс Keap1-Nrf2 диссоциирует, и Nrf2 транслицируется в ядро, где связывается с antioxidant-response elements (ARE) и активирует транскрипцию защитных ферментов, в частности глутатионпероксидазы.

Концентрация H_2O_2 100 мкМ являлась токсичной для клеток линии Сасо-2, вызывала максимальное повышение концентрации карбонильных производных белков и снижение их жизнеспособности, без активации защитных механизмов.

В отличие от H_2O_2 , воздействие БСО повышало концентрацию АФК только к 24 ч. Повышение концентрации АФК также приводило к развитию ОС, о чем свидетельствовало повышение

концентрации карбонильных производных белков на 24 и 72 ч инкубации.

Развитие ОС сопровождалось активацией защитных систем организма, о чем свидетельствовало повышение уровня транскрипционного фактора Nrf2 при воздействии БСО в течение 24 ч и концентрациях 10, 50 и 100 мкМ, а также в течение 72 ч и концентрациях 50 и 100 мкМ. В свою очередь, Nrf2 вызывал повышение уровня антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы.

Интересно отметить, что повышение уровня глутатионпероксидазы не приводило к снижению выраженности ОС (концентрации карбонильных производных белков) при увеличении экспозиции до 72 ч по сравнению с 24 ч воздействием. Скорее всего, это связано с тем, что БСО снижает концентрацию глутатиона – субстрата, необходимого для работы антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы. Поэтому, несмотря на повышение уровня антиоксидантного фермента, выполнять свою функцию он не мог.

Токсичной для клеток линии Сасо-2 являлась концентрация БСО 500 мкМ: при данной концентрации наблюдался максимальный уровень карбонильных производных белков и снижение жизнеспособности клеток, без активации защитных механизмов.

Выводы

1. Пероксид водорода в концентрациях 5, 10, 50 мкМ вызывает развитие компенсированного окислительного стресса (эустресса), что проявляется в повышении уровня карбонильных производных белков, уровня транскрипционного фактора Nrf2 и антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы. Активация антиоксидантной системы защиты приводит к снижению выраженности ОС при увеличении длительности экспозиции до 72 ч. Концентрация H_2O_2 100 мкМ является токсичной для линии клеток Сасо-2 и вызывает развитие некомпенсированного ОС и гибель клеток (дистресс).

2. БСО в концентрациях 10; 50; 100 мкМ на клетках линии Сасо-2 при длительности экспози-

ции 24 и 72 ч вызывает развитие компенсированного окислительного стресса (эустресса), начиная с 24 ч экспозиции, что проявляется в повышении уровня карбонильных производных белков, уровня транскрипционного фактора Nrf2 и антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы. Активация защитных факторов не приводит к снижению выраженности окислительного стресса, что, скорее всего, связано с истощением эндогенного пула глутатиона. Концентрация БСО 500 мкМ является токсичной для линии клеток Сасо-2 и вызывает развитие некомпенсированного окислительного стресса и гибели клеток (дистресс).

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Sies H. Introductory Remarks. Ed. Oxidative Stress, Academic Press, London, 1985; 1–8.
2. Sies H., Cadenas E. Oxidative stress: damage to intact cells and organs. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1985; 311: 617–631.
3. Jones D.P. Redefining oxidative stress. Antioxid Redox Signal. 2006; 8(9-10):1865–1879.
4. Sies H. Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology. 2019; 13: 153–163.
5. Sies H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. Current Opinion in Toxicology. 2018; 7: 122–126.
6. Itoh K., Chiba T., Takahashi S., et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response element. Biochem Biophys Res Commun. 1997; 236: 313–322.
7. Schreck R., Albermann K., Baeuerle P.A. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. Free Radic Res Commun. 1992; 17:221–237.
8. Калинин П.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д. и др. Сравнение цитотоксичности синтетических сосудистых протезов *in vitro*. Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. 2020; 28(2): 183–192.
9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248–54.
10. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. Redox Biology. 2017; 11: 613–619.
11. Smirnov N., Arnaud D. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. New Phytologist. 2019; 2: 1197–1214.

Поступила 20 июня 2022 г.

MODELING AND DYNAMICS OF ENDOGENOUS AND EXOGENOUS OXIDATIVE STRESS *IN VITRO*

© Authors, 2022

Yu.V. Abalenikhina

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

E-mail: abalenikhina88@mail.ru;

S.K. Pravkin

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

A.V. Shchulkin

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

E.D. Rokunov

Student, the Faculty of Medicine, Ryazan State Medical University (Ryazan, Russia);

D.S. Nemtinov

Student, the Faculty of Medicine, Ryazan State Medical University (Ryazan, Russia);

E.P. Vasilyeva

Student, the Pediatric Faculty, Ryazan State Medical University (Ryazan, Russia);

E.N. Yakusheva

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

Relevance. The effect of pro-oxidants on the cell can cause different effects depending on the dose and duration of exposure, therefore, adequate experimental models of oxidative stress (OS) *in vitro* are needed to study these processes.

The aim of the study was to study the dynamics of OS development in endogenous and exogenous *in vitro* models.

Material and methods. The study was carried out on a line of Caco-2 cells. Hydrogen peroxide (H₂O₂) and DL-butynone sulfoximine (BSO) were added to cells at concentrations of 0.1–100 μM and 1–500 μM, respectively, at the confluence of 3, 24 and 72 hours. At the end of the exposure, the percentage of viable cells was determined (MTT test), the level of reactive oxygen species (MitoTracker Red CM-H2 XROS), the amount of Nrf2 and glutathione peroxidase (ELISA), the concentration of carbonyl derivatives of proteins (photometric method.)

Results. H₂O₂ at concentrations of 5–50 μM and BSO – 10; 50; 100 μM cause an increase in the level of carbonyl derivatives of proteins, the level of transcription factor Nrf2 and antioxidant enzyme – glutathione peroxidase at exposure time of 24 and 72 hours. The concentration of H₂O₂ 100 μM and BSO 500 μM are toxic to the Caco-2 cell line. The incubation period of 3 hours does not cause the development of OS.

Conclusion. Hydrogen peroxide at concentrations of 5–50 μM, BSO – 10; 50; 100 μM and exposure time of 24 and 72 hours cause the development of compensated oxidative stress (eustress), and H₂O₂ at concentrations of 100 μM and BSO – 500 μM are toxic to cells of the Caco-2 line.

Key words: oxidative stress, hydrogen peroxide, D,L-butynone sulfoximine, glutathione peroxidase, Nrf-2, carbonyl derivatives of proteins.

For citation: Abalenikhina Yu.V., Pravkin S.K., Shchulkin A.V., Rokunov E.D., Nemtinov D.S., Vasilyeva E.P., Yakusheva E.N. Modeling and dynamics of endogenous and exogenous oxidative stress *in vitro*. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2022;25(12):10–17. <https://doi.org/10.29296/25877313-2022-12-02>



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Алпизарин (таблетки, мазь), рег. №№ 85/507/2; 85/507/10; 85/507/16 – противовирусное средство, получаемое из травы копеечника альпийского (*Hedysarum alpinum* L.) или копеечника желтеющего (*Hedysarum flavescens* Rerel et Schmalh). По сравнению с ацикловиром обладает более широким спектром действия.

Аммифурин (таблетки, спиртовой раствор), рег. №№ 83/914/9; 70/151/47; 70/151/48 – фотосенсибилизирующее средство, получаемое из плодов амми большой (*Ammi majus* L.).

Анмарин (линимент, гель, лосьон (раствор)), рег. №№ 90/248/1; 95/178/5; 90/248/4 – антифунгальное, противогрибковое средство, получаемое из плодов амми большой (*Ammi majus* L.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru