

ИНДУЦИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ S-НИТРОЗОГЛУТАТИОНА НА ЭКСПРЕССИЮ И АКТИВНОСТЬ ПОЛИПЕПТИДА, ТРАНСПОРТИРУЮЩЕГО ОРГАНИЧЕСКИЕ АНИОНЫ 1B1 В КЛЕТКАХ ЛИНИИ HepG2

О.Н. Сучкова¹, Ю.В. Абаленихина^{1*}, А.В. Шулькин¹, П.Ю. Мыльников¹,
Ф.Т. Гаджиева¹, П.Д. Кочанова¹, М.Г. Узбеков², Е.Н. Якушева¹

¹Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова,
390026, Рязань, ул. Высоковольная, 9; *эл. почта: abalenihiina88@mail.ru

²Московский научно-исследовательский институт психиатрии, Москва

В исследовании на клетках линии HepG2 изучено влияние донора оксида азота S-нитрозоглутатиона на количество и активность полипептида, транспортирующего органические анионы 1B1 (OATP1B1), а также экспрессию гена *SLCO1B1*, кодирующего белок-транспортер. В ходе работы было установлено, что при воздействии в течение 3 ч S-нитрозоглутатион не влиял на количество и активность OATP1B1. При инкубации в течение 24 ч S-нитрозоглутатион (10–500 мкМ) увеличивал экспрессию *SLCO1B1* и количество OATP1B1, что сопровождалось повышением активности белка-транспортера. Индукцию белка OATP1B1 под действием донора NO подавлял ингибитор растворимой гуанилатциклазы (pГЦ) — ODQ (1H-[1,2,4]оксадиазол-[4,3-а]хиноксалин-1-ОН) в концентрации 10 мкМ. Таким образом, в ходе выполненного исследования установлено, что S-нитрозоглутатион, действуя через сигнальный путь NO-pГЦ-cGMP, повышает экспрессию гена *SLCO1B1*, что вызывает увеличение количества белка-транспортера и, как следствие, его активности.

Ключевые слова: OATP1B1; ген *SLCO1B1*; S-нитрозоглутатион; NO-pГЦ-cGMP-сигнальный путь

DOI: 10.18097/PBMC1487

ВВЕДЕНИЕ

Белки-транспортеры, способные переносить эндо- и экзобиотики, играют одну из ключевых ролей в фармакокинетических процессах (всасывание, распределение и выведение), а также участвуют в переносе электронейтральных молекул небольшой массы через биологические мембраны [1, 2].

Все белки-транспортеры разделяются на две большие группы: ABC-транспортеры и SLC-транспортеры. ABC-транспортеры (англ.: ATP-binding cassette transporters, АТФ-зависимые переносчики) используют энергию АТФ для переноса субстратов через билипидную мембрану из цитоплазмы во внеклеточное пространство и биологические жидкости (т.н. эффлюксные транспортеры). SLC-белки (англ.: solute carrier, переносчики растворенных веществ) используют для переноса своих субстратов разность электрохимических потенциалов или ионный градиент. Именно поэтому они относятся ко вторично-активным транспортерам. В основном, SLC-транспортеры опосредуют проникновение веществ в клетки, то есть являются инфлюксными переносчиками, хотя некоторые могут функционировать как эффлюксные транспортеры или же опосредовать двунаправленный транспорт веществ. У человека на сегодняшний день идентифицировано более 550 представителей SLC-белков, которые объединены в ряд семейств. Семейство полипептидов, транспортирующих органические анионы (англ.: organic anion transporting polypeptides, OATP1) является одним из самых

изученных и клинически значимых; оно включает в себя 3 подсемейства: OATP1A, OATP1B и OATP1C [3].

Белок OATP1B1 (OATP2, OATP-C, LST-1, SLC21A6) человека представляет собой гликопротеин, состоящий из 691 аминокислотного остатка, который кодируется геном *SLCO1B1*. Транспортер обладает молекулярной массой около 84 кДа, которая после дегликозилирования уменьшается примерно до 54 кДа [4, 5].

OATP1B1 локализован в гепатоцитах, преимущественно на базолатеральной мембране, базальной мембране клеток Сертоли, и диффузно — в клетках Лейдига [4]. мРНК *SLCO1B1* также была обнаружена в энтероцитах, клетках рака молочной железы [6], клетках карциномы яичников [1], гепатоцеллюлярной карциноме и других опухолевых клетках [7]. Во всех данных клетках OATP1B1 выполняет единую функцию — обеспечивает перенос веществ-субстратов из крови и межклеточного пространства внутрь клеток [8].

Экспрессия *SLCO1B1*/OATP1B1 снижена в клетках гепатоцеллюлярной карциномы [9, 10], что может быть одним из механизмов их резистентности к проводимой химиотерапии: сниженное количество инфлюксного транспортера уменьшает проникновение цитостатиков — субстратов OATP1B1 — внутрь опухолевых клеток [11]. Поэтому с целью повышения эффективности проводимой химиотерапии перспективен поиск веществ, повышающих количество и активность OATP1B1 в клетках гепатоцеллюлярной карциномы.



Ранее нами было показано, что донор NO — S-нитрозоглютацион — может повышать активность и количество ABC белка-транспортера — Р-гликопротеина [12]. Поэтому мы предположили, что S-нитрозоглютацион может модулировать и другие белки-транспортеры, в частности OATP1B1.

Цель настоящего исследования — оценить влияние S-нитрозоглютациона на экспрессию и активность OATP1B1 в клеточной линии HepG2, а также изучить его возможные механизмы.

МЕТОДИКА

Культивирование клеток

Исследование выполнено на культуре клеток HepG2 (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), содержащей глюкозу (4,5 г/л), 4 мМ L-глутамин, 10% фетальную бычью сыворотку, пенициллин (100 ЕД/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл) (все компоненты производства “Sigma-Aldrich”, Германия). Клетки культивировали в 96-луночных и 6-луночных планшетах (“Corning”, США).

S-нитрозоглютацион (“Sigma-Aldrich”, Германия) добавляли к культуральной среде в концентрациях 1 мкМ, 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ и 500 мкМ, и клетки инкубировали 3 ч и 24 ч. К контрольным клеткам в эквивалентном объеме добавляли воду для инъекций (растворитель S-нитрозоглютациона). Для оценки роли сигнального пути NO-pГЦ-cGMP в механизме влияния S-нитрозоглютациона на OATP1B1 в питательную среду за 30 мин до добавления донора NO вносили ингибитор pГЦ — 1Н-[1,2,4]оксадиазол-[4,3-а]хиноксалин-1-ОН (ODQ, “Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 10 мкМ [13].

Определение количества мРНК методом ПЦР в реальном времени

Экспрессию гена *SLCO1B1* в клетках HepG2 оценивали методом ПЦР в реальном времени. Для этого клетки культивировали в 6-луночных планшетах (“Corning”). После образования монослоя их механически (с помощью скребка) снимали с лунок. Суммарную РНК выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit (“QIAGEN”, Германия) согласно инструкции производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрическим способом с помощью NanoPhotometr NP80-Touch (“Implen”, Германия). Реакцию ОТ-ПЦР проводили одношаговым методом с помощью набора БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (“Биолабмикс”, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Условия обратной транскрипции: температура 45°C, время инкубации 10 мин, количество циклов 1.

Последовательности праймеров были подобраны с помощью программы DNASTAR Lasregene, PrimerSelect. Использовали следующие праймеры: *SLCO1B1* 5'-GGTGAATGCCCCAAGAGATGAG-3' (прямой) и 5'-TGGAAACCCAGTGCAAGTGATT-3' (обратный) (“Евроген”, Россия). В качестве

референсного гена, относительно экспрессии которого оценивали экспрессию *SLCO1B1*, был выбран ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (GAPDH), и следующие праймеры GAPDH: 5'-GTCCCTCTGACTTCAACAGCG-3' (прямой) и 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3' (обратный) (“Евроген”). Анализ проводили при следующих условиях температурных циклов: денатурация — нагрев реакционной смеси до 95°C, охлаждение — 53°C, элонгация — 72°C. Для работы использовали пробирки объемом 0,2 мл в стрипах по 8 штук. Анализ проводили на амплификаторе нуклеиновых кислот Applied Biosystems Quant Studio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени (“Life Technologies Holdings Pte. Ltd.”, Сингапур) с программным обеспечением QuantStudio Design and Analysis. Расчёт уровня экспрессии *SLCO1B1* относительно референсного гена был осуществлён с помощью программного обеспечения LinRegPCR v.11.0 (“Heart Failure Research Center”, Нидерланды).

Определение относительного количества белка OATP1B1 методом Вестерн-блот

Для оценки относительного количества OATP1B1 клетки культивировали в 6-луночных планшетах. После окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсин и 0,2% ЭДТА, “Sigma-Aldrich”, Германия), трижды промывали раствором фосфатного буфера (“Bio-Rad”, США). Затем клетки лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (“Thermo Fisher Scientific”, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (“Sigma-Aldrich”, Германия) в течение 30 мин при 4°C и постоянном перемешивании из расчёта 10⁷ клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 5000 g (CM-50, “Eppendorf”, Германия). Супернатант использовали для выполнения анализа.

Далее 30 мкг белков супернатанта клеточного лизата подвергали электрофорезу с использованием 7,5% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (“Bio-Rad”) в буферной системе Laemmli (“Bio-Rad”).

Образцы смешивали с буфером Laemmli (“Bio-Rad”), содержащем 50 мМ β-меркаптоэтанола (“Bio-Rad”) в соотношении 1:3, инкубировали 10 мин при температуре 70°C. Электрофорез проводили при 100 В в течение 90 мин.

Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose, “Bio-Rad”) с использованием Mini Trans-Blot (“Bio-Rad”) в течение 7 мин при 25 В и 1,3 А.

Белки на мембране блокировали 1% раствором Casein Blocker (“Bio-Rad”), содержащим 0,1% Tween в течение 1 ч при комнатной температуре.

Детекцию OATP1B1 проводили с использованием первичных мышинных моноклональных антител (OATP2 Polyclonal Antibody, “Invitrogen”, США) в концентрации 1:200 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”) в разведении 1:4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре.

Хемилюминесценцию фиксировали с помощью ChemiDocXRS+ (“Bio-Rad”). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (“Bio-Rad”).

Молекулярная масса OATP1B1 была подтверждена путём сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, “Bio-Rad”).

Содержание OATP1B1 оценивали относительно белка GAPDH, используя первичные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 (“Invitrogen”; разведение 1:1000) и вторичные кроличьи антитела — Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (“Invitrogen”; разведение 1:4000).

Определение активности OATP1B1 методом ВЭЖХ МС/МС

Активность OATP1B1 анализировали по проникновению субстрата транспортера внутрь клеток HepG2. Для оценки влияния S-нитрозоглутатиона на активность OATP1B1 клетки культивировали в 24-луночных планшетах. После достижения монослоя к клеткам добавляли S-нитрозоглутатион в концентрациях 1 мкМ, 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ и 500 мкМ и инкубировали 24 ч при 37°C. По окончании инкубации выполняли транспортные эксперименты. Для этого клетки однократно промывали нагретой до 37°C транспортной средой, содержащей раствор Хэнкса (“Sigma-Aldrich”, Германия), забуференного 25 мМ Hepes при pH 7,4 (“Sigma-Aldrich”, Германия), и 1% диметилсульфоксид (“ПанЭко”, Россия). Далее к клеткам добавляли субстрат OATP1B1 — аторвастатин (1 мкМ, “Sigma-Aldrich”, США). Клетки инкубировали в течение 5 мин. Реакцию останавливали удалением транспортной среды и немедленной промывкой клеток 500 мкл ледяной транспортной среды. После этого клетки трижды промывали 500 мкл ледяного фосфатного буфера (“ПанЭко”). Лизис клеток осуществляли трёхкратным циклом “заморозки-разморозки” (клетки замораживали при -80°C, затем размораживали при комнатной температуре). В полученных лизатах клеток определяли концентрацию аторвастатина методом ВЭЖХ-МС/МС [14].

Для извлечения аторвастатина из образцов к 300 мкл лизата клеток добавляли 300 мкл ацетонитрила с внутренним стандартом (10 нг/мл валсартан, “Sigma”, США), перемешивали с помощью встряхивателя Vortex (“Heidolph”, Германия). Затем образцы центрифугировали 10 мин при 4°C и 21000 g на высокоскоростной центрифуге Avanti JXN-3 (“Beckman Coulter”, США). Супернатант переносили в вials объёмом 1 мл (“Thermo Fisher Scientific”) и помещали в автосемплер. Анализ был выполнен на высокоэффективном жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (“Thermo Fisher Scientific”) с

с tandemным масс-селективным детектором TSQ Fortis (“Thermo Fisher Scientific”), градиентным насосом, дегазатором и автосемплером.

Условия анализа на хроматографе: предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM, хроматографическая колонка UCT Selectra C18 4,6 мм × 100 мм, 5 мкм, 100 Å, термостатирование колонки 35°C.

В работе был применён градиентный режим элюирования. Молекулы ионизировали в режиме положительной ионизации на электроспрее при атмосферном давлении. Напряжение спрея составило 3500 В. Детектирование вещества проводили в следующем режиме: оболочечный газ (sheath gas) — 50 л/мин, вспомогательный газ (aux gas) — 10 л/мин, продувочный газ (sweep gas) — 1 л/мин, температурный режим трубки для переноса ионов 300°C, температура испарителя составляла 350°C. Детектирование вещества осуществляли по нижеприведённым условиям: аторвастатин — положительный режим ионизации, 559,30 m/z → 466,20 m/z, энергия столкновения — 17 В, фрагментация источника — 0, CID gas (collision-induced dissociation gas) — 2 мТорр; 559,30 m/z → 440,20 m/z, энергия столкновения — 32 В, фрагментация источника — 0, CID gas — 2 мТорр; валсартан 436,2 m/z → 206,3* m/z (использовали для количественного анализа), энергия столкновения — 27 В, фрагментация источника — 0, CID gas — 2 мТорр; валсартан — 436,2 m/z → 234,9 m/z, энергия столкновения — 18 В, напряжение линз — 104 В, фрагментация источника — 0, CID gas — 2 мТорр; скорость потока — 0,3 мл/мин; пробы вводили в хроматограф в объёме 2 мкл. Анализ проводили в течение 10 мин. При данных условиях время удерживания аторвастатина составило 4,53 мин, валсартана — 4,45 мин. Результаты пересчитывали на количество белка и выражали в пмоль/мг/мин.

Полученные результаты анализировали с помощью программ StatSoft Statistica 13.0, Microsoft Excel, GraphPad Prism8. Статистическую значимость различий оценивали дисперсионным анализом (ANOVA), в тексте указано точное значение критерия Фишера (F), критический уровень значимости принимали при $p < 0,05$.

Парные сравнения с контролем выполняли с помощью теста Даннетта. Результаты в таблице и на рисунках приведены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние S-нитрозоглутатиона на экспрессию гена SLCO1B1

На первом этапе исследования была оценена экспрессия гена *SLCO1B1* в клетках линии HepG2. Добавление S-нитрозоглутатиона во всех протестированных концентрациях 1–500 мкМ при инкубации в течение 3 ч достоверно не влияло на изучаемый показатель ($F = 2,85$, $p = 0,08$) (рис. 1а).

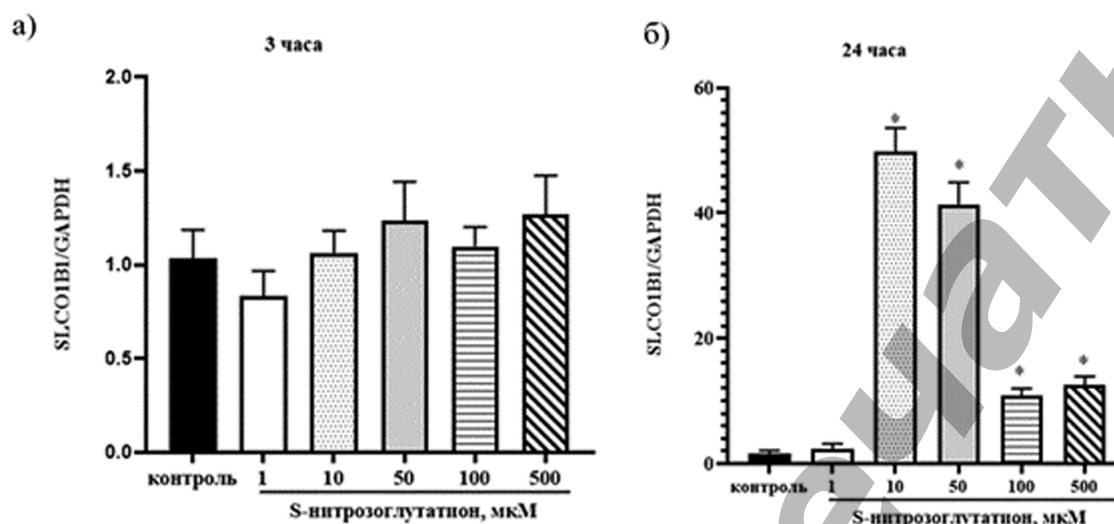


Рисунок 1. Относительная представленность ампликонов гена *SLCO1B1* в клетках линии HepG2 при воздействии S-нитроглютамина в течение 3 ч (а) и 24 ч (б) по результатам количественного ПЦР-анализа в реальном времени. * – $p < 0,001$ относительно контроля.

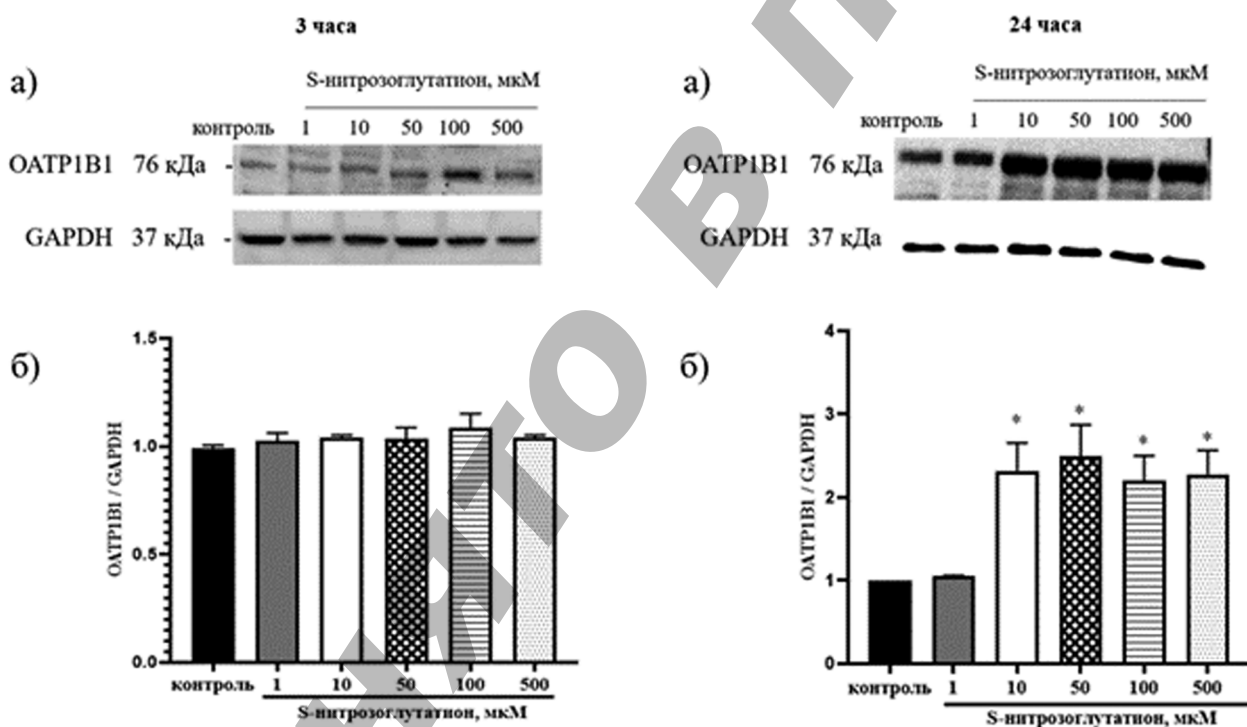


Рисунок 2. Относительное количество полипептида, транспортирующего органические анионы 1B1 (OATP1B1) в клетках линии HepG2 при воздействии S-нитроглютамина в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3 ч и 24 ч. * – $p < 0,001$ относительно контроля. Фото полос получены с помощью ChemiDocXRSt (а). Денситометрический анализ выполнен с помощью программного обеспечения ImageLab (б).

Увеличение длительности воздействия до 24 ч приводило к повышению экспрессии *SLCO1B1* ($F = 225, p < 0,0001$) под действием S-нитроглютамина в концентрациях 10 мкМ, 50 мкМ в 40 раз ($p < 0,0001$), а при 100 мкМ и 500 мкМ в 10 раз ($p = 0,0003$) (рис. 1б).

Влияние S-нитроглютамина на относительное количество белка-транспортера OATP1B1

При оценке влияния S-нитроглютамина на относительное количество белка OATP1B1 были получены аналогичные результаты.

S-нитроглютамин во всех протестированных концентрациях 1–500 мкМ и инкубации 3 ч достоверно не влиял на относительное количество OATP1B1 ($F = 3,18, p = 0,09$) (рис. 2а). Увеличение срока экспозиции до 24 ч приводило к тому, что относительное количество OATP1B1 при инкубации с S-нитроглютамином в концентрации 1 мкМ не изменялось, а при концентрациях 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ и 500 мкМ возрастало ($F = 19,0, p < 0,0001$) на 136,7% ($p = 0,0003$), 154,1% ($p < 0,0001$), 124,5% ($p = 0,0006$), 131,6% ($p = 0,0004$) соответственно (рис. 2б).

Влияние S-нитрозоглутатиона на активность OATP1B1

S-нитрозоглутатион в концентрациях 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ вызывал повышение проникновения аторвастатина в клетках HepG2 ($F = 10,4$, $p < 0,0005$) на 27,8% ($p = 0,02$), 41,8% ($p = 0,001$), 21,8% ($p = 0,06$) соответственно при сроке инкубации 24 ч, и не оказывал влияния при концентрации 500 мкМ ($p > 0,5$) (табл. 1).

Полученные результаты свидетельствуют о повышении активности OATP1B1 под действием S-нитрозоглутатиона.

Повышение относительного количества OATP1B1 сопровождалось увеличением активности белка-транспортера.

Таблица 1. Влияние S-нитрозоглутатиона на накопление аторвастатина внутри клеток HepG2 (пмоль/мг/мин, $M \pm SD$, $n = 3$)

	контроль	S-нитрозоглутатион, мкМ				
		1	10	50	100	500
Концентрация аторвастатина, пмоль/мг/мин	$4,78 \pm 0,49$	$4,62 \pm 0,36$	$6,11 \pm 0,13^*$ $p = 0,02$	$6,76 \pm 0,77^*$ $p = 0,001$	$5,82 \pm 0,41^\#$ $p = 0,07$	$4,79 \pm 0,42$

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно контроля, # – $p = 0,06$ относительно контроля.

Механизм регуляции OATP1B1 при воздействии S-нитрозоглутатиона

При инкубации клеток линии HepG2 с ингибитором рГЦ — ODQ относительное количество белка OATP1B1 статистически не отличалось от значений контроля (рис. 3а). В то же время при добавлении ODQ к S-нитрозоглутатиону ингибитор рГЦ препятствовал повышению количества транспортера под действием донора NO, количество OATP1B1 не отличалось от контрольных значений (рис. 3б). Полученные результаты свидетельствуют об участии биохимического каскада NO-рГЦ-cGMP в регуляции относительного количества OATP1B1 под действием S-нитрозоглутатиона.

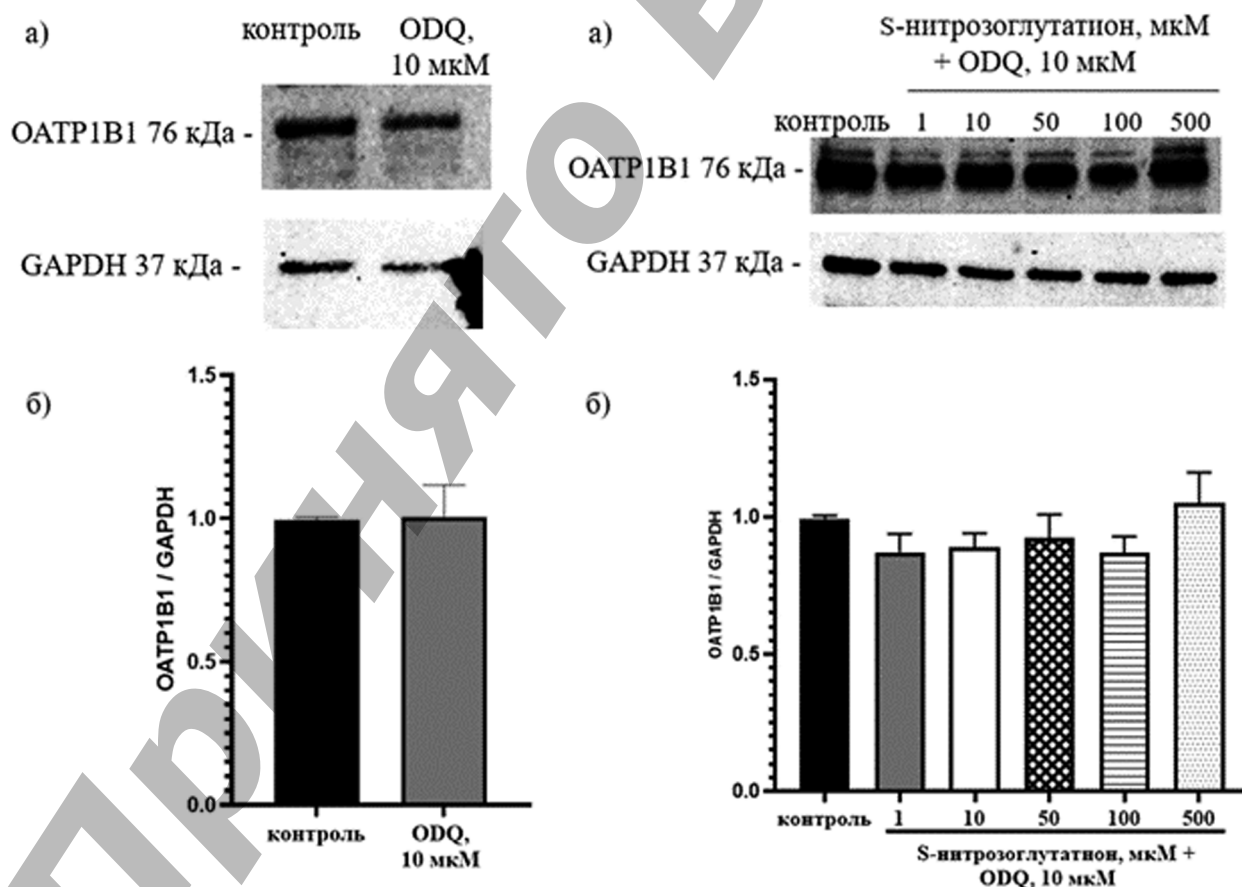


Рисунок 3. Относительное количество полипептида, транспортирующего органические анионы 1B1 (OATP1B1) в клетках линии HepG2 при самостоятельном воздействии ODQ, 10 мкМ и в сочетании с S-нитрозоглутатионом, 1–500 мкМ в течение 24 ч. Фото полос получены с помощью ChemiDocXRSt (a). Денситометрический анализ выполнили с помощью программного обеспечения ImageLab (б).

ОБСУЖДЕНИЕ

HepG2 — клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы человека с выраженным эпителиальным фенотипом, полученная из тканей печени мужчины европеоидного происхождения [15]. Линия клеток HepG2 является одной из наиболее широко используемых линий раковых клеток во многих биомедицинских исследованиях благодаря своей универсальности. Представляя человеческую энтодермальную линию клеток, HepG2 применяется в качестве моделей для исследований в области токсикологии, включая токсикогеномные скрининги с использованием CRISPR-Cas9, онкологии, заболеваний печени, механизмов регуляции генов, открытия биомаркеров и метаболизма лекарств, в том числе при участии белка-транспортера OATP1B1 [16, 17]. Именно поэтому клеточная линия HepG2 была выбрана для изучения молекулярных механизмов регуляции OATP1B1 при воздействии донора оксида азота S-нитрозоглутатиона.

OATP1B1 — инфлюксный белок-транспортер, играющий важную роль в проникновении его субстратов внутрь гепатоцитов и ряда других клеток. Субстратами данного переносчика являются такие лекарственные препараты, как статины, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, сартаны, цитостатики и ряд других веществ [18]. OATP1B1 принимает участие в транспорте билирубина и снижение его активности может приводить к развитию “желтухи” [19]. Экспрессия OATP1B1 в опухолевых клетках способствует проникновению цитостатических субстратов внутрь клеток и снижена в клетках гепатоцеллюлярной карциномы [11]. Поэтому применение индукторов OATP1B1 теоретически может повысить эффективность противоопухолевой терапии [20, 21].

В настоящем исследовании было установлено, что донор NO — S-нитрозоглутатион — при длительности воздействия 24 ч является индуктором экспрессии и активности изучаемого белка OATP1B1. В частности, было показано, что S-нитрозоглутатион повышает экспрессию мРНК гена *SLCO1B1*, кодирующего OATP1B1, относительное количество белка-транспортера, а также проникновение его субстрата аторвастатина внутрь клеток HepG2, что свидетельствует о повышении и его активности.

На данный момент описано несколько механизмов регуляции для OATP1B1 [1]:

- 1) прямое ингибирование OATP1B1;
- 2) транскрипционная регуляция;
- 3) пост-транскрипционная регуляция;
- 4) пост-трансляционная регуляция (гликозилирование, убиквитинирование, регуляция протеинкиназами);
- 5) полиморфизм гена *SLCO1B1*.

При концентрациях S-нитрозоглутатиона 10–500 мкМ отмечено повышение уровня мРНК *SLCO1B1* и количества белка OATP1B1. Это свидетельствует о том, что увеличение количества белка OATP1B1 регулируется экспрессией гена *SLCO1B1* в клетках линии HepG2.

При этом, при концентрации S-нитрозоглутатиона в концентрации 500 мкМ активность белка-транспортера не изменялась при повышенной экспрессии *SLCO1B1* и увеличении количества OATP1B1, что, вероятно, связано со структурной модификацией белка-транспортера (нитрозилированием его аминокислотных остатков) в условиях гиперпродукции NO [12].

S-нитрозоглутатион представляет собой эндогенное S-нитрозилированное производное глутатиона [22], которое и участвует в различных биохимических процессах, контролирующих гомеостаз. Считается, что S-нитрозоглутатион является донором NO; он может активировать классический рГЦ-cGMP-зависимый сигнальный путь или вызывать нитрозилирование определённых белков [23].

Учитывая данные обстоятельства, в заключительной части исследования была оценена роль сигнального пути NO-рГЦ-cGMP в индукции OATP1B1 под действием S-нитрозоглутатиона. В качестве ингибитора NO-cGMP сигнального пути применяли специфический блокатор рГЦ — ODQ. Известно, что ODQ окисляет молекулу гема в рГЦ без влияния на каталитический домен, тем самым снижая её активность [24]. В ходе работы было показано, что ODQ при самостоятельном воздействии не оказывал влияния на изменение количества белка-транспортера, однако при сочетанном применении с S-нитрозоглутатионом в течение 24 ч предотвращал повышение относительного количества OATP1B1 при концентрации донора NO 1–500 мкМ. Полученные результаты свидетельствуют об участии биохимического каскада NO-рГЦ-cGMP в регуляции относительного количества OATP1B1 под действием S-нитрозоглутатиона.

Ограничением данного исследования является то, что работа выполнена на одной клеточной линии HepG2 и активность OATP1B1 оценивали по проникновению внутрь клеток аторвастатина, который также является субстратом другого транспортера — OATP1B3 [25]. Однако на данный момент отсутствуют селективные субстраты OATP1B1, и для изучения влияния на OATP1B1 необходимо использовать рекомбинантные клеточные линии селективно сверхэкспрессирующие изучаемый транспортер (недостатком данного подхода является отсутствие регуляторных путей в данных клеточных линиях, которые представлены в гепатоцитах) или же одновременно применять ингибитор OATP1B3 в проводимых экспериментах (данных веществ также не много и их селективность подвергается сомнению).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе выполненного исследования установлено, что S-нитрозоглутатион, действуя через сигнальный путь NO-рГЦ-cGMP, повышает экспрессию гена *SLCO1B1*, что вызывает увеличение количества белка-транспортера и, как следствие, его активности. Полученные данные об индуцирующем действии S-нитрозоглутатиона

на OATP1B1 могут быть полезны для повышения эффективности терапии гепатоцеллюлярной карциномы за счёт увеличения проникновения цитостатиков-субстратов OATP1B1 внутрь клеток.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена из средств РязГМУ.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией Рязанского государственного медицинского университета (РязГМУ) (протокол № 87 от 07.11.2023).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Svoboda M., Riha J., Wlcek K., Jaeger W., Thalhammer T. (2011) Organic anion transporting polypeptides (OATPs): regulation of expression and function. *Curr. Drug Metab.*, **12**(2), 139–153. DOI: 10.2174/138920011795016863
2. Schneggelberger R.D., Steiert B., Sandoval P.J., Hagenbuch B. (2022) Using a competitive counterflow assay to identify novel cationic substrates of OATP1B1 and OATP1B3. *Front. Physiol.*, **8**(13), 969363. DOI: 10.3389/fphys.2022.969363
3. Liu X. (2019) SLC family transporters. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1141**, 101–202. DOI: 10.1007/978-981-13-7647-4_3
4. König J., Cui Y., Nies A.T., Keppler D. (2000) Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide. *J. Biol. Chem.*, **275**(30), 23161–23168. DOI: 10.1074/jbc.M001448200
5. Hagenbuch B., Gui C. (2008) Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family. *Xenobiotica*, **38**(7–8), 778–801. DOI: 10.1080/00498250801986951
6. Banerjee N., Allen C., Bendayan R. (2012) Differential role of organic anion-transporting polypeptides in estrone-3-sulphate uptake by breast epithelial cells and breast cancer cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **342**(2), 510–519. DOI: 10.1124/jpet.112.192344
7. Wen J., Zhao M. (2021) OATP1B1 Plays an important role in the transport and treatment efficacy of sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Dis. Markers*, **26**, 9711179. DOI: 10.1155/2021/9711179
8. Obaidat A., Roth M., Hagenbuch B. (2012) The expression and function of organic anion transporting polypeptides in normal tissues and in cancer. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **52**, 135–151. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-010510-100556
9. Libra A., Ferneti C., Porosio V., Visigalli M., Anelli P.L., Staud F., Tiribelli C., Pascolo L. (2006) Molecular determinants in the transport of a bile acid-derived diagnostic agent in tumoral and nontumoral cell lines of human liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **319**(2), 809–817. DOI: 10.1124/jpet.106.106591
10. Cui Y., König J., Nies A.T., Pfannschmidt M., Hergt M., Franke W.W., Alt W., Moll R., Keppler D. (2003) Detection of the human organic anion transporters SLC21A6 (OATP2) and SLC21A8 (OATP8) in liver and hepatocellular carcinoma. *Lab. Invest.*, **83**(4), 527–538. DOI: 10.1097/01.lab.0000065015.02412.48
11. Briz O., Serrano M.A., Rebollo N., Hagenbuch B., Meier P.J., Koepsell H., Marin J.J. (2002) Carriers involved in targeting the cytostatic bile acid-cisplatin derivatives cis-diammine-chloro-cholylglycinate-platinum(II) and cis-diammine-bisursodeoxycholate-platinum(II) toward liver cells. *Mol. Pharmacol.*, **61**(4), 853–860. DOI: 10.1124/mol.61.4.853
12. Шулькин А.В., Абаленихина Ю.В., Судакова Е.А., Мыльников П.Ю., Якушева Е.Н. (2022) Механизмы регуляции функционирования белка-транспортера Р-гликопротеина под действием оксида азота. *Биохимия*, **87**(4), 523–538. [Shchulkin A.V., Abalenikhina Y.V., Sudakova E.A., Mylnikov P.Y., Yakusheva E.N. (2022) Mechanisms of regulation of the P-glycoprotein transporter protein functioning under the action of nitric oxide. *Biochemistry (Moscow)*, **87**(4), 366–379.] DOI: 10.1134/S000629792204006X
13. Hwang, T.L., Wu C.C., Teng C.M. (1998) Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea. *Br. J. Pharmacol.*, **125**, 1158–1163. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702181
14. Ерохина П.Д., Мыльников П.Ю., Ганина С.О., Коняхин Е.А., Шулькин А.В., Слепнев А.А., Якушева Е.Н. (2022) Разработка и валидация методики количественного определения аторвастатина в клетках линии HepG2 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*, **30**(2), 149–158. [Erokhina P.D., Mylnikov P.Yu., Ganina S.O., Konyakhin E.A., Shchul'kin A.V., Slepnev A.A., Yakusheva E.N. (2022) Development and validation of the quantitative determination of atorvastatin in HepG2 cell line using high-performance liquid chromatography with mass-spectrometric detection. *I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald*, **30**(2), 149–158.] DOI: 10.17816/PAVLOVJ100986
15. López-Terrada D., Cheung S.W., Finegold M.J., Knowles B.B. (2009) Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum. Pathol.*, **40**(10), 1512–1515. DOI: 10.1016/j.humpath.2009.07.003
16. Chatuphonprasert W., Tukum-Mee W., Wattananthorn J., Jarukamjorn K. (2022) Impact of pineapple juice on expression of CYP3A4, NAT2, SULT1A1 and OATP1B1 mRNA in HepG2 cells. *Pak. J. Biol. Sci.*, **25**(1), 15–22. DOI: 10.3923/pjbs.2022.15.22
17. Choi J.M., Oh S.J., Lee S.Y., Im J.H., Oh J.M., Ryu C.S., Kwak H.C., Lee J.Y., Kang K.W., Kim S.K. (2015) HepG2 cells as an *in vitro* model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics. *Arch. Pharm. Res.*, **38**(5), 691–704. DOI: 10.1007/s12272-014-0502-6
18. Alam K., Crowe A., Wang X., Zhang P., Ding K., Li L., Yue W. (2018) Regulation of organic anion transporting polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-mediated transport: an updated review in the context of OATP-mediated drug-drug interactions. *Int. J. Mol. Sci.*, **19**(3), 855. DOI: 10.3390/ijms19030855
19. Zhang W., He Y.J., Gan Z., Fan L., Li Q., Wang A., Liu Z.Q., Deng S., Huang Y.F., Xu L.Y., Zhou H.H. (2007) OATP1B1 polymorphism is a major determinant of serum bilirubin level but not associated with rifampicin-mediated bilirubin elevation. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **34**(12), 1240–1244. DOI: 10.1111/j.1440-1681.2007.04798.x

20. Whisenant T.C., Nigam S.K. (2022) Organic anion transporters (OAT) and other SLC22 transporters in progression of renal cell carcinoma. *Cancers (Basel)*, **14**(19), 4772. DOI: 10.3390/cancers14194772
21. Shi C., Wu J.B., Chu G.C., Li Q., Wang R., Zhang C., Zhang Y., Kim H.L., Wang J., Zhou H.E., Pan D., Chung L.W. (2014) Hep-tamethine carbocyanine dye-mediated near-infrared imaging of canine and human cancers through the HIF-1 α /OATPs signaling axis. *Oncotarget*, **5**(20), 10114–10126. DOI: 10.18632/oncotarget.2464
22. Broniowska A.K., Diers A.R., Hogg N. (2013) S-nitrosoglutathione. *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**(5), 3173–3181. DOI: 10.1016/j.bbagen.2013.02.004
23. Zhang Y., Sun C., Xiao G., Shan H., Tang L., Yi Y., Yu W., Gu Y. (2019) S-nitrosylation of the peroxiredoxin-2 promotes S-nitrosoglutathione-mediated lung cancer cells apoptosis via AMPK-SIRT1 pathway. *Cell Death Dis.*, **10**(5), 329. DOI: 10.1038/s41419-019-1561-x
24. Zhao Y., Brandish P.E., di Valentin M., Schelvis J.P., Babcock G.T., Marletta M.A. (2000) Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry*, **39**(35), 10848–10854. DOI: 10.1021/bi9929296
25. Garrison D.A., Talebi Z., Eisenmann E.D., Sparreboom A., Baker S.D. (2020) Role of OATP1B1 and OATP1B3 in drug-drug interactions mediated by tyrosine kinase inhibitors. *Pharmaceutics*, **12**(9), 856. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090856

Поступила в редакцию: 05. 06. 2024.

После доработки: 21. 08. 2024.

Принята к печати: 19. 09. 2024.

INDUCING EFFECT OF S-NITROSOGLUTATHIONE ON THE EXPRESSION AND ACTIVITY OF A POLYPEPTIDE TRANSPORTING ORGANIC ANIONS 1B1 (OATP1B1) IN HepG2 CELLS

O.N. Suchkova¹, Yu.V. Abalenikhina¹, A.V. Shchul'kin¹, P.Yu. Myl'nikov¹,
F.T. Gadzhiyeva¹, P.D. Kochanova¹, M.G. Uzbekov², E.N. Yakusheva¹

¹Ryazan State Medical University,

9 Vysokovolt'naya str., Ryazan, 390026 Russia; *e-mail: abalenikhina88@mail.ru

²Moscow Scientific Research Institute of Psychiatry, Moscow, Russia

In a study on HepG2 cells, the effects of the nitric oxide donor S-nitrosoglutathione on the amount and activity of the polypeptide transporting organic anions, 1B1 (OATP1B1), as well as the expression of the *SLCO1B1* gene encoding the transporter protein were studied. In the course of the work, it was found that S-nitrosoglutathione, with a duration of exposure of 3 hours, did not affect the amount and activity of OATP1B1. With an increase in the incubation period to 24 hours, the expression of *SLCO1B1* under the action of S-nitrosoglutathione at concentrations of 10, 50 μ M by 40 times ($p < 0.0001$), 100 and 500 μ M ($p = 0.0003$). The relative amount of OATP1B1 during incubation with S-nitrosoglutathione at a concentration of 1 μ M did not change, but at concentrations of 10, 50, 100 and 500 μ M increased by 136.7% ($p = 0.0003$), 154.1% ($p < 0.0001$), 124.5% ($p = 0.0006$), 131.6% ($p = 0.0004$) accordingly, this was accompanied by an increase in the activity of the transporter protein. The induction of the amount of OATP1B1 was suppressed when a soluble guanylate cyclase inhibitor (rGC) was added to the nutrient medium. Thus, in this study, it was found that S-nitrosoglutathione increases the expression of the *SLCO1B1* gene encoding OATP1B1, the relative amount of the transporter protein, and also increases its activity, acting through the NO-rGC-cGMP signaling pathway.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: OATP1B1; *SLCO1B1* gene; S-nitrosoglutathione; NO-rGC-cGMP-signaling pathway

Funding. The work was carried out from the funds of the Federal State Budgetary Educational Institution of Ryazan State Medical University.

Received: 05.06.2024; revised: 21.08.2024; accepted: 19.09.2024.