

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

©Коллектив авторов

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПРЕГНАН X РЕЦЕПТОРА В УСЛОВИЯХ НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА

Ю.В. Абаленихина, Е.А. Судакова, А.А. Сеидкулиева, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева*

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

Прегнан X рецептор (PXR) — ядерный рецептор, играющий важную роль в регуляции экспрессии ферментов биотрансформации и обмена веществ. Функционирование и возможные механизмы регуляции PXR в условиях нитрозативного стресса (НС) на данный момент не изучены, что и послужило целью настоящего исследования. НС моделировали, инкубируя клетки линии Сасо-2 в присутствии S-нитрозоглутатиона (GSNO) (диапазон концентрации 1-500 мкМ) в течение 3 ч, 24 ч и 72 ч. Количество PXR оценивали методом вестерн-блот. Инкубирование клеток линии Сасо-2 со всеми использованными концентрациями GSNO в течение 3 ч приводило к снижению количества PXR. Увеличение длительности инкубации клеток в присутствии 1-50 мкМ GSNO до 24 ч сопровождалось повышением количества PXR. При концентрации GSNO 100 мкМ данный показатель достоверно не отличался от контроля, а при концентрации 500 мкМ был ниже него. Продление инкубации до 72 ч усиливало НС и приводило к нормализации (1 мкМ GSNO) или снижению (10-500 мкМ GSNO) уровня PXR. Битирозин, являющийся продуктом НС, индуцировал экспрессию PXR в концентрациях 0,4 мМ и 1 мМ.

Ключевые слова: прегнан X рецептор; нитрозативный стресс; нитрозоглутатион; клеточная линия Сасо-2

DOI: 10.18097/PBMC20216705394

ВВЕДЕНИЕ

Прегнан X рецептор (PXR; NR1I2, SXR) является членом семейства ядерных рецепторов — лиганд-зависимых факторов транскрипции — и ключевым регулятором генов, вовлечённых в метаболизм ксенобиотиков и эндобиотиков [1].

PXR локализуется преимущественно в печени и кишечнике, активируется разнообразными лигандами (рифампицин, ампренавир, дексаметазон, никардипин) и способен индуцировать экспрессию генов I (CYP3A4, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9) и II (UDP-глюкуронозилтрансфераза, глутатион-S-трансфераза) фаз метаболизма лекарственных веществ, а также белков-транспортёров (гликопротеин-P, белки множественной лекарственной устойчивости 1 и 2) [2].

В настоящее время активно изучаются и другие функции PXR, такие как участие в воспалительных реакциях [3], пролиферации и миграции клеток [4], обмене глюкозы, липидов и энергии [5].

Активные формы кислорода и азота (АФК и АФА соответственно), включая пероксинитрит, оксид азота (NO), пероксиды, супероксидный и гидроксильный радикалы, образуются во время физиологических и патофизиологических процессов. Взаимодействуя с белками, нуклеиновыми кислотами, липидами, они играют значимую роль в регуляции клеточных функций. Избыточная продукция АФК/АФА может приводить к структурным и функциональным изменениям, вызывающим повреждение клеток. Эти потенциально токсические эффекты компенсируются в нормальных условиях внутренними антиоксидантными механизмами, которые участвуют в физиологическом и/или патологическом метаболизме АФК/АФА [6]. Окислительный и нитрозативный стресс, который возникает в результате

повышенной продукции АФК/АФА и/или снижения ёмкости антиоксидантной защиты, может вызывать повреждение клеточных компонентов, аутоиммунные реакции и, в конечном итоге, способствовать нарушению нормальной работы клеточных процессов [7].

В ряде исследований было показано, что развитие окислительного стресса сопровождается снижением количества PXR [8, 9]. В то же время влияние нитрозативного стресса (НС) на функционирование PXR не изучено, что и послужило целью настоящего исследования.

МЕТОДИКА

Культивирование клеток

Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Сасо-2) (ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в инкубаторе WS-189C (“WorldScience”, Корея) в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) (“Sigma-Aldrich”, США), с добавлением L-глутамина (4 мМ) (“Sigma-Aldrich”), 15% эмбриональной бычьей сыворотки (“Sigma-Aldrich”), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (“Sigma-Aldrich”) соответственно.

Клетки культивировали в течение 21 суток, поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, экспрессирующие PXR [8].

В ходе эксперимента были сформированы следующие серии:

1) контрольная серия (n=3) — клетки, которые инкубировали с питательной средой без добавления тестируемых веществ;

2) контроль индукции PXR (n=3) — клетки линии Caco-2 инкубировали в питательной среде с добавлением рифампицина (“Sigma Aldrich”) в концентрации 10 мкМ в течение 24 ч [10];

3) оценка влияния донора NO S-нитрозоглутатиона (GSNO, “Sigma Aldrich”) [11] на количество PXR — GSNO добавляли в культуральную среду в конечных концентрациях 1 мкМ; 10 мкМ; 50 мкМ; 100 мкМ и 500 мкМ и инкубировали 3 ч, 24 ч и 72 ч (n=3 для каждой концентрации и временной точки);

4) оценка влияния битирозина (конечного продукта нитрозативного стресса) на количество PXR — к клеткам линии Caco-2 добавляли культуральную среду с битирозином (“Cambridge Isotope Laboratories”, Франция) в концентрациях 0,2 мМ; 0,4 мМ; 1 мМ; 1,5 мМ и инкубировали 24 ч (n=3 для каждой концентрации).

Для исследования цитотоксичности GSNO и битирозина клетки высевали в 96-луночный планшет (“Corning”, США). Для изучения влияния GSNO и битирозина на количество PXR концентрацию метаболитов оксида азота и битирозина клетки культивировали в 6-луночных планшетах (“Corning”).

Цитотоксический тест (MTT-тест)

Клетки высевали в 96-луночный планшет из расчёта 10^4 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 суток, затем добавляли питательную среду с GSNO или битирозином. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0,5% раствора бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (MTT) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор MTT удаляли и добавляли 200 мкл 1% раствора диметилсульфоксида (“ПанЭко”, Россия) [12]. Светопоглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на планшетном спектрофотометре StatFax 2100 (“Awareness Technology”, США).

Жизнеспособность клеток Caco-2 рассчитывали по формуле:

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

где ОП — оптическая плотность.

Получение тотальных клеточных лизатов

Клетки высевали в 6-луночные планшеты из расчёта 10^5 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 суток, затем добавляли питательную среду с GSNO или битирозином в соответствующие планшеты. После окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, “Sigma-Aldrich”).

Клетки из расчёта 1×10^6 промывали изотоническим солевым раствором (“Медпро”, Россия) и лизировали в 150 мкл ледяного буфера (50 мМ, трис-HCl pH 7,4,

150 мМ KCl, 0,5% тритон X-100, смесь ингибиторов протеиназ: 2 мМ (гидрохлорид-4-(2-аминоэтил) бензолсульфонилфторид (AEBSF), 0,3 мМ апротинин, 130 мМ бестатин, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ лейпептин, 14 мМ транс-эпоксисукцинил-L-лейциламидо-(4-гуанидино)-бутан (E-64), “Sigma-Aldrich”), встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. После центрифугирования в течение 10 мин при 5000 g (CM-50, “Eppendorf”, Германия) цитоплазматическую фракцию переносили в отдельные пробирки и использовали для определения концентрации метаболитов оксида азота и продукта HC — битирозина.

Определение концентрации битирозина

Образование битирозина регистрировали по интенсивности флуоресценции в фосфатном буфере (pH 7,4) при длине возбуждения $\lambda_{\text{exc}}=325$ нм и длине волны испускания $\lambda_{\text{em}}=415$ нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-6000 (Япония) [13]. Полученные результаты выражали в нмоль/мг белка.

Определение метаболитов оксида азота

Определение уровня метаболитов оксида азота (суммарная концентрация нитратов и нитритов NO_x) проводили спектрофотометрическим методом по окраске в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса (“Нева Реактив”, Россия). Интенсивность окраски определяли в видимой области спектра на микропланшетном анализаторе StatFax 2100 (“Awareness Technology”) при длине волны 540 нм и выражали в нмоль/мг белка [14].

Определение PXR

Определение количества PXR в клетках линии Caco-2 проводили методом вестерн-блот. После окончания экспозиции с GSNO и битирозином клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (“Sigma-Aldrich”), трижды промывали раствором фосфатного буфера (“Bio-Rad”, США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (“Thermo Fisher Scientific”, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (“Sigma-Aldrich”) в течение 30 мин при 40°C и постоянном перемешивании из расчёта 10^7 клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин (Avanti JXN-3, “BeckmanCoulter”, США).

Цитоплазматические белки (30 мкг) подвергали электрофоруезу с использованием TGX Stain-Free Fast Cast Acrylamide Kit (“Bio-Rad”) в буферной системе Laemmli (“Bio-Rad”). Перед загрузкой образцы обрабатывали в соответствии с протоколом Bio-Rad, смешивали в соотношении 1:3 с буфером для образцов Laemmli (“Bio-Rad”), содержащем 2,5% 2-меркаптоэтанола (“Helicon”, Россия), инкубировали 5 мин при температуре 70°C. Электрофорез проводили при 100 В в течение 90 мин.

Для определения относительного количества PXR методом вестерн-блот использовали первичные мышиные моноклональные антитела (MA5-31808

PXR Monoclonal Antibody (1D12G1), “Invitrogen”, США) в разведении 1:200. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbitanti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”) в разведении 1:4000. Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью Chemi Doc XRS+ (“Bio-Rad”). Интенсивность полученных полос анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (“Bio-Rad”). Количество PXR оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68, “Invitrogen”, разведение 1:1000, вторичные антитела — вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH — Rabbitanti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”, разведение 1:4000).

Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) AssayKit, “Thermo Fisher”, США) [15].

Статистический анализ

Полученные результаты анализировали с помощью программ Stat Soft Statistica 13.0 и Microsoft Excel for MAC. Результаты представлены в виде $M \pm SD$. Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), множественные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена-Кейлса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе жизнедеятельности в клетках образуется большое количество химических соединений, которые могут выполнять как регуляторную, так и повреждающую функцию в зависимости от их концентрации, времени воздействия и условий среды. К таким соединениям с двойственной ролью относят оксид азота [16]. В небольших концентрациях он может выступать в качестве сигнальной молекулы и

регулировать важные биохимические процессы [17]. Однако высокие уровни NO и его метаболитов могут привести к окислению тиолов или вызвать HC из-за истощения антиоксидантов.

В качестве источника NO в настоящем исследовании использовали GSNO, который представляет собой S-нитрозированное производное глутатиона и считается важным медиатором сигнальных эффектов оксида азота [11]. Сам GSNO напрямую в клетки не проникает, однако его добавление вызывает повышение внутриклеточных уровней S-нитрозотиолов. Кроме того, описан независимый от NO механизм проникновения GSNO внутрь клеток. При этом нитрозогруппа от GSNO переносится на цистеин. Образующийся в ходе данной реакции S-нитрозоцистеин проникает внутрь клеток через систему транспортера аминокислот [18]. S-нитрозоцистеин внутри клеток может либо вновь нитрозировать глутатион с образованием GSNO, либо непосредственно нитрозировать тиолы белков и запускать сигнальные каскады.

По результатам исследования в контрольной группе жизнеспособность клеток составила 100%. GSNO в концентрациях 1-500 мкМ и длительности инкубации 3 ч достоверно не влиял на жизнеспособность клеток. Данный показатель составил $102,4 \pm 5,6\%$. При воздействии GSNO в концентрациях 1-50 мкМ и длительности инкубации 24 ч жизнеспособность клеток также не изменялась, а при концентрациях 100 мкМ и 500 мкМ снижалась до $79,9 \pm 6,7\%$ ($p = 0,02$) и $78,8 \pm 7,2\%$ ($p = 0,03$). Увеличение длительности экспозиции до 72 ч приводило к снижению жизнеспособности до $68,4 \pm 11,4\%$ ($p = 0,0004$), $69,5 \pm 6,1\%$ ($p = 0,0004$) и $50,9 \pm 7,5\%$ ($p = 0,0003$) при концентрации GSNO 50 мкМ, 100 мкМ и 500 мкМ соответственно и не влияло на данный показатель при концентрации GSNO 1-10 мкМ (рис. 1).

Выраженность HC оценивали по уровню битирозина. В условиях действия АФА нитрозирование тирозина представляет собой наиболее специфичную окислительную модификацию.

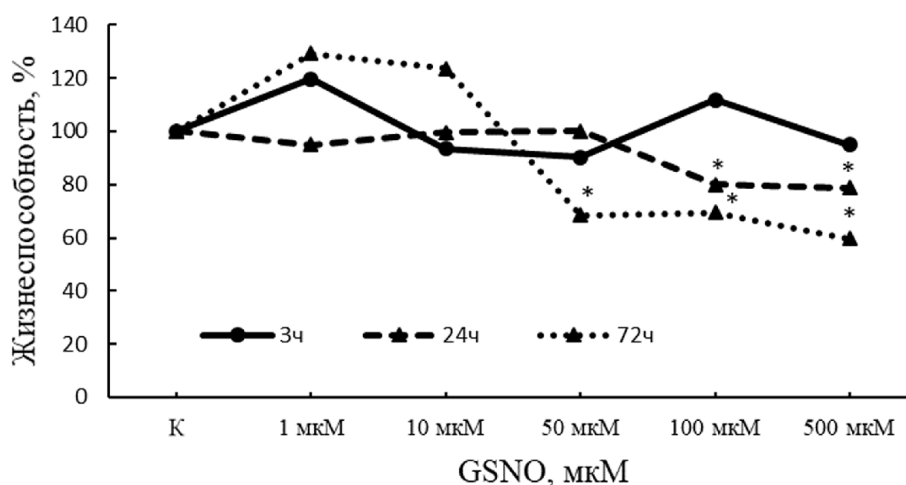


Рисунок 1. Изменение жизнеспособности клеток линии Сасо-2 в зависимости от концентрации S-нитрозоглутатиона при инкубации в течение 3 ч, 24 ч и 72 ч ($M \pm SD$). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем; К — контроль.

Нитротирозин частично диссоциирует до фенолята, но основное его количество конденсируется до 3,3-дитирозина (битирозина) [19]. Доказано, что образование битирозина превалирует над нитротирозином при длительном воздействии и/или более высоких концентрациях АФА, что позволяет рассматривать его в качестве маркера нитрозативного стресса [20].

Уровень битирозина не изменялся при воздействии GSNO в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3 ч, а также при концентрации 1 мкМ и длительности экспозиции 24 ч и 72 ч.

Содержание битирозина статистически значимо возрастало при действии GSNO в концентрациях 10-500 мкМ и сроках инкубации 24 ч и 72 ч:

при концентрации 10 мкМ увеличение отмечалось на 18,3% ($p=0,006$) и 30,3% ($p=0,001$), 50 мкМ — на 22,1% ($p=0,003$) и 27,3% ($p=0,007$), 100 мкМ — на 29,4% ($p=0,001$) и 32,6% ($p=0,005$) соответственно. При этом максимальное возрастание битирозина происходило при концентрации 500 мкМ на 34,9% ($p=0,0002$) при инкубации 24 ч и на 38,3% ($p=0,0003$) при инкубации 72 ч (рис. 2).

Дополнительно оценивали уровень метаболитов оксида азота. Данный показатель возрастал при всех концентрациях GSNO (1-500 мкМ) и всех сроках эксперимента; максимально при концентрации 500 мкМ на 51,8% ($p=0,0002$) при инкубации 3 ч, на 58,9% ($p=0,0002$) при инкубации 24 ч и на 68,5% ($p=0,0002$) при инкубации 72 ч (рис. 3).

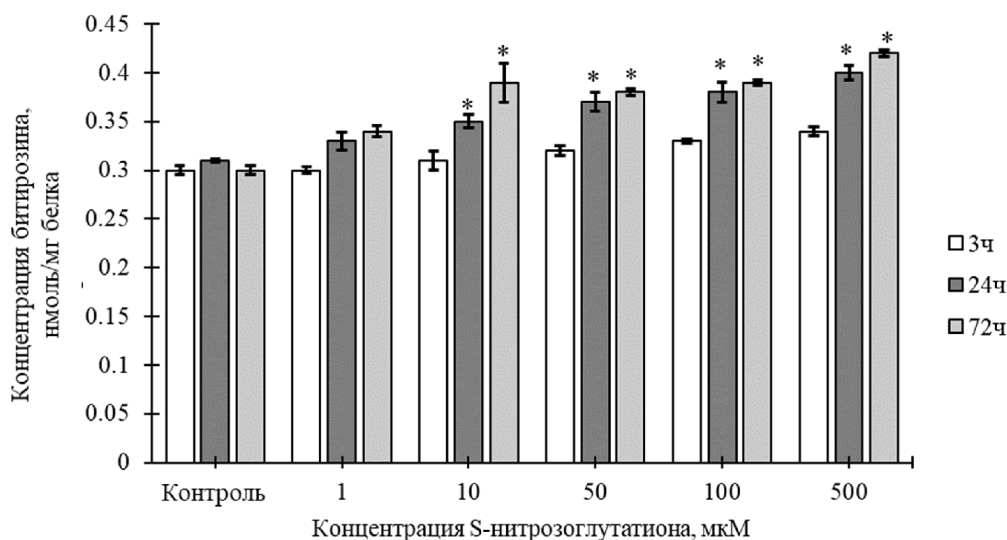


Рисунок 2. Концентрация битирозина при индукции нитрозативного стресса S-нитрозоглутатионом в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3 ч, 24 ч и 72 ч. Уровень битирозина определяли в лизате клеток Сасо-2 по его флуоресценции в фосфатном буфере ($M \pm SD$, $n=3$). * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

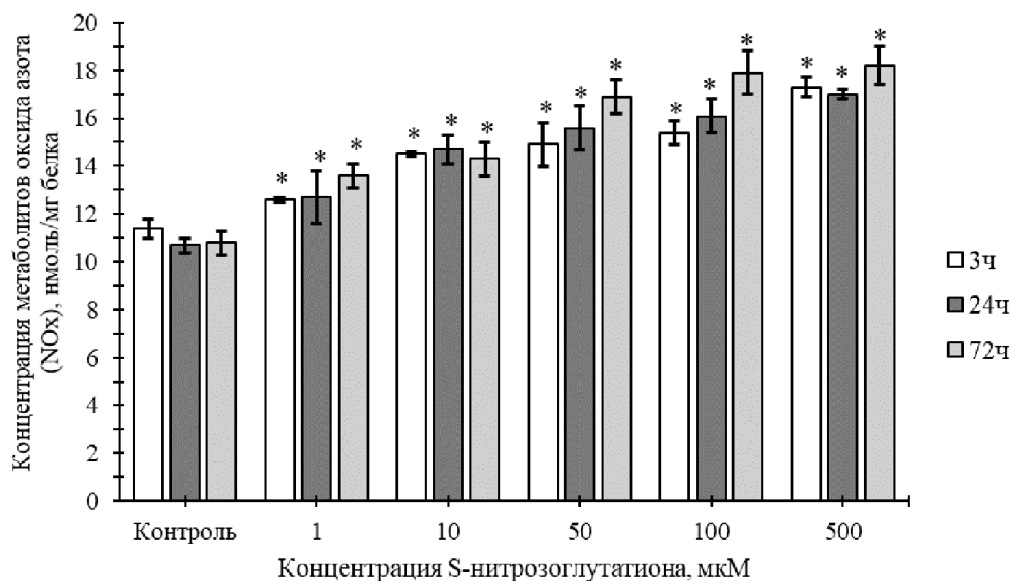


Рисунок 3. Концентрация метаболитов оксида азота (суммарная концентрация нитритов и нитратов NO_x) при индукции НС под действием 1-500 мкМ GSNO в течение 3 ч, 24 ч и 72 ч. Уровень NO_x определяли фотометрическим методом в лизате клеток Сасо-2 ($M \pm SD$, $n=3$). * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ PXR В УСЛОВИЯХ НИТРОЗАТИВНОГО СТРЕССА

Классический индуктор PXR — рифампицин в концентрации 10 мкМ и длительностью воздействия 24 ч вызывал увеличение количества PXR на 64,6% ($p=0,0003$) по сравнению с контролем (рис. 4). Это подтверждает адекватность метода оценки регуляции данного транскрипционного фактора и согласуется с данными литературы [21].

Инкубирование клеток линии Сасо-2 с 1 мкМ, 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ и 500 мкМ GSNO в течение 3 ч приводило к снижению количества PXR по сравнению с показателями контроля на 30,4% ($p=0,005$), 45,5% ($p=0,002$), 57,0% ($p=0,0002$), 12,5% ($p=0,03$) и 32,2% ($p=0,0003$)

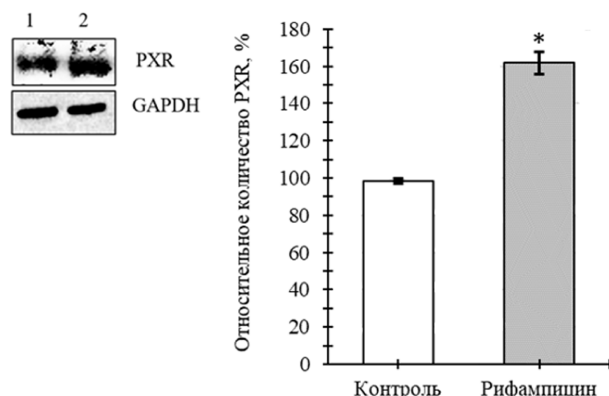


Рисунок 4. Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 при воздействии 10 мкМ рифампицина в течение 24 ч. Относительное количество PXR определяли методом вестерн-блот. 1 — контроль; 2 — рифампицин; * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

соответственно (рис. 5). Можно предположить, что данный эффект реализуется через биохимический каскад Nf-κB, который активируются NO [22] и снижает экспрессию гена PXR [23]. Кроме этого, оксид азота может напрямую нитрозировать PXR (его молекула содержит 4,8% остатков цистеина).

Увеличение длительности экспозиции до 24 ч сопровождалось повышением количества PXR при концентрации GSNO 1 мкМ на 154,9% ($p=0,0002$), 10 мкМ — на 110,3% ($p=0,01$), 50 мкМ — на 32,8% ($p=0,001$) (рис. 5). При концентрации GSNO 100 мкМ уровень PXR достоверно не отличался от показателей контроля, а в концентрации 500 мкМ был его ниже на 14,0% ($p=0,004$), что коррелировало со снижением жизнеспособности клеток.

Можно предположить, что индукция PXR связана с влиянием продуктов НС (битирозина) на данный транскрипционный фактор.

Продление инкубации до 72 ч приводило к нормализации уровня PXR при концентрации GSNO 1 мкМ и к его снижению в концентрациях 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ и 500 мкМ на 18,6% ($p=0,01$), 16,7% ($p=0,04$), 16,6% ($p=0,05$) и 34,5% ($p=0,001$) соответственно (рис. 5).

Для подтверждения высказанного предположения об индуцирующем действии битирозина на уровень PXR, была выполнена отдельная серия экспериментов.

Воздействие битирозина в концентрациях 1 мМ и 1,5 мМ приводило к снижению жизнеспособности клеток линии Сасо-2 до $58,7 \pm 5,4\%$ ($p=0,0002$), $25,4 \pm 1,9\%$ ($p=0,0002$)

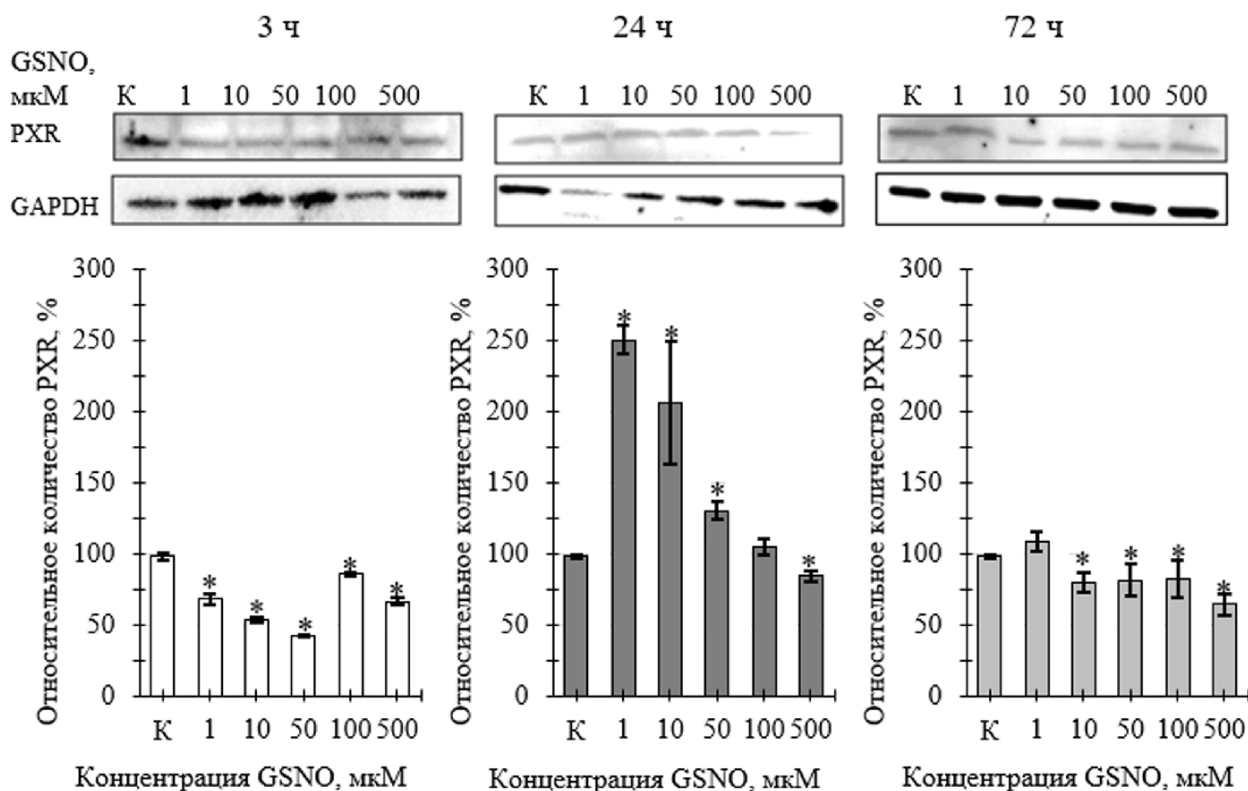


Рисунок 5. Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 при индукции НС 1-500 мкМ GSNO в течение 3 ч, 24 ч и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$). * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем; К — контроль; GSNO — S-нитрозоглутатион.

соответственно. При концентрациях битирозина 0,2 мМ и 0,4 мМ жизнеспособность статистически значимо не снижалась и составила $108,1 \pm 9,1\%$ и $102,9 \pm 3,4\%$ соответственно (рис. 6).

При внесении в питательную среду битирозина в концентрации 0,2 мМ его содержание в клетке не отличалось от контрольных значений, при 0,4 мМ было выше контроля на 30,1% ($p=0,02$), при 1 мМ — на 65,5% ($p=0,0002$), при 1,5 мМ — на 93,1% ($p=0,003$) (рис. 7).

При воздействии битирозина в концентрации 0,4 мМ количество PXR возрастало на 64,1% ($p=0,0002$), в концентрации 1 мМ — на 34,5% ($p=0,0007$), а при концентрациях 0,2 мМ и 1,5 мМ не изменялось (рис. 8).

Таким образом, в настоящем исследовании впервые показано, что индукция PXR при действии GSNO может быть связана с влиянием продуктов HC (битирозина).

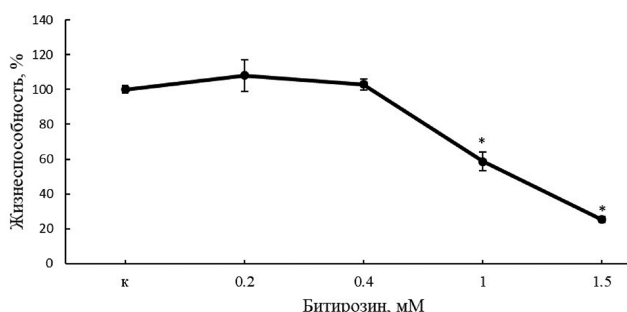


Рисунок 6. Изменение жизнеспособности клеток линии Сасо-2 в зависимости от концентрации битирозина при воздействии в течение 24 ч ($M \pm SD$). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем; К — контроль.

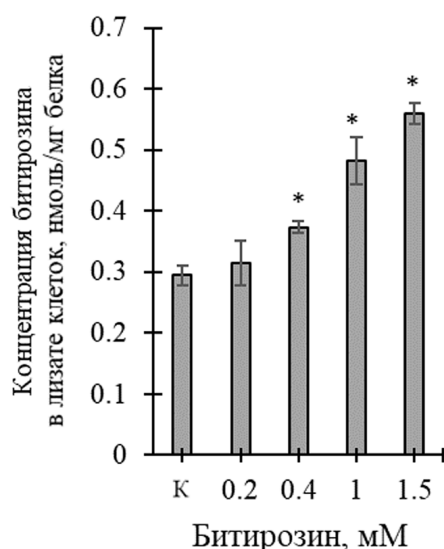


Рисунок 7. Концентрация битирозина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии битирозина в концентрации 0,2 мМ, 0,4 мМ, 1 мМ и 1,5 мМ и сроке воздействия 24 ч на монослой клеток. Уровень битирозина определяли по его флуоресценции в фосфатном буфере ($M \pm SD$, $n=3$). * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

С другой стороны, наблюдаемые эффекты, по-видимому, обусловлены метаболитами NO, образующимися при распаде GSNO, об этом свидетельствует увеличение концентрации нитритов и нитратов. В биологических системах GSNO легко конвертируется в динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), в том числе связанные с SH-группами белков [24, 25]. По аналогии с цинковыми сайтами, ДНКЖ могут модулировать активность SH-групп: блокировать их при низком уровне окислителей и электрофилов и сенсibilизировать их при высоком. Вместе с тем, ДНКЖ способны выступать в качестве антиоксидантов, а также транспортировать и передавать NO на молекулярные мишени [24, 25]. Возможно, что вышеупомянутые свойства ДНКЖ могут играть важную роль в предполагаемом механизме активации PXR.

Изменение количества PXR при развитии HC может играть двоякую роль. С одной стороны, PXR может способствовать генерации АФК/АФА и усилению HC, за счёт индукции изоферментов цитохрома P450 (CYP2B1/2B2, CYP3A1/3A2 и CYP2C6) и интенсификации метаболизма ксенобиотиков [26]. С другой — PXR может иметь и приспособительное значение, так как данный транскрипционный фактор стимулирует экспрессию антиоксидантного фермента глутатион-S-трансферазы [27].

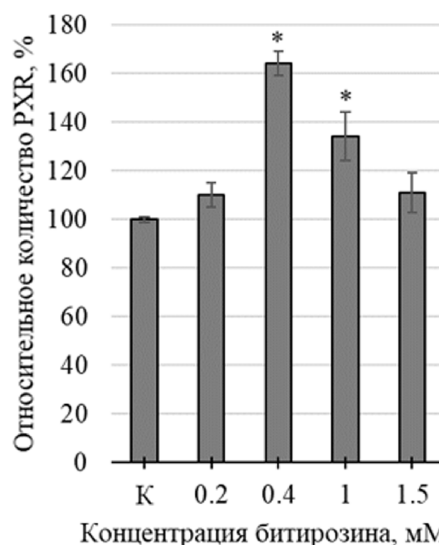
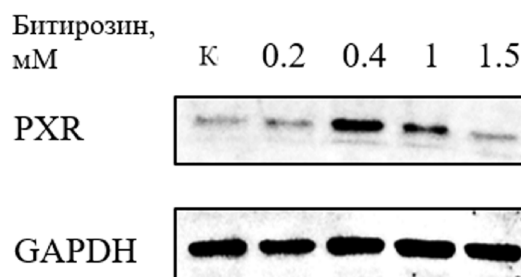


Рисунок 8. Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 при воздействии битирозина в концентрациях 0,2 мМ, 0,4 мМ, 1 и 1,5 мМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$). * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем; К — контроль.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Инкубирование клеток линии Caco-2 с GSNO во всех концентрациях в течение 3 ч приводит к снижению количества PXR. Увеличение длительности инкубации клеток с 1-50 мкМ GSNO до 24 ч сопровождается повышением количества PXR; в концентрации GSNO 100 мкМ данный показатель достоверно не отличается от контроля, а при концентрации GSNO 500 мкМ становится ниже него. Продление инкубации до 72 ч усиливает HC и приводит к нормализации (1 мкМ GSNO) или снижению (10-500 мкМ GSNO) уровня PXR. Индукция PXR под действием GSNO может быть опосредована влиянием продукта HC битирозина, который в концентрациях 0,4 мМ и 1 мМ увеличивал количество PXR.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских учёных — кандидатов наук МК-1856.2020.7.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yan J., Xie W. (2016) *Acta Pharm. Sin.*, **6**, 450-452.
2. Daujat-Chavanieu M., Gerbal-Chaloin S. (2020) *Cells*, **9**, 2395. DOI: 10.3390/cells9112395
3. Okamura M., Shizu R., Abe T., Kodama S., Hosaka T., Sasaki T., Yoshinari K. (2020) *Cells*, **9**(10), 2296. DOI: 10.3390/cells9102296
4. Zhang M., Zhang Z., Xie X., Yao Q., Liu J., Lai B., Xiao L., Wang N. (2019) *J. Cell Physiol.*, **234**(4), 4342-4351.
5. Oladimeji P.O., Chen T. (2018) *Mol. Pharmacol.*, **93**(2), 119-127.
6. Rajendran P., Nandakumar N., Rengarajan T., Palaniswami R., Gnanadhas E.N., Lakshminarasiah U., Gopas J., Nishigaki I. (2014) *Clinica Chimica Acta*, **436**, 332-347.
7. Zhang Y., Tocchetti C.G., Krieg T., Moens A.L. (2012) *Free Radic. Biol. Med.*, **53**(8), 1531-1540.
8. Xu D.-X., Wei W., Sun M.-F., Wu C.-Y., Wang J.-P., Wei L.-Z., Zhou C.-F. (2004) *Free. Radic. Biol. Med.*, **37**, 10-22.
9. Tang H., Xu M., Shi F., Ye G., Lv C., Luo J., Zhao L., Li Y. (2018) *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 2140. DOI: 10.3390/ijms19072140
10. Yamasaki Y., Kobayashi K., Inaba A., Uehara D., Tojima H., Kakizaki S., Chiba K. (2018) *Xenobiotica*, **48**(11), 1098-1105.
11. Broniowska K.A., Diers A.R., Hogg N. (2013) *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – General Subjects*, **1830**(5), 3173-3181.
12. Tolosa L., Donato M.T., Gómez-Lechón M.J. (2015) *Methods Mol. Biol.*, **1250**, 333-348.
13. Amado R., Aeschbach R., Neukom H. (1984) *Methods Enzymol.*, **107**, 377-388.
14. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. (2005) Клиническая лабораторная диагностика, **6**, 15-18. [Metel'skaya V.A., Gumanova N.G. (2005) *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*, **6**, 15-18.]
15. Bradford M.M. (1976) *Anal. Biochem.*, **7**(72), 248-254.
16. Oleson B.J., Corbett J.A. (2018) *Antioxid. Redox Signal.*, **29**(14), 1432-1445.
17. Bredt D.S., Snyder S.H. (1994) *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 175-195.
18. Ramachandran N., Root P., Jiang X.-M., Hogg P.J., Mutus B. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**(17), 9539-9544.
19. Boer T.R., Palomino R.I., Mascharak P.K. (2019) *Med One*, **4**, e190003. DOI: 10.20900/mo.20190003
20. Ferrer-Sueta G., Campolo N., Trujillo M., Bartesaghi S., Carballal S., Romero N., Alvarez B., Radi R. (2018) *Chem. Rev.*, **118**(3), 1338-1408.
21. Lemmen J., Tozakidis I.E.P., Galla H. (2013) *Brain Res.*, **1491**, 1-13.
22. Rogers J.A., Fuseler J.W. (2007) *Nitric Oxide*, **16**(3), 379-391.
23. Okamura M., Shizu R., Hosaka T., Sasaki T., Yoshinari K. (2019) *Drug Metab. Pharmacokinet.*, **34**(4), 272-279.
24. Vanin A.F. (2009) *Nitric Oxide Biol. Chem.*, **21**, 1-13.
25. Шумаев К.Б., Космачевская О.В., Грачев Д.И., Тимошин А.А., Топунов А.Ф., Ланкин В.З., Рууге Э.К. (2021) Биомедицинская химия, **67**(2), 162-168. [Shumaev K.B., Kosmachevskaya O.V., Grachev D.I., Timoshin A.A., Topunov A.F., Lankin V.Z., Ruuge E.K. (2021) *Biomeditsinskaya Khimiya*, **67**(2), 162-168. DOI: 10.18097/PBMC20216702162]
26. Kakehashi A., Hagiwara A., Imai N., Nagano K., Nishimaki F., Banton M., Wei M., Fukushima S., Wanibuchi H. (2013) *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **273**, 390-400.
27. Aleksunes L.M., Klaassen C.D. (2012) *Drug Metab Dispos.*, **740**(7), 1366-1379.

Поступила в редакцию: 18. 07. 2021.
После доработки: 28. 09. 2021.
Принята к печати: 12. 10. 2021.

FUNCTIONING OF PREGNAN X RECEPTOR UNDER CONDITIONS OF NITROSATIVE STRESS

Y.V. Abalenikhina, E.A. Sudakova, A.A. Seidkulieva, A.V. Shchulkin, E.N. Yakusheva*

Ryazan State Medical University,
9 Vyssokovolttnaya str., Ryazan, 390026 Russia; *e-mail: abalenihina88@mail.ru

Pregnan X receptor (PXR) is a nuclear receptor that plays an important role in the regulation of the expression of biotransformation and metabolic enzymes. The functioning and possible mechanisms of PXR regulation under conditions of nitrosative stress have not been studied, which served as the purpose of this study. The work was performed on Caco-2 cells. Nitrosative stress (NS) was modeled using S-nitrosoglutathione (GSNO) at concentrations of 1 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M, and 500 μ M and incubation during of 3 h, 24 h, and 72 h. The amount of PXR was assessed by Western blotting. Incubation of Caco-2 cells with all concentrations GSNO for 3 h led to a decrease in the amount of PXR. Incubation with GSNO (1-50 μ M) for 24 h was accompanied by an increase in the amount of PXR, while at a concentration of 100 μ M this indicator did not significantly differ from the control, at a concentration of 500 μ M it was lower. Prolonged incubation (72 h) enhanced NS and led to a normalization (1 μ M GSNO) or a decrease of the PXR level (10-500 μ M GSNO). The induction of PXR by GSNO was mediated by the effect of the nitrosative stress product bityrosine on the transcription factor. It was shown that bityrosine at concentrations of 0,4 mM and 1 mM increased the amount of PXR.

Key words: pregnan X receptor; nitrosative stress; nitrosoglutathione; Caco-2 cell line

Funding. This work was supported by the Grant from the President of the Russian Federation for Support of Young Scientists (project no. MK_1856.2020.7).

Received: 18.07.2021, revised: 28.09.2021, accepted: 12.10.2021.