

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ

©Коллектив авторов

РЕГУЛЯЦИЯ КОНСТИТУТИВНОГО АНДРОСТАНОВОГО РЕЦЕПТОРА В КЛЕТКАХ ЛИНИИ CACO-2 ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА *IN VITRO*

Ю.В. Абаленихина*, А.В. Щулькин, А.А. Сеидкулиева, С.К. Правкин, Е.Н. Якушева

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

Конститутивный андростановый рецептор (CAR) — ядерный рецептор, который участвует в регуляции биотрансформации токсических веществ и метаболических процессов. Механизмы изменения количества CAR в условиях окислительного стресса (ОС) на данный момент не изучены, что и послужило целью исследования. ОС моделировали, инкубируя клетки линии Caco-2 с H₂O₂ 10 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ в течение 72 ч. Количество CAR определяли методом вестерн-блот, ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) — гетерогенным иммуноферментным анализом, концентрацию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) — фотометрическим методом. Инкубирование клеток с H₂O₂ в концентрациях 10 мкМ и 50 мкМ приводило к увеличению количества CAR и Nrf2, а при 100 мкМ — к их снижению. При ингибировании Nrf2 динамика содержания CAR в условиях ОС не изменялась. МДА в концентрации 10 мкМ повышал, в концентрации 100 мкМ не влиял, в концентрации 150 мкМ снижал количество CAR.

Ключевые слова: конститутивный андростановый рецептор (CAR); ядерный фактор эритроидного происхождения 2 (Nrf2); малоновый диальдегид; окислительный стресс; клетки линии Caco-2

DOI: 10.18097/PBMC20226804297

ВВЕДЕНИЕ

Конститутивный андростановый рецептор (CAR) относится к подсемейству NR1I (nuclear receptor subfamily 1, group I) суперсемейства ядерных рецепторов [1]. CAR экспрессируется преимущественно в печени и почках, также показана низкая базальная экспрессия гена, кодирующего этот рецептор, в тканях мозга, сердца и кишечника [2, 3]. До недавнего времени CAR рассматривали только в качестве ксеносенсора, однако позже была выявлена его роль в регуляции углеводного, липидного и энергетического обменов [4].

Механизмы регуляции CAR активно изучаются в настоящее время. Известно, что уровень CAR зависит от экспрессии гена, кодирующего данный рецептор, его посттрансляционной модификации (фосфорилирование, убиквитинирование), белок-белковых взаимодействий [5].

Ранее в наших исследованиях было показано, что развитие окислительного стресса (ОС) приводит к увеличению количества CAR [6], однако механизм данного процесса не был установлен. Цель работы — изучить механизм регуляции CAR в условиях моделирования ОС *in vitro*.

МЕТОДИКА

Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, Санкт-Петербург, Россия).

Культивирование клеток

Клетки культивировали в течение 21 суток при 37°C и 5% CO₂ в инкубаторе WS-189C (“World Science”, Ю. Корея) в Дульбекко

модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) (“Sigma-Aldrich”, Германия), с добавлением L-глутамин (4 мМ) (“Sigma-Aldrich”), 15% эмбриональной бычьей сыворотки (“Sigma-Aldrich”), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (“Sigma-Aldrich”) соответственно.

В ходе исследования изучали:

1) влияние ОС на количество CAR (n=3). ОС моделировали добавлением в культуральную среду H₂O₂ (“Sigma-Aldrich”) в конечных концентрациях 10 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ и инкубацией в течение 72 ч. Смену питательной среды проводили каждые 24 ч;

2) влияние малонового диальдегида (МДА, продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ)) на количество CAR (n=3). МДА (“Sigma Aldrich”) добавляли к клеткам линии Caco-2 в концентрациях 10 мкМ, 100 мкМ и 150 мкМ и инкубировали в течение 72 ч (n=3 для каждой концентрации);

3) роль Nrf2 в регуляции CAR (n=3). Для оценки роли Nrf2 в регуляции CAR клетки инкубировали с H₂O₂ в тестируемых концентрациях совместно с ингибитором Nrf2 N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин (AEM1, “Sigma Aldrich”) в концентрации 5 мкМ [7]. Ингибитор добавляли в питательную среду за 30 мин до внесения H₂O₂.

Контролем (n=3) служили клетки, которые инкубировали с питательной средой без добавления тестируемых веществ.

Цитотоксический тест (МТТ-тест)

Клетки засевали в 96-луночный планшет из расчёта 10⁴ клеток на каждую лунку и культивировали

в течение 21 суток, затем добавляли питательную среду с H_2O_2 , МДА или H_2O_2 в сочетании с АЕМ1. После окончания инкубации проводили МТТ-тест [8]. Светопоглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 ("Awareness Technology", США).

Жизнеспособность клеток Сасо-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 засеивали в 6-луночные планшеты из расчёта 10^5 клеток на каждую лунку, затем добавляли питательную среду с H_2O_2 , МДА или H_2O_2 в сочетании с АЕМ1 в соответствующие планшеты. После окончания экспозиции с тестируемыми веществами клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, "Sigma-Aldrich").

Клетки в количестве 1×10^6 промывали изотоническим раствором хлорида натрия ("Медпро", Россия) и лизировали в 150 мкл ледяного буфера (50 мМ, pH 7,4 Трис-НСl, 150 мМ КСl, 0,5% тритон X-100, смесь ингибиторов протеиназ (аминоэтилбензенсульфонил флуорида гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ, апротинин 0,3 мкМ, бестатин 130 мкМ, ЭДТА 1 мМ, эпоксисукциниллейцингуанидинобутиламид (E-64) 14 мкМ, лейпептин 1 мкМ, "Sigma-Aldrich"), встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g (СМ-50, "Eppendorf", Германия). Цитоплазматическую (экстрадерную) фракцию переносили в отдельные пробирки и использовали для определения концентрации МДА.

Клетки в количестве 1×10^6 трёхкратно промывали фосфатным буфером pH 7,4 ("ПанЭко", Россия) и выделяли ядерную фракцию коммерческим набором Protein extraction kit (cytoplasmic/nuclear) ("BioRad", США) для определения количества Nrf2.

Определение количества Nrf2

Определение количества транскрипционного фактора Nrf2 в ядре клеток линии Сасо-2 проводили методом гетерогенного иммуноферментного анализа с использованием коммерческого набора (Human Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 ELISA kit, "Blue gene", Китай). Светопоглощение измеряли при 450 нм.

Определение концентрации продуктов перекисного окисления липидов

В лизате клеток с помощью коммерческого набора определяли концентрацию МДА ("Агат", Россия). Метод определения основан на способности МДА образовывать с тиобарбитуровой кислотой окрашенный комплекс, экстрагируемый бутанолом [9].

Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, "Thermo Fisher Scientific", США).

Определение количества CAR в клетках линии Сасо-2 проводили методом вестерн-блот. После окончания экспозиции клетки снимали с лунок в 6-луночных планшетах раствором трипсин-ЭДТА ("Sigma-Aldrich"), трижды промывали раствором фосфатного буфера ("BioRad") и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo ("Thermo Fisher Scientific") с добавлением смеси ингибиторов протеиназ ("Sigma-Aldrich") в течение 30 мин при 4°C и постоянном перемешивании из расчёта 10^7 клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 22440 g в течение 10 мин (AvantiJXN-3, "Beckman Coulter", США) и использовали для определения относительного количества CAR методом вестерн-блот [6]. В работе использовали первичные мышинные моноклональные антитела (MB67 CAR Monoclonal Antibody, "Invitrogen", США) в разведении 1:200. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, "Invitrogen") в разведении 1:4000.

Статистический анализ

Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8. Результаты представлены в виде среднее значение \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью теста Даннетта. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При воздействии H_2O_2 в концентрациях 50 мкМ и 100 мкМ жизнеспособность клеток снижалась до $58,8 \pm 11,5\%$ ($p = 0,02$) и $34,3 \pm 11,1\%$ ($p = 0,002$) соответственно, а в концентрации 10 мкМ не изменялась и составила $79,8 \pm 13,3\%$ ($p > 0,05$) относительно контроля, принятого за 100%.

H_2O_2 в концентрации 10 мкМ достоверно не влиял на уровень продуктов ПОЛ, а в концентрации 50 мкМ и 100 мкМ повышал данный показатель на 194,9% ($p = 0,0002$) и на 323,1% ($p = 0,00016$) соответственно по сравнению с контролем.

Следовательно, концентрацию H_2O_2 10 мкМ, при которой не происходит изменение жизнеспособности клеток и концентрации продуктов ПОЛ, можно рассматривать как физиологическую, имеющую регуляторное значение, а 50 мкМ и 100 мкМ — как токсические, снижающие жизнеспособность клеток.

В условиях ОС активируется редокс-зависимый транскрипционный фактор Nrf2, который может запускать ряд других биохимических каскадов. При инкубации с H_2O_2 в течение 72 ч и концентрациях 10 мкМ и 50 мкМ количество Nrf2 в ядре возрастало

на 47,7% ($p=0,03$) и 25,8% ($p=0,05$) соответственно, а при 100 мкМ снижалось на 85,1% ($p=0,001$) относительно значений контроля.

При этом отмечалось значимое повышение относительного количества CAR по сравнению с контрольными значениями: при концентрациях H_2O_2 10 мкМ и 50 мкМ на 47,4% ($p=0,0003$) и 34,9% ($p=0,002$) соответственно, а в концентрации 100 мкМ — его снижение на 22,9% ($p=0,02$) (рис. 1).

Таким образом, можно предположить, что индукция CAR взаимосвязана с содержанием МДА и количеством Nrf2 в клетке, но остаётся не ясным, какой из указанных факторов вносит первостепенный вклад в регуляцию изучаемого рецептора. Для ответа на данный вопрос были проведены следующие эксперименты: оценка влияния МДА на клетки линии Сасо-2 и ингибирования Nrf2 в условиях ОС.

В результате экспериментов было показано, что при воздействии МДА на клетки линии Сасо-2 их жизнеспособность снижалась при концентрациях

продукта ПОЛ 100 мкМ и 150 мкМ до $80,8 \pm 4,2\%$ ($p=0,001$) и $69,7 \pm 1,3\%$ ($p<0,0001$) соответственно, а при концентрации 10 мкМ статистически значимо не отличалась от значений контроля.

При внесении в питательную среду ингибитора Nrf2 (АЕМ1, 5 мкМ) за 30 мин до инкубации с H_2O_2 в концентрациях 10 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ жизнеспособность клеток снижалась до $57,4 \pm 2,2\%$, $47,8 \pm 5,5\%$, $42,3 \pm 9,8\%$ ($p<0,0001$ для всех серий эксперимента) относительно значений контроля.

При культивировании клеток линии Сасо-2 в питательной среде с добавлением МДА в концентрации 10 мкМ наблюдалось повышение уровня CAR на 14,3% ($p=0,019$), а при 150 мкМ — его снижение на 15,3% ($p=0,0009$) относительно контрольных значений (рис. 2). При внеклеточной концентрации МДА 100 мкМ относительное количество CAR не изменялось, однако отмечалось протеазное расщепление рецептора (детектировалось 2 полосы) (рис. 2).

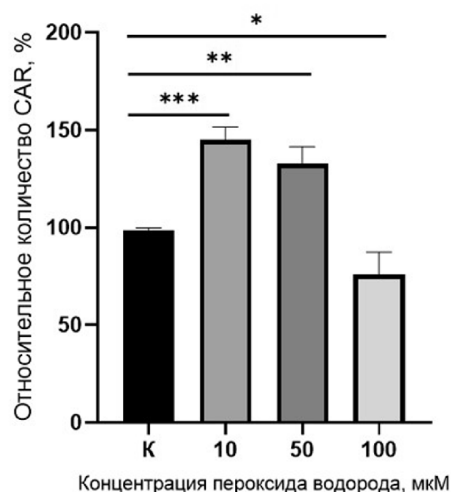
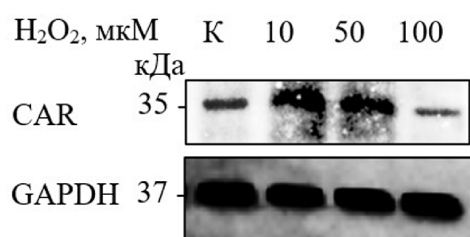


Рисунок 1. Относительное количество CAR в клетках линии Сасо-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 10 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$). К — контроль; * — $p<0,05$; ** — $p<0,01$; *** — $p<0,001$ по сравнению с контролем (тест Даннетта).

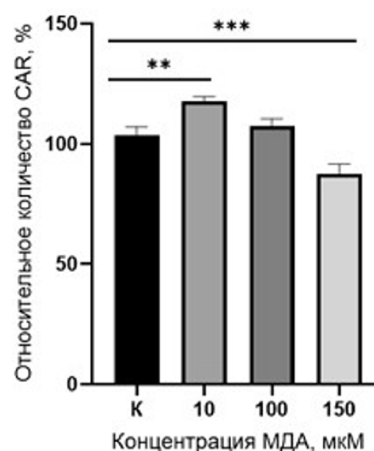
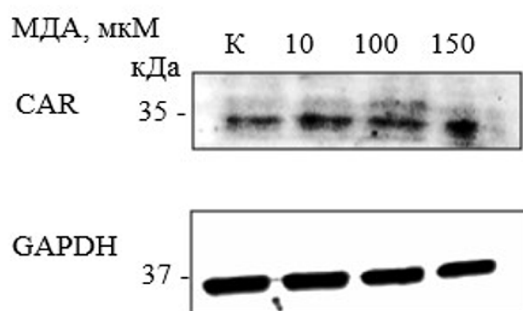


Рисунок 2. Относительное количество CAR в клетках линии Сасо-2 при воздействии МДА в концентрациях 10 мкМ, 100 мкМ и 150 мкМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$). К — контроль; ** — $p<0,05$; *** — $p<0,001$ по сравнению с контролем (тест Даннетта).

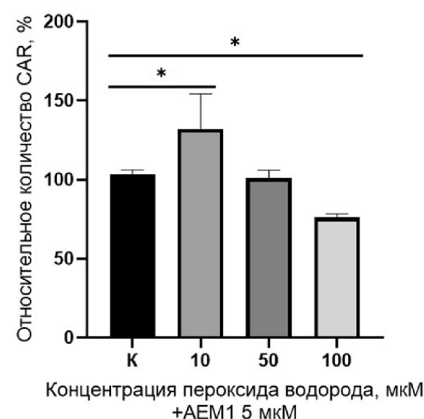
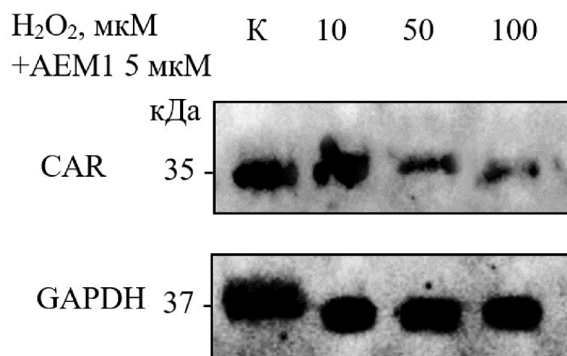


Рисунок 3. Относительное количество CAR в клетках линии Сасо-2 при воздействии пероксида водорода в присутствии ингибитора ядерного фактора эритроидного происхождения 2 – АЕМ1 при инкубации в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$). К – контроль; * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем (тест Даннетта).

Относительное количество CAR при сочетанном воздействии АЕМ1 и H_2O_2 в концентрации 10 мкМ возрастало на 27,9% ($p=0,036$), при 50 мкМ не изменялось ($p>0,05$), при 100 мкМ снижалось на 26,4% ($p=0,048$) по сравнению с контролем (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что уровень CAR в условиях ОС связан с уровнем внутриклеточного МДА. Транскрипционный фактор Nrf2 в условиях ОС играет защитную роль за счёт активации синтеза антиоксидантных ферментов [10]. На основе полученных данных можно предположить, что Nrf2 напрямую не влияет на индукцию CAR, однако оказывает опосредованное действие — при снижении его количества усугубляется ОС, увеличивается уровень МДА и вследствие этого повышается количество CAR.

CAR — это ксеносенсор, который обладает широкой субстратной специфичностью. Его активация может быть лиганд-зависимой при взаимодействии с эндогенными и экзогенными лигандами и лиганд-независимой за счёт ковалентной модификации белка и/или взаимодействия с коактиваторами [1]. В настоящем исследовании показано, что в условиях ОС происходит увеличение уровня CAR, которое, возможно, опосредуется МДА-зависимой индукцией. Вероятно, что в условиях ОС CAR выполняет защитную функцию, так как данный транскрипционный фактор стимулирует экспрессию антиоксидантного фермента глутатион-S-трансферазы [11]. Однако при усугублении ОС, увеличении концентрации МДА происходит снижение относительного количества CAR, что может быть связано с окислительным повреждением его белковой молекулы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На клетках линии Сасо-2 показано, что H_2O_2 в концентрациях 10 мкМ и 50 мкМ вызывает развитие ОС, сопровождающееся увеличением уровней CAR и Nrf2, а в концентрации 100 мкМ приводит к их снижению. Nrf2 не участвует в регуляции CAR.

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 заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Качайло Е.М., Пустыльяк Е.М., Ляхович В.В., Гуляева Л.Ф. (2011) Конститутивный андростановый рецептор (CAR): ксеносенсор и терапевтическая мишень. Биохимия, **76**(10), 1335-1345. [Kachaylo E.M., Pustyl'nyak V.O., Lyakhovich V.V., Gulyaeva L.F. (2011) Constitutive androstane receptor (CAR) is a xenosensor and target for therapy. Biochemistry (Moscow), **76**(10), 1087-1097.] DOI: 10.1134/S0006297911000026
2. Timsit Y.E., Negishi M. (2007) CAR and PXR: The xenobiotic-sensing receptors. Steroids, **72**, 231-246. DOI: 10.1016/j.steroids.2006.12.006
3. Nishimura M., Naito S., Yokoi T. (2004) Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. Drug Metab. Pharmacokinet., **19**(2), 135-149. DOI: 10.2133/dmpk.19.135
4. Inouye Y. (2016) Structure and function of the nuclear receptor constitutive androstane receptor. Yakugaku Zasshi, **136**(2), 297-308. DOI: 10.1248/yakushi.15-00215
5. Timsit Y.E., Negishi M. (2014) Coordinated regulation of nuclear receptor CAR by CCRP/DNAJC7, HSP70 and the ubiquitin-proteasome system. PLoS One, **9**(5), e96092. DOI: 10.1371/journal.pone.0096092

6. Шулькин А.В., Абаленихина Ю.В., Сеидкулиева А.А., Рябков А.Н., Якушева Е.Н. (2021) Индукция конститутивного андростанового рецептора при развитии окислительного стресса. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, **171**(5), 588-591. [Shchul'kin A.V., Abalenikhina Yu.V., Seidkuliyeva A.A., Ryabkov A.N., Yakusheva E.N. (2021) Induction of constitutive androstane receptor during the development of oxidative stress. Bull. Exp. Biol. Med., **171**(5), 615-618.] DOI: 10.1007/s10517-021-05280-7
7. Bollong M.J., Yun H., Sherwood L., Woods A.K., Lairson L.L., Schultz P.G. (2015) A small molecule inhibits deregulated NRF2 transcriptional activity in cancer. ACS Chemical Biology, **10**, 2193-2198. DOI: 10.1021/acscchembio.5b00448
8. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Мжаванадзе Н.Д., Короткова Н.В., Никифоров А.А., Суров И.Ю., Иванова П.Ю., Боженова А.Д., Стрельникова Е.А. (2020) Сравнение цитотоксичности синтетических сосудистых протезов *in vitro*. Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова, **28**(2), 183-192. [Kalinin R.E., Suchkov I.A., Mzhavanadze N.D., Korotkova N.V., Nikiforov A.A., Surov I.Yu., Ivanova P.Yu., Bozhonova A.D., Strelnikova E.A. (2020) Comparison of cytotoxicity of vascular prostheses *in vitro*. I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald, **28**(2), 183-192.] DOI: 10.23888/PAVLOVJ2020282183-192
9. Uchiyama M., Mihara M. (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Analyt. Biochem., **86**(1), 271-278. DOI: 10.1016/0003-2697(78)90342-1
10. Yu J., Zhao Yu., Li B., Sun L., Huo H. (2012) 17 β -Estradiol regulates the expression of antioxidant enzymes in myocardial cells by increasing Nrf2 translocation. J. Biochem. Molecular. Toxicology, **26**(7), 264-269. DOI: 10.1002/jbt.21417
11. Dai G., Chou N., He L., Gyamfi M.A., Mendy A.J., Slitt A.L., Klaassen C.D., Wan Y.J. (2005) Retinoid X receptor alpha regulates the expression of glutathione s-transferase genes and modulates acetaminophen-glutathione conjugation in mouse liver. Mol. Pharmacol., **68**(6), 1590-1596. DOI: 10.1124/mol.105.013680

Поступила в редакцию: 01. 04. 2022.
После доработки: 05. 07. 2022.
Принята к печати: 06. 07. 2022.

MECHANISM OF REGULATION OF THE CONSTITUTIVE ANDROSTANE RECEPTOR UNDER CONDITIONS OF MODELING OXIDATIVE STRESS *IN VITRO*

Yu.V. Abalenikhina*, A.V. Shchulkin, A.A. Seidkuliyeva, S.K. Pravkin, E.N. Yakusheva

¹Ryazan State Medical University,
9 Vyssokovoltynaya str., Ryazan, 390026 Russia; *e-mail: abalenikhina88@mail.ru

The constitutive androstane receptor (CAR) is a nuclear receptor that participates in the regulation of biotransformation of toxic substances and metabolic processes. The mechanisms of expression changes of CAR under conditions of oxidative stress (OS) have not been studied yet and this was the purpose of the study. OS was modeled by incubating Caco2 cells with hydrogen peroxide 10-100 μ M for 72 h. The amount of CAR was determined by the Western blot, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) was evaluated by a heterogeneous enzyme immunoassay malondialdehyde (MDA), the lipid peroxidation products (LPP) was assayed by a photometric method. Incubation of cells with 10 μ M and 50 μ M H₂O₂ led to an increase in the amount of CAR and Nrf2, while incubation with 100 μ M H₂O₂ caused their decrease. Nrf2 inhibition did not influence the CAR content under OS conditions. 10 μ M MDA increased the CAR content, 100 μ M MDA had no effect, while 150 μ M reduced the amount of CAR.

Key words: constitutive androstane receptor (CAR); nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2); malondialdehyde; oxidative stress; cells of the Caco2 line

Funding. This work was supported by the Grant from the President of the Russian Federation for Support of Young Scientists (project no. MK1856.2020.7).

Received: 01.04.2022; revised: 05.07.2022; accepted: 06.07.2022.