

АГОНИСТ КОНСТИТУТИВНОГО АНДРОСТАНОВОГО РЕЦЕПТОРА ИНИЦИИРУЕТ МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ, НЕОБХОДИМУЮ ДЛЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ ГЕПАТОЦИТОВ

© 2023 М.Э. Мазин^{1,2}, А.М. Перевалова¹, А.А. Ярушкин², Ю.А. Пустыльняк¹,
А.Д. Рогачев¹, Е.А. Прокопьева^{1,2}, Л.Ф. Гуляева^{1,2}, В.О. Пустыльняк^{1,2*}

¹ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет,
630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: pustylnyak@post.nsu.ru

² Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины,
630117 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 10.04.2023

После доработки 22.05.2023

Принята к публикации 24.05.2023

Активация конститутивного андростанового рецептора (CAR, NR1H3) химическими соединениями вызывает гиперплазию печени у грызунов. Чаще всего для изучения химически индуцированной гиперплазии печени и пролиферации гепатоцитов *in vivo* используется 1,4-бис[2-(3,5-дихлорпиридилокси)] бензол (ТСРОВОР), агонист мышинового CAR. ТСРОВОР является мощным химическим митогеном, который вызывает гиперплазию печени мышей. В последние годы накоплено много данных о транскрипционных изменениях, характеризующих ТСРОВОР-индуцированную пролиферацию гепатоцитов. Однако данных о метаболических потребностях гепатоцитов, делящихся при воздействии ксенобиотика, немного. В настоящем исследовании мы использовали технологию высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии в сочетании со статистическим анализом для описания изменения профиля метаболитов малых биомолекул, чтобы выявить ключевые метаболические изменения в печени самцов мышей после введения ТСРОВОР. Анализ метаболитов в печени мышей позволил обнаружить биохимические процессы, активация которых осуществляется при воздействии химического митогена ТСРОВОР. Так, сравнение метаболомных профилей показало, что воздействие ТСРОВОР приводит к изменению биохимических процессов, которые имеют отношение к метаболизму нуклеотидов, аминокислот и энергетических субстратов. Наши результаты позволяют сделать вывод о том, что агонист CAR инициирует внутриклеточную программу, которая способствует глобальной скоординированной метаболической активности, необходимой для пролиферации гепатоцитов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: конститутивный андростановый рецептор, ТСРОВОР, печень, гепатоцит, метаболомика.

DOI: 10.31857/S032097252308002X, EDN: IHUBDC

ВВЕДЕНИЕ

Конститутивный андростановый рецептор (CAR, NR1H3) является членом суперсемейства ядерных рецепторов. Первоначально CAR был охарактеризован как ксеносенсор, который в ответ на воздействие ксенобиотиков индуцирует их метаболизм и элиминацию [1]. Маркерными генами-мишенями для CAR являются гены, кодирующие цитохром P450 подсемейства 2B (*CYP2B*). Впоследствии было показано, что CAR обладает гораздо более

широким набором функций в гепатоцитах [2]. Так, например, активация CAR значительно усиливает пролиферацию гепатоцитов с последующей гиперплазией печени мышей [3]. Более того, показано, что активация CAR химическими соединениями вызывает не только гиперплазию печени у грызунов, но и может значительно улучшить регенерацию печени грызунов после экстремальных резекций (более 80% паренхимы), тем самым предотвращая возникновение печеночной недостаточности из-за дефицита ткани органа [4].

Принятые сокращения: CAR – конститутивный андростановый рецептор; *CYP2B* – ген, кодирующий цитохром P450 подсемейства 2B; ТСРОВОР – 1,4-бис[2-(3,5-дихлорпиридилокси)] бензол.

* Адресат для корреспонденции.

Поэтому расширение научных данных, описывающих молекулярные и биохимические процессы, сопряженные с активацией пролиферации гепатоцитов при участии CAR, может позволить сделать выводы о возможности клинического использования агонистов этого рецептора для профилактики печеночной недостаточности при резекции или трансплантации органа.

Большинство исследований *in vivo*, посвященных CAR-опосредованной пролиферации гепатоцитов, были выполнены с использованием 1,4-бис[2-(3,5-дихлорпиридилокси)] бензола (ТСРОВОР), агониста мышинного CAR. ТСРОВОР является мощным химическим митогеном у мышей, который вызывает быструю гиперплазию печени [3]. В последние годы накоплено много данных о транскрипционных изменениях, характеризующих ТСРОВОР-индуцированную пролиферацию гепатоцитов [5, 6]. Однако данных о метаболических изменениях, происходящих в гепатоцитах, делящихся при воздействии ксенобиотиков, немного. Печень является одним из наиболее метаболически активных органов в организме и играет важную роль в регулировании различных метаболических процессов. Метаболическое ремоделирование клеток необходимо для клеточного деления, и гепатоциты оснащены гибким метаболическим механизмом, способным быстро адаптироваться к изменениям во время пролиферации [7]. Ранее уже было показано, что воздействие ТСРОВОР модулирует метаболизм глюкозы и липидов в печени грызунов [6]. Однако глобальные эффекты воздействия ТСРОВОР на профиль низкомолекулярных метаболитов в печени охарактеризованы не были.

Определение путей метаболической адаптации, которые сопряжены с пролиферацией гепатоцитов после воздействия агониста CAR, является основной целью настоящего исследования. Технология высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и масс-спектрометрии (МС) использовалась для определения профиля малых биомолекул (сахаров, аминокислот и нуклеотидов) для выявления ключевых метаболических изменений в печени мышей в ответ на введение химического митогена ТСРОВОР.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные, использованные в исследовании. Самцы мышей (C57BL, масса 25–30 г) были предоставлены Научно-исследовательским институтом нейронаук и медицины (Новоси-

бирск, Россия). Животные прошли пятидневный период акклиматизации со свободным доступом к пище и воде. Животным однократно внутрибрюшинно вводили ТСРОВОР (3 мг/кг массы тела), растворенный в пищевом рафинированном подсолнечном масле. Контрольные животные получали равный объем (100 мкл) подсолнечного масла. Мышей декапитировали через 72 ч после введения ТСРОВОР ($n = 12$) или подсолнечного масла ($n = 12$). При заборе органов осуществляли взвешивание печени, и с учетом массы животного вычисляли индекс ее относительной массы («масса печени/масса тела»). Значение индекса относительной массы печени одного из контрольных животных принималось за 1.

Гистологическое исследование тканей печени. Образцы печени фиксировали в 10%-ном растворе нейтрального формалина, затем обезжизивали по стандартной методике [8] и заливали в парафин. Парафиновые срезы (4–5 мкм) получали с помощью ротационного микротомы НМ 340Е («CarlZeiss», Германия). Срезы, полученные из ткани печени мышей, окрашивали гематоксилином и эозином (H&E). Исследование гистологических препаратов проводили на микроскопе Axio-ImagerA1 («CarlZeiss»), используя программное обеспечение AxioVision (rel. 4.12) («CarlZeiss»).

Определение маркера пролиферации. Маркер пролиферации Ki67 в образцах печени определяли с использованием иммуногистохимического метода и кроличьего поликлонального антитела против Ki67 («Abcam», Великобритания). Парафиновые срезы толщиной 3–4 мкм подвергали депарафинизации и регидратации по стандартной методике [9]. Срезы прогревали на водяной бане в 10 мМ цитратном буфере (pH 6,0) в течение 20 мин для демаскировки антигенов. Затем, после однократной промывки в дистиллированной воде и 10 мМ фосфатно-солевом буфере (pH 7,4), блокировали эндогенную пероксидазу в течение 5 мин в 3%-ной охлажденной перекиси водорода. Время экспозиции с первичными антителами против Ki67 составляло 60 мин при комнатной температуре. Затем срезы инкубировали со стрептавидин-пероксидазным комплексом, в качестве субстрата применяли диаминобензидин. Дополнительно ядра окрашивали гематоксилином.

Выделение РНК, синтез кДНК и ПЦР в режиме реального времени. Выделение суммарной РНК, обратную транскрипцию РНК и ПЦР в режиме реального времени для определения уровней мРНК проводили согласно ранее опубликованному протоколу [10]. Выделение

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использующихся при ПЦР в режиме реального времени для исследования относительного уровня мРНК

Ген	Прямой праймер (5'→3')	Обратный праймер (5'→3')
<i>Cyp2b10</i>	CCCAGTGTTCACGAGACTT	GGTGCCGACAAAGAAGAGAG
<i>Cyclind1</i>	TGAAGGAGACCATTCCCTTG	CCACTTGAGCTTGTTACCA
<i>cMyc</i>	ACGAGCACAAGCTCACCTCT	TCCAGCTCCTCCTCGAGTTA
<i>E2f1</i>	TCTGTACCACACAGCTGCAA	GCACAGGAAAACATCAATGG
<i>Foxm1</i>	TCCAAGGCAAAGACAGGAGA	GCTCCTCAACCTTAACCCGA
<i>Mrpl46</i>	GGGAGCAGGCATTCTCTACAG	GGTCCGGTCATTTTTTTTGTCA

суммарной РНК из образцов печени мышей проводили с использованием реагента TRIzol («Invitrogen», США), согласно рекомендациям производителя. Обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора RT-M-MuLV-RN kit («Биолабмикс», Россия) в соответствии с протоколом производителя. Для определения уровня экспрессии исследуемых генов проводили ПЦР в режиме реального времени с использованием BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (2×) («Биолабмикс») на амплификаторе CFX96™ («Bio-Rad Laboratories», США). Для ПЦР использовали специфические олигонуклеотиды (табл. 1). Подбор специфичных праймеров осуществляли с использованием онлайн-сервиса Primer-BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?GROUP_TARGET=on). Оптимальная концентрация всех пар праймеров в реакционной смеси составила 300 нМ. ПЦР проводили в следующих условиях: предварительный прогрев при 95 °С – 3 мин; после этого следовали 40 основных циклов: денатурация при 95 °С – 15 с, отжиг при 59 °С – 20 с, элонгация при 72 °С – 20 с, сбор данных по флуоресценции при 80 °С – 10 с. Для контроля специфичности ПЦР использовали кривые плавления. Уровни экспрессии мРНК рассчитывали на основе эффективности ПЦР и St. Нормирование проводили по гену *Mrpl46*. Уровень экспрессии гена в печени одного из контрольных животных принимался за 1.

Подготовка проб для метаболомного исследования. Все образцы печени обрабатывали одновременно в соответствии с протоколом, описанным ранее Yuan et al. [11]. Образцы печени (20–30 мг) гомогенизировали в 500 мкл 80%-ного (v/v) охлажденного метанола для ВЭЖХ и инкубировали в течение ночи при –80 °С для осаждения белка. Затем образцы центрифугировали при 4 °С и 17 000 g в течение

10 мин. Супернатант переносили в новую полипропиленовую пробирку и сушили в центрифуге-концентраторе SpeedVac («Thermo Fisher Scientific», США). Полученный остаток разводили в 100 мкл реконституционного раствора вода/метанол (80/20) и подвергали метаболомному анализу с использованием ВЭЖХ-МС/МС.

Анализ ВЭЖХ-МС/МС. Хроматографическое разделение и анализ метаболитов проводили по ранее опубликованному протоколу [12]. Пробы анализировали на хроматографе Shimadzu LC-20AD Prominence («Shimadzu Corporation», Япония), оснащенном автодозатором SIL-20AC («Shimadzu Corporation»). Хроматографическое разделение проводили на колонке Prontosil 120-5-Amino (2,1 × 75 мм) («Эконова», Россия). Сбор данных проводили на масс-спектрометре API 6500 QTRAP («AB SCIEX», США) с использованием программного обеспечения Analyst 1.6.2 («AB SCIEX»). Масс-спектрометрическую детекцию проводили в режиме MRM в положительной и отрицательной ионизации. Полученные хроматограммы обрабатывались в программе MultiQuant™ 2.1 Software («AB SCIEX») с экспортированием данных в таблицы Microsoft Excel. Последующий мультивариантный анализ и анализ биохимических путей проводились с использованием онлайн-сервиса MetaboAnalyst (<http://www.metaboanalyst.ca>). Анализ биохимических путей был проведен на основе данных о метаболитах, нанесенных на карту в соответствии с идентификаторами Киотской энциклопедии генов и геномов (KEGG).

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ проводился с использованием *t*-критерия Стьюдента. Расчеты производились с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 5.0 («GraphPad Software Inc.», США). Значение *p* < 0,05 считалось статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В первую очередь была подтверждена ТСРОВОР-опосредованная активация CAR в печени мышей путем изучения экспрессии гена *Cyp2b10*, ключевого биомаркера для измерения активации CAR. Как и ожидалось, экспрессия гена *Cyp2b10* в печени мышей увеличилась после воздействия ТСРОВОР (рис. 1, а).

Далее были проведены эксперименты по оценке гиперплазии печени при воздействии химического митогена. Увеличение экспрессии гена *Cyp2b10* после воздействия ТСРОВОР сопровождалось достоверным увеличением индекса относительной массы печени, который определяли как масса печени по отношению к массе тела животного (рис. 1, б). Гистологический анализ печени мышей и иммуноокрашивание срезов печени с использованием антител против Ki67 показали, что воздействие ТСРОВОР усиливало митотические процессы в гепатоцитах (рис. 1, в). Так, на срезах, полученных от ТСРОВОР-индуцированных мышей, наблюдались фигуры митоза, особенно среди гепатоцитов, расположенных в центре пече-

ночной дольки вокруг собирательных вен. Образцы из контрольной группы животных были без явных Ki67-положительных ядер, тогда как в образцах, полученных от ТСРОВОР-индуцированных мышей, выявлялось до 40% Ki67-положительных ядер гепатоцитов от общего числа гепатоцитов в 5 случайно выбранных полях. Кроме того, воздействие ТСРОВОР достоверно увеличивало экспрессию генов, кодирующих регуляторы клеточного цикла, *Cyclind1*, *cMyc*, *E2f1* и *Foxm1*, в печени мышей по сравнению с контрольными животными (рис. 1, г).

С помощью ВЭЖХ-МС/МС анализа образцов печени были изучены различия в метаболомном профиле контрольных и ТСРОВОР-индуцированных мышей. Мультивариантный анализ полученных результатов методом анализа главных компонент (РСА) продемонстрировал наличие различий в метаболомном профиле печени, вызванных воздействием ТСРОВОР. Проведенный анализ не показал перекрытия контрольной группы и группы, получавшей ТСРОВОР, что указывает на четкую кластеризацию двух групп образцов печени (рис. 2, а).

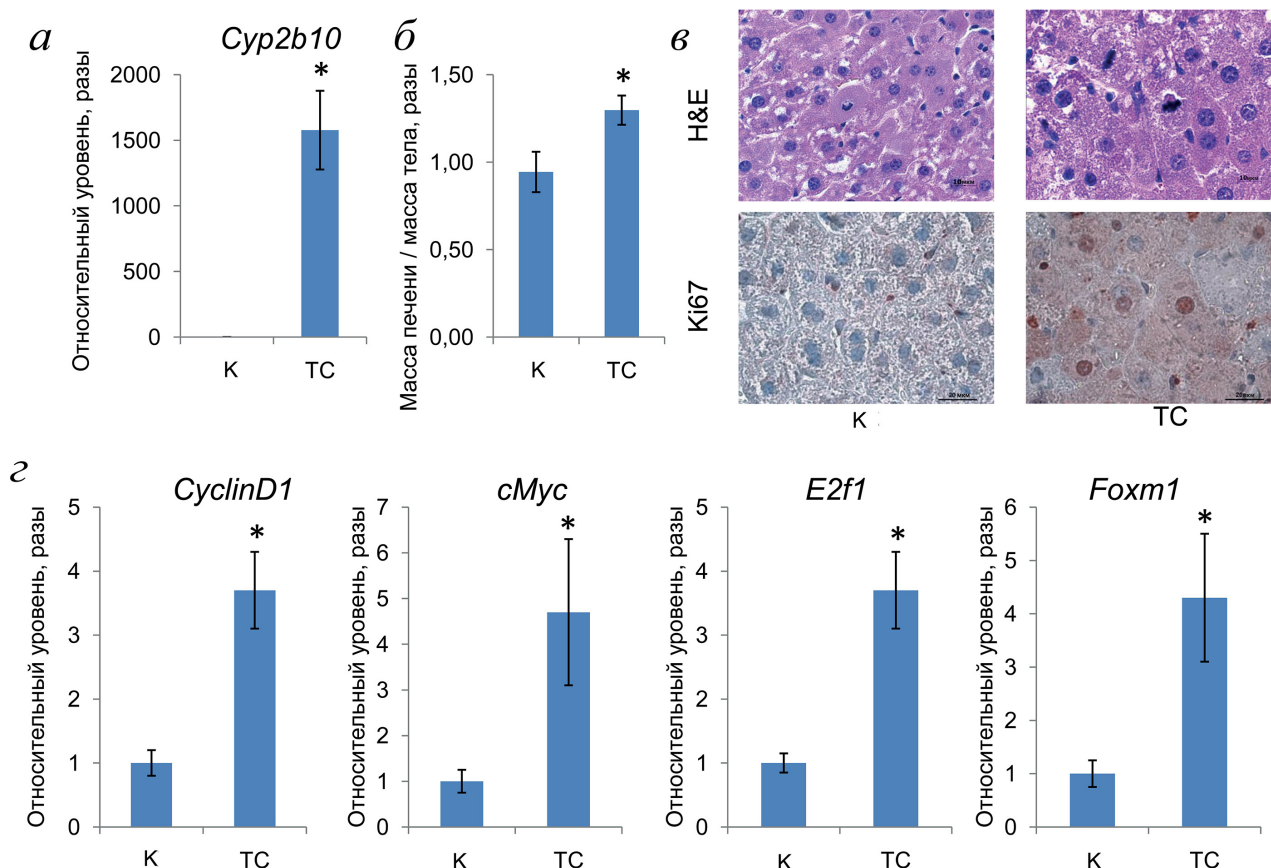


Рис. 1. Влияние ТСРОВОР на мишень CAR — ген *Cyp2b10* (а), размер печени (б), гистопатологию и иммуноокрашивание Ki67 (в) и гены, кодирующие регуляторы клеточного цикла (г). * Достоверное отличие от контрольных животных ($p < 0,05$). Мышей обрабатывали 1,4-бис [2-(3,5-дихлорпиридилокси)] бензолом (ТС) или только подсолнечным маслом (К)

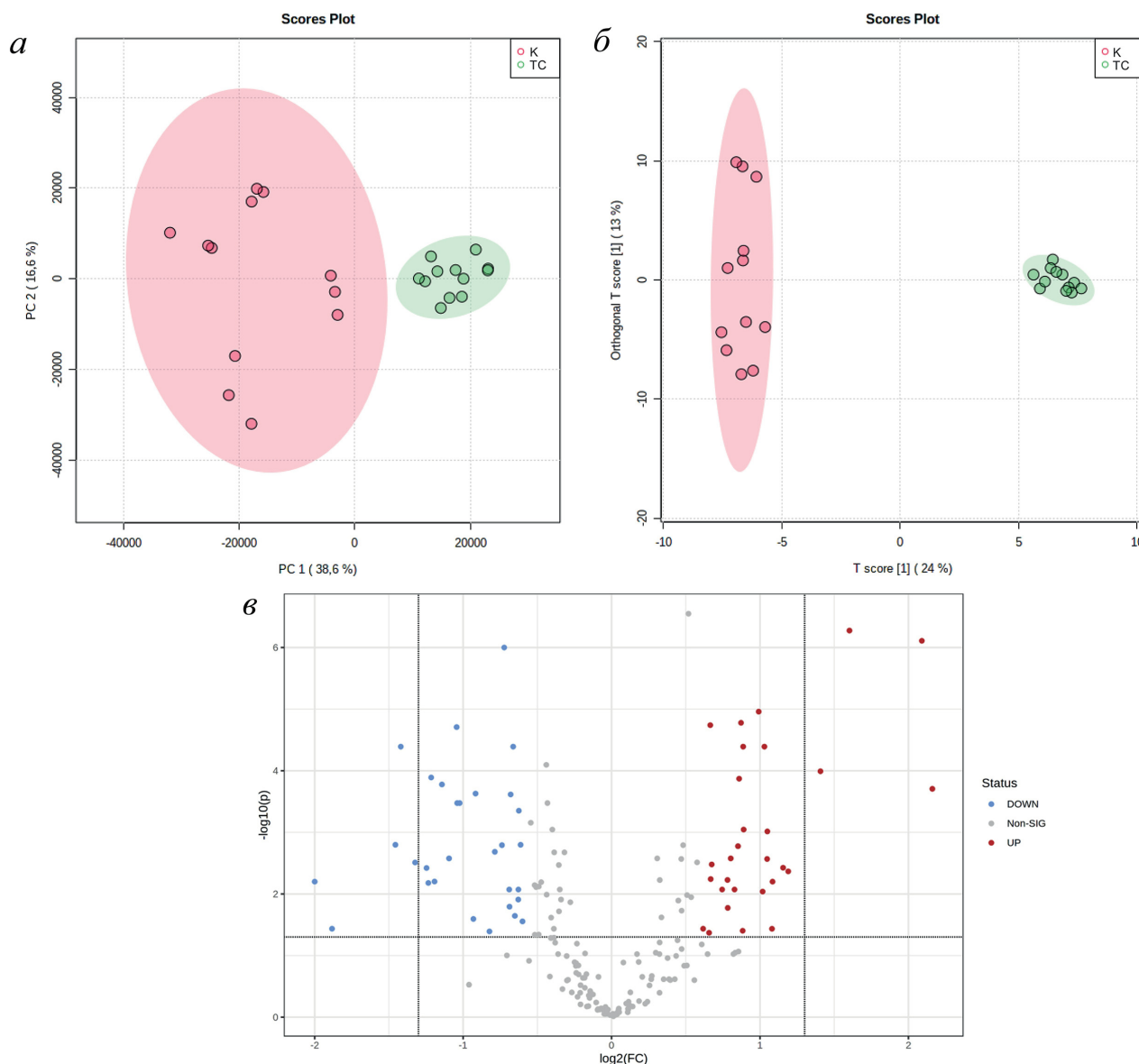


Рис. 2. Изменение метаболомного профиля в печени мышей после воздействия ТСРОВОП (ТС) по сравнению с контрольными животными (К). *а* – Мультивариантный анализ методом анализа главных компонент; *б* – ортогональный дискриминантный анализ методом наименьших квадратов образцов печени на основе всех метаболитов. Каждый символ представляет один образец одной мыши. Образцы одной группы показаны одним цветом. Цветное поле представляет 95%-ный доверительный интервал группы с кружками одного цвета. *в* – Вулканическая диаграмма показывает метаболиты, уровень которых достоверно изменяется при воздействии ТСРОВОП. Метаболиты, уровень которых достоверно снижается, обозначены синим. Метаболиты, уровень которых достоверно повышен, обозначены красным

Дополнительно был проведен ортогональный дискриминантный анализ методом наименьших квадратов (OPLS-DA). Данный анализ позволил лучше выделить метаболические различия между двумя группами образцов печени мышей (рис. 2, *б*). Данные результаты свидетельствуют о том, что контрольные мыши и мыши, получавшие ТСРОВОП, имеют разные метаболомные профили печени. Сравнение уровней метаболитов между группами животных показало, что воздействие ТСРОВОП приводит к достоверному изменению уровней 58 метаболитов в печени мышей, из которых у

30 метаболитов уровень снижался, а у 28 – повышался (рис. 2, *в*; табл. 2).

В заключении был проведен анализ биохимических путей, на которые повлиял агонист мышечного CAR. Результаты анализа продемонстрировали перепрограммирование метаболической сети после воздействия ТСРОВОП. Как показано на рис. 3, ТСРОВОП-индуцированная пролиферация гепатоцитов сопровождается изменениями в метаболизме нуклеотидов (как пиримидиновых, так и пуриновых), метаболизме аминокислот (тирозина, глицина, серина и треонина, глутамина и глутамата,

Таблица 2. Метаболиты, уровень которых достоверно изменяется в печени мышей после воздействия ТСРОВОР

ТСРОВОР-опосредованное снижение уровня		ТСРОВОР-опосредованное увеличение уровня	
метаболит	количество раз	метаболит	количество раз
ксантиловая кислота	0,25000	2-аминооктановая кислота	1,5766
гиппуровая кислота	0,27108	никотинамид мононуклеотид	1,5854
глицерофосфохолин	0,36442	1-метилгистидин	1,5886
акадезин	0,37370	N-ацетилорнитин	1,5961
бетаин	0,39950	гуанозинмонофосфат	1,6758
лактоза	0,42146	пантотеновая кислота	1,7183
аргининосукцинат	0,42503	изобутирилглицин	1,7203
цитруллин	0,43072	дезоксипинозин	1,7443
3-метилгистидин	0,43746	уридин-5'-дифосфат	1,7756
аскорбиновая кислота	0,45287	3-фосфоглицериновая кислота	1,8045
ксантозин	0,46816	пировиноградная кислота	1,8142
гипоксантин	0,48508	2-изопропилмалат	1,8303
инозин	0,48643	уреидосукцинат	1,8442
1-метилникотинамид	0,49199	цитидин	1,8486
оротидиловая кислота	0,52455	триптофанол	1,8527
аденозин	0,52988	глутамат	1,9878
3-гидроксиантраниловая кислота	0,56541	D-глицеральдегид-3-фосфат	2,0244
ксантин	0,57976	фосфоенолпируват	2,0415
гипотаурин	0,59937	5-аминоимидазол-4-карбоксамид рибонуклеотид	2,0675
L-серин	0,60573	дезоксипинодинмонофосфат (dUMP)	2,0697
N-ацетил-L-аланин	0,62012	спермидин	2,1151
дофамин	0,62094	L-кинуридин	2,1205
метанефрин	0,62424	уреидопропионат	2,2277
имидазолуксусная кислота	0,63156	аллантииновая кислота	2,2815
5'-метилтиаденозин	0,63666	глутатиондисульфид	2,6520
фосфорилхолин	0,64681	глюконовая кислота	3,0366
2-арахидоноилглицерин	0,64719	дезокситимидинмонофосфат (dTMP)	4,2578
гуанин	0,64855	D-седогептулозо-7-фосфат	4,4718
O-ацетилсерин	0,65384		
цистин	0,65976		

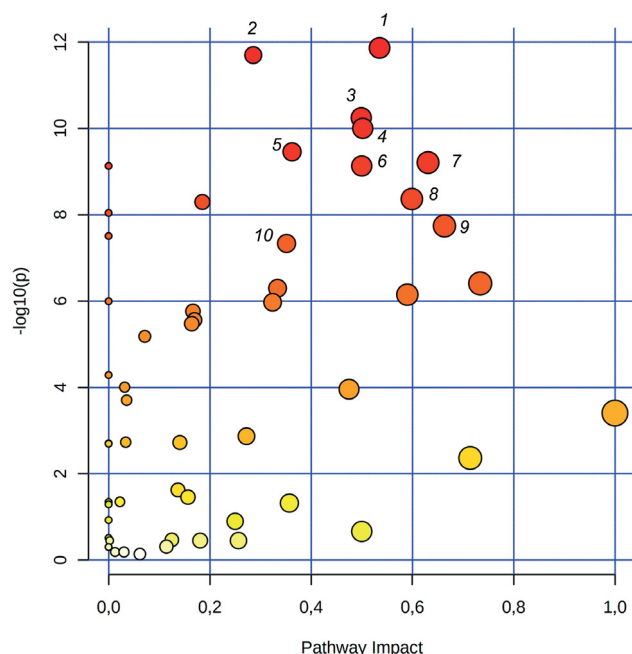


Рис. 3. Метаболические пути, активность которых изменяется после воздействия ТСРОВОР в печени мышей. Размер (диаметр круга) и цвет (оттенок) каждого круга основан на значимости воздействия ТСРОВОР на метаболический путь. Анализ путей проводился с использованием онлайн-сервиса MetaboAnalyst. 1 – Пиримидиновый обмен; 2 – метаболизм тирозина; 3 – пуриновый обмен; 4 – метаболизм глицина, серина и треонина; 5 – метаболизм пирувата; 6 – метаболизм D-глутамина и D-глутамата; 7 – метаболизм аргинина и пролина; 8 – биосинтез аргинина; 9 – метаболизм цистеина и метионина; 10 – пентозофосфатный путь

аргинина и пролина, цистеина и метионина) и биосинтезу аргинина. Кроме того, показано, что пути метаболизма энергетических субстратов (метаболизм пентозофосфата) участвуют в метаболической адаптации печени мышей при воздействии ТСРОВОР.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Хорошо известно, что ТСРОВОР-опосредованная активация CAR вызывает гиперплазию печени мышей [3]. CAR-опосредованная гиперплазия печени связана с изменением экспрессии большого набора генов, кодирующих регуляторы пролиферации гепатоцитов [13]. В настоящем исследовании доза и схема введения ТСРОВОР полностью соответствовали ранее опубликованным данным, в которых впервые было показано, что ТСРОВОР-опосредованная активация CAR приводит к гиперплазии печени мышей [3]. Наши результаты подтвердили, что активация CAR при воздействии ТСРОВОР сопровождается увеличением экспрессии генов-регуляторов кле-

точного цикла (*Cyclind1*, *cMyc*, *E2f1* и *Foxm1*), что коррелировало с увеличением массы печени животных. Известно, что некоторые регуляторы клеточного цикла, такие как Cyclin D1 и E2F1, принимают участие в регуляции экспрессии генов, кодирующих метаболические ферменты, и тем самым контролируют метаболизм [14]. Эти ферменты участвуют в разнообразных биохимических путях синтеза метаболических предшественников для роста клеток.

Пролиферация гепатоцитов требует увеличения внутриклеточной биомассы [7]. Соответственно, производство белков, липидов и нуклеиновых кислот необходимо для успешного деления гепатоцитов. Более того, производство биомассы гепатоцитов должно быть скоординировано с событиями клеточного цикла, чтобы получить две здоровые дочерние клетки. Таким образом, характеристика принципов, лежащих в основе этих путей, может дать важную информацию для понимания роста и пролиферации гепатоцитов. В настоящем исследовании был проведен комплексный метаболомный анализ с использованием ВЭЖХ-МС/МС, который позволил выявить 58 метаболитов, уровень которых изменяется при ТСРОВОР-индуцированной гиперплазии печени у мышей. Анализ путей этих дифференциально затронутых метаболитов в печени мышей продемонстрировал значительное, опосредованное ТСРОВОР, обогащение ряда биохимических процессов. Так, в работе было продемонстрировано, что большинство изменений под действием химического митогена метаболитов вовлечены в пути биосинтеза и метаболизма нуклеотидов и аминокислот. В совокупности эти данные указывают на метаболические предпочтения, лежащие в основе высокой способности к пролиферации гепатоцитов после введения ТСРОВОР.

Глюкоза является основным субстратом для пролиферирующих клеток, обеспечивая клетки как АТФ в качестве источника энергии, так и мономерными блоками для макромолекулярного синтеза [15]. В связи с этим гликолиз считают биохимической платформой, поддерживающей пролиферацию клеток [16]. В настоящем исследовании обнаружено, что ТСРОВОР-индуцированная пролиферация гепатоцитов сопровождается увеличением содержания метаболитов, которые образуются за счет гликолитического разрушения глюкозы, таких как глицеральдегид-3-фосфат, фосфоенолпируват и пировиноградная кислота. Это может свидетельствовать об активации гликолиза при ТСРОВОР-индуцированной пролиферации гепатоцитов мышей.

Накопление гликолитических промежуточных соединений может приводить к их перераспределению в другие биохимические пути, ответвляющиеся от гликолиза. Одним из таких путей является пентозофосфатный путь (PPP), который играет важную роль в биосинтезе нуклеотидов. PPP использует промежуточные продукты гликолиза в реакциях, производящих рибозо-5-фосфат для синтеза нуклеиновых кислот и NADPH для анаболизма [17]. Наши данные показали, что воздействие ТСРОВОР на печень мышей значительно увеличивало уровень седогептулозо-7-фосфата, который связывает гликолиз, пентозофосфатный путь и биосинтез нуклеотидов [18]. Более того, наши результаты показали, что при воздействии ТСРОВОР происходит изменение уровней метаболитов, связанных с метаболизмом пиримидинов (UDP, dUMP, dTMP и цитидин) и пуринов (ксантозин, ксантин, гипоксантин, инозин, GMP и IMP). Эти метаболиты связаны с биосинтезом нуклеотидов. По-видимому, ТСРОВОР-индуцированные пути метаболизма, связанные с синтезом пиримидина и пурина, поддерживают пролиферацию гепатоцитов за счет предоставления нуклеотидов, которые являются необходимыми предшественниками для биосинтеза РНК и ДНК. Ранее было показано, что высокая регенеративная способность органов сочетается с высоким уровнем метаболизма пиримидинов, а пиримидиновые нуклеозиды могут способствовать регенерации различных тканей *in vivo* [19].

Наше исследование показало, что после воздействия ТСРОВОР также наблюдаются изменения в биосинтезе и метаболизме ряда аминокислот в печени мышей. Так, в печени мышей, получавших ТСРОВОР, наблюдалось увеличение метаболитов, участвующих в биосинтезе аргинина. Аргинин является предшественником не только для синтеза белков, но и полиаминов. В этом исследовании воздействие ТСРОВОР повышало уровень двух полиаминов, путресцина и спермидина, в печени мышей. И путресцин, и спермидин являются хорошо известными прорегенеративными метаболитами [20], способными усиливать регенерацию печени после частичной гепатэктомии [21–23].

Аминокислоты также могут выступать в качестве субстратов для разнообразных биохимических путей. Результаты, полученные в этом исследовании, показали снижение гликогенных аминокислот, таких как серин, аланин, метионин и тирозин, при воздействии химического митогена ТСРОВОР. Гликогенные ами-

нокислоты служат субстратами для энергетического метаболизма. По-видимому, наблюдаемое снижение уровня серина, аланина, метионина и тирозина связано с тем, что гликогенные аминокислоты выступают субстратами для биосинтеза углеводов и нуклеотидов.

Метионин также является основным источником метильных групп, превращаясь в универсальный донор метильных групп S-аденозилметионин (SAM). SAM обеспечивает метильную группу для метилирования ДНК и гистонов. После переноса метильной группы SAM превращается в S-аденозилгомоцистеин (SAH). Наши результаты показали опосредованное ТСРОВОР снижение в печени мышей уровня метионина, а также увеличение уровня SAH. Этот факт может указывать на то, что ТСРОВОР может вызывать метилирование ДНК и гистонов, что может способствовать регуляции транскрипции. Предыдущие исследования показали, что активация CAR связана с эпигенетическими изменениями, такими как метилирование ДНК и гистонов, что нарушает регуляцию экспрессии генов в печени [24, 25].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее с использованием технологии RNA-seq установлено, что активация CAR под действием ТСРОВОР вызывает изменение экспрессии более чем 2000 генов в печени мышей [26]. В настоящей работе показано, что при воздействии ТСРОВОР наблюдается скоординированный контроль метаболизма и пролиферации гепатоцитов. По всей видимости, активация CAR инициирует внутриклеточную программу, которая способствует глобальной скоординированной метаболической активности, необходимой для пролиферации гепатоцитов. Эти данные могут свидетельствовать о том, что CAR-опосредованные сигнальные каскады образуют сеть сигнальных цепей, ведущих к сложной регуляции пролиферации гепатоцитов не только на транскриптомном, но и на метаболомном уровне. Требуются дальнейшие углубленные исследования для выявления более нисходящих селективных метаболических путей, которые участвуют в метаболическом гомеостазе во время пролиферации гепатоцитов после ТСРОВОР-опосредованной активации CAR. Тем не менее наши метаболомные данные могут дать новое представление о биологических механизмах, которые происходят во время ТСРОВОР-индуцированной пролиферации гепатоцитов у мышей.

Вклад авторов. В.О. Пустыльняк, Л.Ф. Гуляева — концепция и руководство работой; М.Э. Мазин, А.М. Перевалова, А.А. Ярушкин, Ю.А. Пустыльняк, А.Д. Рогачев, Е.А. Прокопьева — проведение экспериментов и статистическая обработка результатов; М.Э. Мазин, А.А. Ярушкин, В.О. Пустыльняк, Л.Ф. Гуляева — обсуждение результатов исследования; М.Э. Мазин — написание текста; В.О. Пустыльняк — редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-15-00021).

Благодарности. Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием

Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Содержание животных и все эксперименты с животными проводились в соответствии с позицией по этике использования животных в исследованиях, выполняемых при поддержке Российского научного фонда, а также в соответствии с Директивой 2010/63/ЕС Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. и одобрены Комиссией по биоэтике Федерального исследовательского центра фундаментальной и трансляционной медицины (протокол № 23-17).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yan, J., and Xie, W. (2016) A brief history of the discovery of PXR and CAR as xenobiotic receptors, *Acta Pharm. Sin. B*, **6**, 450-452, doi: 10.1016/j.apsb.2016.06.011.
2. Cai, X., Young, G. M., and Xie, W. (2021) The xenobiotic receptors PXR and CAR in liver physiology, an update, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.*, **1867**, 166101, doi: 10.1016/j.bbadis.2021.166101.
3. Blanco-Bose, W. E., Murphy, M. J., Ehninger, A., Offner, S., Dubey, C., Huang, W., Moore, D. D., and Trump, A. (2008) C-Myc and its target FoxM1 are critical downstream effectors of constitutive androstane receptor (CAR) mediated direct liver hyperplasia, *Hepatology*, **48**, 1302-1311, doi: 10.1002/hep.22475.
4. Tschuor, C., Kachaylo, E., Limani, P., Raptis, D. A., Linecker, M., Tian, Y., Herrmann, U., Grabliauskaite, K., Weber, A., Columbano, A., Graf, R., Humar, B., and Clavien, P. A. (2016) Constitutive androstane receptor (Car)-driven regeneration protects liver from failure following tissue loss, *J. Hepatol.*, **65**, 66-74, doi: 10.1016/j.jhep.2016.02.040.
5. Lodato, N. J., Melia, T., Rampersaud, A., and Waxman, D. J. (2017) Sex-differential responses of tumor promotion-associated genes and dysregulation of novel long noncoding RNAs in constitutive androstane receptor-activated mouse liver, *Toxicol. Sci.*, **159**, 25-41, doi: 10.1093/toxsci/kfx114.
6. Skoda, J., Dohnalova, K., Chalupsky, K., Stahl, A., Templin, M., Maixnerova, J., Micuda, S., Grøntved, L., Braeuning, A., and Pavek, P. (2022) Off-target lipid metabolism disruption by the mouse constitutive androstane receptor ligand TCPOBOP in humanized mice, *Biochem. Pharmacol.*, **197**, 114905, doi: 10.1016/j.bcp.2021.114905.
7. Solhi, R., Lotfinia, M., Gramignoli, R., Najimi, M., and Vosough, M. (2021) Metabolic hallmarks of liver regeneration, *Trends Endocrinol. Metab.*, **32**, 731-745, doi: 10.1016/j.tem.2021.06.002.
8. Cardiff, R. D., Miller, C. H., and Munn, R. J. (2014) Manual hematoxylin and eosin staining of mouse tissue sections, *Cold Spring Harb. Protoc.*, **2014**, 655-658, doi: 10.1101/pdb.prot073411.
9. Graefe, C., Eichhorn, L., Wurst, P., Kleiner, J., Heine, A., Panetas, I., Abdulla, Z., Hoeft, A., Frede, S., Kurts, C., Endl, E., and Weisheit, C. K. (2019) Optimized Ki-67 staining in murine cells: a tool to determine cell proliferation, *Mol. Biol. Rep.*, **46**, 4631-4643, doi: 10.1007/s11033-019-04851-2.
10. Mazin, M. E., Yarushkin, A. A., Pustyl'nyak, Y. A., Prokopyeva, E. A., and Pustyl'nyak, V. O. (2022) Promotion of NR1H3-mediated liver growth is accompanied by STAT3 activation, *Mol. Biol. Rep.*, **49**, 4089-4093, doi: 10.1007/s11033-022-07340-1.
11. Yuan, M., Breitkopf, S. B., Yang, X., and Asara, J. M. (2012) A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue, *Nat. Protoc.*, **7**, 872-881, doi: 10.1038/nprot.2012.024.
12. Rogachev, A. D., Alemasov, N. A., Ivanisenko, V. A., Ivanisenko, N. V., Gaisler, E. V., Oleshko, O. S., Cheresiz, S. V., Mishinov, S. V., Stupak, V. V., and Pokrovsky, A. G. (2021) Correlation of metabolic profiles of plasma and cerebrospinal fluid of high-grade glioma patients, *Metabolites*, **11**, 133, doi: 10.3390/metabo11030133.
13. Kazantseva, Y. A., Pustyl'nyak, Y. A., and Pustyl'nyak, V. O. (2016) Role of nuclear constitutive androstane receptor in regulation of hepatocyte proliferation and hepatocarcinogenesis, *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 338-347, doi: 10.1134/S0006297916040040.

14. Huber, K., Mestres-Arenas, A., Fajas, L., and Leal-Esteban, L. C. (2021) The multifaceted role of cell cycle regulators in the coordination of growth and metabolism, *FEBS J.*, **288**, 3813-3833, doi: 10.1111/febs.15586.
15. Locasale, J. W., and Cantley, L. C. (2011) Metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth, *Cell Metab.*, **14**, 443-451, doi: 10.1016/j.cmet.2011.07.014.
16. Lunt, S. Y., and Vander Heiden, M. G. (2011) Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **27**, 441-464, doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.
17. Ge, T., Yang, J., Zhou, S., Wang, Y., Li, Y., and Tong, X. (2020) The role of the pentose phosphate pathway in diabetes and cancer, *Front Endocrinol. (Lausanne)*, **11**, 365, doi: 10.3389/fendo.2020.00365.
18. Jin, L., and Zhou, Y. (2019) Crucial role of the pentose phosphate pathway in malignant tumors, *Oncol. Lett.*, **17**, 4213-4221, doi: 10.3892/ol.2019.10112.
19. Liu, Z., Li, W., Geng, L., Sun, L., Wang, Q., Yu, Y., Yan, P., Liang, C., Ren, J., Song, M., Zhao, Q., Lei, J., Cai, Y., Li, J., Yan, K., Wu, Z., Chu, Q., Li, J., Wang, S., Li, C., Han, J. J., Hernandez-Benitez, R., Shyh-Chang, N., Belmonte, J. C. I., Zhang, W., Qu, J., and Liu, G. H. (2022) Cross-species metabolomic analysis identifies uridine as a potent regeneration promoting factor, *Cell Discov.*, **8**, 6, doi: 10.1038/s41421-021-00361-3.
20. Doi, J., Fujimoto, Y., Teratani, T., Kasahara, N., Maeda, M., Tsuruyama, T., Iida, T., Yagi, S., and Uemoto, S. (2019) Bolus administration of polyamines boosts effects on hepatic ischemia-reperfusion injury and regeneration in rats, *Eur. Surg. Res.*, **60**, 63-73, doi: 10.1159/000497434.
21. Mandal, S., Mandal, A., Johansson, H. E., Orjalo, A. V., and Park, M. H. (2013) Depletion of cellular polyamines, spermidine and spermine, causes a total arrest in translation and growth in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 2169-2174, doi: 10.1073/pnas.1219002110.
22. Alhonen, L., Räsänen, T. L., Sinervirta, R., Parkkinen, J. J., Korhonen, V. P., Pietilä, M., and Jänne, J. (2002) Polyamines are required for the initiation of rat liver regeneration, *Biochem. J.*, **362**, 149-153, doi: 10.1042/0264-6021:3620149.
23. Chattopadhyay, M. K., Park, M. H., and Tabor, H. (2008) Hypusine modification for growth is the major function of spermidine in *Saccharomyces cerevisiae* polyamine auxotrophs grown in limiting spermidine, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 6554-6559, doi: 10.1073/pnas.0710970105.
24. Lempiäinen, H., Müller, A., Brasa, S., Teo, S. S., Roloff, T. C., Morawiec, L., Zamurovic, N., Vicart, A., Funhoff, E., Couttet, P., Schübeler, D., Grenet, O., Marlowe, J., Moggs, J., and Terranova, R. (2011) Phenobarbital mediates an epigenetic switch at the constitutive androstane receptor (CAR) target gene *Cyp2b10* in the liver of B6C3F1 mice, *PLoS One*, **6**, e18216, doi: 10.1371/journal.pone.0018216.
25. Rumpersaud, A., Lodato, N. J., Shin, A., and Waxman, D. J. (2019) Widespread epigenetic changes to the enhancer landscape of mouse liver induced by a specific xenobiotic agonist ligand of the nuclear receptor CAR, *Toxicol. Sci.*, **171**, 315-338, doi: 10.1093/toxsci/kfz148.
26. Cui, J. Y., and Klaassen, C. D. (2016) RNA-Seq reveals common and unique PXR- and CAR-target gene signatures in the mouse liver transcriptome, *Biochim. Biophys. Acta*, **1859**, 1198-1217, doi: 10.1016/j.bbagr.2016.04.010.

CONSTITUTIVE ANDROSTANE RECEPTOR AGONIST INITIATES METABOLIC ACTIVITY REQUIRED FOR HEPATOCYTE PROLIFERATION

M. E. Mazin^{1,2}, A. M. Perevalova¹, A. A. Yarushkin², Y. A. Pustyl'nyak¹,
A. D. Rogachev¹, E. A. Prokopyeva^{1,2}, L. F. Gulyaeva^{1,2}, and V. O. Pustyl'nyak^{1,2*}

¹ Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: pustyl'nyak@post.nsu.ru

² Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine,
630117 Novosibirsk, Russia

Constitutive androstane receptor (CAR, NR1I3) activation by chemical compounds evokes liver hyperplasia in rodent. 1,4-Bis[2-(3,5-dichloropyridyloxy)] benzene (TCPOBOP), a mouse CAR agonist, is most commonly used to study chemically induced liver hyperplasia and hepatocyte proliferation *in vivo*. TCPOBOP is potent murine liver chemical mitogen, which induces rapid direct liver hyperplasia independent of liver injury. In recent years, a lot of data has been accumulated on the transcription program that characterizes TCPOBOP-induced hepatocyte proliferation. However, there are scarce data about metabolic requirements of hepatocytes dividing upon treatment with xenobiotics. In present study, we employed liquid chromatography – mass spectrometry technology combined with statistical analysis to develop a metabolite profile of

small biomolecules, to identify key metabolic changes in male mouse liver tissue after TCPOBOP administration. Analysis of biochemical pathways of the differentially affected metabolites in mouse livers demonstrated significant TCPOBOP-mediated enrichment of several processes including those relevant to nucleotide metabolism, amino acid metabolism, and energy substrate metabolism. Our findings provide evidence to support the conclusion that CAR agonist, TCPOBOP, initiates an intracellular program that promotes the global coordinated metabolic activities required for hepatocyte proliferation. Our metabolic data may provide novel insight into the biological mechanisms that occur during TCPOBOP-induced hepatocyte proliferation in mice.

Keywords: constitutive androstane receptor, TCPOBOP, liver, hepatocyte, metabolomics