
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

ВЛИЯНИЕ ДОНОРА ОКСИДА АЗОТА S-НИТРОЗОГЛУТАТИОНА НА ЭКСПРЕССИЮ КОНСТИТУТИВНОГО АНДРОСТАНОВОГО РЕЦЕПТОРА

© 2022 г. Ю. В. Абаленихина^{1,*}, Е. А. Судакова¹,
А. А. Сейдкулиева¹, А. В. Щулькин¹, Е. Н. Якушева¹

¹ Рязанский государственный медицинский университет имени академика И. П. Павлова, Рязань, Россия

*e-mail: abalenihina88@mail.ru

Поступила в редакцию 08.04.2022 г.

После доработки 23.06.2022 г.

Принята к публикации 16.07.2022 г.

Настоящая работа посвящена изучению механизмов регуляции конститутивного андростанового рецептора (CAR) при воздействии донора оксида азота (NO) S-нитрозоглутатиона (GSNO) *in vitro*. Исследование выполнено на клетках линии Caco-2, которые инкубировали в питательной среде в присутствии S-нитрозоглутатиона (диапазон концентраций 1–500 мкМ) в течение 3, 24 и 72 ч. Относительное количество CAR оценивали методом вестерн-блот. В работе показано, что кратковременное воздействие донора NO GSNO в течение 3 и 24 ч в концентрациях 1–500 мкМ не влияло на количество CAR, а при экспозиции 72 ч с GSNO в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ отмечалось его увеличение. Доказано, что повышение относительного количества CAR при воздействии низких концентраций GSNO (1 мкМ) реализуется через NO-циГМФ-сигнальный путь. При увеличении концентрации GSNO до 10 и 50 мкМ отмечается развитие нитрозативного стресса и регуляция CAR осуществляется через битирозин. Прогрессирование нитрозативного стресса (концентрация GSNO 100 и 500 мкМ) приводит к снижению относительного количества CAR, предположительно, вследствие повреждения его молекулы.

Ключевые слова: конститутивный андростановый рецептор, нитрозативный стресс, оксид азота, битирозин, гуанилатциклаза

DOI: 10.31857/S0044452922050023

Конститутивный андростановый рецептор (CAR) – член суперсемейства ядерных рецепторов (NR1I3 – Nuclear Receptor Subfamily 1, Group I, Member 3, семейство орфанных рецепторов) [1], регулирующий экспрессию целевых генов и принимающий участие в защите организма от ксенобиотиков.

CAR главным образом экспрессируется в гепатоцитах и энteroцитах тонкого кишечника, где регулирует биотрансформацию лекарственных веществ [2]. Низкий уровень базальной экспрессии CAR обнаружен также в скелетных и сердечной мышцах, ткани почек и головном мозге [3, 4].

CAR в виде комплекса с шаперонами (HSP90, HSP70, HSP60) конститутивно локализуется в цитозоле клеток [5]. Взаимодействие с лигандами приводит к диссоциации CAR от шаперонов, транслокации рецептора в ядро, где он в виде гетеродимера с рецептором ретиноевой кислоты (RXR) запускает транскрипцию таргетных генов [6].

Долгое время считалось, что основной функцией CAR является индукция ферментов детоксикации ксенобиотиков в микросомальной цепи окисления – CYP2B, CYP2C, CYP3A, а также ферментов второй фазы биотрансформации ури-

динифосфат глюкуронозилтрансферазы, сульфотрансферазы [7, 8]. Новые экспериментальные данные указывают на то, что функции CAR гораздо шире, чем рецептор ксенобиотиков. Показано, что CAR может принимать участие в обмене желчных кислот, билирубина, жирных кислот, стероидных гормонов, метаболизме глюкозы [9]. В связи с этим актуальным представляется изучение вопросов регуляции CAR.

Оксид азота (NO) выступает в качестве важного внутриклеточного мессенджера. Физиологической мишенью для NO является растворимая гуанилатциклаза (рГЦ) [10], которая при активации увеличивает внутриклеточную концентрацию циклического гуанозинмонофосфата (циГМФ), в результате чего активируется протеинкиназа G, кальций-кальмодулинзависимая протеинкиназа в клетках головного мозга [11] и MAP-киназа фибробластов [12].

Эндогенный NO участвует во многих жизненно важных процессах, являясь универсальным и необходимым регулятором функций клеточного метаболизма. NO ингибит агрегацию и адгезию тромбоцитов [13], миграцию лейкоцитов [14], участвует в регуляции тонуса кровеносных сосудов

[15], деятельности органов дыхания [16], желудочно-кишечного тракта [17] и мочеполовой системы [18], кроме этого NO играет важную роль в нейротрансмиссии [16, 17, 19] и в формировании иммунного ответа [20].

Известно, что NO отличается высокой реакционной способностью, благодаря наличию неспаренного электрона на внешней π -орбитали [21]. Основным продуктом окисления оксида азота являются химически инертные нитратные ионы, способные вновь превращаться в NO [22]. При взаимодействии NO с супероксид-анионом радикалом образуется пероксинитрит, который оказывает не только токсическое действие, взаимодействуя с липидами, белками и ДНК, но и регуляторное, влияя на активность киназ (протеинкиназа В и С, фосфоинозид-3-киназа, митоген-активируемые протеинкиназы и др.).

Одним из продуктов нитрозативного стресса является битирозин, который образуется в результате взаимодействия пероксинитрита с тирозином. Битирозин выступает не только в качестве маркера нитрозативного стресса, но также выполняет функции сигнальной молекулы [23].

Таким образом, NO как через цГМФ-сигнальный путь, так и через продукты нитрозативного стресса (например, битирозин) может оказывать регуляторное воздействие, в том числе и на CAR.

Цель исследования – изучить влияние донора оксида азота S-нитрозоглутатиона на изменение экспрессии CAR и установить возможный механизм регуляции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на линии клеток аденоакарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП “Коллекция культур клеток позвоночных”, Российская Федерация). Культивирование клеток проводили в инкубаторе WS-189C (“World Science”, Корея) при 37°C и 5%-ном содержании CO₂, в среде Игла, модифицированной Дульбекко, (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), с добавлением L-глутамина (4 мМ), 15% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все компоненты “Sigma-Aldrich”, Германия).

Культивирование клеток осуществляли в 96-луночном планшете (“Corning”, США) для определения жизнеспособности клеток и 6-луночных планшетах (“Corning”, США) для оценки биохимических показателей в течение 21 суток, так как при этом сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, экспрессирующие CAR [24].

Исследование было выполнено в три этапа:

Первый этап – оценка влияния донора оксида азота на относительное количество CAR в клетках

линии Caco-2, включал в себя две серии экспериментов:

1.1. Контрольная серия – клетки, которые инкубировали в питательной среде без добавления тестируемых веществ.

1.2. Опытная серия – S-нитрозоглутатион (GSNO, “Sigma-Aldrich”, Германия) добавляли в культуральную среду в конечных концентрациях 1, 10, 50, 100 и 500 мкМ и инкубировали в течение 3, 24 и 72 ч. При инкубации 72 ч смену питательной среды проводили каждые 24 ч.

Второй этап – изучение роли NO-цГМФ-сигнального пути в регуляции CAR, включал в себя три серии экспериментов:

2.1. Контрольная серия – клетки инкубировали в питательной среде с добавлением этанола (растворитель ODQ) в конечной концентрации 0.0001% в течение 72 ч.

2.2. Ингибирование NO-цГМФ-сигнального пути. В качестве ингибитора растворимой гуанилатциклазы использовали – 1Н-[1.2.4]оксадиазоло-[4.3-а]хиноксалин-1-он (ODQ, “Sigma Aldrich”, Германия). Клетки инкубировали в питательной среде с добавлением ODQ в концентрации 10 мкМ в течение 72 ч [25].

2.3. Индукция CAR под действием GSNO – клетки инкубировали в культуральной среде, содержащей этанол в конечной концентрации 0.0001%, с добавлением GSNO (“Sigma-Aldrich”, Германия) в конечной концентрации 10 мкМ в течение 72 ч.

2.4. Влияние GSNO на количество CAR в условиях ингибирования рГЦ – клетки инкубировали с GSNO в концентрациях 1 и 10 мкМ, повышающих уровень CAR, совместно с ODQ в концентрации 10 мкМ в течение 72 ч [25]. Ингибитор добавляли в питательную среду за 30 мин до внесения GSNO.

Третий этап – оценка влияния продукта нитрозативного стресса – битирозина на относительное количество CAR в клетках линии Caco-2, включала две серии опытов.

3.1. Контрольная серия – клетки, которые инкубировали с питательной средой без добавления тестируемого вещества.

3.2. Опытная серия – битирозин (“Cambridge Isotope Laboratories”, Франция) добавляли к клеткам линии Caco-2 в концентрациях 0.2; 0.4; 1 и 1.5 мМ и инкубировали в течение 72 ч. Смену питательной среды проводили каждые 24 ч.

На каждый эксперимент в каждой временной точке и концентрации было выполнено по 3 повторения ($n = 3$).

Получение клеточных лизатов. После завершения экспериментов с клетками их снимали с лунок раствором, состоящим из 0.25% трипсина и 0.2% ЭДТА (“Sigma-Aldrich”, Германия).

Клетки в количестве 1×10^6 промывали фосфатным буфером pH 7.4 (“BioRad”, США). Далее ли-

зировали ледяным буфером в объеме 150 мкл. Состав лизирующего буфера: 50 мМ трис-HCl (рН 7.4), 150 мМ KCl, 0.5% тритон X-100, смесь ингибиторов протеиназ (“Sigma-Aldrich”, Германия). Полученную клеточную супензию встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем центрифугировали при 5000 g (CM-50, “Eppendorf”, Германия) 10 мин. Цитоплазматическую фракцию переносили в отдельные пробирки и использовали для определения биохимических показателей.

Определение уровня метаболитов оксида азота (суммарная концентрация нитратов и нитритов, NO_x) проводили фотоколориметрическим методом с использованием реактива Грисса (“Нева Ректифик”, Россия) и хлорида ванадия (III) (“Acros organics”, Франция). Интенсивность окраски определяли на микропланшетном анализаторе Stat Fax 2100 (“Awareness Technology”, США) при длине волны 540 нм [26]. Концентрацию NO_x рассчитывали по калибровочному графику, для построения которого использовали NaNO₃.

Уровень пероксинитрита анализировали по интенсивности светопоглощения при длине волны 302 нм СФ 2000 (“ОКБ-спектр”, Россия). Концентрацию рассчитывали с использованием молярного коэффициента 1670 М⁻¹ см⁻¹ [27].

Определение концентрации битирозина осуществляли по интенсивности флуоресценции образца в фосфатном буфере (рН 7.4) при длине волны возбуждения (экстинкция) 325 нм и длине волны испускания (эмиссия) 415 нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-6000 (“Shimadzu Corporation”, Япония) [28].

Концентрацию метаболитов оксида азота, пероксинитрита и битирозина выражали в нмоль/мг белка.

Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, “ThermoFisher”, США) [29].

Определение количества CAR в клетках линии Caco-2 проводили методом вестерн-блот.

После окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (“Sigma-Aldrich”, США), трижды промывали раствором фосфатного буфера (“BioRad”, США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (“Thermo Fisher Scientific”, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (“Sigma-Aldrich”, США) в течение 30 мин при

4°C и постоянном перемешивании из расчета 10⁷ клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифugировали при 22440 g в течение 10 мин (“AvantiJXN-3, Beckman Coulter”, США).

Супернатант подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (“Bio-Rad”, США). Перед загрузкой образцы смешивали с буфером Laemmli (“Bio-Rad”, США), содержащим 50 мМ β-меркаптоэтанола (“Bio-Rad”, США) в соотношении 1:3, инкубировали 5 мин при температуре 70°C. Гели прогоняли при 100 В в течение 90 мин.

Для определения относительного количества CAR методом вестерн-блот использовали первичные мышиные моноклональные антитела (MB67 CAR Monoclonal Antibody, “Invitrogen”, США) в концентрации 1:200. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”, США) в разведении 1:4000. Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью Chemi Doc XRS+ (“Bio-Rad”, США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (“Bio-Rad”, США). Количество CAR оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные мышиные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68, “Invitrogen”, США разведение 1:1000, вторичные кроличьи антитела – Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”, США, разведение 1:4000).

Цитотоксический тест (МТТ-тест). Клетки засевали в 96-луночный планшет из расчета 10⁴ клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут, затем добавляли питательную среду с GSNO. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0.5%-ного раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1%-ного раствора диметилсульфоксида (“ПанЭко”, Россия) [30]. Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (“Awareness Technology”, США).

Жизнеспособность клеток Caco-2 в присутствии GSNO 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.

Статистический анализ. Полученные результаты обрабатывали с помощью программного обеспече-

ния GrafPad Prism 8, Statistica 13.0 (StatSoft, Inc). Данные представлены в виде среднего арифметического значения (*M*) ± стандартное отклонение

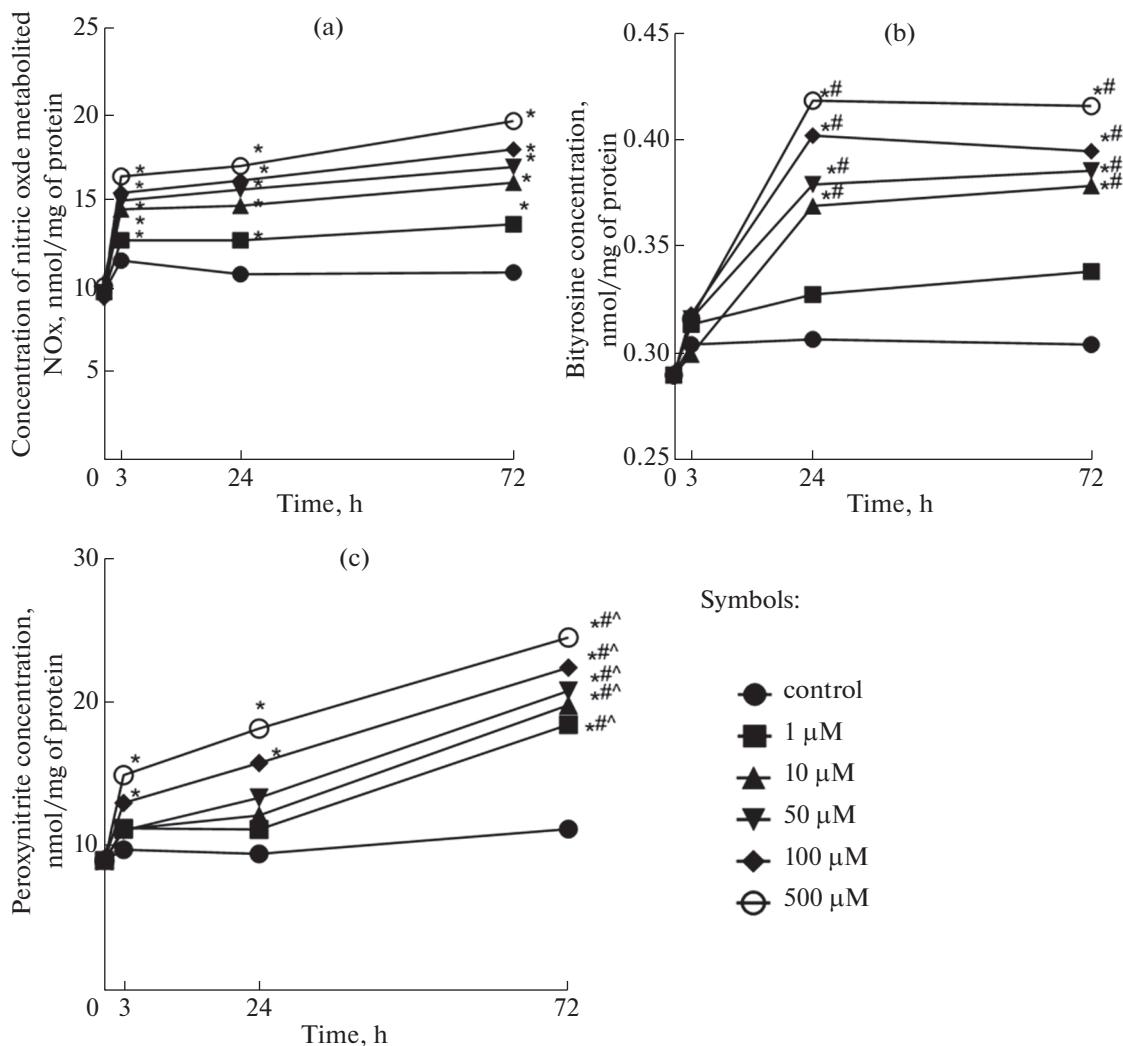


Рис. 1. Изменение уровня метаболитов оксида азота (а), битирозина (б), пероксинитрита (с) при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1–500 мкМ ($M, n = 3$).

* $p < 0.05$ – статистически значимые отличия от контроля; # $p < 0.05$ – статистически значимые отличия от группы 3 ч; ^ $p < 0.05$ – статистически значимые отличия от группы 24 ч (тест Фишера).

(SD). Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения осуществляли с помощью критерия Фишера. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Развитие нитрозативного стресса под действием GSNO в клетках линии Caco-2.

Уровень метаболитов оксида азота возрастал при всех концентрациях GSNO (1–500 мкМ) и всех сроках эксперимента. Максимальные изменения наблюдались при концентрации 500 мкМ: при инкубации 3 ч – на 51.8% ($p < 0.001$) выше значений контроля, при инкубации 24 ч – на 58.9% ($p < 0.001$) и при инкубации 72 ч – на 68.5% ($p < 0.001$) (рис. 1а).

При этом концентрация не изменялась в зависимости от времени инкубации.

Выраженность нитрозативного стресса оценивали по уровню битирозина и пероксинитрита (рис. 1б, с). Содержание битирозина не изменялось при воздействии GSNO в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3 ч. При экспозиции 24 ч и концентрации GSNO 1 мкМ содержание битирозина также не изменилось, а при концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ увеличивалось на 18.3% ($p < 0.01$), 22.1% ($p < 0.01$), 29.4% ($p < 0.01$) и 34.9% ($p < 0.001$) по сравнению с контролем соответственно. При увеличении длительности воздействия до 72 ч количество битирозина при концентрации GSNO 1 мкМ не изменилось и возрастало при концентрациях 10 мкМ на 30.3% ($p < 0.01$), 50 мкМ – на 27.3% ($p < 0.01$),

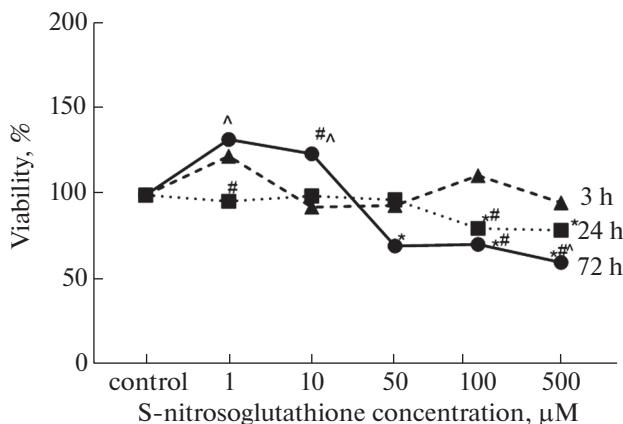


Рис. 2. Изменение жизнеспособности клеток (%) при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1–500 мкМ ($M, n = 3$).

* $p < 0.05$ – статистически значимые отличия от контроля; # $p < 0.05$ – статистически значимые отличия от группы 3 ч; ^ $p < 0.05$ – статистически значимые отличия от группы 24 ч (тест Фишера).

100 мкМ – на 32.6% ($p < 0.01$), 500 мкМ – на 38.3% ($p < 0.001$) (рис. 1б).

Содержание битирозина статистически значимо увеличивалось на 16.1% ($p < 0.001$) и на 24.7% ($p < 0.001$) при инкубации с GSNO в концентрации 10 мкМ в течение 24 и 72 ч соответственно относительно экспозиции 3 ч. GSNO в концентрации 50 мкМ способствовал увеличению содержания битирозина на 13.8% ($p < 0.001$) и на 13.5% ($p < 0.001$) при экспозиции 24 и 72 ч относительно инкубации 3 ч, а в концентрации 100 мкМ – на 34.1% ($p < 0.001$) и 28.8% ($p < 0.001$). При использовании GSNO в концентрации 500 мкМ наблюдалось увеличение концентрации битирозина на 34.1% ($p < 0.001$) и на 30.5% ($p < 0.001$) при инкубации 24 и 72 ч соответственно относительно срока воздействия 3 ч.

При длительности экспозиции 3 ч GSNO увеличивал уровень пероксинитрита в концентрациях 100 и 500 мкМ на 68.1% ($p < 0.01$) и 92.6% ($p < 0.001$) соответственно (рис. 1с).

Аналогичные результаты были получены и при длительности эксперимента 24 ч: содержание пероксинитрита увеличивалось на 34.0% ($p < 0.05$) и 53.6% ($p < 0.01$) по сравнению с контролем соответственно. При увеличении длительности экспозиции до 72 ч содержание пероксинитрита возрастало при концентрациях GSNO 1 – 500 мкМ, максимально на 84.4% ($p < 0.001$) при концентрации 500 мкМ (рис. 1с).

Уровень пероксинитрита повышался при инкубации клеток в течение 72 ч с GSNO в концентрации 1 мкМ на 9.9% ($p < 0.001$) и на 8.9% ($p < 0.001$), 10 мкМ – на 72.9% ($p < 0.01$) и 72.9% ($p < 0.001$), 50 мкМ – на 65.9% ($p < 0.001$) и 68.6% ($p < 0.001$),

100 мкМ – на 41.8% ($p < 0.001$) и 72.3% ($p < 0.001$), 500 мкМ – на 24.3% ($p < 0.01$) и 50.0% ($p < 0.001$) относительно срока воздействия 3 и 24 ч соответственно (рис. 1с).

Цитотоксическое действие GSNO оценивалось по результатам MTT-теста. В контрольной группе жизнеспособность клеток была принята за 100%. GSNO в концентрациях 1–500 мкМ и длительности воздействия 3 ч достоверно не влиял на жизнеспособность клеток. При воздействии GSNO в концентрациях 1–50 мкМ и длительности экспозиции 24 ч жизнеспособность клеток также не изменялась, а при концентрациях 100 и 500 мкМ снижалась до $79.9 \pm 6.7\%$ ($p < 0.05$) и $78.8 \pm 7.2\%$ ($p < 0.05$). Увеличение длительности экспозиции до 72 ч приводило к снижению жизнеспособности до $68.4 \pm 11.4\%$ ($p < 0.001$), $69.5 \pm 6.1\%$ ($p < 0.001$) и $50.9 \pm 7.5\%$ ($p < 0.001$) при концентрации GSNO 50, 100 и 500 мкМ соответственно (рис. 2).

При анализе результатов в зависимости от срока инкубации были получены следующие результаты. GSNO в концентрации 100 мкМ при длительности экспозиции 24 и 72 ч снижал выживаемость клеток на 28.6% ($p < 0.05$) и на 37.9% ($p < 0.01$) относительно инкубации 3 ч, а в концентрации 500 мкМ и длительности воздействия 72 ч на 46.3% ($p < 0.001$) и на 35.4% ($p < 0.05$) относительно 3 и 24 ч экспозиции.

Таким образом, полученные данные подтверждают, что GSNO является донором NO, причем концентрации 100 и 500 мкМ при длительности экспозиции 24 ч и 50, 100 и 500 мкМ при длительности воздействия 72 ч являются токсичными для клеток линии Caco-2 [31].

Влияние GSNO на количество CAR в клетках линии Caco-2. При воздействии GSNO на клетки линии Caco-2 в течение 3 и 24 ч количество CAR достоверно по сравнению с контролем не изменялось (рис. 3).

При культивировании клеток линии Caco-2 с GSNO в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ в течение 72 ч количество CAR статистически значимо увеличивалось по сравнению с контролем на 25.5% ($p < 0.05$), на 47.9% ($p < 0.001$) и 18.7% ($p < 0.05$) соответственно. При повышении концентрации донора NO до 100 и 500 мкМ наблюдалось снижение количества транскрипционного фактора на 27.5% ($p < 0.01$) и на 38.8% ($p < 0.001$) соответственно относительно контрольных значений (рис. 3).

Изучение роли NO-циГМФ-сигнального пути в регуляции CAR.

При изучении роли NO-циГМФ-сигнального пути в регуляции CAR при воздействии GSNO в течение 72 ч были получены следующие результаты.

Ингибитор рГЦ ODQ в концентрации 10 мкМ и спирт (растворитель ODQ) не влияли на относительное количество CAR (рис. 4).

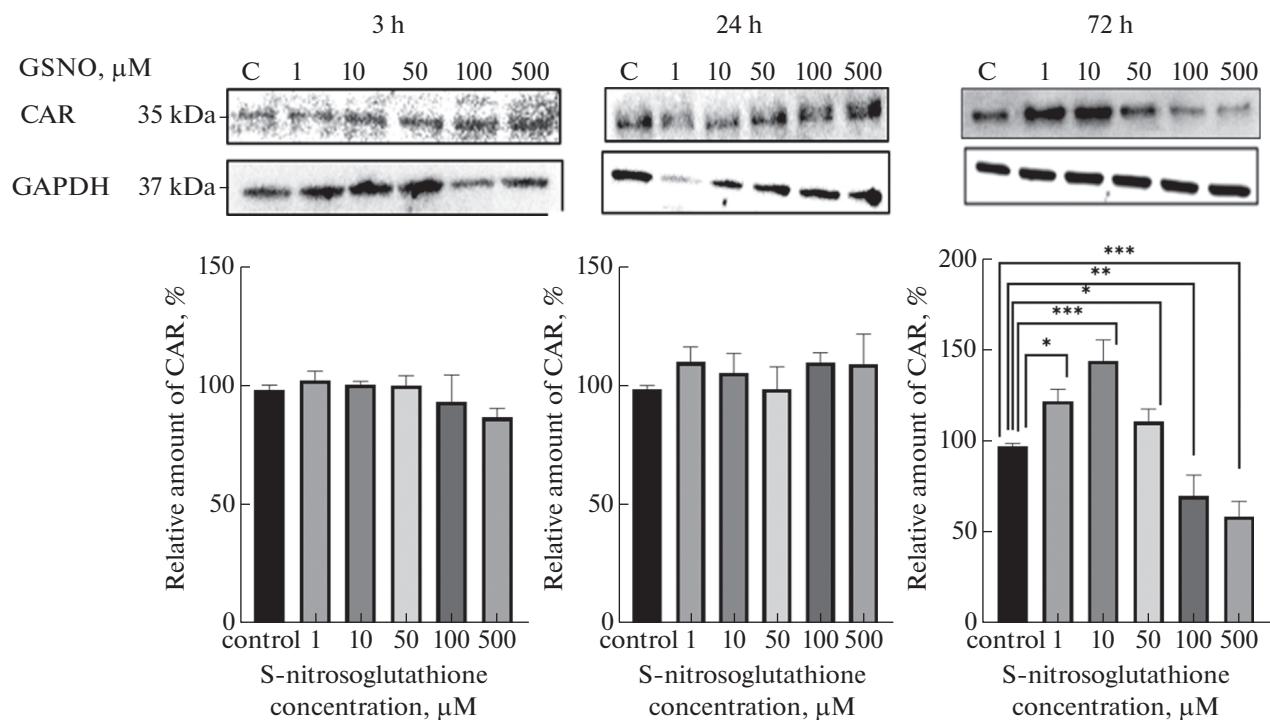


Рис. 3. Относительное количество конститутивного андростанового рецептора в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1 – 500 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD, n = 3$).

С-контроль; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем (тест Фишера).

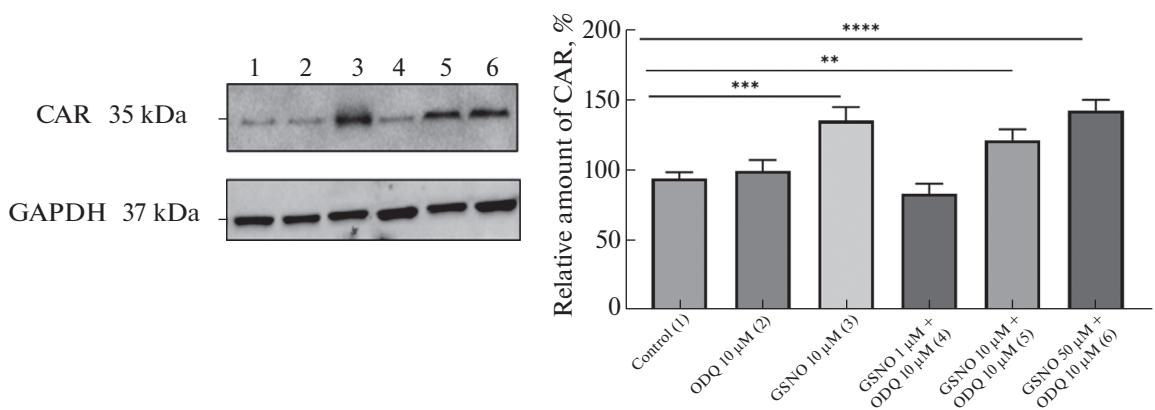


Рис. 4. Относительное количество конститутивного андростанового рецептора в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием растворимой гуанилатциклазы (ODQ, 10 мкМ) в течение 72 ч.

** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ по сравнению с контролем (тест Фишера).

Сочетанное применение ODQ и GSNO в концентрации 1 мкМ приводило к нормализации относительного количества CAR по сравнению с контролем (индуцирующий эффект GSNO подавлялся ODQ). В то же время ODQ не влиял на стимулирующее действие GSNO в концентрациях 10 и 50 мкМ на относительное количество CAR, которое возрастало на 22.3% ($p < 0.01$) и 43.8% ($p < 0.0001$) соответственно по сравнению с контролем (рис. 4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что индуцирующее действие GSNO в концентрации 1 мкМ на CAR реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь.

Оценка влияния продукта нитрозативного стресса – битирозина на относительное количество CAR в клетках линии Caco-2.

Добавление битирозина в питательную среду в концентрации 0.4 мМ приводило к возрастанию

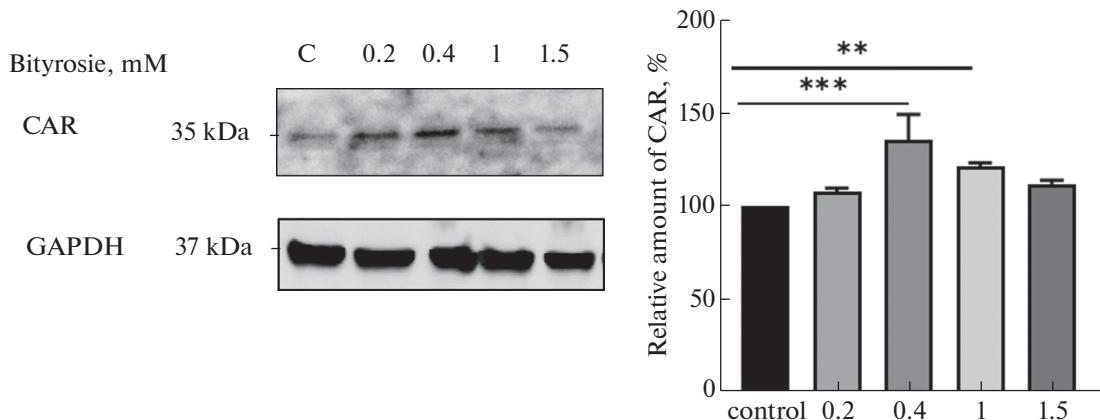


Рис. 5. Относительное количество конститутивного андростанового рецептора в клетках линии Caco-2 при воздействии битирозина в концентрациях 0.2, 0.4, 1, 1.5 мМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n = 3$).

C – контроль; *** $p < 0.001$; ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем (тест Фишера).

относительного количества CAR на 26.2% ($p < 0.001$), в концентрации 1 мМ – на 13.1% ($p < 0.01$) по сравнению с контролем, а в концентрациях 0.2 и 1.5 мМ не оказывало эффекта (рис. 5).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что продукт нитрозативного стресса – битирозин участвует в регуляции экспрессии CAR.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

GSNO представляет собой S-нитрозированное производное глутатиона и является физиологической эндогенной молекулой-носителем NO. Гомеостатический уровень GSNO в клетке низкий, поскольку он быстро и необратимо разлагается на NO и глутатион при участии фермента S-нитрозоглутатонредуктазы (КФ 1.2.1.1.46) [32].

GSNO не проникает в клетки напрямую, однако его добавление вызывает повышение внутриклеточных уровней S-нитрозотиолов. Предполагается, что GSNO диссоциирует во внеклеточном пространстве с высвобождением NO, который затем может диффундировать через клеточную мембрану [33]. Также описан независимый от NO механизм его проникновения внутрь клеток. Нитрозогруппа от GSNO переносится на цистein с образованием S-нитроцистеина, который способен проникать внутрь клеток через систему транспортера аминокислот [34]. S-нитроцистеин внутри клеток может либо вновь нитрозилировать глутатион с образованием GSNO, либо непосредственно нитрозилировать тиолы белков и запускать сигнальные каскады.

GSNO считается важным медиатором сигнальных механизмов NO, однако его эффект зависит от концентрации и времени воздействия: концентрации от 1 до 100 мКМ оказывают регуляторное дей-

ствие [35, 36], а концентрации выше 500 мКМ являются токсичными [37].

Анализ литературных данных и определил рабочий диапазон концентраций GSNO 1–500 мКМ. Полученные результаты демонстрируют, что добавление GSNO к клеткам линии Caco-2 вызывает повышение содержания метаболитов NO в лизате клеток, что свидетельствует об адекватности используемой экспериментальной модели.

В представленном исследовании было показано, что воздействие GSNO в концентрациях 1, 10 и 50 мКМ на клетки линии Caco-2 в течение 72 ч приводило к увеличению относительного количества CAR. В дальнейшем в ходе работы были изучены возможные механизмы данного явления.

Экспрессия CAR может изменяться в результате белок-белковых взаимодействий (Src-семейство киназ [38], ретиноидный X рецептор [39], шаперон 90 [40, 41]), посттрансляционной модификации (fosфорилирование [42], убиквитинирование [5]), транскрипционной и посттранскрипционной регуляции (метилирование) [43].

При воздействии GSNO на клетки линии Caco-2 возможны механизмы регуляции: через NO-цГМФ-сигнальный путь (NO-зависимый), а также через продукты нитрозативного стресса (битирозин-зависимый).

Основной физиологической мишенью для NO в организме является рГЦ, которая катализирует биосинтез из гуанозинтрифосфата (ГТФ) циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). цГМФ – это универсальная внутриклеточная сигнальная молекула, присутствующая в большинстве типов клеток [44].

Важно отметить, что GSNO в концентрации 1 мКМ в течение 72 ч вызывал повышение уровня метаболитов NO и пероксинитрита, что свидетельствует о генерации NO, однако содержание бити-

розина при этом не изменялось. Следовательно, регуляция CAR в этих условиях осуществляется посредством NO и маловероятна при участии битирозина.

В ходе настоящего исследования с помощью специфического ингибитора растворимой гуанилатциклазы – ODQ было показано, что повышение уровня CAR при воздействии GSNO в концентрации 1 мкМ реализуется через NO-ГЦ-цГМФ сигнальный путь.

Дальнейшее увеличение концентрации GSNO (10 и 50 мкМ) приводило к увеличению уровня метаболитов NO, образованию пероксинитрита и повреждению белковых молекул по тирозину.

Нитрозилирование тирозина представляет собой наиболее специфичную окислительную модификацию. Нитротирозин частично диссоциирует до фенолята, но основное его количество конденсируется до 3,3-дитирозина (битирозина) [45]. Доказано, что образование битирозина превалирует над нитротирозином при длительном воздействии и/или более высоком уровне активных форм азота, что позволяет рассматривать его в качестве маркера нитрозативного стресса [46].

Поэтому на следующем этапе исследования изучался другой потенциальный механизм регуляции через продукт нитрозативного стресса – битирозин.

Прямое воздействие битирозина в концентрациях 0,4 и 1 мМ на клетки линии Caco-2 приводило к увеличению относительного количества CAR, что указывает на участие продукта нитрозативного стресса в регуляции данного орфанного рецептора. Сигнальная роль битирозина согласуется с данными литературы [47, 48].

При усугублении нитрозативного стресса (воздействие GSNO в концентрациях 100 и 500 мкМ) наблюдались снижение жизнеспособности клеток и уменьшение относительного количества CAR.

Конститутивный андростановый receptor состоит из 301 аминокислоты, из них 33 приходится на формирование лиганд-связывающего кармана. Аминокислоты, выстилающие и окружающие лиганд-связывающий карман, идентифицированы как наиболее важные и определяющие активность CAR [49].

При усугублении нитрозативного стресса происходит взаимодействие пероксинитрита с аминокислотными остатками белков. Пероксинитрит проявляет высокую реакционную активность в отношении следующих аминокислот: цистеин, триптофан, метионин, тирозин. Можно предположить, что изменение относительного количества CAR может объясняться его структурной модификацией – нитрозилированием цистеина (292), триптофана (283, 305), метионина (241, 272, 316, 418) и тирозина (283, 311, 399), входящих в состав лиганд-связывающего кармана CAR.

Таким образом, нами показано, что воздействие донора NO GSNO в течение 3 и 24 ч в концентрациях 1–500 мкМ не влияет на количество CAR. Увеличение длительности экспозиции до 72 ч приводит к увеличению относительного количества CAR при экспозиции с GSNO в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ, при этом регуляция осуществляется по разным механизмам.

Повышение относительного количества CAR при воздействии низких концентраций GSNO (1 мкМ) реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь, а при увеличении концентрации GSNO до 10 и 50 мкМ отмечается развитие нитрозативного стресса, и регуляция осуществляется через продукт нитрования – битирозин. В условиях прогрессирование нитрозативного стресса, вызванного GSNO в концентрации 100–500 мкМ, относительное количество CAR снижается, что, вероятно, связано с повреждением его молекулы.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа проведена при поддержке гранта Президента Российской Федерации (МК-1856.2020.7).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (А.В.Щ., Ю.В.А.), проведение эксперимента (А.В.Щ., Ю.В.А., Е.А.С., А.А.С.), обработка данных (А.В.Щ., Ю.В.А., Е.А.С., А.А.С.), написание и редактирование манускрипта (А.В.Щ., Ю.В.А., Е.А.С., Е.Н.Я.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kachaylo EM, Pustylnyak VO, Lyakhovich VV, Gulyaeva LF (2011) Constitutive androstan receptor (CAR) is a xenosensor and target for therapy. Biochemistry (Mosc) 76 (10): 1087–1097.
<https://doi.org/10.1134/S000629791100026>
2. Qatanani M, Moore DD (2005) CAR, the continuously advancing receptor, in drug metabolism and disease. Current Drug Metabolism 6 (4): 329–339.
<https://doi.org/10.2174/1389200054633899>
3. Timsit YE, Negishi M (2007) CAR and PXR: the xenobiotic-sensing receptors. Steroids 72: 231–246.
<https://doi.org/10.1016/j.steroids.2006.12.006>
4. Nishimura M, Naito S, Yokoi T (2004) Tissue-specific mRNA expression profiles of human nuclear receptor subfamilies. Drug Metab Pharmacokinet 19 (2): 135–149.
<https://doi.org/10.2133/dmpk.19.135>

5. Timsit YE, Negishi M (2014) Coordinated regulation of nuclear receptor CAR by CCRP/DNAJC7, HSP70 and the ubiquitin-proteasome system. *PLoS One* 9 (5): e96092. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096092>
6. Kakizaki S, Yamamoto Y, Ueda A, Moore R, Sueyoshi T, Negishi M (2003) Phenobarbital induction of drug/steroid-metabolizing enzymes and nuclear receptor CAR. *Biochim Biophys Acta* 1619 (3): 239–242. [https://doi.org/10.1016/s0304-4165\(02\)00482-8](https://doi.org/10.1016/s0304-4165(02)00482-8)
7. He L, Wu J, Tang W, Zhou X, Lin Q, Luo F, Yin Y, Li T (2018) Prevention of oxidative stress by α -ketoglutarate via activation of car signaling and modulation of the expression of key antioxidant-associated targets in vivo and in vitro. *J Agric Food Chem* 66 (43): 11273–11283. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b04470>
8. Yang H, Wang H (2014) Signaling control of the constitutive androstane receptor (CAR). *Protein Cell* 5 (2): 113–123. <https://doi.org/10.1007/s13238-013-0013-0>
9. Lynch C, Pan Y, Li L, Heyward S, Moeller T, Swaan PW, Wang H (2014) Activation of the constitutive androstane receptor inhibits gluconeogenesis without affecting lipogenesis or fatty acid synthesis in human hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol* 279 (1): 33–42. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2014.05.009>
10. Abalenikhina YV, Kosmachevskaya OV, Topunov AF (2020) Peroxynitrite: toxic agent and signaling molecule (review). *Appl Biochem Microbiol* 56: 611–623. <https://doi.org/10.1134/S0003683820060022>
11. Araki S, Osuka K, Takata T, Tsuchiya Y, Watanabe Y (2020) Coordination between calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and neuronal nitric oxide synthase in neurons. *Int J Mol Sci* 21: 7997. <https://doi.org/10.3390/ijms21217997>
12. Browning DD, McShane MP, Marty C, Ye RD (2000) Nitric oxide activation of p38 mitogen-activated protein kinase in 293T fibroblasts requires cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275 (4): 2811–2816. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2811>
13. Bladowski M, Gawrys J, Gajecki D, Szahidewicz-Krupska E, Sawicz-Bladowska A, Doroszko A (2020) Role of the platelets and nitric oxide biotransformation in ischemic stroke: a translative review from bench to bedside. *Oxid Med Cell Longev* 28: 2979260. <https://doi.org/10.1155/2020/2979260>
14. Saini R, Azam Z, Sapra L, Srivastava RK (2021) Neuronal nitric oxide synthase (nNOS) in neutrophils: an insight. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 180: 49–83. https://doi.org/10.1007/112_2021_61
15. Zweier JL, Ilangoan G (2020) Regulation of nitric oxide metabolism and vascular tone by cytoglobin. *Antioxid Redox Signal* 32 (16): 1172–1187. <https://doi.org/10.1089/ars.2019.7881>
16. Antosova M, Mokra D, Pepucha L, Plevkova J, Buday T, Sterusky M, Bencova A (2017) Physiology of nitric oxide in the respiratory system. *Physiol Res* 66 (Suppl 2): 159–172. <https://doi.org/10.33549/physiolres.933673>
17. Sanders KM, Ward SM (2019) Nitric oxide and its role as a non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmitter in the gastrointestinal tract. *Br J Pharmacol* 176 (2): 212–227. <https://doi.org/10.1111/bph.14459>
18. Ahmad A, Dempsey SK, Daneva Z, Azam M, Li N, Li PL, Ritter JK (2018) Role of nitric oxide in the cardiovascular and renal systems. *Int J Mol Sci* 19 (9): 2605. <https://doi.org/10.3390/ijms19092605>
19. Garthwaite J (2019) NO as a multimodal transmitter in the brain: discovery and current status. *Br J Pharmacol* 176 (2): 197–211. <https://doi.org/10.1111/bph.14532>
20. Mazurek M, Rola R (2021) The implications of nitric oxide metabolism in the treatment of glial tumors. *Neurochem Int* 150: 105172. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105172>
21. Lancaster JR (2015) Nitric oxide: a brief overview of chemical and physical properties relevant to therapeutic applications. *Future Sci OA* 1 (1): FSO59. <https://doi.org/10.4155/fso.15.59>
22. Гуманова НГ (2021) Оксид азота и его циркулирующие метаболиты NOx, их роль в функционировании человеческого организма при прогнозе риска сердечно-сосудистой смерти (Часть II). Профилакт мед 24 (10): 119–125. [Gumanova NG (2021) Nitrogen oxide and its circulating NOx metabolites, their role in human body functioning and cardiovascular death risk prediction (Part II). Russ J Preventiv Med 24 (10): 199–125. (In Russ)]. <https://doi.org/10.17116/profmed202124101119>
23. Koseki K, Yamamoto A, Tanimoto K, Okamoto N, Teng F, Bito T, Yabuta Y, Kawano T, Watanabe F (2021) Dityrosine crosslinking of collagen and amyloid- β peptides is formed by vitamin B₁₂ deficiency-generated oxidative stress in *Caenorhabditis elegans*. *Int J Mol Sci* 22 (23): 12959. <https://doi.org/10.3390/ijms222312959>
24. Li AP (2020) In vitro human cell-based experimental models for the evaluation of enteric metabolism and drug interaction potential of drugs and natural products. *Drug Metab Dispos* 48 (10): 980–992. <https://doi.org/10.1124/dmd.120.000053>
25. Hwang TL, Wu CC, Teng CM (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 (6): 1158–1163. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702181>
26. Метельская ВА, Гуманова НГ (2005) Скрининг – метод определения уровня метаболитов оксида азота сыворотке человека. Клин лаб диагноз 6: 15–18. [Metelskaya VA, Gumanova NG (2005) Screening method for determining the level of nitric oxide metabolites in human serum. Clin Lab Diagnost 6: 15–18. (In Russ)].
27. Лобышева ИИ, Сереженков ВА, Ванин АФ (1999) Взаимодействие динитрозильных тиолсодержащих комплексов железа с пероксинитритом и перекисью водорода *in vitro*. Биохимия 64 (2): 194–200. [Lobysheva II, Serezhenkova VA, Vanin AF (1999) Interaction of di-nitrosyl thiol-containing iron complexes with peroxynitrite and hydrogen peroxide *in vitro*. Biochemistry 64 (2): 194–200. (In Russ)].

28. Amado R, Aeschbach R, Neukom H (1984) Dityrosine: in vitro production and characterization. *Methods Enzymol* 107: 377–388.
[https://doi.org/10.1016/0076-6879\(84\)07026-9](https://doi.org/10.1016/0076-6879(84)07026-9)
29. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt Biochem* 72: 248–254.
<https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>
30. Tolosa L, Donato MT, Gómez-Lechón MJ (2015) General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Methods Mol Biol* 1250: 333–348.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_26
31. Абаленихина ЮВ, Судакова ЕА, Сейдкулиева АА, Шулькин АВ, Якушева ЕН (2021) Функционирование pregnan X рецептора в условиях нитрозативного стресса. *Биомед химия* 67 (5): 394–401. [Abalenikhina YV, Sudakova EA, Seidkulieva AA, Shulkina AV, Yakusheva EN (2021) Functioning of pregnan X receptor under conditions of nitrosative stress. *Biomed Khim* 67 (5): 394–401. (In Russ.)].
<https://doi.org/10.18097/PBMC20216705394>
32. Rizza S, Giglio P, Faienza F, Filomeni G (2019) Therapeutic application of nitric oxide in cancer and inflammatory disorders. Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816545-4.00009-8>
33. Ramachandran N, Root P, Jiang XM, Hogg PJ, Mutus B (2001) Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (17): 9539–9544.
<https://doi.org/10.1073/pnas.171180998>
34. Ramachandran N, Root P, Jiang XM, Hogg PJ, Mutus B (2001) Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9539–9544.
<https://doi.org/10.1073/pnas.171180998>
35. 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.
<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1561-x>
36. Kim J, Islam SMT, Qiao F, Singh AK, Khan M, Won J, Singh I (2021) Regulation of B cell functions by S-nitrosoglutathione in the EAE model. *Redox Biol* 45: 102053.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102053>
37. Mussbacher M, Stessel H, Pirker T, Gorren ACF, Mayer B, Schrammel A (2019) S-nitrosoglutathione inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by S-nitrosation of CCAAT/enhancer-binding protein β . *Sci Rep* 9 (1): 15403.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51579-x>
38. Chen T, Chen Q, Xu Y, Zhou Q, Zhu J, Zhang H, Wu Q, Xu J, Yu C (2011) SRC-3 is required for CAR-regulated hepatocyte proliferation and drug metabolism. *J Hepatol* 56 (1): 210–217.
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.07.015>
39. Suino K, Peng L, Reynolds R, Li Y, Cha JY, Repa JJ, Kliewer SA, Xu HE (2004) The nuclear xenobiotic receptor CAR: structural determinants of constitutive activation and heterodimerization. *Mol Cell* 16 (6): 893–905.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.036>
40. Yoshinari K, Kobayashi K, Moore R, Kawamoto T, Negishi M (2003) Identification of the nuclear receptor CAR: HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital. *FEBS Letters* 548 (1–3): 17–20.
[https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)00720-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)00720-8)
41. Kanno Y, Miyama Y, Ando M, Inouye Y (2010) Dependence on the microtubule network and 90-kDa heat shock protein of phenobarbital-induced nuclear translocation of the rat constitutive androstane receptor. *Mol Pharmacol* 77 (2): 311–316.
<https://doi.org/10.1124/mol.109.060434>
42. Chen T, Laurenzana EM, Coslo DM, Chen F, Omiecinski CJ (2014) Proteasomal interaction as a critical activity modulator of the human constitutive androstane receptor. *Biochem J* 458 (1): 95–107.
<https://doi.org/10.1042/BJ20130685K>
43. Scopino K, Dalgarno C, Nachmanoff C, Krizanc D, Thayer KM, Weir MP (2021) Arginine methylation regulates ribosome CAR function. *Int J Mol Sci* 22 (3): 1335.
<https://doi.org/10.3390/ijms22031335>
44. Tejero J, Shiva S, Gladwin MT (2019) Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation. *Physiol Rev* 99 (1): 311–379.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00036.2017>
45. Ferrer-Sueta G, Campolo N, Trujillo M, Bartesaghi S, Carballal S, Romero N, Alvarez B, Radi R (2018) Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Chem Rev* 118 (3): 1338–1408.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b0056846>
46. Boer TR, Palomino RI, Mascharak PK (2019) Peroxynitrite-mediated dimerization of 3-nitrotyrosine: unique chemistry along the spectrum of peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine. *Med One* 4: e190003.
<https://doi.org/10.20900/mo.20190003>
47. Lu Y, Ma S, Tang X, Li B, Ge Y, Zhang K, Yang S, Zhao Q, Xu Y, Ren H. (2020) Dietary dityrosine induces mitochondrial dysfunction by diminished Thyroid Hormone Function in Mouse Myocardia. *J Agric Food Chem.* 26; 68(34): 9223–9234.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03926>
48. Lu Y, Ma S, Tang X, Li B, Ge Y, Zhang K, Yang S, Zhao Q, Xu Y, Ren H. (2020) Dietary Dityrosine Induces Mitochondrial Dysfunction by Diminished Thyroid Hormone Function in Mouse Myocardia. *J Agric Food Chem* 68 (34): 9223–9234.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03926>
49. Mathäs M, Nussstag C, Burk O, Gödtel-Armbrust U, Herlyn H, Wojnowski L, Windshügel B (2014) Structural and functional similarity of amphibian constitutive androstane receptor with mammalian pregnane X receptor. *PloS One* 9 (5): e96263.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096263>

Effect of the Nitrogen Oxide Donor S-Nitrosoglutathione on Expression of the Constitutive Androstane Receptor

Yu. V. Abalenikhina^{a, #}, E. A. Sudakova^a, A. A. Seidkulyeva^a,
A. V. Shchulkina^a and , and E. N. Yakusheva^a

^a Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

#e-mail: abalenikhina88@mail.ru

The mechanisms of regulation of the constitutive androstane receptor (CAR) under the effect of the nitric oxide (NO) donor S-nitrosoglutathione (GSNO), added to a nutrient medium at concentrations ranging from 1 to 500 μM for 3, 24, and 72 h, were studied *in vitro* on Caco-2 cells. Relative CAR levels were assessed by Western blotting. It was found that short-term (3 and 24 h) exposure to GSNO at concentrations of 1–500 μM did not affect the relative CAR level, while after a 72-h exposure to GSNO concentrations of 1 and 10 μM , it increased. Such an increase in the relative CAR level upon exposure to a low GSNO concentration (1 μM) was proved to be implemented via the NO-cGMP signaling pathway. Further increase in the GSNO concentration to 10 μM triggered the development of nitrosative stress, and the relative CAR level was regulated via the nitration product bi-tyrosine. Nitrosative stress progression at GSNO concentrations of 100 and 500 μM was accompanied by a decline in Caco-2 cell survival, leading to a decrease in the relative CAR level.

Keywords: constitutive androstane receptor, nitrosative stress, nitric oxide, bi-tyrosine