

УДК 576.54

МЕХАНИЗМ БИМОДАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ DL-БУТИОНИНСУЛЬФОКСИМИНА НА КОНСТИТУТИВНЫЙ РЕЦЕПТОР АНДРОСТАНА И X-РЕЦЕПТОР ПРЕГНАНА *in vitro*

© 2023 г. Ю. В. Абаленихина^а, *, А. В. Шулькин^а, А. А. Сеидкулиева^а,
Е. Д. Рокунов^а, Ф. Т. Гаджиева^а, Е. Н. Якушева^а

^аРязанский государственный университет им. академика И.П. Павлова, Рязань, 390026 Россия

*e-mail: abalenihtina88@mail.ru

Поступила в редакцию 04.12.2022 г.

После доработки 03.03.2023 г.

Принята к публикации 29.03.2023 г.

Конститутивный рецептор андростана (CAR) и X-рецептор прегнана (PXR) – ядерные рецепторы, участвующие в регуляции транскрипции генов ферментов биотрансформации и экскреции эндо- и ксенобиотиков. Изучено влияние и механизмы действия DL-бутионинсульфоксими́на (БСО, ингибитор γ -глутамилцистеин-синтетазы) на продукцию CAR и PXR в клетках линии Saso-2. БСО использовали в концентрациях 1–500 мкМ при длительности воздействия 24 и 72 ч. Образование активных форм кислорода (АФК) определяли, используя флуоресцентные зонды MitoTracker Red CM-H₂XRos. Цитотоксичность БСО анализировали с помощью МТТ-теста. Относительное количество CAR и PXR оценивали методом вестерн-блоттинга. Обработка клеток БСО (24 ч в концентрации 10, 50 и 100 мкМ; 72 ч – в концентрации 50, 100 мкМ) увеличивала образование АФК. При этом БСО в концентрации 500 мкМ снижал жизнеспособность клеток при всех сроках воздействия. Относительное количество CAR возрастало при обработке клеток БСО (50 и 100 мкМ) в течение 24 ч, в концентрации 10, 50 мкМ в течение 72 ч. Количество PXR повышалось при инкубации с БСО 50 мкМ – в течение 72 ч, а при 100 и 500 мкМ в течение и 24, и 72 ч. Установлено, что совместное применение БСО (24 ч, 50 мкМ; 10 и 50 мкМ, 72 ч) и глутатиона подавляет индукцию CAR, тогда как воздействие БСО в концентрации 50 и 100 мкМ в течение 72 ч подавляло продукцию PXR. Внесение 1 мМ глутатиона в среду культивирования клеток вместе с БСО (100 и 500 мкМ (24 ч) и 500 мкМ (72 ч)) не влияло на относительное количество PXR, а на количество CAR – при концентрации 100 мкМ (24 ч) и 50 и 100 мкМ (72 ч). Таким образом, БСО может как индуцировать продукцию CAR и PXR за счет повышения уровня свободных радикалов и развития окислительного стресса, так и действовать как ксенобиотик.

Ключевые слова: конститутивный рецептор андростана, X-рецептор прегнана, DL-бутионинсульфоксими́н, клетки линии Saso-2

DOI: 10.31857/S0026898423050026, **EDN:** XVODRS

ВВЕДЕНИЕ

Конститутивный рецептор андростана (CAR; NR113) и X-рецептор прегнана (PXR; NR112, SXR и PAR) являются ядерными рецепторами и ключевыми регуляторами генов ферментов, катализирующих реакции биотрансформации и экскреции эндо- и ксенобиотиков [1].

CAR и PXR участвуют в регуляции метаболических процессов, включая углеводный, липид-

ный и энергетический обмен. Доказано, что CAR и PXR активируют экспрессию цитохромов P450 (изоформы CYP 3A4, CYP 2A6, CYP2Cs, CYP 2B), ферментов фазы II биотрансформации ксенобиотиков (глутатион-S-трансфераза, сульфотрансфераза, UDP-глюкуронозилтрансфераза), белков-транспортёров (белок множественной лекарственной устойчивости 1, Р-гликопротеин) [2–5], а также ферментов углеводного и липидного обмена [6, 7].

Механизмы регуляции CAR и PXR активно изучаются. Уровень этих рецепторов в клетке зависит от экспрессии их генов [8], а также от посттрансляционной модификации (фосфорилирование [9], убиквитинирование [10]) и белок-белковых взаимодействий [11].

Сокращения: АФК – активные формы кислорода; БСО – DL-бутионинсульфоксими́н; Saso-2 – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека; CAR – конститутивный рецептор андростана; CYP – цитохром; GSH – глутатион; Nrf2 – фактор эритроидного происхождения 2; PXR – X-рецептор прегнана; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид.

Ранее нами было показано, что развитие окислительного стресса (ОС) приводит к увеличению количества CAR и PXR [12, 13]. Индукция синтеза опосредовалась малоновым диальдегидом и не зависела от фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) [14]. В условиях нитрозативного стресса, вызванного нитрозоглутатионом, индукция CAR регулируется через сигнальный путь NO-cGMP, а при повышении концентрации донора оксида азота(II) – за счет битирозина, продукта нитрозативного стресса [15].

Глутатионзависимая регуляция CAR и PXR остается слабо изученной. Ключевую роль в синтезе глутатиона и поддержании его уровня в клетках играет γ -глутамилцистеин-синтетаза, селективным ингибитором которой является DL-бутионинсульфоксимин (BCO) [16].

Нами изучено влияние и механизм воздействия BCO на относительное количество CAR и PXR в клетках Caco-2 *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследование выполнено на линии клеток Caco-2 (клетки аденокарциномы ободочной кишки человека), полученной из Института цитологии РАН (Санкт-Петербург).

Клетки линии Caco-2 культивировали при 37°C и 5% CO₂ в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) (“Sigma-Aldrich”, Германия), содержащей L-глутамин (4 мМ), 15% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 100 ед./мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина соответственно. После достижения 70–90% монослоя клетки снимали с поверхности флакона, добавляя раствор трипсин-EDTA (0.25% трипсина и 0.2% EDTA, “Sigma-Aldrich”) и высевали в 6- и 96-луночные планшеты (“Corning”, США). Клетки культивировали в течение 21 сут, поскольку на данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки.

В ходе эксперимента клетки линии Caco-2 инкубировали в питательной среде с добавлением BCO в концентрации 1–500 мкМ в течение 24 и 72 ч.

В качестве контроля использовали интактные клетки, которые инкубировали в питательной среде с добавлением воды для инъекций (растворитель BCO). На следующем этапе исследования для уточнения эффекта ОС или прямого воздействия BCO корректировали дефицит синтеза глутатиона. В питательную среду клеток одновременно с добавлением BCO вносили восстановленный глутатион (“Sigma-Aldrich”) в концентрации 1 мМ и инкубировали в течение 24 и 72 ч [17]. При экспозиции в течение 72 ч смену питательной среды

проводили каждые 24 ч. Каждый эксперимент выполняли в трех повторностях ($n = 3$).

Содержание небелковых SH-групп в лизате клеток определяли по методу Элмана с 5,5'-дитиобис-2-нитробензойной кислотой (DTNB) [19]. Пробу предварительно смешивали с охлажденной 5%-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ, “Химмед”, Россия), инкубировали на льду в течение 15 мин, затем центрифугировали при 11000 g (CM-50, “Eppendorf”, Германия) в течение 5 мин при 4°C. Полученный супернатант нейтрализовали с помощью 1%-ого NaOH и использовали для анализа. К 100 мкл супернатанта добавляли 100 мкл 2 мМ DTNB (“Serva”, Германия) в 1 М Трис-HCl-буфере (pH 8.0) и 1000 мкл дистиллированной воды. После экспозиции в течение 30 мин определяли содержание 5-тио-2-нитробензойной кислоты при 412 нм на фотометре Stat Fax 2100 (“Awareness Technology”, США). Концентрацию SH-групп рассчитывали, используя коэффициент экстинкции $\lambda_{412} = 13.6 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [20], и выражали в мкмоль/мг белка.

Гиперпродукцию активных форм кислорода (АФК) под действием BCO подтверждали с помощью флуоресцентных зондов MitoTracker Red CM-H₂XRos (“Invitrogen”, США). Восстановленный дигидро-Х-розамин проникает в живые клетки и окисляется АФК с образованием флуоресцентного зонда, который связывается с тиоловыми группами в митохондриях. Таким образом, по интенсивности флуоресценции можно судить об уровне АФК в клетке. После инкубации клетки снимали с поверхности 6-луночных планшетов раствором трипсин-EDTA и лизировали 0.2%-ным раствором Triton X-100 (“Sigma-Aldrich”). Уровень АФК в лизате клеток оценивали количественно по степени флуоресценции ($\lambda_{\text{ext}} = 579 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{em}} = 599 \text{ нм}$) с помощью спектрофлуориметра (Shimadzu RF-6000) и пересчитывали на количество клеток (счетчик и анализатор жизнеспособности клеток Countess 3 Automated Cell Counter, США). Работу с флуоресцентными зондами проводили согласно инструкции к набору (<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M22426>).

Оценка выживаемости клеток (цитотоксическое действие BCO), МТТ-тест. Клетки Caco-2 культивировали в 96-луночном планшете. После экспозиции с тестируемым веществом в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 20 мкл 0.5%-ого раствора МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1%-ого раствора диметилсульфоксида (“ПанЭко”, Россия) [18]. Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (“Awareness Technology”).

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.

Приготовление полных клеточных лизатов. Лизаты клеток готовили после окончания экспозиции с тестируемыми веществами. Для этого клетки снимали с лунок раствором трипсин-EDTA (0.25% трипсин и 0.2% EDTA, “Sigma-Aldrich”), трижды промывали раствором фосфатного буфера (“Bio-Rad”, США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (“Thermo Fisher Scientific”, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (гидрохлорид 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонилфторида, AEBSF) 2 мМ, апротинина 0.3 мкМ, бестатина 130 мкМ, EDTA 1 мМ, *транс*-эпоксисукцинил-*L*-лейциламидо(4-гуанидино)бутана (E-64) 14 мкМ, лейпептина 1 мкМ (“Sigma-Aldrich”) в течение 30 мин при +4°C и постоянном перемешивании из расчета 10^7 клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 5000 *g* (CM-50, “Eppendorf”). Супернатант использовали для проведения биохимических анализов.

Количественное определение белка. Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, “ThermoFisher”) [21].

Определение относительного количества CAR, PXR. Относительное количество CAR, PXR определяли методом вестерн-блоттинга. Белки клеточного лизата (20 мкг) подвергали электрофорезу с использованием 7.5% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (“Bio-Rad”) в буферной системе Laemmli (“Bio-Rad”). Образцы смешивали с буфером Laemmli (“Bio-Rad”), содержащим 50 мМ β-меркаптоэтанол (“Helicon”, США) в соотношении 3 : 1, инкубировали в течение 10 мин при 70°C. Электрофорез проводили при 100 В в течение 90 мин.

Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose, “Bio-Rad”) с использованием Mini Trans-Blot (“Bio-Rad”) в течение 10 мин при 25 В и 1.3 А.

Белки на мембране блокировали 1%-ным раствором Casein Blocker (“Bio-Rad”), содержащим 0.1% Tween-20 (“Sigma”), инкубируя в течение 1 ч и комнатной температуре.

CAR и PXR детектировали с использованием первичных моноклональных антител мыши (MB67 CAR Monoclonal Antibody, “Invitrogen”, США; MA5-31808 PXR Monoclonal Antibody 1D12G1, “Invitrogen”) в концентрации 1 : 200 в блокирующем растворе Casein blocker (“Bio-Rad”) в течение 2 ч при 37°C. Первичные антите-

ла визуализировали с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit-anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP, “Invitrogen”) в разведении 1 : 4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Хемилюминесценцию фиксировали с помощью ChemiDocXRS+ (“Bio-Rad”). Интенсивность полученных полос анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (“Bio-Rad”). Молекулярную массу CAR и PXR подтверждали, используя маркеры молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, “Bio-Rad”).

Содержание CAR и PXR оценивали по содержанию белка домашнего хозяйства GAPDH (глицеральдегид-фосфат-дегидрогеназа) (первичные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 (“Invitrogen”), разведение 1 : 1000; вторичные кроличьи антитела – Rabbit-anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP (“Invitrogen”), разведение 1 : 4000).

Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение ($M \pm SD$). Статистическую значимость различий оценивали с помощью дисперсионного анализа (ANOVA), попарные сравнения выполняли с использованием теста Даннетта. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе исследования оценивали уровень небелковых SH-групп, основным источником которых служит глутатион, в клетках линии Сасо-2, подвергнутых воздействию БСО.

Воздействие БСО (ингибитор γ-глутамилцистеин-синтетазы) в концентрации 10, 50, 100 и 500 мкМ приводило к снижению содержания небелковых SH-групп в течение 24 ч на 40.71% ($p = 0.002$); 57.6% ($p = 0.0004$); 67.8% ($p = 0.0002$) и 55.9% ($p = 0.0004$), а при воздействии в течение 72 ч – на 31.96% ($p = 0.007$); 48.36% ($p = 0.0006$); 62.29% ($p = 0.0002$) и 57.4% ($p = 0.0002$) соответственно (табл. 1).

Снижение уровня небелковых SH-групп приводило к повышению продукции АФК.

Так, БСО (10, 50, 100 мкМ в течение 24 ч) повышал интенсивность флуоресценции клеток Сасо-2, окрашенных Mitotracker Red CM-H₂XRos на 38.8% ($p = 0.001$), 46.5% ($p = 0.0004$) и 70.2% ($p = 0.0001$), соответственно, по сравнению

Таблица 1. Концентрация небелковых SH-групп в лизате клеток линии Сасо-2, обработанных БСО и БСО в сочетании с глутатионом

БСО, мкМ	SH-группы, мкмоль/мг белка			
	БСО	БСО + глутатион	БСО	БСО + глутатион
	24 ч		72 ч	
Контроль	0.118 ± 0.015	0.120 ± 0.017	0.122 ± 0.018	0.119 ± 0.025
1	0.120 ± 0.019	0.118 ± 0.014	0.134 ± 0.005	0.135 ± 0.009
5	0.117 ± 0.022	0.115 ± 0.013	0.119 ± 0.022	0.117 ± 0.022
10	0.070 ± 0.010**	0.117 ± 0.021	0.083 ± 0.013**	0.117 ± 0.010
50	0.050 ± 0.004***	0.115 ± 0.034	0.063 ± 0.002***	0.115 ± 0.014
100	0.038 ± 0.008***	0.118 ± 0.025	0.046 ± 0.008***	0.118 ± 0.019
500	0.052 ± 0.011***	0.119 ± 0.021	0.052 ± 0.012***	0.158 ± 0.023

Примечание. Концентрация глутатиона 1 мМ; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – статистически значимые отличия от показателей в контроле. Данные представлены как $M \pm SD$, $n = 3$.

с контролем (рис. 1а). При воздействии БСО в течение 72 ч и концентрации 50 и 100 мкМ интенсивность флуоресценции клеток Сасо-2 возрастала на 12.7% ($p = 0.026$) и 15.7% ($p = 0.007$), соответственно, по сравнению с контролем (рис. 1б). Обработка клеток БСО в концентрации 1–5 и 1–10 мкМ в течение 24 и 72 ч, соответственно, на уровень АФК не влияла [22].

При внесении в инкубационную среду с БСО в концентрации 10 мкМ (24 ч) и 50, 100 мкМ (24 и 72 ч) восстановленного глутатиона в концентрации 1 мМ уровень АФК не отличался от значений в контроле, интенсивность флуоресценции в среднем составила $93.5 \pm 6.7\%$.

Далее оценивали жизнеспособность клеток, принимая за 100% значения в контроле. Жизнеспособность клеток, инкубируемых с БСО в концентрации 1–100 мкМ в течение 24 и 72 ч, была такой же, как в контроле, а в присутствии 500 мкМ БСО снижалась на 23.9% ($p = 0.003$) и 30.1% ($p = 0.001$) соответственно (рис. 2).

Таким образом, БСО (10–500 мкМ) способствует снижению уровня глутатиона и выработке АФК, а в концентрации 500 мкМ приводит также к потере жизнеспособности клеток.

Воздействие БСО (24 ч, 50 и 100 мкМ) приводило к статистически значимому повышению относительного количества CAR – на 32.7% ($p = 0.0006$)

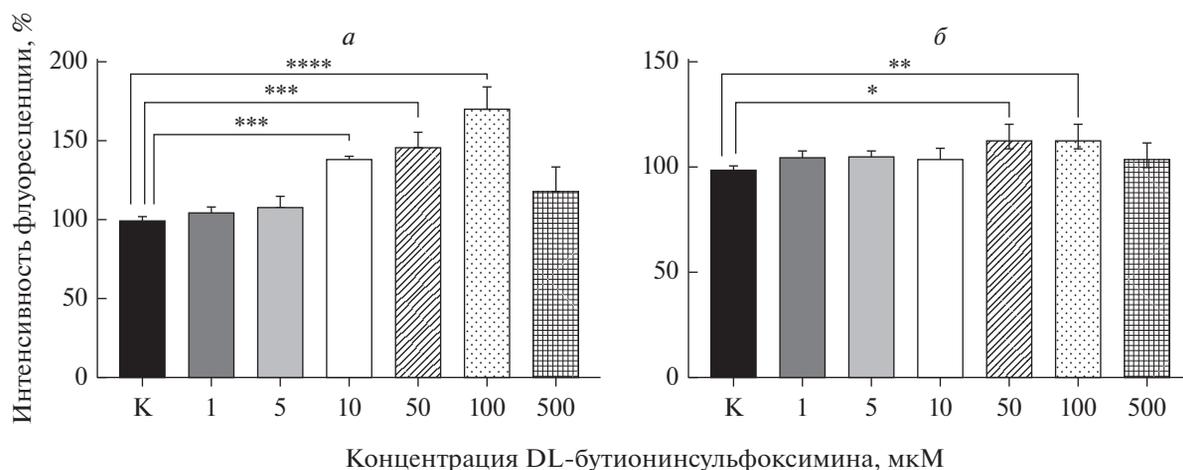


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции в лизате клеток, обработанных DL-бутионинсульфоксимином в концентрации 1–500 мкМ в течение 24 (а) и 72 ч (б). Клетки окрашены Mito tracker Red CM-H2 XROS. * $p < 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; **** $p < 0.0001$ – статистически значимые отличия от показателей в контроле.

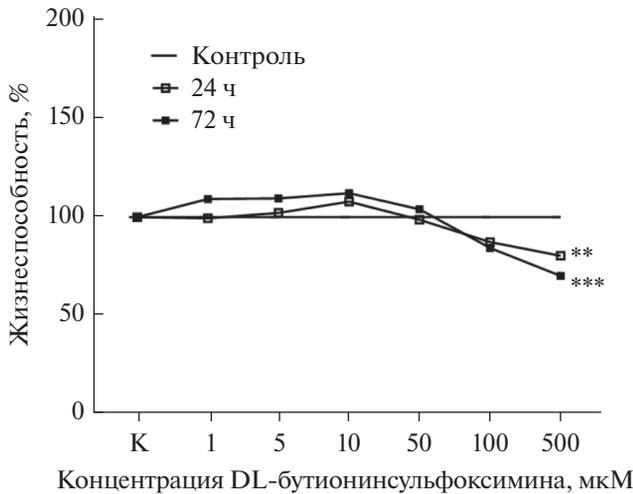


Рис. 2. Изменение жизнеспособности клеток линии Сасо-2 в зависимости от концентрации БСО при инкубации в течение 24 и 72 ч ($M \pm SD, n = 3$). ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ – статистически значимые отличия от показателей в контроле.

и 39.6% ($p = 0.0001$) соответственно (рис. 3а) по сравнению с контролем. Инкубация клеток с БСО в течение 72 ч и концентрации 10 и 50 мкМ приводила к увеличению относительного количества CAR на 24.9% ($p = 0.045$) и 43.3% ($p = 0.0007$) соответственно (рис. 3б).

Относительное количество PXR в клетках, инкубируемых с БСО в концентрации 100 и 500 мкМ в течение 24 ч, возрастало статистически значимо – на 33.6% ($p < 0.0001$) и 40.5% ($p < 0.0001$) соответственно (рис. 4а), а при инкубации в течение 72 ч и концентрации БСО 50, 100 и 500 мкМ – на 26.4% ($p = 0.047$), 41.5% ($p = 0.002$) и 36.5% ($p = 0.006$) (рис. 4б).

Для изучения механизмов индукции CAR и PXR под действием БСО, а также для уточнения активности БСО как ксенобиотика или как агента, вызывающего ОС, в качестве антиоксиданта использовали восстановленный глутатион.

Показано, что сочетанное воздействие БСО (50 мкМ) и глутатиона (1 мМ) в течение 24 ч не приводило к изменению относительного количества CAR по сравнению с контролем, тогда как при применении 100 мкМ БСО относительное количество CAR было на 43.1% ($p = 0.01$) выше, чем в контроле (рис. 5а).

Индукрующий эффект БСО в концентрации 10 мкМ и инкубации в течение 72 ч подавлялся глутатионом – относительное количество CAR не отличалось от значений в контроле. Совместное применение глутатиона и БСО (50 и 100 мкМ) приводило к повышению относительного количества CAR – на 26.7% ($p = 0.04$) и 46.7% ($p = 0.03$) (рис. 5б).

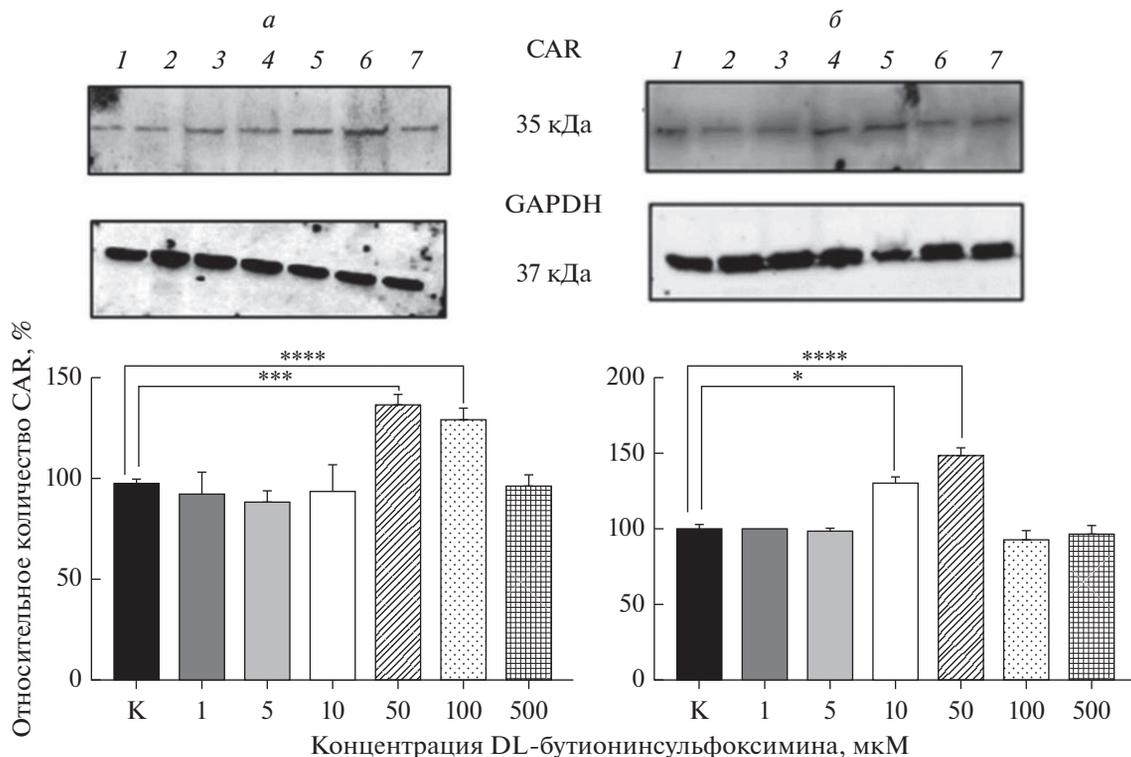


Рис. 3. Относительное количество CAR в клетках линии Сасо-2 в норме (1) и при воздействии DL-бутионинсульфоксида в концентрации 1–500 мкМ (2–7) в течение 24 (а) и 72 ч (б). ($M \pm SD, n = 3$). * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$ – статистически значимые отличия от показателей в контроле.

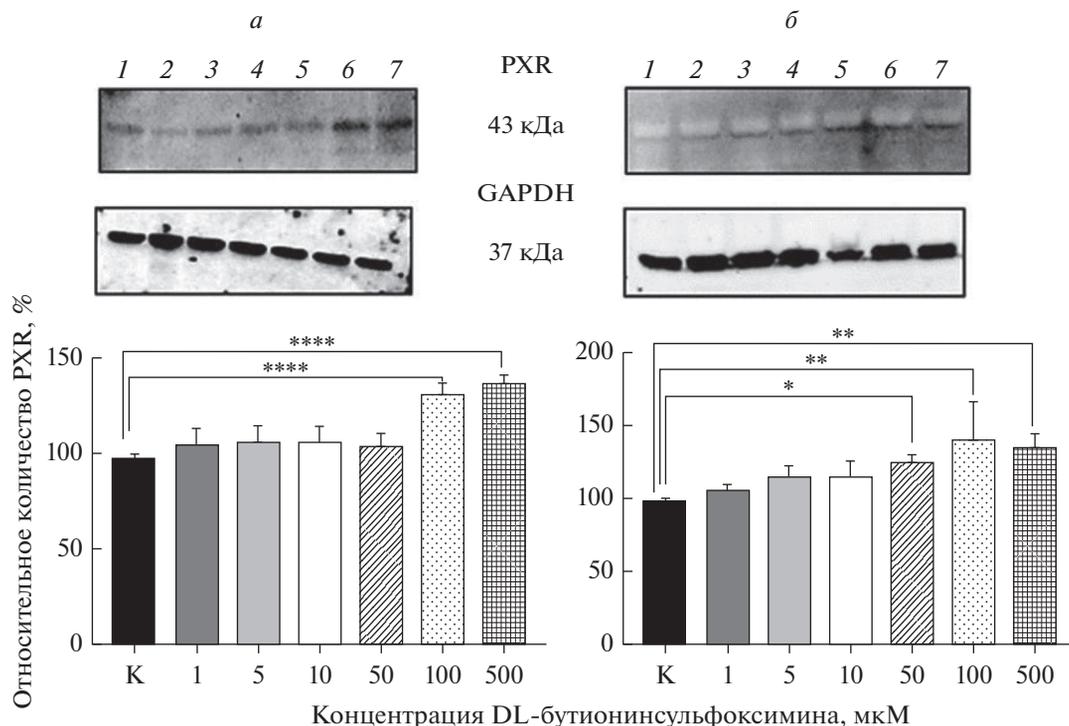


Рис. 4. Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 в норме (1) и при воздействии DL-бутионинсульфокси-мина в концентрации 1–500 мкМ (2–7) в течение 24 (а) и 72 ч (б). ($M \pm SD$, $n = 3$). * $p < 0.05$; ** $p \leq 0.01$; **** $p \leq 0.0001$ – статистически значимые отличия от показателей в контроле.

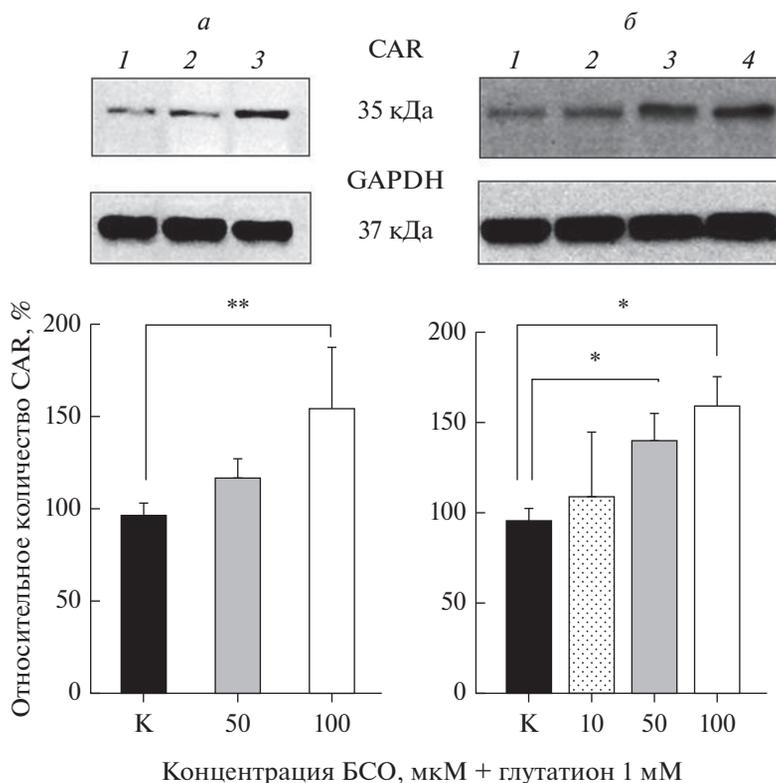


Рис. 5. Относительное количество CAR в клетках линии Сасо-2 в норме (1) и при сочетанном применении глутатиона (1 мМ) и DL-бутионинсульфокси-мина (БСО) в концентрации 10 (б, 2), 50 (а, 2; б, 3) и 100 (а, 3; б, 4) мкМ в течение 24 (а) и 72 ч (б). ($M \pm SD$, $n = 3$). * $p < 0.05$; ** $p \leq 0.01$ – статистически значимые отличия от показателей в контроле.

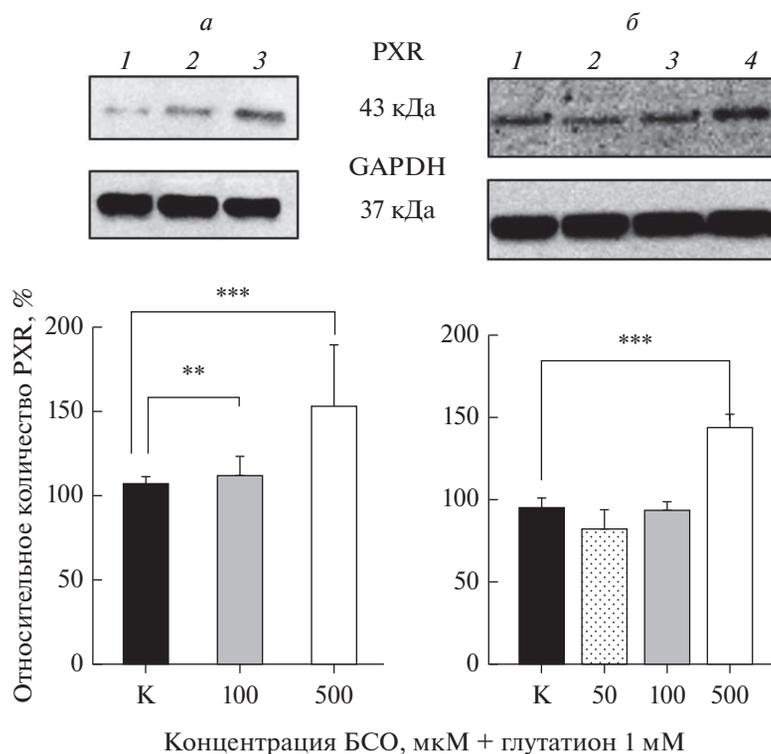


Рис. 6. Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 в норме (1) и при сочетанном применении глутатиона (1 мМ) и DL-бутионинсульфоксиима (БСО) в концентрации 50 (б, 2), 100 (а, 2; б, 3) и 500 (а, 3; б, 4) мкМ в течение 24 (а) и 72 ч (б). ($M \pm SD$, $n = 3$). ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$ – статистически значимые отличия от показателей в контроле.

Индукция PXR не подавлялась при воздействии БСО (100 и 500 мкМ, 24 ч) в присутствии глутатиона – относительное количество рецептора возрастало на 20.9% ($p = 0.001$) и 27.3% ($p = 0.0002$), соответственно, по сравнению со значениями в контроле (рис. 6а). Однако стоит отметить, что в присутствии антиоксиданта относительное количество PXR стало ниже, чем в клетках, которые обрабатывали только БСО – на 12.7% ($p = 0.02$) и 13.2% ($p = 0.02$).

Способность БСО в концентрации 50 и 100 мкМ и воздействии в течение 72 ч увеличивать количество CAR и PXR в клетках линии Сасо-2 подавлялась глутатионом. Но при совместном действии БСО (500 мкМ) и глутатиона относительное количество PXR возрастало на 49.4% ($p = 0.001$) по сравнению с контролем (рис. 6б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Глутатион – основной небелковый тиол, содержащийся в клетках и играющий важную роль в защитных механизмах, действует как антиоксидант или вступает в реакции с электрофильными соединениями [23]. Глутатион может реагировать со многими токсичными агентами с образованием конъюгатов [24, 25].

Концентрация глутатиона в клетке поддерживается несколькими механизмами, основными из которых являются синтез глутатиона *de novo* и восстановление дисульфида глутатиона глутатионредуктазой при участии $NADPH_2$. *De novo* глутатион синтезируется из глутамата, цистеина и глицина посредством двух последовательных АТФ-зависимых реакций, катализируемых γ -глутамилцистеин-синтетазой и глутатионсинтазой [23].

Глутатион синтезируется только в цитозоле, откуда он проникает в остальные компартменты клеток. Известны три варианта транспорта глутатиона: внутриклеточный, межклеточный и межорганный. Внеклеточный глутатион подвергается гидролизу до аминокислот, которые транспортируются в клетку и используются для синтеза антиоксиданта [26].

Ингибирование γ -глутамилцистеин-синтетазы с помощью БСО приводит к снижению синтеза глутатиона и, как следствие, к истощению антиоксидантной защиты клетки, что часто применяют в качестве методического подхода при моделировании окислительного стресса [16, 27].

Использование БСО в качестве специфического ингибитора синтеза глутатиона имеет преимущества перед другими глутатион-истощающими агентами, действующими как конкурентные

субстраты глутатионтрансфераз, такие как N-этил-малеимид, йодацетат, 2-йодацетамид. В отличие от них, БСО не влияет на активность цитохрома P-450 и на оксидазную активность ферментов [27]. Таким образом, БСО представляет собой удобный агент для снижения уровня глутатиона и моделирования эндогенного ОС.

В настоящем исследовании показано, что воздействие БСО в концентрации 10–500 мкМ в течение 24 и 72 ч вызывает снижение уровня небелковых SH-групп, что свидетельствует о снижении концентрации глутатиона внутри клеток. При этом БСО в концентрации 500 мкМ не усиливало снижение концентрации глутатиона, что, видимо, свидетельствует о достижении максимального ингибирования γ -глутамилцистеин-синтетазы.

Снижение уровня глутатиона под действием БСО приводило к повышению уровня АФК, что при максимальной концентрации ингибитора γ -глутамилцистеин-синтетазы проявлялось в снижении жизнеспособности клеток. Внесение в питательную среду глутатиона нивелировало эти изменения.

На фоне таких изменений относительное количество CAR возрастало в присутствии 50 и 100 мкМ БСО и длительности воздействия 24 ч, а также 10, 50 мкМ БСО в течение 72 ч. Относительное количество PXR также повышалось в присутствии 100 и 500 мкМ БСО и инкубации в течение 24 ч; 50, 100 и 500 мкМ БСО в течение 72 ч.

При нивелировании ОС глутатионом (воздействие 24 ч, 50 мкМ БСО; экспозиция 72 ч, 10 и 50 мкМ БСО) продукция CAR была в норме, т.е. подавлялся индуцирующий эффект БСО. Важно отметить, что индукция CAR продолжалась при инкубации клеток в течение 24 ч со 100 мкМ БСО, что, вероятно, связано с самостоятельным эффектом БСО как ксенобиотика.

Индукция PXR подавлялась при внесении глутатиона в среду с БСО (50 и 100 мкМ) и инкубации в течение 72 ч, что свидетельствует об опосредованном действии БСО – через развитие ОС.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что индукция экспрессии изучаемых транскрипционных факторов может быть обусловлена развитием ОС. Ранее нами было показано, что продукты пероксидации – малоновый диальдегид и карбонильные производные белков – способны индуцировать продукцию CAR и PXR [12, 13]. Именно поэтому подавление развития ОС способствовало нормализации уровня этих рецепторов.

Представленные результаты показывают, что CAR и PXR по-разному отвечают на воздействие ингибитора γ -глутамилцистеин-синтетазы. Так, относительное количество CAR возрастало в присутствии БСО (50 мкМ, 24 ч и 10 мкМ, 72 ч), тогда как относительное количество PXR в этих усло-

виях не изменялось. Стоит отметить, что БСО в концентрации 100 мкМ (24 ч) и 50 мкМ (72 ч) вызывал повышение относительного количества CAR и PXR, но количество PXR повышалось в меньшей степени.

Культивирование клеток Caco-2 в среде, содержащей глутатион и БСО в концентрации 500 мкМ в течение 72 ч, не повлияло на продукцию PXR, как и культивирование в присутствии 100 мкМ (24 ч), 50 и 100 мкМ БСО в течение 72 ч – на CAR. Следовательно, БСО в указанных концентрациях и при данных условиях выступает в качестве ксенобиотика и индуцирует продукцию рецепторов CAR и PXR.

Собственный эффект БСО как ксенобиотика может, по-видимому, проявляться и на фоне ОС. Так, например, в присутствии БСО (100 и 500 мкМ, 24 ч) и антиоксиданта уровень индукции PXR был ниже, чем при воздействии только БСО.

В качестве индукторов CAR и PXR могут выступать многие эндобиотики, в том числе стероиды (андростаны, эстрогены и прогестины), желчные кислоты, метаболиты холестерина, а также пестициды, пищевые флавоноиды и полифенолы, полученные из спирта [28]. Стоит отметить, что не установлены общие признаки индукторов орфанных рецепторов, к которым относятся CAR и PXR, а механизм действия индукторов может быть как прямым, так и косвенным. Прямой механизм характерен для веществ, способных проникать в ядро, что не типично для БСО, поэтому механизм его действия можно отнести скорее к опосредованному (косвенному).

Таким образом, БСО вызывает индукцию CAR и PXR, причем делает это двумя разными способами: в низких концентрациях преимущественно за счет снижения уровня глутатиона и развития ОС, а в высоких БСО действует непосредственно как ксенобиотик.

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gao J., Xie W. (2010) Pregnane X receptor and constitutive androstane receptor at the crossroads of drug metabolism and energy metabolism. *Drug. Metab. Dispos.* **38**(12), 2091–2095.
2. Lemmen J., Tozakidis I.E.P., Bele P., Gala H. (2013) Constitutive androstane receptor upregulates Abcb1

- and Abcg2 at the blood–brain barrier after CITCO activation. *Brain Res.* **1501**, 68–80.
3. Slosky L.M., Thompson B.J., Sanchez-Covarrubias L., Zhang Y., Laracuenta M.L., Vanderah T.W., Ronaldson P.T., Davis T.P. (2013) Acetaminophen modulates P-glycoprotein functional expression at the blood–brain barrier by a constitutive androstane receptor-dependent mechanism. *Mol. Pharmacol.* **84**(5), 774–786.
 4. Li Y., Wang Q., Yao X., Li Y. (2010) Induction of *CYP3A4* and *MDR1* gene expression by baicalin, baicalein, chlorogenic acid, and ginsenoside Rf through constitutive androstane receptor- and pregnane X receptor-mediated pathways. *Eur. J. Pharmacol.* **640**(1–3), 46–54.
 5. Daujat-Chavanieu M., Gerbal-Chaloin S. (2020) Regulation of CAR and PXR expression in health and disease. *Cells.* **9**, 2395.
 6. Yang H., Wang H. (2014) Signaling control of the constitutive androstane receptor (CAR). *Protein Cell.* **5**(2), 113–123.
 7. Lynch C., Pan Y., Li L., Heyward S., Moeller T., Swaan P.W., 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.
 8. Scopino K., Dalgarno C., Nachmanoff C., Krizanc D., Thayer K.M., Weir M.P. (2021) Arginine methylation regulates ribosome CAR function. *Int. J. Mol. Sci.* **22**(3), 1335.
 9. 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.
 10. Chen T., Laurenzana E.M., Coslo D.M., Chen F., Omiecinski C.J. (2014) Proteasomal interaction as a critical activity modulator of the human constitutive androstane receptor. *Biochem. J.* **458**(1), 95–107.
 11. 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.
 12. Шулькин А.В., Абаленихина Ю.В., Сеидкулиева А.А., Рябков А.Н., Якушева Е.Н. (2021) Индукция конститутивного андростанового рецептора при развитии окислительного стресса. *Бюлл. экп. биологии и медицины.* **171**(5), 588–591.
 13. Абаленихина Ю.В., Судакова Е.А., Слепнев А.А., Сеидкулиева А.А., Ерохина П.Д., Шулькин А.В., Якушева Е.Н. (2022) Функционирование прегнан X рецептора в условиях окислительного стресса. *Биол. мембраны.* **39**(2), 107–115.
 14. Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Сеидкулиева А.А., Правкин С.К., Якушева Е.Н. (2022) Регуляция конститутивного андростанового рецептора в клетках линии Сасо-2 при моделировании окислительного стресса *in vitro*. *Биомед. химия.* **68**(4), 297–301.
 15. Абаленихина Ю.В., Судакова Е.А., Сеидкулиева А.А., Шулькин А.В., Якушева Е.Н. (2022) Влияние донора оксида азота S-нитрозоглутатиона на экспрессию конститутивного андростанового рецептора. *Журн. эволюционной биохимии и физиологии.* **58**(5), 1341–1352.
 16. Haddad J.J. (2001) L-Buthionine-(S,R)-sulfoximine, an irreversible inhibitor of gamma-glutamylcysteine synthetase, augments LPS-mediated pro-inflammatory cytokine biosynthesis: evidence for the implication of an IkappaB-alpha/NF-kappaB insensitive pathway. *Eur. Cytokine.* **12**(4), 614–624.
 17. Rao R.K., Li L., Baker R.D., Baker S.S., Gupta A. (2000) Glutathione oxidation and PTPase inhibition by hydrogen peroxide in Caco-2 cell monolayer. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **279**(2), 332–340.
 18. Tolosa L., Donato M.T., Gómez-Lechón M.J. (2015) General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay. *Methods Mol. Biol.* **1250**, 333–348.
 19. Boschi-Muller S, Azza S., Sanglier-Cianferani S., Tal-fourrier F., Van Dorsselaar A., Branlant G. (2000) A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**(46), 35908–35913.
 20. Ellman G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.* **82**(1), 70–77.
 21. Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Anal. Biochem.* **7**(72), 248–254.
 22. Абаленихина Ю.В., Шулькин А.В., Мьельников П.Ю., Рокунов Е.Д., Якушева Е.Н. (2022) Механизмы регуляции Р-гликопротеина в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*. *Acta Naturae.* **14**(3), 69–78.
 23. Forman H.J., Zhang H., Rinna A. (2009) Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* **30**(1–2), 1–12.
 24. Usta M., Wortelboer H.M., Vervoort J., Boersma M.G., Rietjens I.M., van Bladeren P.J., Cnubben N.H. (2007) Human glutathione S-transferase-mediated glutathione conjugation of curcumin and efflux of these conjugates in Caco-2 cells. *Chem. Res. Toxicol.* **20**(12), 1895–1902.
 25. Schumacher F., Neuber C., Finke H., Nieschalke K., Baesler J., Gulbins E., Kleuser B. (2017) The sphingosine 1-phosphate breakdown product, (2E)-hexadecenal, forms protein adducts and glutathione conjugates *in vitro*. *J. Lipid Res.* **58**(8), 1648–1660.
 26. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. (2009) Система глутатиона I. Синтез, транспорт, глутатион-трансферазы, глутатионпероксидазы. *Биомед. химия.* **55**(3), 255–277.
 27. Drew R., Miners J.O. (1984) The effects of buthionine sulphoximine (BSO) on glutathione depletion and xenobiotic biotransformation. *Biochem. Pharmacol.* **33**(19), 2989–2994.
 28. Cherian M.T., Chai S.C., Chen T. (2015) Small-molecule modulators of the constitutive androstane receptor. *Exp. Opin. Drug Metab. Toxicol.* **11**(7), 1099–1114.

Mechanism of Bimodal Effect of DL-Butyonine Sulfoximine of Constitutive Androstane and Pregnane X Receptors *in vitro*

Y. V. Abalenikhina^{1, *}, A. V. Shchulkin¹, A. A. Seidkulieva¹, E. D. Rokunov¹,
F. T. Gadzhieva¹, and E. N. Yakusheva¹

¹Ryazan State Medical University, Ryazan, 390026 Russia

*e-mail: abalenikhina88@mail.ru

The constitutive androstane receptor (CAR) and the pregnane X receptor (PXR) are nuclear receptors that are involved in the regulation of gene transcription of enzymes responsible for biotransformation and excretion of endo- and xenobiotics. The aim of the study was to study the effect of DL-butyronine sulfoximine (BSO, gamma-glutamylcysteine synthetase inhibitor) on the relative amount of CAR and PXR in Caco-2 cells and to evaluate its mechanisms. BSO was used in concentrations of 1–500 μM and exposure duration of 24 and 72 h. The generation of reactive oxygen species (ROS) was determined using MitoTracker Red CM-H2 XROS fluorescent probes. Cytotoxicity was analyzed according to the results of the MTT test. The relative amount of CAR and PXR was estimated by the Western blot method. It was shown that BSO caused an increase in the formation of ROS at exposure duration of 24 h at concentrations of 10, 50 and 100 μM , at 72 h – at concentrations of 50, 100 μM . At the same time, at a concentration of 500 μM , BSO reduced the viability of cells during all periods of exposure. The relative amount of CAR increased at BSO concentrations of 50, 100 μM and exposure duration of 24 hours and 10, 50 μM at exposure of 72 h, and PXR – at concentrations of 100 and 500 μM and incubation of 24 h and 50, 100, 500 μM and incubation of 72 h. When used together with BSO, glutathione, the synthesis of which it blocks, it was found that at exposure time of 24 h and BSO concentrations of 50 μM and 72 h and concentrations of 10 and 50 μM , CAR induction was suppressed, and at 50 and 100 μM and exposure time of 72 h – PXR. The introduction of glutathione into the nutrient medium with BSO had no effect on PXR at xenobiotic concentrations of 100 and 500 μM (24 h) and 500 μM (72 h), on CAR – at concentrations of 100 μM (24 h) and 50 and 100 μM (72 h). Thus, BSO can induce CAR and PXR both by increasing the production of free radicals and the development of oxidative stress, and independently as a xenobiotic.

Keywords: constitutive androstane receptor, pregnane X receptor, DL-butyronine sulfoximine, Caco-2 cells