

УДК 577.122:615.355

# Механизмы регуляции Р-гликопротеина в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*

Ю. В. Абаленихина\*, А. В. Щулькин, П. Ю. Мыльников, Е. Д. Рокунов, Е. Н. Якушева  
Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова  
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Рязань, 390026 Россия

\*E-mail: abaleniuhina88@mail.ru

Поступила в редакцию 28.06.2022

Принята к печати 11.08.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11759

**РЕФЕРАТ** На клетках линии Сасо-2 изучены механизмы регуляции белка-транспортера Р-гликопротеина (Pgp) в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса (ОС). Экзогенный ОС моделировали, добавляя в питательную среду пероксид водорода в концентрации 0,1, 0,5 и 1 мкМ на 24 ч и 10 мкМ на 72 ч. Эндогенный ОС моделировали, инкубируя клетки с DL-бутионинсульфоксимином (БСО, ингибитор  $\gamma$ -глутамилцистеин-синтетазы) в концентрации 10, 50 и 100 мкМ в течение 24 ч. Уровень внутриклеточных активных форм кислорода оценивали с помощью флуоресцентных зондов MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub> XRos, относительное количество Pgp анализировали методом вестерн-блоттинга. Показано, что развитие экзогенного и эндогенного ОС приводит к увеличению относительного количества Pgp. С использованием специфических ингибиторов установлена важная роль сигнального пути Nrf2-Keap1 в повышении количества Pgp в условиях моделирования экзогенного ОС пероксидом водорода. Транскрипционный фактор HIF1 участвует в регуляции количества Pgp в условиях 24-часового экзогенного ОС, а транскрипционный фактор CAR – при 72-часовом ОС, PXR, видимо, не вносит существенного вклада в регуляцию белка-транспортера в данной модели. В условиях эндогенного ОС все протестированные транскрипционные факторы и сигнальные пути участвуют в индукции Pgp. Скорее всего, это связано с бимодальным влиянием БСО на Pgp. С одной стороны, БСО вызывает развитие ОС, с другой, будучи ксенобиотиком, может стимулировать PXR и CAR, которые, в свою очередь, повышают количество Pgp.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** Р-гликопротеин, окислительный стресс, вестерн-блоттинг, клетки линии Сасо-2, Nrf2, HIF1a, CAR, PXR.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АФК – активные формы кислорода; БСО – DL-бутионинсульфоксимиин; ОС – окислительный стресс; CAR – конститутивный андростановый рецептор; HIF1a – фактор 1a, индуцируемый гипоксией; Nrf2 – ядерный фактор эритроидного происхождения 2; PXR – X-рецептор прегнана; Pgp – Р-гликопротеин.

## ВВЕДЕНИЕ

Р-гликопротеин (Pgp, ABCB1) – продукт гена множественной лекарственной устойчивости (*MDR1*) – АТР-зависимый белок-транспортер, локализованный на цитоплазматических мембранах энтероцитов кишечника, гепатоцитов, эпителиальных клеток почечных канальцев, эндотелиальных клеток гистоматических барьеров [1].

Pgp обладает широкой субстратной специфичностью и работает как транспортер оттока, ограничивая проникновение в клетку веществ, служащих его субстратами, таких, как противоопухолевые, гипотензивные, антигистаминные лекарственные средства, сердечные гликозиды, антиагреганты,

антикоагулянты, стероидные и тиреоидные гормоны, антибиотики, ингибиторы протеиназы ВИЧ, иммунодепрессанты. Учитывая эти свойства, принято считать, что Pgp играет важную роль в защите опухолевых клеток от цитостатиков (формирование множественной лекарственной устойчивости опухоли), в ограничении транспорта субстратов в ткани плода и забарьерные органы (головной мозг, тестикулы), а также участвует в фармакокинетике (всасывании, распределении, выведении) лекарственных веществ [2, 3].

Активность и экспрессия Pgp могут изменяться под воздействием ряда веществ и факторов. Например, изменение экспрессии Pgp наблюдается

в гематоэнцефалическом барьере при неврологических (эпилепсия) заболеваниях [4] и в клетках рака желудка, остеосаркомы [5, 6].

Окислительный стресс (ОС) – типовой патологический процесс, возникающий в результате сдвига баланса между оксидантами и антиоксидантами в пользу оксидантов, что приводит к нарушению окислительно-восстановительной сигнализации и контроля и/или к повреждению биомолекул [7]. ОС играет важную роль в патогенезе широкого спектра заболеваний, включая сердечно-сосудистые, онкологические, бронхолегочные, офтальмологические и т.д. [8]. Показано, что инкубация культуры гепатоцитов крысы с  $H_2O_2$  (0.5–1 мМ, 72 ч) вызывает повышение экспрессии гена *Pgp*, количества и активности кодируемого им белка-транспортера [9]. Установлено также, что воздействие  $H_2O_2$  в концентрации до 500 мкМ в течение 48 ч на первичную культуру клеток эндотелия крыс приводит к повышению экспрессии *Pgp* и в меньшей степени влияет на активность белка-транспортера [10]. В то же время обработка клеток hCMC/D3 (модель гематоэнцефалического барьера *in vitro*)  $H_2O_2$  (0.5–5 мМ, 20 мин) снижает транспортную активность *Pgp* [11]. На культуре эндотелиальных клеток сосудов головного мозга крыс показано, что  $H_2O_2$  в концентрации 200 мкМ вызывает развитие ОС и повышает экспрессию мРНК генов *mdr1a* и *mdr1b*, кодирующих *Pgp*, а также синтез самого белка *Pgp*. Предварительная обработка клеток полиэтиленгликоль-каталазой нивелировала данные изменения [12]. Воздействие ингибитора каталазы 3-амино-1,2,4-триазола (2–4 мМ в течение 72 ч или 10 мМ, 1 ч) на гепатоциты крысы приводило к усилению экспрессии мРНК *mdr1b* и *Pgp* [9]. Напротив, антиоксиданты (1 мМ аскорбат, 10 мМ маннит) заметно подавляли экспрессию мРНК *mdr1b* и избыточную экспрессию *Pgp* [13, 14]. Культивирование клеток Caco-2 в среде, содержащей 1 мкмоль/л  $H_2O_2$ , повышало экспрессию в них *Pgp*, тогда как  $H_2O_2$  в концентрации 10 ммоль/л приводила к снижению экспрессии транспортера [15].  $H_2O_2$  усиливал экспрессию *Pgp* в митохондриях клеток D407 (эпителиальный сегмент сетчатки), в то время как антиоксиданты ее подавляли [16].

В исследованиях, выполненных в нашей лаборатории на клетках линии Caco-2, показано, что кратковременное (3 ч) воздействие  $H_2O_2$  в концентрации 10 и 50 мкМ приводило к понижению активности *Pgp*, а в концентрации 100 мкМ – еще и к снижению количества белка-транспортера. Увеличение длительности экспозиции до 24 и 72 ч выявило индукцию *Pgp* при низких концентрациях  $H_2O_2$  (0.1–1 мкМ, 24 ч и 10 мкМ, 72 ч), а также

снижение количества и активности *Pgp* при повышении концентрации  $H_2O_2$  до 100 мкМ и выше [17].

Таким образом, в большинстве исследований показано, что воздействие прооксидантов повышает экспрессию и активность *Pgp*, которые могут подавляться при срыве адаптационных процессов и развитии декомпенсированного ОС.

Считается, что снижение количества *Pgp* в условиях ОС связано с повреждением молекулы белка-транспортера активными формами кислорода (АФК), однако механизмы повышения экспрессии *Pgp* не установлены. Предполагается, что в этом процессе могут участвовать транскрипционные факторы Nrf2 и HIF1 [17, 18]. Цель нашей работы состояла в изучении механизмов регуляции *Pgp* при развитии ОС.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Культивирование клеток

В работе использовали линию клеток Caco-2 аденокарциномы ободочной кишки человека (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5% содержании  $CO_2$  в инкубаторе WS-189C (World Science, Корея) в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) с добавлением L-глутамин (4 мМ), 15% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ед./мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (все Sigma-Aldrich, США). Клетки высевали в шестилуночные планшеты (Corning, США), площадь поверхности лунки 9.6 см<sup>2</sup>, количество клеток в лунке – 1.8–2.0 × 10<sup>6</sup>, рабочий объем питательной среды – 1.5 мл. Клетки культивировали в течение 21 сут, поскольку на данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, сверхэкспрессирующие *Pgp* [19].

В ходе исследования были сформированы следующие экспериментальные группы:

1) контроль ( $n = 3$ ) – клетки инкубировали в питательной среде с добавлением в эквивалентном объеме воды для инъекций (растворитель  $H_2O_2$  и БСО);

2) индукция *Pgp* в условиях моделирования ОС. Экзогенный ОС моделировали, добавляя в питательную среду  $H_2O_2$  в концентрации 0.1, 0.5, 1 мкМ на 24 ч ( $5–50 \times 10^{-17}$  моль/клетка) и 10 мкМ на 72 ч ( $5 \times 10^{-15}$  моль/клетка).

Эндогенный ОС воспроизводили с помощью ингибитора синтеза глутатиона – DL-бутионинсульфоксимида (БСО, ингибитор  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтазы) [20] в конечной концентрации 10,

50 и 100 мкМ в питательной среде ( $5-50 \times 10^{-15}$  моль/клетка).

Концентрации прооксидантов и длительность экспозиции выбирали в соответствии с результатами предварительных экспериментов, в которых было доказано их индуцирующее действие на Pgr [17, 21].

3) Ингибирование ОС – одновременно с добавлением прооксидантов в питательную среду вносили глутатион в концентрации 1 мМ [22].

4) Оценка роли Nrf2-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления  $H_2O_2$ /BCO вносили ингибитор N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин (AEM1, Sigma-Aldrich) в концентрации 5 мкМ [23].

5) Оценка роли NIF1-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления  $H_2O_2$ /BCO вносили N,N'-(дисульфандиилбис(этан-2,1-диил))-бис(2,5-дихлорбензолсульфонамид) (KC7F2, Sigma-Aldrich) в концентрации 7.5 мкМ [24].

6) Оценка роли CAR-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления  $H_2O_2$ /BCO вносили ингибитор этиловый эфир [5-[(диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-дibenzo[b,f]азепин-3-ил]-карбаминовой кислоты (CINPA1, TOCRIS, Великобритания) в концентрации 10 мкМ [25].

7) Оценка роли PXR-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления  $H_2O_2$ /BCO вносили кетоконазол, 10 мкМ (Sigma-Aldrich) [26].

Каждый эксперимент выполняли в трех повторностях. При экспозиции в течение 72 ч смену питательной среды, содержащей прооксидант и ингибитор, проводили каждые 24 ч.

#### **Сверхпродукцию АФК под действием прооксидантов подтверждали с помощью флуоресцентных зондов**

Клетки культивировали в 24-луночных планшетах. После инкубации с  $H_2O_2$  в течение 3 ч и с BCO в течение 24 ч в тестируемых концентрациях уровень внутриклеточных АФК оценивали с помощью окрашивания клеток MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub> XRos (Invitrogen, США). Зонды MitoTracker Red (нефлуоресцентная форма) содержат восстановленный дигидроксиразамин, который проникает в живые клетки, связывается с тиоловыми группами в митохондриях и флуоресцирует при окислении АФК.

Клетки визуализировали с помощью инвертированного микроскопа Olympus СКХ-53 (Olympus,

Япония), затем снимали с лунок и лизировали с помощью 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich; <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M7513>). Уровень свободных радикалов в лизате клеток определяли по интенсивности флуоресценции ( $\lambda_{ex} = 579$  нм,  $\lambda_{em} = 599$  нм) с помощью спектрофлуориметра (Shimadzu RF-6000, Япония) и пересчитывали на количество клеток (счетчик и анализатор жизнеспособности клеток Countess 3 Automated Cell Counter, США).

В остальных экспериментах клетки культивировали в шестилуночных планшетах.

#### **Получение полных клеточных лизатов**

После окончания экспозиции с  $H_2O_2$  и BCO клетки снимали с лунок шестилуночных планшетов раствором трипсин-EDTA (0.25% трипсина и 0.2% EDTA, Sigma-Aldrich), трижды промывали раствором фосфатного буфера (BioRad, США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонилфторид гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ, апротинин 0.3 мкМ, бестатин 130 мкМ, EDTA 1 мМ, *транс*-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4-гуанидино)бутан (E-64) 14 мкМ, лейпептин 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, Германия). Супернатант использовали для выполнения биохимических анализов.

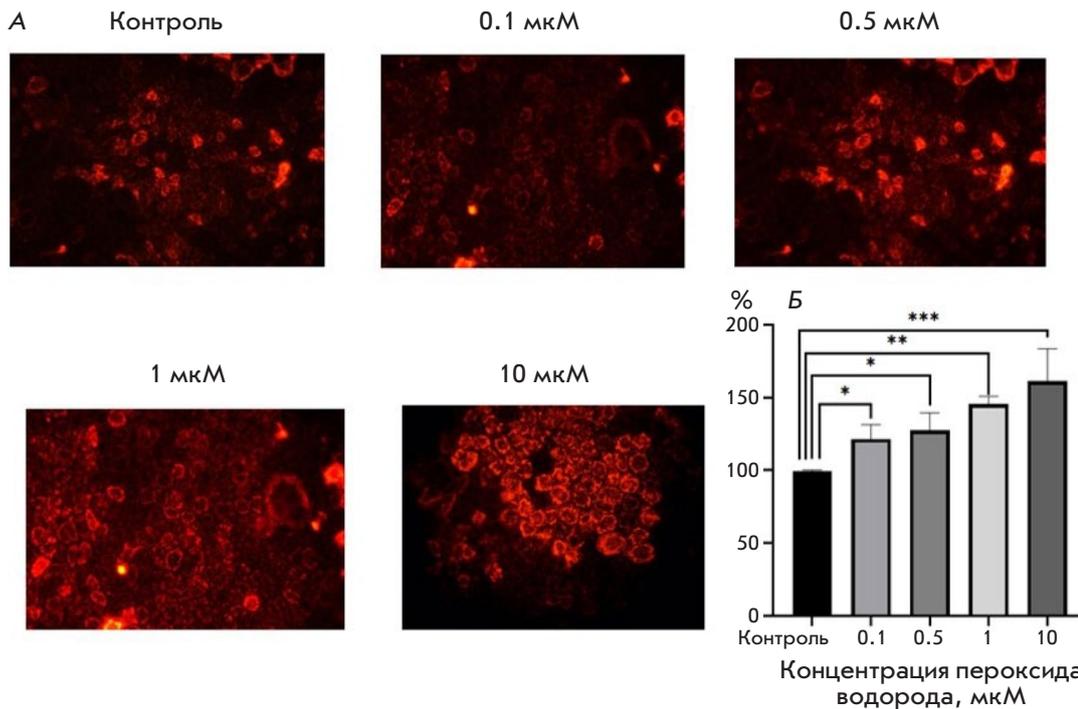
Количество белка в пробах анализировали методом Брэдфорд (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, ThermoFisher, США) [27].

#### **Определение относительного количества Pgr в клетках линии Caco-2 методом вестерн-блоттинга**

Белки супернатанта (20 мкг) подвергали электрофорезу с использованием 7.5% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (BioRad, США) в буферной системе Laemmli (BioRad). Образцы смешивали с буфером Laemmli, содержащим 50 мМ β-меркаптоэтанол (Helicon, США) в соотношении 1:3, 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, BioRad) с использованием Mini Trans-Blot (BioRad) в течение 10 мин при 25 В и 1.3 А.

Белки на мембране блокировали 1% раствором Casein Blocker (BioRad), содержащим 0.1% Tween-20 (Sigma, Германия), в течение 1 ч и комнатной температуре.



**Рис. 1.** Изменение уровня АФК под действием пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) в клетках линии Caco-2. А – окрашивание с помощью MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub> XRos, увеличение  $\times 400$  раз. Б – интенсивность флуоресценции в лизате клеток. \* $p \leq 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p \leq 0.001$  по сравнению с контролем (тест Даннетта)

Белок Pgp детектировали с использованием первичных моноклональных антител мыши (P-Glycoprotein Antibody MA5-13854, Invitrogen) в концентрации 1:200 в блокирующем растворе Casein blocker (BioRad) в течение 2 ч при 37°C. Первичные антитела визуализировали с использованием вторичных антител кролика (Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, Invitrogen) в разведении 1:4000 и инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре. Хемилюминесценцию фиксировали с использованием ChemiDocXRS+ (BioRad). Интенсивность полос определяли денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (BioRad).

Молекулярная масса Pgp подтверждена путем сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, BioRad).

Содержание Pgp нормировали по содержанию белка домашнего хозяйства GAPDH (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).

### Статистический анализ

Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Статистическую значимость различий оценивали с помощью диспер-

сионного анализа (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью теста Даннетта. Статистически значимыми считали различия при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Продукция АФК при моделировании окислительного стресса

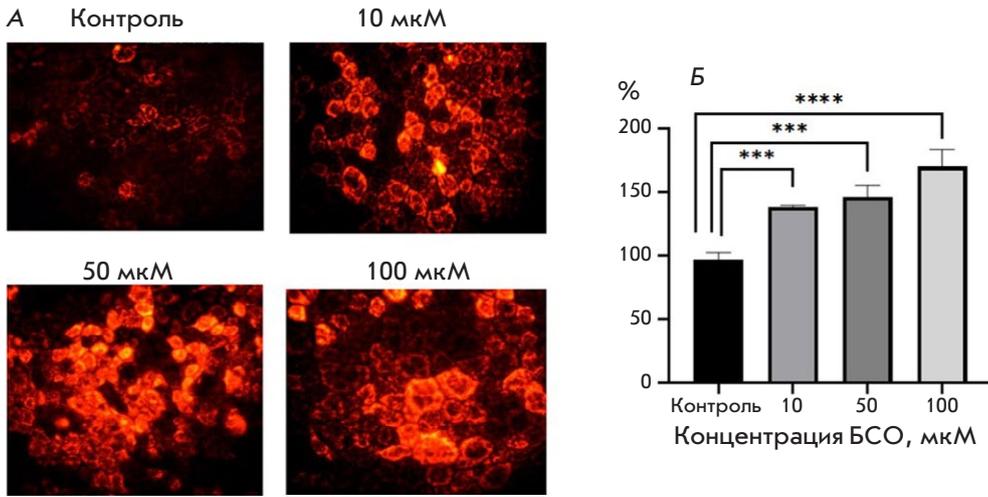
Экспозиция клеток линии Caco-2 с  $H_2O_2$  в диапазоне концентраций 0.1, 0.5, 1.0, 10 мкМ в течение 3 ч приводила к повышению интенсивности флуоресценции клеток после окраски MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub> XRos на 21.5 ( $p = 0.05$ ), 27.3 ( $p = 0.046$ ), 45.4 ( $p = 0.004$ ), 61.1% ( $p = 0.001$ ) соответственно по сравнению с контролем, принятым за 100% (рис. 1).

Аналогичным образом при воздействии БСО в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ в течение 24 ч интенсивность флуоресценции клеток Caco-2 после окраски MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub> XRos возрастала на 38.8 ( $p = 0.001$ ), 46.5 ( $p = 0.0004$ ) и 70.2% ( $p = 0.0001$ ) соответственно по сравнению с контролем (рис. 2).

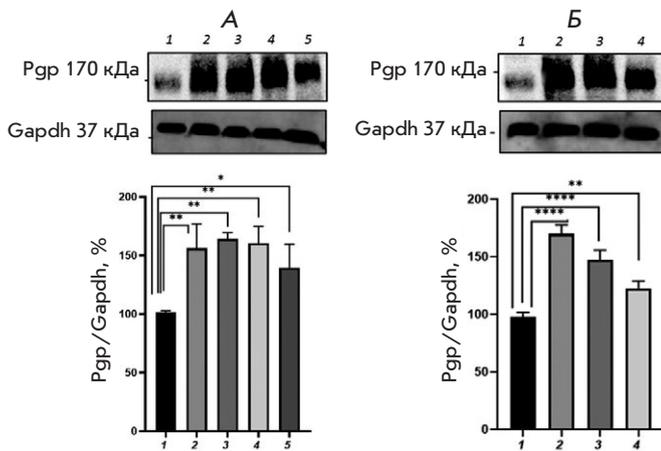
Полученные результаты свидетельствуют о повышении продукции АФК в используемых экспериментальных моделях.

### Изменение относительного количества Pgp в клетках линии Caco-2 в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса

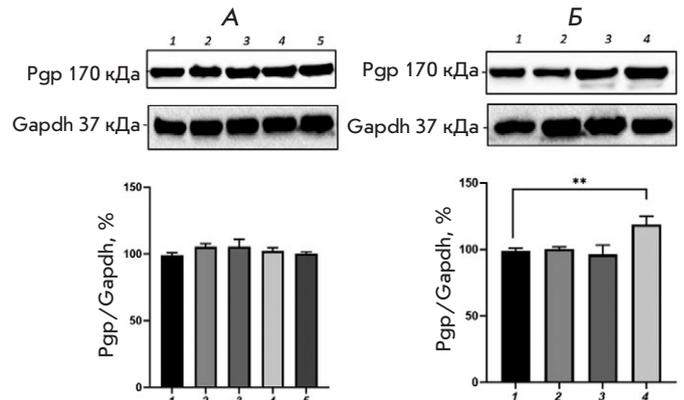
Воздействие  $H_2O_2$  (моделирование экзогенного ОС) в течение 24 ч в концентрации 0.1, 0.5 и 1 мкМ вызывало повышение количества



**Рис. 2.** Изменение уровня АФК под действием DL-бутионинсульфоксимины в клетках линии Сасо-2. А – окрашивание с помощью MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub>XRos, увеличение ×400 раз. Б – интенсивность флуоресценции в лизате клеток. \*\*\* $p \leq 0.001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0.0001$  по сравнению с контролем (тест Даннетта)



**Рис. 3.** Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (А, экзогенный окислительный стресс) и DL-бутионинсульфоксимины (Б, эндогенный окислительный стресс). А) 1 – контроль; 2, 3, 4, 5 – пероксид водорода в концентрации 10 мкМ (72 ч), 0.1, 0.5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно; Б) 1 – контроль; 2, 3, 4 – DL-бутионинсульфоксимины в концентрации 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ , статистически значимые отличия от контроля (тест Даннетта)



**Рис. 4.** Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (А, экзогенный окислительный стресс) и DL-бутионинсульфоксимины (Б, эндогенный окислительный стресс) в сочетании с глутатионом (1 мМ). А) 1 – контроль; 2, 3, 4, 5 – пероксид водорода в концентрации 10 мкМ (72 ч), 0.1, 0.5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно; Б) 1 – контроль; 2, 3, 4 – DL-бутионинсульфоксимины в концентрации 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно. \*\* $p < 0.01$ , статистически значимые отличия от контроля (тест Даннетта)

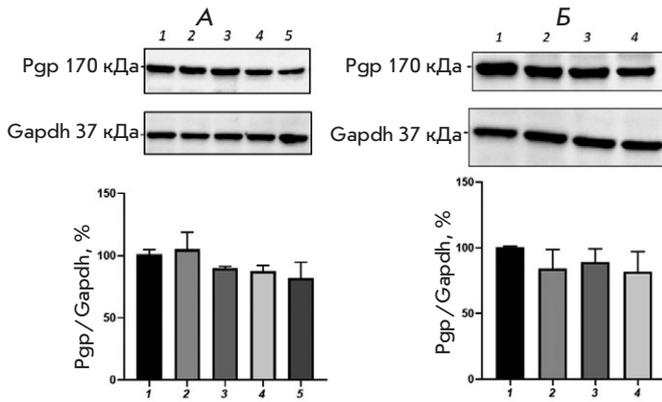
Рgp на 78.9 ( $p = 0.0013$ ), 67.1 ( $p = 0.0019$ ) и 44.6% ( $p = 0.029$ ) соответственно (рис. 3А) по сравнению с контролем. Увеличение длительности экспозиции до 72 ч приводило к повышению уровня Рgp при концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 мкМ – на 68.9% ( $p = 0.0033$ ) по сравнению с контролем (рис. 3А).

Инкубация клеток линии Сасо-2 с БСО (моделирование эндогенного стресса) в концентрации 10, 50 и 100 мкМ в течение 24 ч приводила к увеличению относительного количества Рgp на 71.6 ( $p < 0.0001$ ),

51.6 ( $p < 0.0001$ ) и 25.4% ( $p = 0.007$ ) соответственно (рис. 3Б).

При увеличении экспозиции до 72 ч эффект БСО нивелировался и количество Рgp не отличалось значительно от показателей в контроле.

Добавление GSH в концентрации 1 мМ в питательную среду с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при всех концентрациях и сроках инкубации предотвращало повышение количества Рgp; его уровень не отличался значительно от показателей в контроле (рис. 4А).



**Рис. 5.** Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при одновременном воздействии ингибитора ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (АЕМ1, 5 мкМ) и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (А) или DL-бутионинсульфоксимины (Б): А) 1 – контроль; 2, 3, 4, 5 – пероксид водорода в концентрации 10 мкМ (72 ч), 0.1, 0.5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно; Б) 1 – контроль; 2, 3, 4 – DL-бутионинсульфоксимины в концентрации 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно

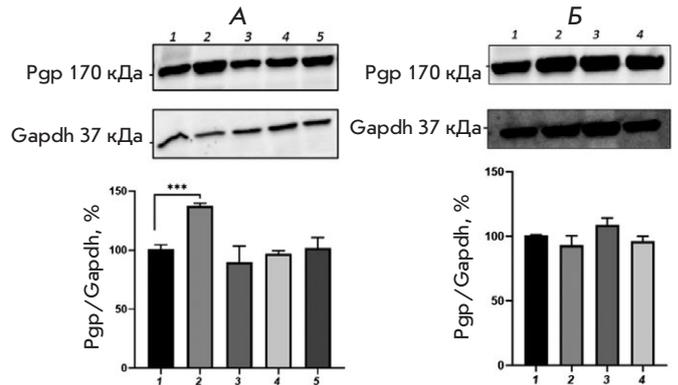
При сочетанном использовании 1 мМ глутатиона и БСО в концентрации 100 мкМ и инкубации в течение 24 ч относительное количество Рgp возросло на 19.7% ( $p = 0.003$ ) по сравнению с контролем, однако это повышение было менее выраженным, чем при изолированном применении прооксиданта. При этом GSH предотвращал повышение уровня Рgp, вызванное воздействием БСО в течение 24 ч в более низких концентрациях 10 и 50 мкМ (рис. 4Б).

Таким образом, воздействие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и БСО на клетки линии Сасо-2 (моделирование экзогенного и эндогенного ОС) приводит к повышению количества Рgp, а применение эндогенного антиоксиданта глутатиона нивелирует данную индукцию, за исключением воздействия БСО (100 мкМ) в течение 24 ч.

### Изучение механизмов повышения количества Рgp под действием пероксида водорода и DL-бутионинсульфоксимины

Механизмы, приводящие к повышению количества Рgp в условиях экзогенного и эндогенного ОС, изучали с использованием ингибиторов транскрипционных факторов Nrf2 – АЕМ1, HIF1а – КС7F2, CAR – СИНРА1, PXR – кетоконазола, стимулирующих экспрессию гена MDR1, кодирующего Рgp.

Ингибитор Nrf2 – АЕМ1 (5 мкМ) при совместной инкубации с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при всех концентрациях и сроках экспозиции предотвращал повышение относительного количества Рgp, его уровень не отличался ста-



**Рис. 6.** Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии ингибитора фактора, индуцируемого гипоксией HIF1а (КС7F2, 7.5 мкМ) в сочетании с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (А) и DL-бутионинсульфоксимином (Б): А) 1 – контроль; 2, 3, 4, 5 – пероксид водорода в концентрации 10 мкМ (72 ч), 0.1, 0.5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно; Б) 1 – контроль; 2, 3, 4 – DL-бутионинсульфоксимины в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно. \*\*\* $p < 0.001$ , статистически значимые отличия от значений в контроле (тест Даннетта)

тистически значимо от уровня в контроле (рис. 5А).

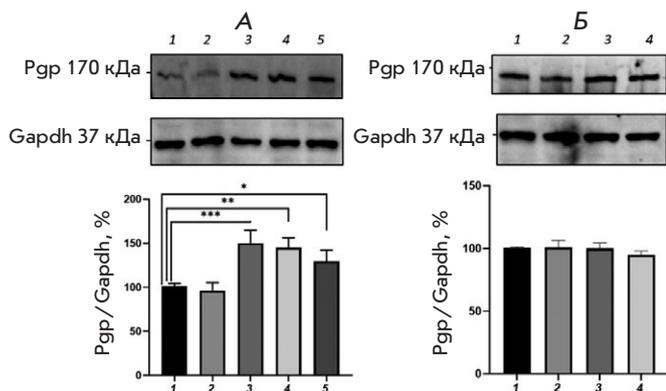
Добавление к клеткам АЕМ1 в сочетании с БСО (10, 50 и 100 мкМ) и инкубации в течение 24 ч также препятствовало повышению относительного количества Рgp (уровень белка-транспортера не отличался от значений в контроле) (рис. 5Б).

Ингибитор HIF1а КС7F2 (7.5 мкМ) препятствовал повышению уровня транспортера в присутствии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (24 ч, все использованные концентрации) – относительное количество Рgp не отличалось статистически значимо от значений в контроле. При инкубации в течение 72 ч КС7F2 не влиял значимо на относительное количество Рgp – его содержание увеличивалось на 37% относительно значений в контроле ( $p = 0.0004$ ) (рис. 6А).

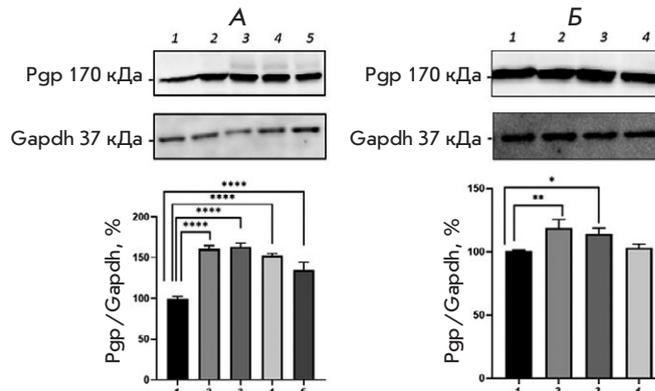
Добавление КС7F2 к клеткам, инкубируемым с БСО (10, 50 и 100 мкМ), также приводило к нормализации относительного количества Рgp, его уровень не отличался статистически значимо от уровня в контроле (рис. 6Б).

Добавление ингибитора CAR СИНРА1 (10 мкМ) к клеткам, инкубируемым в присутствии 0.1, 0.5 и 1 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 24 ч, не подавляло эффект прооксиданта: относительное количество Рgp увеличивалось на 51.5 ( $p = 0.0008$ ), на 46.5 ( $p = 0.0019$ ), на 31.3% ( $p = 0.02$ ) соответственно по сравнению со значениями в контроле (рис. 7А).

Однако при длительности воздействия 72 ч СИНРА1 препятствовал повышению уровня Рgp под действием 10 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (рис. 7А).



**Рис. 7.** Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии ингибитора конститутивного андростанового рецептора САР (СINРА1, 10 мкМ) в сочетании с Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> (А) и DL-бутионинсульфоксимином (Б): А) 1 – контроль; 2, 3, 4, 5 – пероксид водорода в концентрации 10 мкМ (72 ч), 0.1, 0.5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно; Б) 1 – контроль; 2, 3, 4 – DL-бутионинсульфоксимином в концентрации 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\**p* < 0.001, статистически значимые отличия от контроля (тест Даннетта)



**Рис. 8.** Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии ингибитора X-рецептора прегнана (кетоконазол, 10 мкМ) в сочетании с Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> (А) и DL-бутионинсульфоксимином (Б): А) 1 – контроль; 2, 3, 4, 5 – пероксид водорода в концентрации 10 мкМ (72 ч), 0.1, 0.5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно; Б) 1 – контроль; 2, 3, 4 – DL-бутионинсульфоксимином в концентрации 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно. \**p* < 0.05; \*\**p* < 0.01; \*\*\*\**p* < 0.0001, статистически значимые отличия от контроля (тест Даннетта)

СINРА1 при его совместном применении с БСО (10, 50 и 100 мкМ) предотвращал повышение относительного количества Рgr, уровень белка-транспортера не отличался значимо от показателей в контроле (рис. 7Б).

Ингибитор PXR кетоконазол (10 мкМ) при его совместном применении с Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> не подавлял эффект индуктора окислительного стресса. Относительное количество Рgr возрастало на 64.6, 53.5 и 36.4% при воздействии Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> (24 ч, 0.1, 0.5 и 1 мкМ) и на 62.6% при воздействии Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> (72 ч, 10 мкМ) соответственно. *p* < 0.0001 в каждой серии опытов, рис. 8А.

В то же время кетоконазол предотвращал повышение количества Рgr под действием БСО в концентрации 100 мкМ и не влиял на эффекты прооксиданта в концентрациях 10 и 50 мкМ, уровень Рgr повышался на 18.8 (*p* = 0.0027) и 14.1% (*p* = 0.015) соответственно по сравнению с контролем (рис. 8Б).

Таким образом, при развитии экзогенного ОС (Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub>) регуляция Рgr осуществляется в основном через сигнальный путь Nrf2-Keap1, тогда как в случае эндогенного ОС (БСО) в регуляции Рgr принимают участие все изученные транскрипционные факторы.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Окислительный стресс – это редокс-зависимый процесс, на фоне которого протекает множество пато-

логий различного генеза. Причина развития ОС может быть экзогенной (воздействие прооксиданта) и/или эндогенной (подавление внутриклеточной антиоксидантной защиты) [28].

В настоящем исследовании экзогенный ОС моделировали добавлением к клеткам линии Сасо-2 пероксида водорода. Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> способен проникать через клеточные мембраны. При взаимодействии с металлами переменной валентности (Fe<sup>2+</sup> или Cu<sup>+</sup>) в ходе реакций Фентона и Хабера–Вайса Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> образует в клетках кислородсодержащие высокотоксичные свободные радикалы (гидроксильный радикал ОН и супероксид-анион О<sub>2</sub><sup>-</sup>), которые могут вызывать окислительные повреждения биомолекул клетки [29]. Учитывая использованный в работе микромолярный диапазон концентраций Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> и быструю скорость элиминации Н<sub>2</sub>О<sub>2</sub> клетками [30], выявленные изменения количества Рgr, скорее всего, обусловлены сигнальными каскадами, которые запустил прооксидант.

Эндогенный ОС воспроизводили инкубацией клеток с БСО, который ингибирует фермент γ-глутамилцистеин-синтетазу (γ-GCS), играющий ключевую роль в синтезе и поддержании клеточного уровня глутатиона. Глутатион (GSH) – тиолсодержащий трипептид, обладающий собственной антиоксидантной активностью и необходимый для функционирования антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы, глутатион-S-

трансферазы). Снижение уровня эндогенного глутатиона уменьшает емкость эндогенной антиоксидантной системы, что провоцирует развитие ОС [31].

Динамика развития ОС подтверждена в нашем исследовании путем детекции АФК по интенсивности флуоресценции MitoTracker Red CM-H<sub>2</sub> XRos. При воздействии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> повышение АФК наблюдалось уже через 3 ч, в то время как БСО повышал концентрацию АФК через 24 ч экспозиции, когда происходило истощение эндогенного пула глутатиона.

Развитие как экзогенного, так и эндогенного ОС приводило к повышению относительного количества Pgr. При этом добавление антиоксиданта глутатиона к клеткам вместе с используемыми прооксидантами предотвращало индукцию Pgr под действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и снижало (100 мкМ) или подавляло (10 и 50 мкМ) ее под действием БСО.

Частичное подавление индукции Pgr под действием глутатиона может быть связано с тем, что БСО, будучи ксенобиотиком, сам может повышать количество Pgr за счет стимуляции экспрессии гена *MDR1*.

На данный момент известно несколько механизмов регуляции Pgr, основным из которых является изменение экспрессии гена *MDR1*, кодирующего белок-транспортер [31].

В ходе настоящего исследования была оценена роль транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 $\alpha$ , CAR и PXR, которые активируются при окислительном стрессе [17, 33–35] и гипотетически могут повышать экспрессию Pgr.

Сигнальный путь Nrf2 считается основным механизмом регуляции антиоксидантной защиты клетки при ОС. В физиологических условиях ядерный фактор транскрипции Nrf2 входит в состав комплекса Keap1-Nrf2-Cullin-3, что обеспечивает его локализацию в цитозоле и блокирует специфическую активность. Nrf2 является редокс-чувствительным транскрипционным фактором, при окислении SH-групп в составе Keap1 происходит активация фактора, его транслокация в ядро и изменение биологических эффектов – индукция антиоксидантных ферментов [36].

Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF1) – это транскрипционный фактор, играющий ключевую роль в адаптации клеток к снижению содержания кислорода в тканях [37]. HIF1 представляет собой гетеродимер, состоящий из двух белковых субъединиц – HIF1 $\alpha$  и HIF1 $\beta$ . Функциональный статус HIF1 определяется экспрессией и активностью его  $\alpha$ -субъединицы, регуляция которой осуществляется на нескольких уровнях: транскрипции, трансля-

ции, посттрансляционных изменений, транслокации в ядро [38]. В условиях нормоксии кислород-зависимые пролингидроксилазы модифицируют пролин в структуре HIF1 $\alpha$ . При ОС пролингидроксилазы неактивны, в этих условиях  $\alpha$ - и  $\beta$ -субъединицы способны связываться друг с другом, проникать в ядро и активировать экспрессию целевых генов.

Конститутивный андростановый рецептор (CAR, NR1I3, подсемейство 1, группа I, член 3) и X-рецептор прегнана (PXR, steroid and xenobiotic receptor – SXR, R1I2 – Nuclear Receptor Subfamily 1, Group I, Member 2) – входят в суперсемейство ядерных рецепторов, представленное в основном факторами транскрипции [39].

Эти рецепторы локализуются преимущественно в печени и кишечнике, где регулируют экспрессию ферментов I фазы биотрансформации, таких, как изоферменты CYP3A и CYP2B цитохрома P450, а также белков-транспортеров, в частности Pgr.

Относительное количество CAR и PXR увеличивается в условиях ОС в ответ на накопление продуктов перекисидации [34, 35].

Роль Nrf2 в регуляции Pgr оценивали с использованием AEM1 (ARE expression modulator 1), блокирующим взаимодействие Nrf2 с ARE (antioxidant responsive element) и подавляющим экспрессию генов, контролируемых данным транскрипционным фактором. В ходе исследования показано, что AEM1 блокировал способность H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и БСО (во всех применяемых концентрациях и сроках экспозиции) индуцировать Pgr.

Таким образом, Nrf2 принимает участие в регуляции Pgr в условиях как экзогенного, так и эндогенного ОС.

Ингибитор HIF1 $\alpha$  KC7F2 (controls the biological activity of HIF1 $\alpha$ ) представляет собой симметричное соединение, которое избирательно подавляет клеточный синтез белка HIF1 $\alpha$ , но не HIF1 $\beta$ , не влияя на транскрипцию мРНК HIF1 $\alpha$  или стабильность белка HIF1 $\alpha$ . KC7F2 при воздействии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и БСО в течение 24 ч нормализовал количество Pgr (препятствовал индуцирующему действию прооксидантов), а при воздействии в сочетании с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 72 ч не оказывал значимого эффекта (относительное количество Pgr возрастало под действием пероксида водорода).

Таким образом, известны два транскрипционных фактора – Nrf2 и HIF1, которые принимают участие в регуляции Pgr при развитии как эндогенного, так и экзогенного ОС. Можно предположить, что оба фактора могут связываться с промотором гена *MDR1*, кодирующего Pgr, и повышать его экспрессию. Ранее нами было показано, что при развитии ОС Nrf2 вызывает повышение экспрессии

HIF1 $\alpha$  [33], т.е. действие Nrf2 может реализоваться через HIF1 $\alpha$ . Поскольку ингибирование Nrf2, в отличие от HIF1 $\alpha$ , препятствовало индукции Pgr во всех при инкубации 24 и 72 ч в условиях экзогенного и эндогенного ОС, то в клетке, видимо, одновременно функционируют два описанных механизма.

В представленной работе в качестве ингибитора CAR использовали CINPA1 (CAR inhibitor not PXR activator 1), который взаимодействует и блокирует лигандсвязывающий домен CAR и подавляет его связывание с коактиваторами [40]. Для ингибирования PXR использовали противогрибковый препарат группы азолов – кетоконазол, который связывается с областью AF-2 (activation function) на N-концевом лигандсвязывающем домене PXR и таким образом подавляет его активацию [41].

CINPA1 не подавлял индукцию Pgr под действием H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> при инкубации в течение 24 ч, а при воздействии в течение 72 ч препятствовал повышению уровня Pgr. Показано, что H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывает индукцию CAR [34], который, в свою очередь, видимо, повышает экспрессию Pgr при экспозиции 72 ч.

Сочетанное применение БСО и CINPA1 предотвращало повышение относительного количества Pgr; уровень белка-транспортера не отличался достоверно от показателей в контроле.

Ингибитор PXR кетоконазол, применяемый совместно с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, не подавлял эффект индуктора ОС. В то же время кетоконазол полностью предотвращал повышение количества Pgr под действием БСО в концентрации 100 мкМ и лишь частично – при концентрациях 10 и 50 мкМ. CAR и PXR являются основными ксеносенсорными внутриклеточными рецепторами, т.е. они взаимодействуют с ксенобиотиками и запускают внутриклеточный ответ, направленный на их обезвреживание и выведение.

Можно предположить, что БСО, являясь ксенобиотиком, самостоятельно активирует CAR и PXR, а они, в свою очередь, повышают экспрессию Pgr. Сохранение повышенного уровня Pgr при совместном применении БСО и глутатиона, выявленное в нашем исследовании, подтверждает данное предположение.

Интересно отметить, что при моделировании как экзогенного, так и эндогенного окислительного стресса, несмотря на одновременное участие в индукции Pgr разных транскрипционных факторов, ингибирование только одного из них приводило к подавлению повышения количества Pgr, что свидетельствует о том, что для индукции Pgr в определенных ситуациях необходимо совместное действие нескольких механизмов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в повышении количества Pgr при развитии экзогенного ОС, вызванного инкубацией клеток линии Сасо-2 с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, вероятно, первоочередная роль принадлежит сигнальному пути Nrf2-Keap1, который участвует в регуляции белка-транспортера при длительности воздействия 24 и 72 ч. Транскрипционный фактор HIF принимает участие в регуляции Pgr при воздействии H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 24 ч, а транскрипционный фактор CAR – при времени инкубации 72 ч. PXR, видимо, не вносит существенный вклад в регуляцию белка-транспортера при данной модели ОС.

При моделировании эндогенного ОС на клетках Сасо-2 с помощью ингибитора синтеза глутатиона – БСО – установлено, что все протестированные транскрипционные факторы и сигнальные пути участвуют в индукции Pgr. Скорее всего, это связано с бимодальным влиянием БСО на Pgr. С одной стороны, он вызывает развитие ОС, с другой – будучи ксенобиотиком, может стимулировать PXR и CAR. ●

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yakusheva E.N., Titov D.S. // *Biochemistry (Moscow)*. 2018. V. 83. № 8. P. 907–929.
2. Han L.W., Gao C., Mao Q. // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2018. V. 14. № 8. P. 817–829.
3. Chai A.B., Leung G.K.F., Callaghan R., Gelissen I.C. // *FEBS J*. 2020. V. 287. № 4. P. 612–625.
4. Wang G.X., Wang D.W., Liu Y., Ma Y.H. // *Int. J. Neurosci*. 2016. V. 126. № 5. P. 385–392.
5. Xu H.W., Xu L., Hao J.H., Qin C.Y., Liu H. // *J. Int. Med. Res*. 2010. V. 38. № 1. P. 34–42.
6. Gao Y., Liao Y., Shen J.K., Feng Y., Choy E., Cote G., Harmon D., Mankin H.J., Hornicek F.J., Duan Z. // *J. Orthop. Res*. 2016. V. 34. № 9. P. 1606–1612.
7. Sies H., Jones D.P. Oxidative stress. In *Encyclopedia of stress*. Amsterdam: Elsevier, 2007. P. 45–48.
8. Cabello-Verrugio C., Simon F., Trollet C., Santibañez J.F. // *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2017. 4310469.
9. Ziemann C., Bürkle A., Kahl G.F., Hirsch-Ernst K.I. // *Carcinogenesis*. 1999. V. 20. № 3. P. 407–414.
10. Felix R.A., Barrand M.A. // *J. Neurochem*. 2002. V. 80. № 1. P. 64–72.
11. Hoshi Y., Uchida Y., Tachikawa M., Ohtsuki S., Couraud P., Suzuki T., Terasaki T. // *J. Cerebral Blood Flow Metabolism*. 2019. V. 40. № 2. P. 420–436.
12. Robertson S.J., Kania K.D., Hladky S.B., Barrand M.A. // *J. Neurochem*. 2009. V. 111. № 1. P. 132–141.
13. Hirsch-Ernst K.I., Ziemann C., Foth H., Kozian D., Schmitz-Salue C., Kahl G.F. // *J. Cell Physiol*. 1998. V. 176. № 3. P. 506–515.
14. Miyata Y., Asano Y., Muto S. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2002. V. 282. № 4. P. 718–729.
15. Terada Yu., Ogura J., Tsujimoto T., Kuwayama K., Koizumi T., Sasaki Sh., Maruyama H., Kobayashi M., Yamaguchi H.,

- Iseki K. // *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2014. V. 17. № 2. P. 266–276.
16. Zhang Yu., Li Ju., Yang W., Xian Zh., Feng Q., Ruan X. // *Int. J. Ophthalmol.* 2017. V. 10. № 7. P. 1055–1063.
17. Shchulkin A.V., Abalenikhina Y.V., Erokhina P.D., Chernykh I.V., Yakusheva E.N. // *Biochemistry (Moscow)*. 2021. V. 86. № 2. P. 197–206.
18. Seebacher N.A., Richardson D.R., Jansson P.J. // *Br. J. Pharmacol.* 2015. V. 172. № 10. P. 2557–2572.
19. Hilgers A.R., Conradi R.A., Burton P.S. // *Pharmac. Res.* 1990. V. 7. № 9. P. 902–910.
20. Haddad J.J. // *Eur. Cytokine Netw.* 2001. V. 12. № 4. P. 614–624.
21. Abalenikhina Yu.V., Erokhina P.D., Mylnikov P.Yu., Shchulkin A.V., Yakusheva E.N. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022. V. 58. № 3. P. 232–242.
22. Rao R.K., Li L., Baker R.D., Baker S.S., Gupta A. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000. V. 279. № 2. P. 332–340.
23. Bollong M.J., Yun H., Sherwood L., Woods A.K., Lairson L.L., Schultz P.G. // *ACS Chem. Biol.* 2015. V. 10. P. 2193–2198.
24. Ke Q., Costa M. // *Mol. Pharmacol.* 2006. V. 70. № 5. P. 1469–1480.
25. Cherian M.T., Lin W., Wu J., Chen T. // *Mol. Pharmacol.* 2015. V. 87. № 5. P. 878–889.
26. Kota B.P., Tran V.H., Allen J., Bebawy M., Roufogalis B.D. // *Pharmacol. Res.* 2010. V. 62. № 5. P. 426–431.
27. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 7. № 72. P. 248–254.
28. Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., et al. // *Clin. Interv. Aging.* 2018. V. 26. № 13. P. 757–772.
29. Sies H. // *Redox Biol.* 2017. V. 11. P. 613–619.
30. Wagner B.A., Witmer J.R., van't Erve T.J., Buettner G.R. // *Redox Biol.* 2013. V. 1. № 1. P. 210–217.
31. Adeoye O., Olawumi J., Opeyemi A., Christiania O. // *JBRA Assist. Reprod.* 2018. V. 1. № 22. P. 61–66.
32. Li S., Yang Y., Ding X., Yang M., She S., Peng H., Xu X., Ran X., Li S., Hu P., et al. // *Oncotarget.* 2017. V. 17. № 8 (3). P. 4549–4562.
33. Абаленихина Ю.В., МЫЛЬНИКОВ П.Ю., ШУЛЬКИН А.В., Черных И.В., Якушева Е.Н. // *Бюл. эксп. биол. мед.* 2022. Т. 173. № 3. С. 301–306.
34. Shchul'kin A.V., Abalenikhina Y.V., Seidkulieva A.A., Ryabkov A.N., Yakusheva E.N. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021. V. 171. № 5. P. 615–618.
35. Abalenikhina Y.V., Sudakova E.A., Slepnev A.A., Seidkulieva A.A., Erokhina P.D., Shchulkin A.V., Yakusheva E.N. // *Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. A: Membrane Cell Biol.* 2022. V. 16. № 1. P. 21–28.
36. Bellezza I., Giambanco I., Minelli A., Donato R. // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* 2018. V. 1865. № 5. P. 721–733.
37. Schofield C.J., Ratcliffe P.J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 338. № 1. P. 617–626.
38. Ke Q., Costa M. // *Mol. Pharmacol.* 2006. V. 70. № 5. P. 1469–1480.
39. di Masi A., De Marinis E., Ascenzi P., Marino M. // *Mol. Aspects Med.* 2009. V. 30. № 5. P. 297–343.
40. Cherian M.T., Lin W., Wu J., Chen T. // *Mol. Pharmacol.* 2015. V. 87. № 5. P. 878–889.
41. Wang H., Huang H., Li H., Teotico D.G., Sinz M., Baker S.D., Staudinger J., Kalpana G., Redinbo M.R., Mani S. // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13. № 8. P. 2488–2495.