УДК 576.54

### ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА НА ТРАНСПОРТ СУБСТРАТА Р-ГЛИКОПРОТЕИНА ЧЕРЕЗ КЛЕТОЧНЫЙ МОНОСЛОЙ

## © 2021 г. А. В. Щулькин<sup>*a*, \*</sup>, Ю. В. Абаленихина<sup>*a*</sup>, А. А. Сеидкулиева<sup>*a*</sup>, И. В. Черных<sup>*a*</sup>, Е. Н. Якушева<sup>*a*</sup>

<sup>а</sup>Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова Минздрава России, Рязань, 390026 Россия \*e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru Поступила в редакцию 13.01.2021 г. После доработки 24.03.2021 г. Принята к публикации 24.03.2021 г.

Р-гликопротеин (Pgp) – АТР-зависимый трансмембранный белок, участвующий в эффлюксе липофильных веществ. Цель работы – оценить влияние окислительного стресса на транспорт субстрата Рдр через монослой клеток линии Сасо-2, гиперэкспрессирующих данный белок-транспортер. Окислительный стресс моделировали инкубированием клеток с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Воздействие H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в концентрациях 10 и 50 мкМ в течение 3 ч снижало активность (но не количество) Рдр при сохранении целостности клеточного монослоя. Увеличение концентрации прооксиданта до 100 мкМ снижало количество Рдр, нарушало целостность клеточного монослоя и повышало трансцеллюлярный и парацеллюлярный транспорт фексофенадина. При длительности воздействия 24 ч Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в концентрациях 0.1-1 мкМ приводил к увеличению количества Pgp, опосредованному транскрипционным фактором Nrf2, но активность белка-транспортера оставалась неизменной. При концентрации прооксиданта 10 мкМ активность Рер снижалась и повышалась проницаемость клеточной мембраны, а при концентрациях 50-100 мкМ происходило снижение количества (100 мкМ) и активности Рдр, повышение пара- и трансцелюллярной проницаемости клеточного монослоя для субстрата белкатранспортера – фексофенадина. Таким образом, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> повышает транспорт субстрата Рgp фексофенадина через клеточный монослой за счет ингибирования активности белка-транспортера, снижения его количества, а также нарушения целостности клеточной мембраны и межклеточных контактов. Клетки могут адаптироваться к данным воздействиям, повышая количество Рдр.

Ключевые слова: Р-гликопротеин, окислительный стресс, клеточная линия Caco-2, трансмембранный транспорт, фексофенадин

DOI: 10.31857/S0233475521040101

#### введение

Транспорт веществ через клеточный монослой может происходить трансцеллюлярно (через билипидную мембрану клеток) или парацеллюлярно (через межклеточные щелевые контакты). Парацеллюлярный транспорт осуществляется только пассивной диффузией по градиенту концентрации, в то время как трансцеллюлярный транспорт может происходить путем пассивной и облегченной диффузии, активным транспортом и трансцитозом [1].

Одним из самых изученных трансмембранных белков, участвующих в транспорте веществ через билипидную мембрану клеток, является Р-гликопротеин (Pgp, ABCB1-белок, MDR1-белок) [2].

Pgp — это ATP-зависимый эффлюксный белок-транспортер, который относится к суперсемейству ABC-транспортеров (ATP-binding cassette). Молекула Pgp состоит из двух одинаковых

частей, каждая из которых включает большой гидрофобный трансмембранный домен и консервативный цитоплазматический домен с ATP-связывающим сайтом [3].

Рдр обладает широкой субстратной специфичностью. Его субстратами являются биогенные вещества — сфинголипиды, фактор активации тромбоцитов, короткоцепочечные фосфолипиды, цитокины [4], а также липофильные лекарственные средства — противоопухолевые препараты, иммунодепрессанты, стероидные и тиреоидные гормоны, антибиотики, ингибиторы ВИЧ-протеиназы, сердечные гликозиды, антикоагулянты и др. [5].

Являясь липофильными молекулами, субстраты Pgp легко растворяются в цитоплазматической мембране. Pgp, работая как "гидрофобный пылесос", связывает данные вещества в липидном бислое и выводит их во внеклеточную среду. То есть транспортер способен перехватывать субстраты прежде, чем они смогут войти в цитозоль. Некоторые авторы считают, что Pgp может также работать как "флоппаза", транспортируя вещества от цитоплазматического к внеклеточному монослою билипидной мембраны [4, 6].

Активность Pgp может изменяться под воздействием ряда факторов внешней и внутренней среды (гипоксия, pH, уровень гормонов) и различных веществ. Так, индукторы (рифампицин, карбамазепин) повышают активность белкатранспортера, а ингибиторы (верапамил, амиодарон) — ее снижают [5, 7].

Окислительный стресс — патологический процесс, развивающийся в результате дисбаланса между продукцией и утилизацией активных форм кислорода, когда образующиеся свободные радикалы не успевают инактивироваться из-за повышения их продукции или из-за снижения емкости антиоксидантной системы защиты [8].

При широком спектре патологий, таких как атеросклероз, сахарный диабет, воспалительные, инфекционные заболевания, снижение кровоснабжения, а также при воздействии ряда ксенобиотиков развивается окислительный стресс [8], что, в свою очередь, может оказывать воздействие на транспорт экзогенных и эндогенных веществ через биологические барьеры, представляющие, прежде всего, монослой клеток.

В ряде исследований было показано, что окислительный стресс повышает экспрессию и активность Pgp [9, 10].

С другой стороны, в исследованиях Basuroy и соавт. показано, что при окислительном стрессе происходит повреждение межклеточных контактов и повышение парацеллюлярного транспорта веществ [11]. Кроме того, активные формы кислорода при взаимодействии с цитоплазматической мембраной клеток вызывают активацию перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к образованию пор, повреждению билипидного слоя и в конечном счете повышению проницаемости цитоплазматической мембраны и трансцеллюлярного транспорта [12].

Таким образом, при развитии окислительного стресса может происходить как снижение проницаемости субстратов Pgp через клеточный монослой за счет повышения активности белка-транспортера, так и активация транспорта вследствие усиления парацеллюлярной и трансцеллюлярной диффузии.

Кроме того, исследований, в которых бы оценивалось влияние окислительного стресса одновременно на парацеллюлярный и трансцеллюлярный транспорт с участием белков-транспортеров не проводилось, что и явилось целью настоящего исследования.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Исследование выполнено на линии клеток аленокаршиномы ободочной кишки человека (Сасо-2) (ЦКП "Коллекция культур клеток позвоночных", Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37°С и 5% содержании СО<sub>2</sub> в инкубаторе WS-189C (World Scienc, Корея) в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) (Sigma-Aldrich, США), с добавлением *L*-глутамина (4 мМ) (Sigma-Aldrich), 15% бычьей сыворотки (Sigma-Aldrich), 100 ед/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (Sigma-Aldrich), соответственно. Клетки культивировали в течение 21 сут, поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, гиперэкспрессирующие Рдр [13].

Окислительный стресс моделировали добавлением в культуральную среду пероксида водорода  $H_2O_2$  (Sigma-Aldrich) в конечных концентрациях 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 и 100 мкМ и инкубацией в течение 3 и 24 ч. Контрольным клеткам в эквивалентном объеме в культуральную среду добавляли воду для инъекций. Каждый эксперимент был выполнен в 3 повторах.

Для исследования цитотоксичности пероксида водорода клетки высевали в 96-луночный планшет (Corning, США), для изучения влияния пероксида водорода на количество Pgp и транскрипционного фактора Nrf2, концентрацию продуктов ПОЛ, карбонильных производных белков, содержание тиоловых SH-групп клетки культивировали в 6-луночных планшетах (Corning), а для оценки действия прооксиданта на проницаемость клеточного монослоя для субстрата Pgp — в специальной трансвеллсистеме (12 mm Transwell with 0.4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, Corning) [14].

Цитотоксический тест (МТТ-тест). Клетки высевали в 96-луночный планшет из расчета  $10^4$  клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут, затем добавляли питательную среду с  $H_2O_2$ . После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0.5% 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% раствора диметилсульфоксида (ПанЭко, Россия) [15]. Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

Жизнеспособность клеток Caco-2 в присутствии пероксида водорода рассчитывали по формуле:

#### Жизнеспособность =

<u>ОП опытных лунок – ОП среды</u> ×100%,

ОП контрольных лунок – ОП среды где ОП – оптическая плотность. Получение тотальных клеточных лизатов. После окончания экспозиции с пероксидом водорода клетки снимали с лунок раствором трипсин—EDTA (0.25% трипсина и 0.2% EDTA, Sigma-Aldrich). Клетки в расчете 2 × 10<sup>6</sup> трехкратно промывали фосфатным буфером pH 7.4 (ПанЭко) и лизировали трехкратным циклом замораживания—размораживания в 200 мкл фосфатного буфера при –20°С, далее полученный лизат использовали для иммуноферментного анализа.

Клетки из расчета 1 × 10<sup>6</sup> промывали изотоническим солевым раствором (Мелпро, Россия) и ресуспендировали в 150 мкл ледяного буфера для лизиса (50 мМ трис-HCl, pH 7.4, 150 мМ KCl, 0.5% тритон Х-100, смесь ингибиторов протеиназ (аминоэтилбензолсульфонилфторид гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ; апротинин 0.3 мкМ; бестатин 130 мкМ; EDTA 1 мМ; эпоксисукциниллейцингуанидинобутиламид (Е-64) 14 мкМ; лейпептин 1 мкМ (Sigma-Aldrich)), встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем пентрифугировали в течение 10 мин при 5000g (CM-50, Eppendorf, Германия). Цитоплазматическую фракцию переносили в отдельные пробирки и использовали для определения концентрации продуктов ПОЛ (малоновый диальдегид (МДА) и 4-гидроксиолефины).

Получение клеточных мембран. Полученную аналогичным образом с других лунок суспензию клеток (3 × 10<sup>6</sup>) использовали для выделения клеточных мембран методом дифференциального центрифугирования [16]. Клетки осаждали при 100g в течение 10 мин и ресуспендировали в буфере для лизиса с добавлением 0.25 М сахарозы, встряхивали на шейкере, инкубировали на льду в течение 20 мин. Полученные лизаты центрифугировали 10 мин при 800 g (CM-50, Eppendorf, Германия) для осаждения не полностью разрушенных клеток и ядер. Надосадочную жидкость центрифугировали 15 мин при 14000 g для удаления митохондрий, а затем полученный супернатант при 20000 g 30 мин для осаждения лизосом. Полученную цитоплазматическую фракцию центрифугировали при 100000 g 35 мин (Avanti JXN-3, Beckman Coulter, США) для осаждения мембран, полученный осадок ресуспендировали в 200 мкл лизирующего буфера и использовали для оценки степени окисления белков по уровню SH-групп и карбонильных производных.

Определение количества Рдр и транскрипционного фактора Nrf2 в клетках линии Caco-2 проводили методом гетерогенного иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов (Human Permeability glycoprotein ELISA kit и Human Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 ELISA kit, Blue gene, Китай). Светопоглощение измеряли при 450 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, ThermoFisher, США) [17].

Анализ содержания тиоловых SH-групп проводили по методу Эллмана с 5,5'-дитиобис(2-нитро)-бензоатом (DTNB) в неденатурирующих условиях [18]. Уровень SH-групп количественно оценивали по уровню 5-тио-2-нитробензойной кислоты при 412 нм на Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США). Концентрацию SH-групп рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции  $\varepsilon_{412} = 13.6 \text{ мM}^{-1} \text{ см}^{-1}$  [19], полученные результаты выражали в мкмоль/мг белка.

Определение концентрации продуктов перекисного окисления липидов. В лизате клеток с помощью коммерческого набора определяли концентрацию продуктов ПОЛ (Elabscience, Китай). Метод определения продуктов ПОЛ – МДА и 4-гидроксиолефинов (4-гидрокси-2-ноненаля и 4-гидрокси-2-гексеналя) – основан на их взаимодействии с 1-метил-2-фенилиндолом с образованием стабильного хромофора, который имеет максимум поглощения при 586 нм (Awareness Technology, США) [20]. Полученные результаты выражали в мкмоль/мг белка.

Определение концентрации карбонильных производных белков проводили с помощью коммерческого набора (Sigma-Aldrich).

Метод определения продуктов карбонильных производных белков основан на их взаимодействии с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов [21], которые регистрировали при длине волны 375 нм (Awareness Technology, США). Концентрацию карбонильных производных белков рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции  $\varepsilon_{375} =$ = 22 мM<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup> и выражали в нмоль/мг белка. Анализ выполняли на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

Оценка транспорта субстрата Рдр фексофенадина через монослой клеток линии Сасо-2. В качестве субстрата белка-транспортера Рдр использовали фексофенадин (Sigma-Aldrich) [22]. Транспорт субстрата оценивали по его проникновению через монослой клеток линии Сасо-2 в специальной трансвелл-системе (рис. 1). Трансвелл-система представлена двумя камерами: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры является полупроницаемой мембраной, на которую высевали клетки линии Сасо-2 с плотностью  $10^5/см^2$  и культивировали в течение 21 сут.

Целостность клеточного монослоя оценивали по величине трансэпителиального сопротивления, которое определяли с помощью вольтметра



**Рис. 1.** Структура трансвелл-системы. Трансвелл-система представлена двумя камерами: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры является полупроницаемой мембраной, на которую высеивали клетки линии Caco-2 с плотностью 10<sup>5</sup>/см<sup>2</sup>.

Millicell ERS-2 (Millipore, США). При его значении выше 500 мОм см<sup>2</sup> к клеткам добавляли тестируемые концентрации пероксида водорода в питательной среде. После окончания инкубации питательную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хенкса (Sigma-Aldrich) с 25 мМ HEPES (Sigma-Aldrich) и 1% диметилсульфоксида (ПанЭко). Затем добавляли субстрат Pgp фексофенадин в апикальную камеру в концентрации 150 мкМ [23]. Через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из базолатеральной камеры-реципиента для определения концентрации субстрата (a-b транспорт, обусловленный пассивной диффузией против работы транспортера).

В аналогичной трансвелл-системе оценивали транспорт фексофенадина из базолатеральной камеры в апикальную (b-a транспорт, обусловленный пассивной диффузией и работой Pgp). Для этого субстрат в той же концентрации добавляли в базолатеральную камеру, а затем через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из апикальной камеры для определения концентрации фексофенадина.

Транспорт маркерного субстрата рассчитывали по формуле [24]:

$$Papp = \frac{dQ}{dt} \frac{1}{(AC_0)}$$

где Рарр — коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient, см/с), dQ/dt изменение количества субстрата в камере-реципиенте за время инкубации (мкМ мл/с), A площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе (см<sup>2</sup>),  $C_0$  — начальная концентрация субстрата в камере-доноре (мкМ).

Концентрации фексофенадина в транспортной среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием при длине волны 220 нм. Исследование выполнялось на хроматографе (Стайер, Россия) по оригинальной методике [25]. Полученную пробу транспортной среды, содержащую фексофенадин, в количестве 50 мкл, разводили в 150 мкл подвижной фазы и 100 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

При анализе использовали хроматографическую колонку (Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A, 250 × 4.6, США) с зернением 4 мкм. Температура разделения: 45°С, скорость потока: 1 мл/мин, состав подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила (PanReac AppliChem, Испания), 267.4 мл воды деионизированной, 6.33 мл кислоты уксусной ледяной (PanReac AppliChem), с добавлением триэтиламина (PanReac AppliChem) до рН 6.7. Время удерживания фексофенадина в данных условиях составляло 12.8 мин. Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составлял 1.2–57.4 мкМ.

Оценка плотности межклеточных контактов. Влияние  $H_2O_2$  на плотность межклеточных контактов клеток оценивали по величине трансэпителиального сопротивления (TEER), которое измеряли с помощью вольтметра Millicell ERS-2 (Millipore, США). Показано, что чем выше плотность межклеточных контактов, тем выше трансэпителиальное сопротивление [26].

Измеряли данный показатель до начала инкубации монослоя клеток с пероксидом водорода и по окончании экспозиции, то есть непосредственно перед выполнением транспортных экспериментов.

Статистический анализ. Полученные результаты анализировали с помощью программ Stat-Soft Statistica 13.0 (США, номер лицензии JPZ8111521319AR25ACD-W) и Microsoft Excel for MAC ver. 16.24 (ID02984-001-000001). Результаты представлены в виде  $M \pm SD$ . Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ ANOVA, попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюме-



**Рис. 2.** Изменение жизнеспособности клеток линии Сасо-2 в зависимости от концентрации пероксида водорода при инкубации 3 и 24 ч, ( $M \pm SD$ , n = 3). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. \* – достоверное отличие от контроля,  $p \le 0.01$ .

на—Кейлса. Статистически значимыми считали различия при p < 0.05.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитотоксическое и прооксидантное действие  $H_2O_2$  на клетки линии Сасо-2. Цитотоксическое действие  $H_2O_2$  оценивалось в ходе МТТ-теста. В контрольной группе жизнеспособность клеток составила 100% и статистически значимо не отличалась от значений в группе клеток, подвергавшихся воздействию пероксида водорода в концентрациях 0.1–10 мкМ в течение 3 и 24 ч. При инкубации клеток с  $H_2O_2$  в течение 3 и 24 ч при концентрации прооксиданта 50 мкМ жизнеспособность клеток собность клеток снижалась до 71.3 ± 12.1% (p = 0.01) и 54.1 ± 9.5% (p = 0.001), а при 100 мкМ – до 70.9 ± 12.2% (p = 0.006) и 26.8 ± 14.3% (p = 0.0003), соответственно (рис. 2).

Оценку окислительного повреждения белков клеток линии Caco-2 под действием  $H_2O_2$  проводили по анализу содержания SH-групп и карбонильных производных белков в мембранной фракции клеточного лизата, а повреждения липидов — по концентрации продуктов ПОЛ в тотальном лизате клеток.

Концентрация SH-групп в мембранах клеток при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0.1-5 мкМ в течение 3 ч статистически значимо не изменялась по сравнению с показателями контроля, а в концентрациях 10 мкМ, 50 мкМ и 100 мкМ снижалась на 40.8% (p = 0.039), 56.7% (p = 0.016) и 74.2% (p = 0.007), соответственно (рис. 3).

При инкубировании клеток Caco-2 с пероксидом водорода в течение 24 ч во всех тестируемых концентрациях 0.1–100 мкМ уровень белковых SH-групп мембран достоверно снижался с максимальными изменениями при концентрации 100 мкМ (на 74.4% ниже значений контроля, *p* = = 0.01) (рис. 3).

При воздействии  $H_2O_2$  на клетки линии Сасо-2 в течение 3 ч уровень карбонильных производных белков в мембране клеток статистически значимо не изменялся в диапазоне концентраций от 0.1 до 10 мкМ и повышался в концентрации 50 мкМ на 87.3% (p = 0.005), а в концентрации 100 мкМ на 130.4% (p = 0.001) по сравнению с показателями контроля (рис. 4).

При увеличении длительности воздействия прооксиданта до 24 ч уровень карбонильных производных белков увеличивался по сравнению со значениями контроля при концентрациях пероксида водорода 5, 10, 50 и 100 мкМ на 74.8% (p = 0.01), 97.1% (p = 0.01), 150.5% (p = 0.001) и 189.3% (p = 0.0005), соответственно (рис. 4).

Воздействие пероксида водорода на клетки линии Сасо-2 в течение 3 ч приводило к увеличению уровня продуктов ПОЛ лишь в концентрации 100 мкМ на 35.7% (p = 0.04) по сравнению с контролем. Увеличение длительности экспозиции  $H_2O_2$  до 24 ч сопровождалось повышением содержания МДА и 4-гидроксиолефинов уже при двух концентрациях прооксиданта: 50 мкМ – на 42.1% (p = 0.006) и 100 мкМ – на 57.1% (p = 0.0007), соответственно (рис. 5).

Таким образом, цитотоксичными для клеток линии Сасо-2 являются концентрации  $H_2O_2$  50 и 100 мкМ при длительности воздействия 3 и 24 ч. При этом окислительные изменения в белках наблюдаются и при более низких концентрациях прооксиданта (10 мкМ при инкубации 3 ч, 0.1–10 мкМ при 24-часом воздействии).

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Так, в исследованиях на культуре клеток фибробластов установлено, что пероксид водорода в концентрации 50 мкМ запускает апоптоз, а выше 100 мкМ — некроз [27], аналогичные результаты были описаны для клеток линии 293T



**Рис. 3.** Изменение концентрации белковых SH-групп мембран клеток линии Caco-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0.1-100 мкМ в течение 3 и 24 ч ( $M \pm SD$ , n = 3). Количественное определение тиоловых SH-групп проводили фотометрическим методом. \* – достоверное отличие от контроля, p < 0.05.



**Рис. 4.** Изменение концентрации карбонильных производных белков мембран клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0.1-100 мкМ в течение 3 и 24 ч ( $M \pm SD$ , n = 3). Количественное определение карбонилированных белков проводили фотометрическим методом. \* – достоверное отличие от контроля, p < 0.05.

(клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека) и клеток миокарда при сроке инкубации от 6 до 36 ч [28]. Следовательно, полученные результаты указывают, что концентрации  $H_2O_2 0.1-10$  мкМ являются физиологическими и имеют регуляторное значение.

Влияние  $H_2O_2$  на количество Pgp в клетках линии Caco-2. Количество Pgp в лизате клеток линии Caco-2, оцененное методом иммуноферментного анализа, составило 118.1 ± 10.6 нг/мг белка.

Количество Pgp статистически значимо не изменялось при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0.1-50 мкМ в течение 3 ч, однако при максимальной концентрации  $H_2O_2$  100 мкМ статистически значимо снижалось на 55.3% (p = 0.003) по сравнению с контролем (рис. 6).

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

При инкубации клеток Сасо-2 с пероксидом водорода в течение 24 ч количество белкатранспортера повышалось при концентрациях прооксиданта 0.1 мкМ, 0.5 мкМ и 1 мкМ на 78.9% (p = 0.01), 67.1% (p = 0.02) и 44.6% (p = 0.04), соответственно, по сравнению с контролем. В концентрациях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5, 10 и 50 мкМ уровень Рдр не отличался от контроля (p > 0.05), а в максимальной концентрации 100 мкМ его уровень достоверно снижался на 65.1% (p = 0.02) (рис. 6).

Влияние  $H_2O_2$  на количество Nrf2. Ранее нами было показано, что повышение количества Pgp при развитии окислительного стресса может быть связано с активацией транскрипционного фактора Nrf2 (Nuclear erythroid 2-related factor) [29]. Поэтому в данном исследовании также был оценен



**Рис. 5.** Изменение концентрации продуктов перекисного окисления липидов (МДА и 4-гидроксиолефинов) в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0.1-100 мкМ в течение 3 и 24 ч ( $M \pm SD$ , n = 3). Количественное определение продуктов ПОЛ проводили фотометрическим методом. \* – достоверное отличие от контроля, p < 0.05.



**Рис. 6.** Изменение количества Рдр в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0.1-100 мкМ в течение 3 и 24 ч, ( $M \pm SD$ , n = 3). Количество Рдр определяли с помощью ИФА. \* – достоверное отличие от контроля, p < 0.05.

уровень Nrf2 и его взаимосвязь с количеством белка-транспортера.

При воздействии пероксида водорода во всех протестированных концентрациях в течение 3 ч на клетки линии Сасо-2 количество транскрипционного фактора Nrf2 не изменялось (рис. 7). Увеличение срока инкубации до 24 ч способствовало повышению количества Nrf2 при концентрациях  $H_2O_2$  0.1, 0.5 и 1 мкМ на 394.1% (p = 0.006), 311.7% (p = 0.01) и 214.7% (p = 0.03), соответственно (рис. 7).

При проведении корреляционного анализа была выявлена прямая корреляционная зависимость между количеством Nrf2 и Pgp при длительности воздействия пероксида водорода 24 ч (коэффициент корреляции Пирсона r = 0.76, p = 0.00002) (рис. 8).

Таким образом, пероксид водорода в концентрациях 0.1-1 мкМ повышает уровень транскрипционного фактора Nrf2, который в свою очередь увеличивает количество белка-транспортера Pgp. Повышение концентрации  $H_2O_2$  выше 5 мкМ нивелирует индуцирующее действие прооксиданта как на количество Nrf2, так и на уровень Pgp.

Влияние  $H_2O_2$  на плотность межклеточных контактов клеток линии Caco-2. Влияние  $H_2O_2$  на плотность межклеточных контактов оценивали по величине трансэпителиального сопротивления монослоя клеток. До начала экспериментов



**Рис.** 7. Изменение количества Nrf2 в лизате клеток линии Caco-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0.1–100 мкМ в течение 3 и 24 ч, ( $M \pm SD$ , n = 3). Количество Nrf2 определяли с помощью  $U\Phi A$ . \* – достоверное отличие от контроля, p < 0.05.



**Рис. 8.** Корреляционная зависимость между количеством Nrf2 (нг/мг белка) и Pgp (нг/мг белка) при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0.1–100 мкМ в течение 24 ч.

сопротивление клеточного монослоя составляло 775.3  $\pm$  34.7 мОм см<sup>2</sup>.

При экспозиции 3 ч пероксид водорода в концентрациях 0.1-50 мкМ достоверно не влиял на значение трансэпителиального сопротивления, данный показатель достоверно не отличался от значений контроля (p > 0.05). Однако в концентрации 100 мкМ прооксидант вызывал снижение трансэпителиального сопротивления на 62.5% (p = 0.0001) (рис. 9).

При инкубации в течение 24 ч  $H_2O_2$  в концентрациях 0.1—1 мкМ достоверно не влиял на значение трансэпителиального сопротивления, а в концентрациях 5, 10, 50 и 100 мкМ вызывал сни-

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

жение данного показателя на 28.4% (p = 0.008), 28.2% (p = 0.003), 43.8% (p = 0.0003) и 74.5% (p = 0.0002), соответственно (рис. 9).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что плотность межклеточных контактов уменьшается при воздействии пероксида водорода в концентрации 100 мкМ при экспозиции в течение 3 ч и в концентрациях 5– 100 мкМ при 24-часовой экспозиции.

Влияние  $H_2O_2$  на транспорт субстрата Pgp фексофенадина через монослой клеток линии Caco-2. Коэффициент кажущейся проницаемости Papp b-a фексофенадина, характеризующий его транспорт из базолатеральной камеры в апикальную за



Рис. 9. Значения трансэпителиального сопротивления (TEER) монослоя клеток линии Caco-2 (мОм см<sup>2</sup>) при воздействии пероксида водорода в диапазоне концентраций 0.1-100 мкМ в течение 3 и 24 ч. ( $M \pm SD$ , n = 3). Трансэпителиальное сопротивление определяли с помощью вольтметра. \* – достоверное отличие от контроля, p < 0.01.

счет пассивной диффузии и работы Pgp, в среднем составил  $3.08 \times 10^{-6} \pm 0.94 \times 10^{-6}$  см/с, а коэффициент кажущейся проницаемости Papp a-b, оценивающий транспорт из апикальной камеры в базолатеральную за счет пассивной диффузии против работы Pgp, равнялся  $1.13 \times 10^{-6} \pm 0.6 \times$  $\times 10^{-6}$  см/с Представленные данные показывают, что транспорт, обусловленный Рдр, почти в 3 раза интенсивнее транспорта, происходящего за счет пассивной диффузии против функционирования белка-транспортера (p = 0.004) (табл. 1).

При возлействии пероксила водорода на клетки линии Сасо-2 в течение 3 ч были получены следующие результаты: при концентрациях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1-5 мкМ коэффициенты кажущейся проницаемости Рарр b-a фексофенадина и Рарр a-b достоверно не отличались от показателей контроля.

В концентрации 10 мкМ пероксил водорода вызывал снижение коэффициента кажущейся проницаемости Рарр b-a на 56.3% (p = 0.0004) и повышение коэффициента кажущейся проницаемости Рарр a-b на 50.4% (p = 0.01). Аналогичным образом при концентрации 50 мкМ пероксид водорода вызывал снижение коэффициента кажущейся проницаемости Рарр b-a на 18.4% (p == 0.01) и повышение коэффициента кажущейся проницаемости Рарр a-b на 155.6% (p = 0.01). При этом стоит отметить, что при данных концентрациях (10 и 50 мкМ) прооксиданта значения коэффициентов кажущейся проницаемости Рарр b-a и Рарр a-b фексофенадина выравнивались и достоверно между собой не различались. Полученные результаты свидетельствуют о снижении

Н <sub>2</sub> О <sub>2</sub> , мкМ	Рарр $b-a$ , ×10 <sup>-6</sup> см/с	Рарр $a-b$ , ×10 <sup>-6</sup> см/с	Рарр <i>b—a</i> , ×10 <sup>-6</sup> см/с	Рарр <i>a—b</i> , ×10 <sup>-6</sup> см/с
	3 ч		24 ч	
Контроль	$3.09\pm0.13$	$1.17\pm0.15$	$3.06\pm0.35$	$1.03\pm0.34$
0.1	$3.08\pm0.11$	$0.94\pm0.16$	$2.96\pm0.25$	$0.95\pm0.11$
0.5	$2.90\pm0.59$	$1.17\pm0.03$	$3.65\pm0.76$	$1.18\pm0.08$
1	$2.79\pm0.42$	$1.16\pm0.09$	$3.59\pm0.61$	$1.36 \pm 0.43$
5	$2.52\pm0.43$	$1.26\pm0.06$	$2.85\pm0.76$	$1.19\pm0.05$
10	$1.35 \pm 0.13^{*}$	$1.76 \pm 0.18^{*}$	$3.82\pm0.65$	$2.53 \pm 0.39^{*}$
50	$2.52\pm0.16*$	$2.99\pm0.65^*$	$5.16 \pm 0.47*$	$5.52 \pm 0.38*$
100	$4.92 \pm 0.96^{**}$	$5.15 \pm 1.81^{**}$	$7.81 \pm 0.18^{*}$	$8.95 \pm 1.05^{*}$

**Таблица 1.** Влияние  $H_2O_2$  в диапазоне концентраций 0.1-100 мкМ в течение 3 и 24 ч на транспорт субстрата Pgp (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток Caco-2 ( $M \pm SD$ , n = 3)

Примечание. Клетки линии Сасо-2 после экспозиции с пероксилом водорода (3 и 24 ч) инкубировали в транспортной среде с добавлением фексофенадина (150 мкМ) в апикальную и базолатеральную камеры соответствующих трансвелл-систем. Забирали образцы через 1, 2 и 3 ч из противоположной камеры-реципиента: базолатеральной (а-b транспорт) и из апикальной камеры (*b-a* транспорт) для определения концентрации фексофенадина. Концентрацию фексофенадина в транспортной среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. \* – Достоверное отличие от контроля,  $p \le 0.01$ , \*\* – достоверное отличие от контроля, p < 0.05.

активности Pgp при воздействии пероксида водорода в указанных концентрациях.

При увеличении концентрации прооксиданта до 100 мкМ происходило повышение как коэффициента кажущейся проницаемости Рарр b-a на 59.2% (p = 0.03), так и коэффициента кажущейся проницаемости Рарр a-b – на 340.2% (p = 0.02). Данные показатели между собой также не различались. Выявленные изменения свидетельствуют об усилении транспорта фексофенадина через монослой клеток линии Сасо-2 как в эффлюксном направлении функционирования Рдр, так и в противоположном, то есть о повышении проницаемости клеточного монослоя.

При воздействии пероксида водорода на клетки линии Сасо-2 в течение 24 ч были получены следующие результаты:  $H_2O_2$  в концентрациях 0.1-5 мкМ достоверно не влиял на коэффициенты кажущейся проницаемости Рарр b-a и Рарр a-b фексофенадина, их значения достоверно не отличались от показателей контроля.

В концентрации 10 мкМ пероксид водорода повышал коэффициент кажущейся проницаемости Рарр a-b фексофенадина на 145.6% (p = 0.04) по сравнению с контролем и не влиял на коэффициент кажущейся проницаемости Рарр b-a, что свидетельствует о снижении активности Рдр и повышении проницаемости клеточного монослоя.

Увеличение концентрации  $H_2O_2$  до 50 и 100 мкМ вызывало повышение коэффициента кажущейся проницаемости Рарр *b*–*a* на 68.6% (*p* = 0.006) и 155.2% (*p* = 0.0003) и повышение коэффициента кажущейся проницаемости Рарр *a*–*b* на 435.9% (*p* = 0.0003) и 768.9% (*p* = 0.0005), соответственно (табл. 1), что является следствием дальнейшего повышения проницаемости клеточного монослоя в обоих направлениях.

Таким образом, при воздействии  $H_2O_2$  в течение 3 ч в концентрациях выше 10 мкМ происходит снижение активности Pgp, а в концентрации 100 мкМ также повышение проницаемости клеточного монослоя в обоих направлениях для субстрата белка-транспортера, как трансцеллюлярно, так и парацеллюлярно.

Увеличение длительности экспозиции до 24 ч не только снижает активность Pgp, но и повышает проницаемость клеточного монослоя для субстрата Pgp уже с концентрации прооксиданта 10 мкМ.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки линии Сасо-2 представляют собой клетки аденокарциномы толстого кишечника человека. При культивировании данных клеток в течение 21 сут происходит их спонтанная дифференцировка в столбчатые поляризованные эпителиальные клетки, подобные энтероцитам тонко-

го кишечника [30]. Исторически клетки линии Caco-2 после их спонтанной дифференцировки используют для изучения абсорбции лекарственных веществ, а также оценки проникновения веществ через билипидную мембрану [31]. При этом особенностью образуемого монослоя клеток линии Caco-2 является то, что на нем можно изучать все виды транспорта веществ: парацелюллярный и трансцеллюлярный (пассивная диффузия, облегченная диффузия, активный транспорт, в том числе с помощью белка-транспортера Pgp), трансцитоз [32].

В настоящем исследовании в опытах *in vitro* оценивалось влияние окислительного стресса на транспорт субстрата белка-транспортера Рдр фексофенадина через монослой клеток линии Сасо-2 после их спонтанной дифференцировки.

Окислительный стресс моделировали инкубированием клеток с  $H_2O_2$  в диапазоне концентрации 0.1–100 мкМ в течение 3 и 24 ч. Показано, что  $H_2O_2$  может непосредственно контактировать с цитоплазматической мембраной и межклеточными контактами и проникать внутрь клетки путем пассивной диффузии [33] или через аквапорины [34].

В ходе реакции Фентона и Габера-Вейса из пероксида водорода образуется гидропероксидный радикал НО, который вызывает повреждение белков, липидов и нуклеиновых кислот [35].

В ходе выполнения настоящего исследования нами было показано, что воздействие пероксида водорода в течение 3 ч на клетки линии Сасо-2 в концентрациях 0.1-5 мкМ не вызывало окислительного повреждения биомакромолекул, существенно не влияло на функционирование белкатранспортера Рдр и на проницаемость клеточного монослоя для его субстрата фексофенадина. Повышение концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> до 10-50 мкМ сопровождалось повреждением белков, снижением активности Рдр (скорее всего вследствие окисления SH-групп в его молекуле, доля которых составляет примерно 1% [36]), при этом количество белка-транспортера не изменялось, также как сохранялась целостность клеточного монослоя. Увеличение концентрации прооксиданта до 100 мкМ приводило к усилению окислительного стресса, повреждению белков, липидов, снижению количества Pgp, его активности, повышению парацелюллярного и трансцелюллярного транспорта фексофенадина через клеточный монослой и снижению жизнеспособности клеток.

При инкубировании клеток линии Caco-2 с пероксидом водорода в течение 24 ч было показано, что  $H_2O_2$  уже в концентрациях 0.1–1 мкМ снижал содержание белковых SH-групп. Однако при этом происходило повышение количества Pgp, что, видимо, предотвращало снижение активности белка-транспортера (данный показа-

тель достоверно не отличался от контроля), несмотря на окисление SH-групп в его молекуле.

Увеличение концентрации  $H_2O_2$  до 5–10 мкМ сопровождалось усилением окислительного стресса, что, видимо, приводило к снижению уровня Рдр до величин нормы и уменьшению по сравнению с контролем активности белка транспортера при концентрации прооксиданта 10 мкМ.

В концентрациях  $H_2O_2$  50—100 мкМ наблюдалось дальнейшее усиление окислительного стресса, повреждение как белков, так и липидов, снижение количества Рдр при концентрации прооксиданта 100 мкМ, его активности, повышение парацелюллярного и трансцелюллярного транспорта фексофенадина через клеточный монослой и снижение жизнеспособности клеток.

Таким образом, при воздействии  $H_2O_2$  на транспорт субстрата Pgp через монослой клеток линии Caco-2 в течение 3 и 24 ч отмечалась аналогичная картина: сначала снижается транспорт фексофенадина, опосредованный Pgp, а затем при повышении концентрации прооксиданта до 50—100 мкМ нарушается целостность клеточного монослоя и растет транспорт субстрата за счет пассивной диффузии пара- и трансцеллюлярно.

Однако есть и ряд отличий. При длительности воздействия пероксида водорода 24 ч описанные выше изменения начинаются при более низких концентрациях прооксиданта. С другой стороны, при увеличении срока экспозиции до 24 ч клетки начинают адаптироваться к возникшим патологическим условиям, повышая количество белкатранспортера Рgp при концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – 0.1–1 мкМ.

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Так, в исследовании Ziemann и соавт. на культуре крысиных гепатоцитов было показано, что  $H_2O_2$  в концентрации 0.5–1 мМ при инкубации в течение 72 ч вызывал повышение количества Pgp, экспрессии его гена и активности белка-транспортера [9]. В работе Felix и Barrand [10] выявлено, что  $H_2O_2$  в концентрации до 500 мкМ при воздействии в течение 48 ч на первичную культуру эндотелия крыс повышал экспрессию Pgp и в меньшей степени влиял на активность белка-транспортера.

В то же время Hoshi и соавт. установлено, что обработка клеток hCMEC/D3 (модель гематоэнцефалического барьера *in vitro*)  $H_2O_2$  в концентрации 0.5–5 мМ при экспозиции 20 мин снижал транспортную активность Pgp [37], что согласуется с нашими результатами при длительности воздействия прооксиданта 3 ч.

В отличие от ряда процитированных работ в нашем исследовании, несмотря на повышение количества Рдр при воздействии пероксида водорода в течение 24 ч, активность белка-транспортера не изменялась. Данные различия могут быть связаны с разной длительностью экспозиции, концентрацией  $H_2O_2$  и типами клеток, используемых в исследованиях, а также методиками оценки активности Pgp, учетом или не учетом вклада парацеллюлярного транспорта в перенос субстрата, что в цитируемых работах не изучалось.

В ограничении парацеллюлярного транспорта наибольшее значение имеют плотные соединения (tight junction). Три типа трансмембранных белков: окклюдин, клаудины и zonula occludens (ZO, относяшиеся к семейству каркасных белков мембраносвязанных гуанилаткиназ) были идентифицированы в области плотных соединений [38]. В исследовании на клетках линии Сасо-2 было показано, что окислительный стресс вызывал повышение парацеллюлярного транспорта, что было связано с нарушением плотных соединений из-за фосфорилирования тирозина окклюдина. ZO-1, Е-кадгерина и бета-катенина [39], что согласуется с нашими результатами и объясняет увеличение транспорта фексофенадина через клеточный монослой в обоих направлениях при увеличении концентрации Н<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и времени его экспозиции.

В рамках настоящего исследования также был изучен возможный механизм увеличения количества белка-транспортера в условиях окислительного стресса. В частности, было показано, что повышение уровня Рgp прямопропорционально повышению количества транскрипционного фактора Nrf2.

Nrf2 — редокс-чувствительный транскрипционный фактор. Его экспрессия повышается при развитии окислительного стресса и направлена на защиту клетки от воздействия свободных радикалов [40]. В условиях нормы данный транскрипционный фактор находится в комплексе с белком-репрессором Keap 1, который, с одной стороны, способствует убиквитированию и протеасомной деградации Nrf2, а с другой — предотвращает его проникновение из цитоплазмы в ядро.

После активации комплекс Keap1–Nrf2 диссоциирует, и Nrf2 транслоцируется в ядро, где связывается с ARE (antioxidant-response elements) и активирует транскрипцию защитных ферментов [41].

Полученные результаты могут иметь важное практическое значение. Проникновение веществ через монослой клеток линии Caco-2 является классической модельной системой абсорбции веществ в тонком кишечнике [31, 32]. Выявленное в нашем исследовании снижение активности Рдр и повышение проницаемости монослоя клеток для субстрата белка-транспортера при воздействии пероксида водорода может свидетельствовать о повышении абсорбции веществ-субстратов белка-транспортера в тонком кишечнике при развитии заболеваний, сопровождающихся окислительным стрессом, что в свою очередь может приводить к увеличению их концентрации в плазме крови и сопровождаться развитием побочных эффектов фармакотерапии.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами показано, что кратковременное воздействие  $H_2O_2$  в течение 3 ч в концентрации 10—50 мкМ снижает активность (но не количество) Pgp и, соответственно, транспорт его субстрата, опосредованный данным белкомтранспортером, при сохранении целостности клеточного монослоя. Увеличение концентрации прооксиданта до 100 мкМ приводит к снижению количества Pgp и нарушению целостности клеточного монослоя, что приводит к повышению трансцеллюлярного и парацеллюлярного транспорта фексофенадина.

При инкубировании клеток линии Caco-2 с пероксидом водорода в течение 24 ч в концентрациях 0.1–1 мкМ повышается количество Pgp, опосредованное транскрипционным фактором Nrf2, но активность белка-транспортера остается неизменной. В концентрации прооксиданта 10 мкМ снижается активность Pgp и повышается проницаемость клеточной мембраны, а в концентраци-ях 50–100 мкМ происходит снижение количества (100 мкМ) и активности Pgp и повышение пара- и трансцелюллярной проницаемости клеточного монослоя для субстрата Pgp фексофенадина.

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

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

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Maiti S. 2017. Nanometric biopolymer devices for oral delivery of macromolecules with clinical significance. *Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics*. 6, 109–138. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-52725-5.00006-X
- Subramanian N., Condic-Jurkic K., O'Mara M.L. 2016. Structural and dynamic perspectives on the promiscuous transport activity of P-glycoprotein. *Neurochem. Int.* 98, 146–152.

https://doi.org/10.1016/j.neuint.2016.05.005

 Esser L., Zhou F., Pluchino K.M., Shiloach J., Ma J., Tang W.K., Gutierrez C., Zhang A., Shukla S., Madi-

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ том 38 № 4 2021

gan J.P., Zhou T., Kwong P.D., Ambudkar S.V., Gottesman M.M., Xia D. 2017. Structures of the multidrug transporter P-glycoprotein reveal asymmetric ATP binding and the mechanism of polyspecificity. *J. Biol. Chem.* **292**, 446–461.

https://doi.org/10.1074/jbc.M116.755884

- Якушева Е.Н., Титов Д.С., Правкин С.К. 2017. Локализация, модели функционирования и физиологические функции гликопротеина-Р. *Успехи физиол. наук.* 48 (4), 70–87.
- 5. Кукес В.Г., Грачев С.В., Сычев Д.А., Раменская Г.В. 2008. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей. М.: Гэотар-Медиа, 2008. 304 с.
- Aller S.G., Yu J., Ward A., Weng Y., Chittaboina S., Zhuo R., Harrell P.M., Trinh Y.T., Zhang Q., Urbatsch I.L., Chang G. 2009. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*. 323 (5922), 1718–1722. https://doi.org/10.1126/science.1168750.
- Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Попова Н.М., Черных И.В., Титов Д.С. 2014. Структура, функции гликопртеина-Р и его значение для рациональной фармакотерапии. Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 12 (2), 3–11.
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 2015. Free radicals in biology and medicine. 5th Edition. New York: Oxford University Press. 905 p. https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780198717478. 001.0001
- 9. Ziemann C., Bürkle A., Kahl G.F., Hirsch-Ernst K.I. 1999. Reactive oxygen species participate in mdr1b mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures. *Carcinogenesis*. **20** (3), 407– 414.

https://doi.org/10.1093/carcin/20.3.407

Felix R.A., Barrand M.A. 2002. P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells: evidence for regulation by transient oxidative stress. *J. Neurochem.* 80 (1), 64–72.

https://doi.org/10.1046/j.0022-3042.2001.00660.x

- Basuroy S., Sheth P., Kuppuswamy D., Balasubramanian S., Ray R.M., Rao R.K. 2003. Expression of kinase-inactive c-Src delays oxidative stress-induced disassembly and accelerates calcium-mediated reassembly of tight junctions in the Caco-2 cell monolayer. *J. Biol. Chem.* 278 (14), 11916–11924. https://doi.org/10.1074/jbc.M211710200
- Van der Paal J., Neyts E.C., Verlackt C.C.W., Bogaerts A. 2016. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress, *Chem. Sci.* 7, 489–498. https://doi.org/10.1039/C5SC02311D
- Hilgers A.R., Conradi R.A., Burton P.S. 1990. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa. *Pharmac. Res.* 7 (9), 902–910. http://dx.doi.org/10.1023/A:1015937605100
- 14. Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Черных И.В., Попова Н.М., Котлярова А.А., Слепнев А.А. 2019. Метод анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-Р in vitro. Обзоры по клинической

фармакологии и лекарственной терапии. 17 (1), 71–78. https://doi.org/10.7816/RCF17171-78

- 15. 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. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7 26
- 16. Wibo M. 1976. Cell Fractionation by Centrifugation Methods. In: Eukaryotic Cell Function and Growth. Eds Dumont J.E., Brown B.L., Marshall N.J. Boston: Springer, p. 1-17. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-4322-6 1
- 17. 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. https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999

18. Boschi-Muller S., Azza S., Sanglier-Cianferani S., Talfournier F., Dorsselear A.V., 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, 35908-35913.

https://doi.org/10.1074/jbc.M006137200

- 19. Ellman L.G. 1959 Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77.
  - https://doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6
- 20. Gérard-Monnier D., Erdelmeier I., Régnard K., Moze-Henry N., Yadan J.C., Chaudière J. 1998. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation, Chem. Res. Toxicol. 11 (10), 1176-1183. https://doi.org/10.1021/tx9701790
- 21. Weber D., Davies M.J., Grunea T. 2015. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions. Redox Biol. 5, 367-380.

https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.005

22. Bronsky E.A., Falliers C.J., Kaiser H.B., Ahlbrandt R., Mason J.M. 1998. Effectiveness and safety of fexofenadine, a new nonsedating H1-receptor antagonist in the treatment of fall allergies. Allergy Asthma Proc. 19, 135-141.

https://doi.org/10.2500/108854198778604112

- 23. Petri N., Tannergren C., Rungstad D., Lennernäs H. 2004. Transport Characteristics of Fexofenadine in the Caco-2 Cell Model. Pharmac. Res. 21 (8), 1398-1404. https://doi.org/10.1023/B:PHAM.0000036913.90332.b1
- 24. Elsby R., Surry D.D., Smith V.N., Gray A.J. 2008. Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions, Xenobiotic, 38, 1140-1164. https://doi.org/10.1080/00498250802050880
- 25. Ерохина П.Д., Абаленихина Ю.В., Щулькин А.В., Черных И.В., Попова Н.М., Слепнев А.А., Якушева Е.Н. 2020. Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-Р in vitro. Российский медико-биологический вестник им. акад. И.П. Павлова. 28 (2), 135-142.

https://doi.org/10.23888/PAVLOVJ2020282135-142

- 26. Srinivasan B., Kolli A.R., Esch M.B., Abaci H.E., Shuler M.L., Hickman J.J. 2015. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. J. Lab. Autom. 20 (2), 107-126. https://doi.org/10.1177/2211068214561025
- 27. Hirsch I., Prell E., Weiwad M. 2014. Assessment of cell death studies by monitoring hydrogen peroxide in cell culture. Analyt. Biochem. 456 (1), 22-24. https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.04.009
- 28. Xiang J., Wan C., Guo R., Guo D. 2016. Is hydrogen peroxide a suitable apoptosis inducer for all cell types? Biomed Res Int. Article ID 7343965. https://doi.org/10.1155/2016/7343965
- 29. Shchulkin A.V., Abalenikhina Y.V., Erokhina P.D., Chernykh I.V., Yakusheva E.N. 2021. The role of P-glycoprotein in decreasing cell membranes permeability during oxidative stress. Biochemistry (Moscow). 86 (2), 197-206.

https://doi.org/10.1134/S0006297921020085

- 30. Hidalgo I.J., Raub T.J., Borchardt R.T. 1989. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. Gastroenterology. 96 (3), 736-749.
- 31. Sun H., Chow E.C., Liu S., Du Y., Pang K. S. 2008. The Caco-2 cell monolayer: Usefulness and limitations. Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 4 (4), 395-411. https://doi.org/10.1517/17425255.4.4.395
- 32. Shah P., Jogani V., Bagchi T., Misra A. 2006. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption. Biotechnology Progress., 22 (1), 186-198. https://doi.org/ 10.1021 / bp050208u
- 33. Möller M.N., Cuevasanta E., Orrico F., Lopez A.C., Thomson L., Denicola A. 2019. Diffusion and transport of reactive species across cell membranes. Adv. Exp. Med. Biol. 1127, 3-19. https://doi.org/10.1007/978-3-030-11488-6 1
- 34. Hara-Chikuma M., Watanabe S., Satooka H. 2016. Involvement of aquaporin-3 in epidermal growth factor receptor signaling via hydrogen peroxide transport in cancer cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 471 (4), 603-609. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.02.010
- 35. Sies H. 2019. Oxidative stress: eustress and distress in redox homeostasis. Handbook of Stress Series. 3, 153-163.

https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8

36. Sim H.M., Bhatnagar J., Chufan E.E., Kapoor K., Ambudkar S.V. 2013. Share conserved walker A cysteines 431 and 1074 in human P-glycoprotein are accessible to thiol-specific agents in the apo and ADP-vanadate trapped conformations. Biochemistry. 52 (41), 7327-7338.

https://doi.org/10.1021/bi4007786

37. Hoshi Y., Uchida Y., Tachikawa M., Ohtsuki S., Couraud P., Suzuki T., Terasaki T. 2019. Oxidative stress-induced activation of Abl and Src kinases rapidly induces P-glycoprotein internalization via phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine-14, decreasing cortisol efflux at the blood-brain barrier. J. Cerebral Blood Flow Metabolism. 40 (2), 420-436. https://doi.org/10.1177/0271678X18822801

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ 2021 том 38 Nº 4

305

- Kim S., Kim G.H. 2017. Roles of claudin-2, ZO-1 and occludin in leaky HK-2 cells. *PLoS One.* 12 (12), e0189221. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189221
- Rao R.K., Basuroy S., Rao V.U., Karnaky K. J., Gupta A. 2002. Tyrosine phosphorylation and dissociation of occludin-ZO-1 and E-cadherin-beta-catenin complexes from the cytoskeleton by oxidative stress. *Biochem. J.* 368, 471–481.

https://doi.org/10.1042/BJ20011804

- Kang K.A., Hyun J.W. 2017. Oxidative stress, Nrf2, and epigenetic modification contribute to anticancer drug resistance. *Toxicol. Res.* 33, 1–5. https://doi.org/10.5487/TR.2017.33.1.001
- Wen Zh., Liu W., Li X., Chen W., Liu J., Wen Zh., Liu Zh. 2019. A Protective Role of the NRF2-Keap1 Pathway in Maintaining Intestinal Barrier Function, *Oxid. Med. Cell Longev.* Article ID 1759149. https://doi.org/10.1155/2019/1759149

# Effect of Oxidative Stress on the Transport of P-Glycoprotein Substrate through the Cell Monolayer

A. V. Shchulkin<sup>1</sup>, Yu. V. Abalenikhina<sup>1</sup>, A. A. Seidkulieva<sup>1</sup>, I. V. Chernykh<sup>1</sup>, E. N. Yakusheva<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Ryazan State Medical University, Ryazan, 390026 Russia \*e-mail: aleksevshulkin@rambler.ru

P-glycoprotein (Pgp) is an ATP-dependent transmembrane protein that is involved in the efflux of lipophilic substances. The aim of this work was to evaluate the effect of oxidative stress (OS) on the transport of Pgp substrate through the monolayer of Caco-2 cells, which overexpress this transporter. OS was simulated by incubating cells with  $H_2O_2$ . Exposure to  $H_2O_2$  at concentrations 10 and 50  $\mu$ M for 3 h caused a decrease in the activity (but not the amount) of Pgp with preservation of intercellular contacts and the integrity of the cell membrane. An increase in the concentrations of  $H_2O_2$  to 100  $\mu$ M decreased the amount of Pgp, disrupted the integrity of the cell monolayer, and increased the transcellular and paracellular transport of the Pgp substrate fexofenadine. Exposure to  $H_2O_2$  at concentrations of  $0.1-1 \mu$ M for 24 h increased the amount of Pgp mediated by the transcription factor Nrf2, but the activity of the transporter protein remained unchanged. At a concentration of  $10 \mu$ M,  $H_2O_2$  decreased the Pgp activity and increased the para- and transcellular permebrane, while at 50–100  $\mu$ M the amount and activity of Pgp decreased and the para- and transcellular permebrane, while at 50–100  $\mu$ M the cell monolayer by inhibiting the activity of the transporter protein, reducing its amount, as well as disrupting the integrity of the cell membrane and intercellular contacts. Cells can adapt to these influences by increasing the amount of Pgp.

Keywords: P-glycoprotein, oxidative stress, Caco-2 cells, transmembrane transport, fexofenadine