

УДК 576.54

ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПРЕГНАН X РЕЦЕПТОРА В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

© 2022 г. Ю. В. Абаленихина^а, *, Е. А. Судакова^а, А. А. Слепнев^а,
А. А. Сеидкулиева^а, П. Д. Ерохина^а, А. В. Щулькин^а, Е. Н. Якушева^а

^аРязанский государственный медицинский университет
имени академика И.П. Павлова Минздрава России, Рязань, 390026 Россия

*e-mail: abalenihiina88@mail.ru

Поступила в редакцию 07.04.2021 г.

После доработки 05.07.2021 г.

Принята к публикации 06.07.2021 г.

Прегнан X рецептор (PXR) — ядерный рецептор, играющий важную роль в регуляции экспрессии ферментов биотрансформации и обмена веществ, а также белков-транспортёров. В литературе имеются противоречивые данные о влиянии окислительного стресса на количество PXR. Цель настоящего исследования — оценить влияние окислительного стресса на функционирование PXR. Работа выполнена на клетках линии Сасо-2. Окислительный стресс моделировали пероксидом водорода в концентрациях 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50 и 100 мкМ и длительностью инкубации 3, 24 и 72 ч. Количество PXR оценивали методом вестерн-блот. H₂O₂ во всех концентрациях при инкубации 3 ч достоверно не влиял на количество PXR. Увеличение экспозиции до 24 ч в концентрации прооксиданта 10, 50 и 100 мкМ приводило к повышению количества PXR, что сочеталось с увеличением концентрации продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Продолжение воздействия пероксида водорода до 72 ч сопровождалось нарастанием концентрации продуктов ПОЛ и снижением количества PXR до показателей контроля (при концентрации H₂O₂ 10 мкМ) или ниже него (при концентрации H₂O₂ 50 и 100 мкМ). Инкубирование клеток с малоновым диальдегидом, конечным продуктом ПОЛ, в концентрации 10 мкМ в течение 24 ч приводило к увеличению содержания PXR. Таким образом, воздействие пероксида водорода в течение 24 ч приводит к повышению количества PXR и связано с индуцирующим воздействием продуктов ПОЛ. Увеличение длительности экспозиции до 72 ч уменьшает индуцирующее действие пероксида водорода.

Ключевые слова: прегнан X рецептор, окислительный стресс, малоновый диальдегид, клеточная линия Сасо-2

DOI: 10.31857/S0233475522010030

ВВЕДЕНИЕ

Прегнан X рецептор (PXR, steroid and xenobiotic receptor — SXR, NR1I2 — Nuclear Receptor Subfamily 1, Group I, Member 2) является членом суперсемейства ядерных рецепторов, которое в основном включает факторы транскрипции [1].

Впервые PXR был независимо клонирован в лабораториях Kliewer в Glaxo Wellcome и Evans в Salk Institute в 1998 году [2, 3]. PXR был назван Kliewer на основании его активации 21-углеродными стероидами прегнанами. В лаборатории Evans данный рецептор получил наименование стероидный и ксенобиотический рецептор (SXR) из-за его активации широким спектром природных и синтетических стероидов, а также ксенобиотиков [3].

PXR экспрессируется преимущественно в печени и кишечнике. Первоначально было выявлено, что PXR регулирует экспрессию ферментов

I фазы биотрансформации, таких как изоферменты цитохрома P450 CYP3A и CYP2B. Последующие исследования, выполненные во многих лабораториях, показали, что PXR является одним из главных регуляторов ксенобиотического ответа, регулируя экспрессию ферментов, также II фазы биотрансформации UDP-глюкуронозилтрансферазы 1A1 и сульфотрансферазы, а также переносчиков лекарственных веществ MDR1 и MRP2 [4].

PXR контролирует экспрессию генов через модуль PXR-чувствительного элемента в промоторной области генов-мишеней. Основными индукторами PXR являются рифампицин, рифаксимин, ампренавир, литохолевая кислота, соломо-стерол А и В, дексаметазон, никардипин и др. [5].

Совсем недавно было показано, что PXR-опосредованная регуляция ферментов и переносчиков может принимать участие во многих физиологических и патологических процессах, например,

обмене желчных кислот, билирубина, стероидных гормонов, глюкозы и липидов. Эти новые данные предполагают, что функции PXR выходят за рамки “рецептора ксенобиотиков” [4].

Активные формы кислорода (АФК) образуются во время физиологических процессов и, взаимодействуя с белками, жирами, нуклеиновыми кислотами, играют значимую роль в регуляции клеточных функций. Однако избыточная продукция АФК может приводить к структурным и функциональным изменениям, вызывающим повреждение клеток. Эти потенциально токсические эффекты компенсируются в нормальных условиях внутренними антиоксидантными механизмами, которые участвуют в физиологическом и/или патологическом метаболизме АФК [6].

Окислительный стресс, который возникает в результате повышенной продукции АФК и/или снижения емкости антиоксидантной защиты, может вызывать повреждение клеточных компонентов, аутоиммунные реакции и, в конечном итоге, способствовать нарушению биохимических и физиологических процессов [7].

В ряде исследований оценивалось влияние окислительного стресса на количество PXR. В опытах *in vivo* на мышах и крысах выявлено, что развитие воспаления и окислительного стресса, вызванных введением липополисахарида или наночастиц меди, сопровождается снижением количества PXR в печени животных [8, 9]. В то же время в опытах *in vitro* на эндотелиальных клетках HUVEC показано, что воздействие H_2O_2 в концентрации 400 мкМ и длительностью экспозиции 3 ч не влияет на уровень PXR [10].

Таким образом, данные о функционировании PXR в условиях окислительного стресса носят противоречивый характер. Поэтому целью настоящего исследования было оценить влияние окислительного стресса на функционирование PXR.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (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 Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) (Sigma-Aldrich, США), с добавлением *L*-глутамина (4 мМ) (Sigma-Aldrich), 15% эмбриональной 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 спон-

танная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, экспрессирующие PXR [11].

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, 24 и 72 ч.

Контрольным клеткам в эквивалентном объеме в культуральную среду добавляли воду для инъекций (растворитель для H_2O_2). На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения. При инкубации 72 ч смену питательной среды проводили каждые 24 ч. В качестве контроля индукции PXR дополнительно проводили инкубирование клеток Caco-2 с рифампицином (Sigma-Aldrich) в концентрации 10 мкМ в течение 24 ч.

Дополнительно для изучения механизма влияния окислительного стресса на количество PXR были выполнены серии экспериментов с оценкой влияния продукта перекисного окисления липидов (ПОЛ) — малонового диальдегида (МДА, Sigma-Aldrich) — в концентрациях 10, 100 и 150 мкМ и экспозицией 24 ч на содержание PXR ($n = 3$ для каждой концентрации).

Для исследования цитотоксичности пероксида водорода и МДА клетки высевали в 96-луночный планшет (Corning, США), для изучения влияния данных веществ на концентрацию продуктов ПОЛ и количество PXR клетки культивировали в 6-луночных планшетах (Corning).

Цитотоксический тест (МТТ-тест). Клетки засевали 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 или МДА. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0,5% раствора бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ, ПанЭко, Россия) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1% раствора диметилсульфоксида (ПанЭко) [12]. Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

Жизнеспособность клеток Caco-2 рассчитывали по формуле: $(ОП \text{ опытных лунок} - ОП \text{ среды}) / (ОП \text{ контрольных лунок} - ОП \text{ среды}) \times 100\%$, где ОП — оптическая плотность.

Получение тотальных клеточных лизатов. Клетки засевали в 6-луночные планшеты из расчета 10^5 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут, затем добавляли питательную среду с H_2O_2 или МДА в соответствующие планшеты. После окончания экспозиции с пероксидом водорода или МДА клетки снимали с лунок раствором трипсин—EDTA (0,25% трипсина и 0,2% EDTA, Sigma-Aldrich).

Клетки из расчета 1×10^6 промывали изотоническим солевым раствором (Медпро, Россия) и лизировали в 150 мкл ледяного буфера (50 мМ, рН 7.4 трис-НСl, 150 мМ KCl, 0.5% тритон X-100, смесь ингибиторов протеиназ (аминоэтилбензенсульфонил флуорида гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ, апротинин 0.3 мкМ, бестатин 130 мкМ, EDTA 1 мМ, эпоксисукциниллейцингуанидинобутиламид (E-64) 14 мкМ, лейпептин 1 мкМ, Sigma-Aldrich), встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g (СМ-50, Eppendorf, Германия). Цитоплазматическую (экстраядерную) фракцию переносили в отдельные пробирки и использовали для определения концентрации продуктов ПОЛ (МДА и 4-гидроксифенолы).

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-гидроксифенолов (4-гидроксифенол-2-нонанола и 4-гидроксифенол-2-гексанола) основан на их взаимодействии с 1-метил-2-фенилиндолом с образованием стабильного хромофора, который имеет максимум поглощения при 586 нм [13]. Полученные результаты выражали в мкмоль/мг белка. Анализ выполняли на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 (Awareness Technology).

Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, США) [14].

Определение количества PXR в клетках линии Сасо-2 проводили методом вестерн-блот. После окончания экспозиции с пероксидом водорода и МДА, клетки снимали с лунок раствором трипсин-EDTA (Sigma-Aldrich), трижды промывали раствором фосфатного буфера (BioRad, США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (Thermo Fisher Scientific) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (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 22440 g в течение 10 мин (AvantiJXN-3, Beckman Coulter, США). Цитоплазматические белки (30 мкг) подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (Bio-Rad) в буферной системе Лэммли (BioRad). Перед загрузкой образцы обрабатывались в соответствии с протоколом Bio-Rad. Их смешивали с буфером для образцов Лэммли (Bio-Rad), содержащем 2.5% 2-меркаптоэтанола (Bio-Rad) в соотношении 1 : 3, инкубировали 5 мин при температуре 95°C. Гели прогоняли при 100 В в течение 90 мин. Для определения относительного количества PXR методом вестерн-блот использовали первичные мышиные

моноклональные антитела (MA5-31808 PXR Monoclonal Antibody (1D12G1, Invitrogen, США) в концентрации 1 : 200. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP, Invitrogen) в разведении 1 : 4000. Белки визуализировали хемилюминесценцией с помощью Chemi Doc XRS+ (Bio-Rad). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (Bio-Rad). Количество PXR оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные антитела к GAPDH – Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68, Invitrogen, разведение 1 : 1000, вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH – Rabbit anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP, Invitrogen, разведение 1 : 4000).

Статистический анализ. Полученные результаты анализировали с помощью программ StatSoft Statistica 13.0 (США) и Microsoft Excel for MAC ver. 16.24. Результаты представлены в виде $M \pm SD$. Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена-Кейлса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитотоксическое действие H_2O_2 и МДА на клетки линии Сасо-2. Цитотоксическое действие H_2O_2 и МДА оценивалось по результатам МТТ-теста. В контрольной группе жизнеспособность клеток составила 100%. При воздействии пероксида водорода в концентрациях 0.1–10 мкМ и сроках инкубации 3, 24 и 72 ч жизнеспособность клеток не изменялась и составляла в среднем $87.6 \pm 9.3\%$.

При инкубации клеток с H_2O_2 в течение 3, 24 и 72 ч при концентрации прооксиданта 50 мкМ жизнеспособность клеток снижалась до $71.3 \pm 12.1\%$ ($p = 0.01$), $54.1 \pm 9.5\%$ ($p = 0.001$) и $58.8 \pm 11.5\%$ ($p = 0.02$), а при концентрации 100 мкМ – до $70.9 \pm 12.2\%$ ($p = 0.006$), $26.8 \pm 14.3\%$ ($p = 0.0003$) и $34.3 \pm 11.1\%$ ($p = 0.002$) соответственно (рис. 1).

При воздействии МДА на клеточную линию Сасо-2 их жизнеспособность снижалась при концентрации субстанции 100 и 150 мкМ до $88.5 \pm 4.6\%$ ($p = 0.028$) и $63.9 \pm 3.1\%$ ($p = 0.0003$), а при концентрации 10 мкМ статистически значимо не отличались от значений контрольной группы и составила $98.1 \pm 6.5\%$ (рис. 2).

Концентрация продуктов ПОЛ в клетках Сасо-2 после инкубации с H_2O_2 и МДА. Воздействие пероксида водорода на клетки линии Сасо-2 в течение 3 ч приводило к увеличению уровня продук-

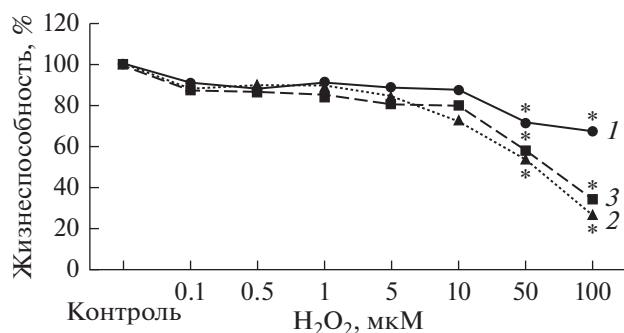


Рис. 1. Изменение жизнеспособности клеток линии Сасо-2 в зависимости от концентрации пероксида водорода при инкубации 3 (1), 24 (2) и 72 ч (3) ($n = 3$). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

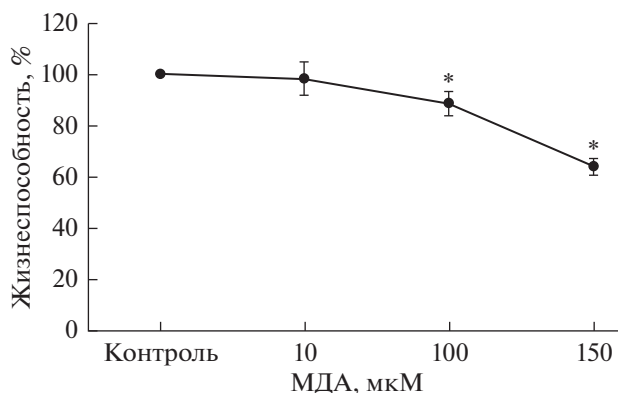


Рис. 2. Изменение жизнеспособности клеток линии Сасо-2 в зависимости от концентрации МДА при инкубации 24 ч ($M \pm SD$, $n = 3$). Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. * $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

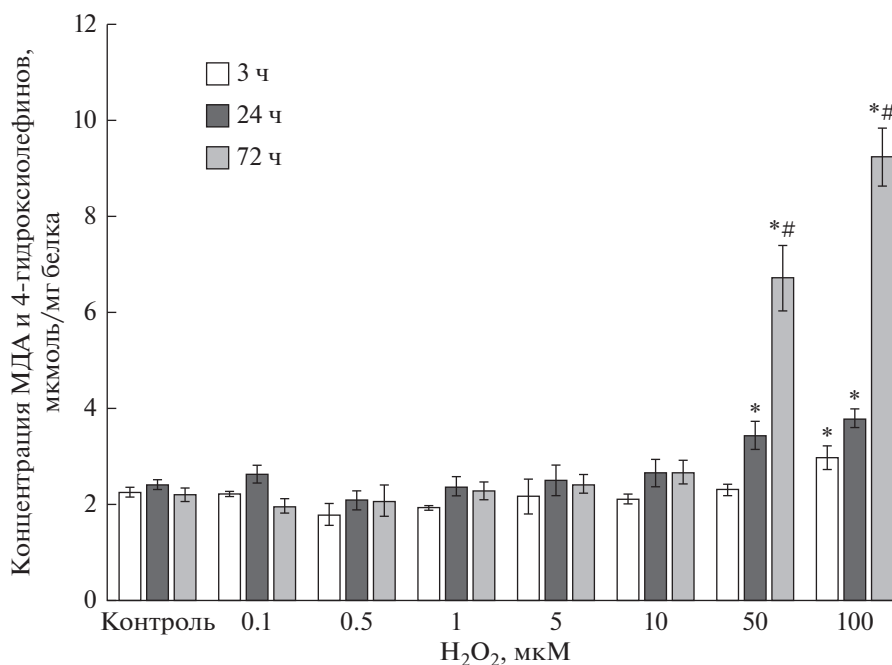


Рис. 3. Изменение концентрации продуктов перекисного окисления липидов (МДА и 4-гидроксиолефинов) при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0.1–100 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч. Количественное определение продуктов ПОЛ проводили фотометрическим методом в лизате клеток линии Сасо-2 ($M \pm SD$, $n = 3$). * $p < 0.05$ по сравнению с контролем. # $p < 0.01$ по сравнению с группой 24 ч.

тов 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 пероксида: 50 мкМ — на 42.1% ($p = 0.006$) и 100 мкМ — на 57.1% ($p = 0.0007$) соответственно (рис. 3). При увеличении длительности воздействия пероксида водорода до 72 ч отмечалось дальнейшее нарастание уровня продуктов ПОЛ

при концентрациях H_2O_2 50 и 100 мкМ, данные показатели превышали значение контроля на 194.9% ($p = 0.0002$) и 323.4% ($p = 0.0003$) соответственно.

Важно отметить, что при увеличении срока инкубации до 72 ч концентрация продуктов ПОЛ возрастала также относительно значений при сроке инкубации 24 ч на 87.6% ($p = 0.002$) при концентрации 50 мкМ и на 144.8% ($p = 0.0004$) при концентрации 100 мкМ.

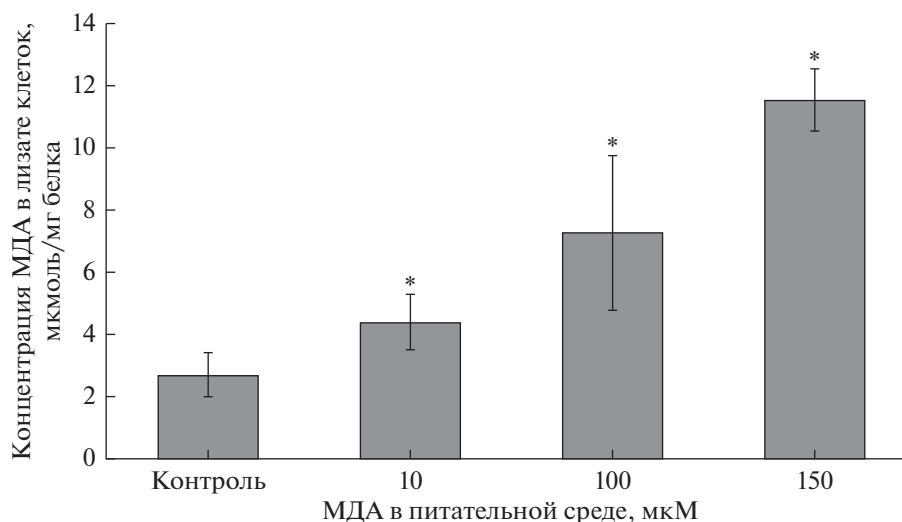


Рис. 4. Изменение концентрации МДА в лизате клеток линии Сасо-2 после инкубации в питательной среде с добавлением МДА в концентрациях 10, 100 и 150 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n = 3$). * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

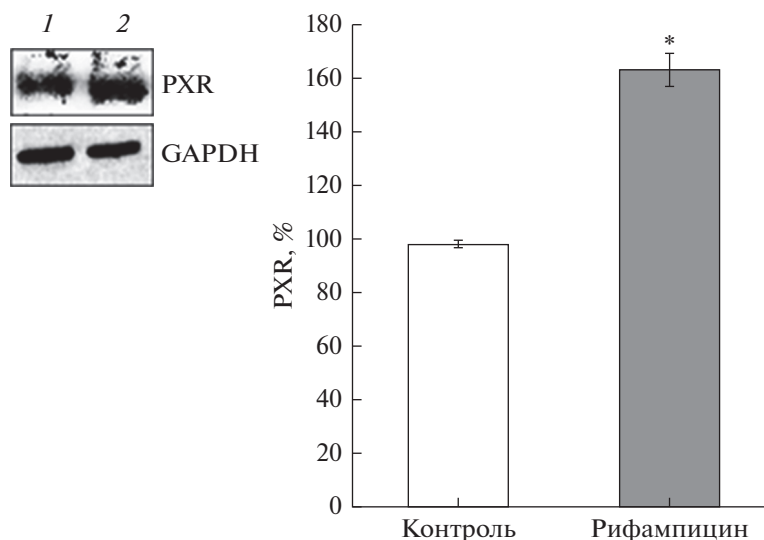


Рис. 5. Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 при воздействии рифампицина в концентрации 10 мкМ в течение 24 ч. Относительное количество PXR определяли методом вестерн-блот с последующим денситометрическим анализом с помощью программного обеспечения ImageLab. 1 – контроль; 2 – рифампицин; * $p < 0.05$ по сравнению с контролем (дисперсионный анализ).

Добавление МДА в питательную среду к клеткам линии Сасо-2 в концентрации 10, 100 и 150 мкМ приводило к статистически значимому увеличению количества МДА в лизате клеток на 63.8% ($p = 0.03$), 168.3% ($p = 0.02$), 325.1% ($p = 0.0008$) соответственно, что свидетельствует о проникновении продукта ПОЛ в цитоплазму клеток (рис. 4).

Влияние H_2O_2 и МДА на количество PXR. Классический индуктор PXR – рифампицин в концентрации 10 мкМ и длительностью воздействия 24 ч вызывал увеличение количества PXR на

64.6% ($p = 0.0003$) по сравнению с контролем (рис. 5), что подтверждает адекватность метода оценки регуляции данного транскрипционного фактора и согласуется с данными литературы [15].

Воздействие пероксида водорода на клетки линии Сасо-2 в течение 3 ч не влияло на количество PXR, данный показатель достоверно не отличался от значений контроля (рис. 6).

Увеличение длительности экспозиции с окислителем до 24 ч вызывало повышение количества PXR при концентрации H_2O_2 10, 50 и 100 мкМ

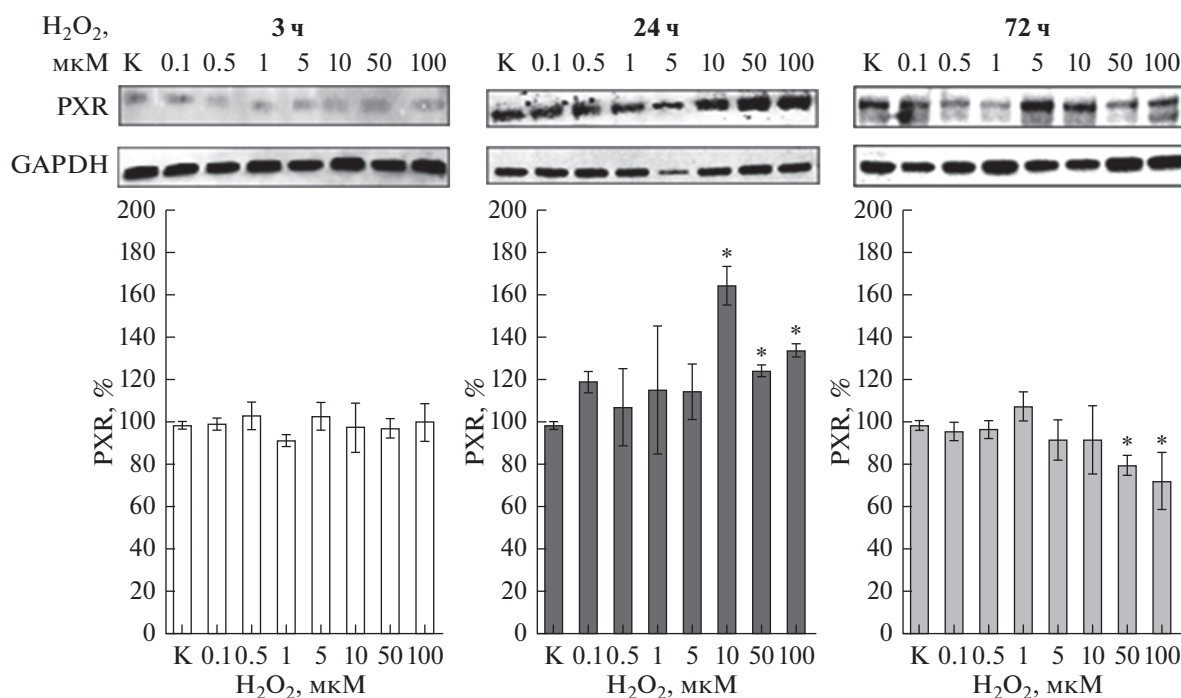


Рис. 6. Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0.1–100 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n = 3$). Относительное количество PXR определяли методом вестерн-блот с последующим денситометрическим анализом с помощью программного обеспечения ImageLab. К – контроль; * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

на 67.1% ($p = 0.03$), 25.9% ($p = 0.0003$) и 35.9% ($p = 0.0003$) соответственно (рис. 6).

Увеличение длительности воздействия до 72 ч сопровождалось нормализацией уровня PXR при концентрации H₂O₂ 0.1–10 мкМ и его снижением при концентрации 50 мкМ на 18.6% ($p = 0.0003$) и при концентрации 100 мкМ на 26.9% ($p = 0.03$) по сравнению с контролем (рис. 6).

При концентрации пероксида водорода 100 мкМ и длительности инкубации 72 ч отмечалось расщепление бэнда PXR, что скорее всего, связано с повреждением молекулы транскрипционного фактора за счет окислительного повреждения или действием протеолитических ферментов.

Инкубирование клеток с МДА также приводило к индукции PXR: при концентрации МДА 10 мкМ количество PXR возрастало на 38.6% ($p = 0.007$), 100 мкМ – на 20.8% ($p = 0.07$), а при 150 мкМ – снизилось на 8.9% ($p = 0.21$) (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ

Активные формы кислорода (АФК) постоянно образуются в ходе жизнедеятельности клеток. При этом их избыточное образование может вызывать окислительное повреждение биомолекул клеток и способствовать развитию заболеваний и старению [16]. Между тем, АФК могут играть и регуляторную роль [17]. В настоящее время

принято считать, что в функции АФК как сигнальной молекулы главную роль играет цистеин [18]. Тиолы белков образуют различные окислительные модификации, такие как сульфеновая кислота, сульфеновая кислота, сульфеновая кислота, дисульфидные связи, S-глутатионилированные и S-нитрозилированные производные. Эти окислительные модификации тиолов участвуют во множестве клеточных процессов, таких как экспрессия генов, энергетический метаболизм, фосфорилирование белков [19]. Кроме этого, известно, что изучаемые нами показатели – малоновый диальдегид и 4-гидроксиолефины – могут выступать в качестве сигнальных молекул, а именно доказана их цитотоксическая роль в подавлении экспрессии генов, что способствует гибели клеток [20].

В ходе настоящего исследования было показано, что воздействие пероксида водорода на клетки линии Сасо-2 в течение 3 ч не влияло на количество PXR, увеличение длительности экспозиции с прооксидантом до 24 ч вызывало повышение количества PXR при концентрации H₂O₂ 10, 50 и 100 мкМ. При длительности экспозиции 72 ч отмечалась нормализация уровня PXR при концентрации H₂O₂ 0.1–10 мкМ и его снижение в концентрации 50 и 100 мкМ. Снижение количества изучаемого транскрипционного фактора, скорее всего, связано с усилением окислительного стресса:

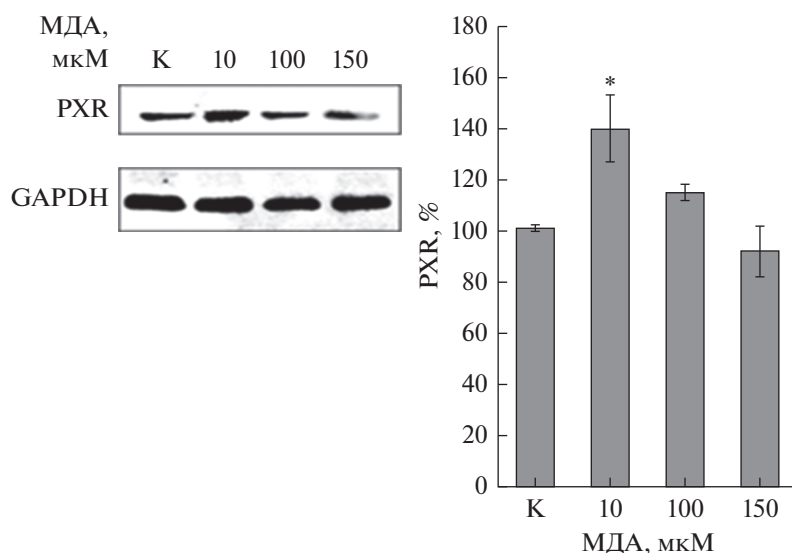


Рис. 7. Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 при воздействии МДА в концентрациях 10, 100 и 150 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n = 3$). Относительное количество PXR определяли методом вестерн-блот с последующим денситометрическим анализом с помощью программного обеспечения ImageLab. К – контроль; * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

при данных концентрациях и длительности воздействия отмечалось максимальное увеличение уровня МДА и снижение жизнеспособности клеток. Кроме этого, в условиях окислительного стресса происходит активация протеолитических ферментов, что может приводить к протеазному расщеплению PXR и вследствие этого снижать его количество.

Для исследования механизма повышения количества PXR при развитии окислительного стресса были выполнены эксперименты по оценке влияния МДА-конечного продукта ПОЛ на уровень изучаемого транскрипционного фактора. В ходе эксперимента было установлено, что инкубация клеток линии Сасо-2 с МДА в течение 24 ч приводила к повышению его концентрации внутри клеток. По данным литературы известно, что МДА может растворяться в билипидной мембране клеток и проникать внутрь клеток [21], тем самым оказывая внутриклеточные эффекты.

МДА в концентрации 10 мкМ вызывал повышение содержания PXR, а увеличение концентрации МДА до 100 и 150 мкМ приводило к проявлению его цитотоксических свойств и снижению содержания PXR.

В совокупности данные результаты свидетельствуют о том, что индукция PXR при развитии окислительного стресса обусловлена влиянием продуктов пероксидации (в частности МДА) на данный транскрипционный фактор.

Сделанный вывод согласуется с данными литературы. Известно, что короткоцепочечные жирные кислоты, например бутират натрия, мо-

гут вызывать индукцию экспрессии гена PXR на клетках линии Сасо-2 [22].

На данный момент механизмы индукции PXR продолжают активно изучаться [4]. Для низкомолекулярных веществ наиболее вероятным механизмом является их связывание с аналогичными рецепторами ксенобиотиков (например, Farnesoid X receptor) и повышение транскрипции гена PXR.

Повышение количества PXR при развитии окислительного стресса может иметь двоякое значение. С одной стороны, PXR может способствовать генерации АФК и повреждению клеток за счет индукции изоферментов цитохрома P450 (CYP2B1/2B2, CYP3A1/3A2 и CYP2C6) и интенсификации метаболизма ксенобиотиков [23]. С другой – PXR может иметь приспособительную функцию, так как данный транскрипционный фактор стимулирует экспрессию антиоксидантного фермента глутатион-S-трансферазы [24].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе исследования на клетках линии Сасо-2 было показано, что H_2O_2 в концентрациях при 10, 50 и 100 мкМ при длительности экспозиции 24 ч вызывает повышение количества PXR, что сочетается с увеличением концентрации продуктов липопероксидации (ПОЛ). Продолжение воздействия пероксида водорода до 72 ч сопровождается нарастанием концентрации продуктов ПОЛ и снижением количества PXR до показателей контроля (10 мкМ) или ниже него (50 и 100 мкМ). Инкубирование клеток с

МДА в концентрации 10 мкМ также приводит к индукции PXR, что свидетельствует о том, что индукция PXR при развитии окислительного стресса обусловлена влиянием продуктов пероксидации (в частности МДА) на данный транскрипционный фактор.

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 МК-1856.2020.7.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yan J., Xie W. 2016. A brief history of the discovery of PXR and CAR as xenobiotic receptors. *Acta Pharm. Sin.* **6**, 450–452. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.06.011>
2. Kliewer S.A., Moore J.T., Wade L., Staudinger J.L., Watson M.A., Jones S.A., McKee D.D., Oliver B.B., Willson T.M., Zetterström R.H., Perlmann T., Lehmann J.M. 1998. An orphan nuclear receptor activated by pregnanes defines a novel steroid signaling pathway. *Cell*. **92** (1), 73–82. [http://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80900-9](http://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80900-9)
3. Blumberg B., Sabbagh Jr.W., Juguilon H., Bolado Jr.J., Meter C.M., Ong E.S., Evans R.M. 1998. SXR, a novel steroid and xenobiotic-sensing nuclear receptor. *Genes Dev.* **12** (20), 3195–205. <http://doi.org/10.1101/gad.12.20.3195>
4. Daujat-Chavanieu M., Gerbal-Chaloin S. 2020. Regulation of CAR and PXR expression in health and disease. *Cells*. **9**, 2395. <https://doi.org/10.3390/cells9112395>
5. Chai S.C., Lin W., Li Y., Chen T. 2019. Drug discovery technologies to identify and characterize modulators of the pregnane X receptor and the constitutive androstane receptor. *Drug Discov. Today*. **24** (3), 906–915. <http://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.01.021>
6. Rajendran P., Nandakumar N., Rengarajan T., Palaniswami R., Gnanadhas E.N., Lakshminarasiah U., Gopas J., Nishigaki I. 2014. Antioxidants and human diseases. *Clinica Chimica Acta*. **436**, 332–347. <http://doi.org/10.1016/j.cca.2014.06.004>
7. Zhang Y., Tocchetti C.G., Krieg T., Moens A.L. 2012. Oxidative and nitrosative stress in the maintenance of myocardial function. *Free Radic. Biol. Med.* **53** (8), 1531–1540. <http://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.07.010>
8. Xu D.-X., Wei W., Sun M.-F., Wu C.-Y., Wang J.-P., Wei L.-Z., Zhou C.-F. 2004. Kuper cells and reactive oxygen species partially mediate lipopolysaccharide-induced downregulation of nuclear receptor pregnane X receptor and its target gene CYP3a in mouse liver. *Free. Radic. Biol. Med.* **37**, 10–22. <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20140654>
9. Tang H., Xu M., Shi F., Ye G., Lv C., Luo J., Zhao L., Li Y. 2018. Effects and mechanism of nano-copper exposure on hepatic cytochrome P450 enzymes in rats. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2140. <https://doi.org/10.3390/ijms19072140>
10. Zhu H., Chen Z., Ma Z., Tan H., Xiao C., Tang X., Zhang B., Wang Y., Gao Y. 2017. Tanshinone IIA protects endothelial cells from H₂O₂-induced injuries via PXR activation. *Biomol. Ther. (Seoul)*. **25** (6), 599–608. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2016.179>
11. Garg A., Zhao A., Erickson S.L., Mukherjee S., Lau A.J., Alston L., Chang T.K., Mani S., Hirota S.A. 2016. Pregnane X receptor activation attenuates inflammation-associated intestinal epithelial barrier dysfunction by inhibiting cytokine-induced myosin light-chain kinase expression and c-Jun N-terminal kinase 1/2 activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **359** (1), 91–101. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.234096>
12. 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
13. 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. <http://doi.org/10.1021/tx9701790>
14. 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>
15. Lemmen J., Tozakidis I. E.P., Galla H.-J. 2013. Pregnane X receptor upregulates ABC-transporter Abcg2 and Abcb1 at the blood-brain barrier. *Brain Research*. **1491**, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2012.10.060>
16. Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T., Mazur M., Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 44–84. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001>
17. Camello-Almaraz C., Gomez-Pinilla P.J., Pozo M.J., Camello P.J. 2006. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am. J. Physiol.* **291**, 1082–1088. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00217.2006>
18. Garcia-Garcia, A., Zavala-Flores L., Rodriguez-Rocha H., Franco R. 2012. Thiol-redox signaling, dopaminergic cell death, and Parkinson's Disease. *Antioxidants Redox Signal.* **17**, 1764–1784. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4501>
19. Takata T., Araki S., Tsuchiya Y., Watanabe Y. 2020. Oxidative stress orchestrates MAPK and nitric-oxide synthase signal. *Int. J. Mol. Sci.* **21** (22), 8750. <https://doi.org/10.3390/ijms21228750>
20. Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mecha-

- nisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2014**, 360438. <https://doi.org/10.1155/2014/360438>
21. Debouzy J.-C., Fauvelle F., Vezin H., Brasme B., Chancerelle Y. 1992. Interaction of the malonyldialdehyde molecule with membranes: A differential scanning calorimetry, ¹H-, ³¹P-NMR and ESR study. *Biochem. Pharmacol.* **44** (9), 1787–1793. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(92\)90073-r](https://doi.org/10.1016/0006-2952(92)90073-r)
 22. Ranhotra H.S., Flannigan K.L., Brave M., Mukherjee S., Lukin D.J., Hirota S.A., Mani S. 2016. Xenobiotic receptor-mediated regulation of intestinal barrier function and innate immunity. *Nucl. Receptor Res.* **3**, 101199. <https://doi.org/10.11131/2016/101199>
 23. Kakehashi A., Hagiwara A., Imai N., Nagano K., Nishimaki F., Banton M., Wei M., Fukushima S., Wanibuchi H. 2013. Mode of action of ethyl tertiary-butyl ether hepatotumorigenicity in the rat: Evidence for a role of oxidative stress via activation of CAR, PXR and PPAR signaling pathways. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **273**, 390–400. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2013.09.016>
 24. Aleksunes L.M., Klaassen C.D. 2012. Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPAR-, and Nrf2-null mice. *Drug Metab. Dispos.* **740** (7), 1366–1379. <https://doi.org/10.1124/dmd.112.045112>

Functioning of the Pregnan X Receptor under Oxidative Stress

Yu. V. Abalenikhina¹, *, E. A. Sudakova¹, A. A. Slepnev¹, A. A. Seidkulieva¹,
P. D. Erokhina¹, A. V. Shchulkin¹, E. N. Yakusheva¹

¹Ryazan State Medical University, Ryazan, 390026 Russia

*e-mail: abalenikhina88@mail.ru

Pregnan X receptor (PXR) is a nuclear receptor playing an important role in the regulation of biotransformation and metabolism enzymes and transporter proteins expression. The published data on the effect of oxidative stress on the amount of PXR is ambiguous and contradictory. The aim of this work is the evaluation of the effects of oxidative stress on the PXR functions. The study was performed using the Caco-2 cell line. Oxidative stress was modeled with hydrogen peroxide at concentrations of 0.1, 0.5, 1, 5, 10, 50, and 100 μM. Cells were incubated with hydrogen peroxide for 3, 24, and 72 h. The amount of PXR was measured using the Western blot method. Exposure to H₂O₂ for 3 h did not significantly affect the amount of PXR at all tested concentrations of H₂O₂. Increasing of the exposure time up to 24 h at H₂O₂ concentrations of 10, 50, and 100 μM led to an increase of the PXR amount, and this effect was associated with an increase of the amount of lipid peroxidation products. Exposure to H₂O₂ for 72 h increased the concentration of lipid peroxidation products and decreased the amount of PXR to the control values (H₂O₂ concentrations of 10 μM) or even below it (H₂O₂ concentrations of 50 and 100 μM). Incubation of cells with malondialdehyde (MDA), the end product of LPO, at a concentration of 10 μM for 24 h led to the increase of the PXR content. Thus, a 24-h exposure to H₂O₂ leads to an increase of the PXR amount and is associated with an inducing effect of the LPO products. Increasing of the exposure time up to 72 h neutralizes this effect.

Keywords: pregnan X receptor, oxidative stress, H₂O₂, malondialdehyde, Caco-2 cell line