

РАЗДЕЛ: БИОХИМИЯ

О.Н. Сучкова¹, Ю.В. Абаленихина¹, А.В. Шулькин¹, Ф.Т. Гаджиева¹,
М.Г. Узбеков², Е.Н. Якушева¹

Изменение относительного количества белка-транспортера OATP1B1 при воздействии S-нитрозоглутатиона *in vitro*

¹ ФГБОУ ВО РязГМУ им. академика И.П. Павлова Минздрава России

² ФГУ Московский научно-исследовательский институт психиатрии

Резюме. Полипептид, транспортирующий органические анионы (OATP1B1) - инфлюксный белок-транспортер, локализующийся главным образом в печени и переносящий ксенобиотики и лекарственные вещества. Фарнезоидный X рецептор (FXR) является одним из основных транскрипционных факторов, регулирующих экспрессию OATP1B1. Оксид азота является важной сигнальной молекулой, однако его воздействие на белок-транспортер не изучено. Цель – изучить влияние донора NO - S-нитрозоглутатиона на OATP1B1 и роль FXR в данном процессе. Исследование проводилось на клетках линии HepG2. В ходе эксперимента было получено, что S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ (72 ч) не оказывает цитотоксического действия, вызывает повышение уровня метаболитов оксида азота (II) и вызывает повышение относительного количества OATP1B1, которая подавляется при ингибировании FXR тауро-β-холевой кислотой. Таким образом, полученные результаты демонстрируют индуцирующий эффект донора оксида азота (II) – S-нитрозоглутатиона (10, 50, 100 мкМ) на относительное количество OATP1B1, участие которого опосредовано фарнезоидным X рецептором.

Ключевые слова: полипептид, транспортирующий органические анионы (OATP1B1), S-нитрозоглутатион, фарнезоидный X рецептор, клеточная линия HepG2.

Актуальность. Транспорт эндогенных и экзогенных веществ через билипидные мембраны может осуществляться не только пассивной диффузией, но и с помощью специфических белков-транспортеров, которые классифицируются на АТФ-связывающие транспортные белки и транспортеры, растворенных веществ (Solute carrier family, SLC) [1, 2]. Полипептид, транспортирующий органические анионы (OATP1B1) относится к семейству SLC. В настоящее время доказано, что OATP1B1 локализуется главным образом в гепатоцитах и принимает участие в инфлюксе эндогенных соединений (желчные кислоты, тиреоидные гормоны, билирубин, кортюгированные стероиды), а также ксенобиотиков (статины, антибактериальные средства, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, противогрипковые и противоопухолевые средства, т.д.) [3].

OATP1B1 человека кодируется геном SLCO1B1. Ведущими факторами, регулирующими транскрипцию SLCO1B1, являются печёночный X рецептор α (liver X receptor, LXR α), фарнезоидный X рецептор (рецептор желчных кислот, farnesoid X receptor, FXR) и ретиноидный X рецептор (retinoid X receptor, RXR) [4].

FXR способен напрямую связываться с промотором генов SLCO и регулировать его транскрипцию, а также может реализовывать свой механизм опосредованно через желчные кислоты, которые подавляют экспрессию OATP1B1 [5].

Таким образом, FXR может как повышать, так и снижать количество OATP1B1 в клетках печени, вследствие чего выступает в качестве регуляторной мишени.

S-нитрозоглутатион является S-нитрозированным производным глутатиона и рассматривается в донора оксида азота II (NO). В свою очередь, NO важный внутриклеточный мессенджер, который участвует в регуляции эффлоксного белка-транспортера Р-гликопротеина как через NO-сигнальный каскад, так и рецепторы конститутивный андростановый рецептор (CAR) и прегнан X рецептор (PXR) [6].

Таким образом, в настоящее время хорошо описаны индукторы и ингибиторы OATP1B1, но отсутствует информация о воздействии доноров оксида азота (II) и механизмах регуляции данного белка.

Цель – изучить влияние донора NO S-нитрозоглутатиона на OATP1B1 и роль FXR в данном процессе.

Материал и методы исследования. Исследование выполнено на культуре клеток HepG2 (ФГБУН ИНЦ РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), содержащей L-глутамин (4 мМ), 10% фетальной бычьей сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все компоненты производства Сигма-Альдрик).

В качестве контроля в эксперименте использовали клетки, которые инкубировали в питательной среде без добавления тестируемых веществ. S-нитрозоглутатион вносили в питательную среду в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ, срок инкубации составил 72 ч, смену среды проводили каждые сутки.

Для оценки роли FXR в регуляции функционирования белка-транспортера OATP1B1 в эксперименте использовали ингибитор рецептора тауро-β-холевую кислоту (β-ТХК) в концентрации 200 мкМ (Сигма-Альдрик) [7]. Инкубацию клеток проводили в комбинации S-нитрозоглутатиона и β-ТХК в концентрации 200 мкМ (за 30 мин до внесения в питательную среду тестируемого вещества) в течение 72 часов.

Протокол исследования был одобрен Биоэтической комиссией РязГМУ Минздрава России (Протокол № 87 от 07.11.2023).

Для выполнения биохимических анализов клетки культивировали в 6-луночных планшетах («Корнинг», n=3 на каждую концентрацию тестируемого вещества).

Жизнеспособность клеток после воздействия S-нитрозоглутатиона оценивали по степени активности митохондрий. В работе использовали клеточно-проникающие зонды Мито Тракер Ред CM-H2 XRoS («Инвитроген»), которые окрашивают активные митохондрии в живых клетках, флуоресцентный анализ проводили при $\lambda_{\text{exc}} = 579$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 599$ нм [8].

Уровень оксида азота (II) определяли с помощью реагента DAF-FM («Инвитроген»), флуоресцентный анализ проводили при $\lambda_{\text{exc}} = 495$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 515$ нм [9].

Количественную оценку уровня живых митохондрий и оксида азота определяли по степени флуоресценции с помощью спектрофлуориметра («Шимадзу РФ-6000») и пересчитывали на количество клеток (счетчик и анализатор жизнеспособности клеток

«Коунтесс 3 Автомат счетчик клеток»), полученные данные выражали в ед.фл./106 клеток.

Относительное количество ОАТР1В1 оценивали методом вестерн-блот. Перед приготовлением клеточного лизата клетки снимали с лунок 6-луночного планшета раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, Сигма Альдрих), затем промывали раствором фосфатного буфера 3 раза (БиоРед). Лизис клеток проводили с помощью буфера NP40 Клеточный буфер для лизиса Термо (Терми Фишер Синтетик), срок инкубации 30 минут, температура +4 °С, 100 мкл буфера на 107 клеток. Далее приготовленный лизат центрифугировали при 5000 g (СМ-50, Эппендорф), полученный супернатант использовали для выполнения анализа.

Электрофорез и последующий анализ вестерн-блоттинга проводили согласно стандартному протоколу [6]. Для работы использовались первичные мышинные моноклональные антитела (ОАТР2 поликлональное антитело, РА5-113548, Инвитроген), для визуализации которых с применялись вторичные кроличьи антитела (кролячьи-мышинные IgG (H+L) Вторичные Антитела, HRP, Инвитроген).

С целью подтверждения молекулярной массы ОАТР1В1 использовали маркер молекулярной массы Точность плюс стандарты белка Двойной цвет, Био-Ред). Для регистрации хемилюминисценции использовали ХемиДокXRS+ («Био-Ред»), интенсивность полученных бендов анализировали с использованием программного обеспечения ИмиджЛаб (ХемиДок). Для стандартизации и расчета относительного количества ОАТР1В1 оценивали относительное количество глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, англ.: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, первичные антитела GAPDH Загрузка контрольного моноклонального антитела (GA1R), ДуЛигт 68 («Инвитроген»), вторичные кроличьи антитела (IgG (H+L) Вторичное антитело, HRP, Инвитроген).

Результаты анализировали с помощью патетов стандартных статистических программ. Статистическую значимость различий оценивали дисперсионным анализом (ANOVA), парные сравнения с контролем выполняли с помощью теста Даннетта. Результаты на графиках приведены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Полученные результаты и их обсуждение. Выбранные концентрации S-нитрозоглутатиона были протестированы на активность митохондрий, что характеризует жизнеспособность клеток. Мито Такер Ред СМ-Н2XRos является восстановленным, нефлуоресцентным зондом на основе розамина, которые флуоресцируют при окислении. Флуоресцентные зонды пассивно проникают через плазматическую мембрану и накапливаются в активных митохондриях. После того, как митохондрии помечены выполнялся количественный анализ. В ходе работы было получено, что в диапазоне концентраций 1-50 мкМ S-нитрозоглутатион не оказывал действия на митохондрии клеток линии НерG2, а концентрация 100 мкМ приводила к снижению их активности – флуоресценция снижалась на 28,6% ($p=0,001$) (рис. 1).

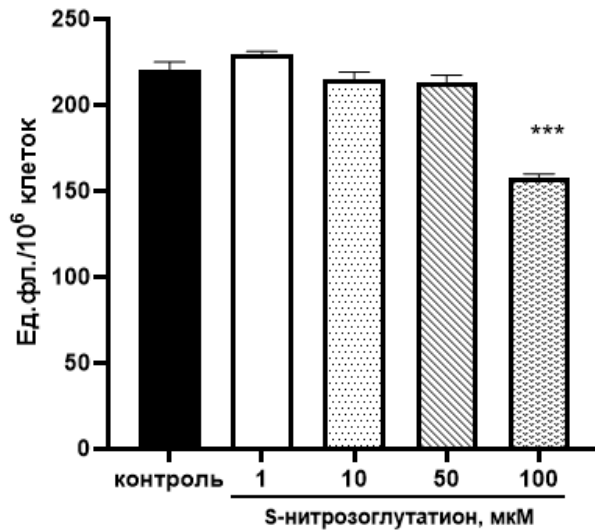


Рис. 1. Влияние S-нитроглютациона в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ и сроке воздействия 72 ч на активность митохондрий клеток линии HerG2

Примечание: *** $p < 0,001$ относительно значений контрольной группы

DAF-FM - это реагент, который используется для обнаружения и количественного определения низких концентраций оксида азота (II). Реактив не флуоресцирует, пока не вступит в реакцию с NO с образованием флуоресцирующего бензотриазола.

Уровень оксида азота (II) дозозависимо возрастал при воздействии S-нитроглютациона в концентрациях 1,10,50 и 100 мкМ на 82,8% ($p=0,02$), 212,9% ($p < 0,0001$), 297,6% ($p < 0,0001$), 427,4% ($p < 0,0001$) соответственно (рис. 2) по сравнению с показателями контроля, что подтверждает адекватность выбранной экспериментальной модели.

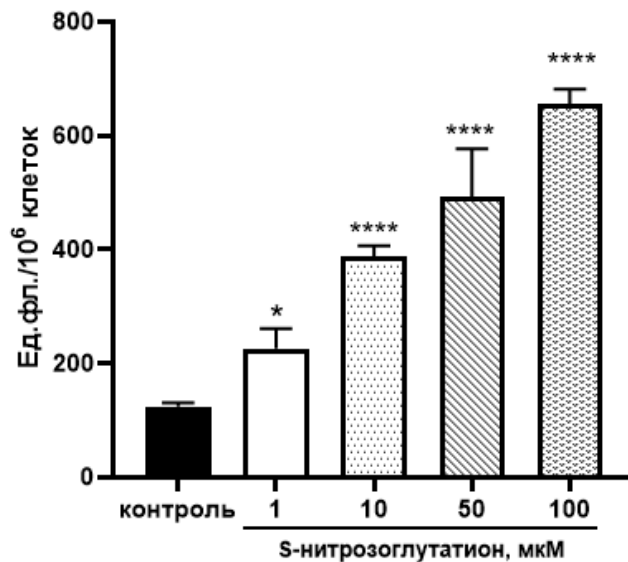


Рис. 2. Влияние S-нитроглютациона в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ и сроке воздействия 72 ч на содержание оксида азота (II) в клетках линии HerG2.

Примечание: * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ относительно значений контрольной группы

Воздействие S-нитрозоглутатиона в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ в течение 72 ч приводило к увеличению относительного количества OATP1B1 на 37,6% ($p=0,032$), 45,8% ($p=0,004$), 137,4% ($p<0,0001$) соответственно (рис. 3). S-нитрозоглутатион в концентрации 1 мкМ не оказывал воздействия на уровень белка-транспортера.

Далее проводили оценку самостоятельного влияния β -ТХК на относительное количество OATP1B1 без воздействия тестируемого вещества S-нитрозоглутатиона. В ходе работы было получено, что относительное количество OATP1B1 не изменялось при воздействии β -ТХК, а, следовательно, ингибитор FXR не оказывает самостоятельное действие на белок-транспортер и может использоваться для дальнейшей работы (рис. 3).

При внесении в питательную среду β -ТХК за 30 мин до воздействия S-нитрозоглутатиона относительное количество OATP1B1 не изменялось по сравнению с контрольными значениями. Таким образом ингибитор β -ТХК препятствовал индукции OATP1B1, вызванной донором оксида азота (II) - S-нитрозоглутатионом, а следовательно FXR принимает участие в биохимическом каскаде регуляции повышения количества белка-транспортера OATP1B1 при воздействии S-нитрозоглутатиона.

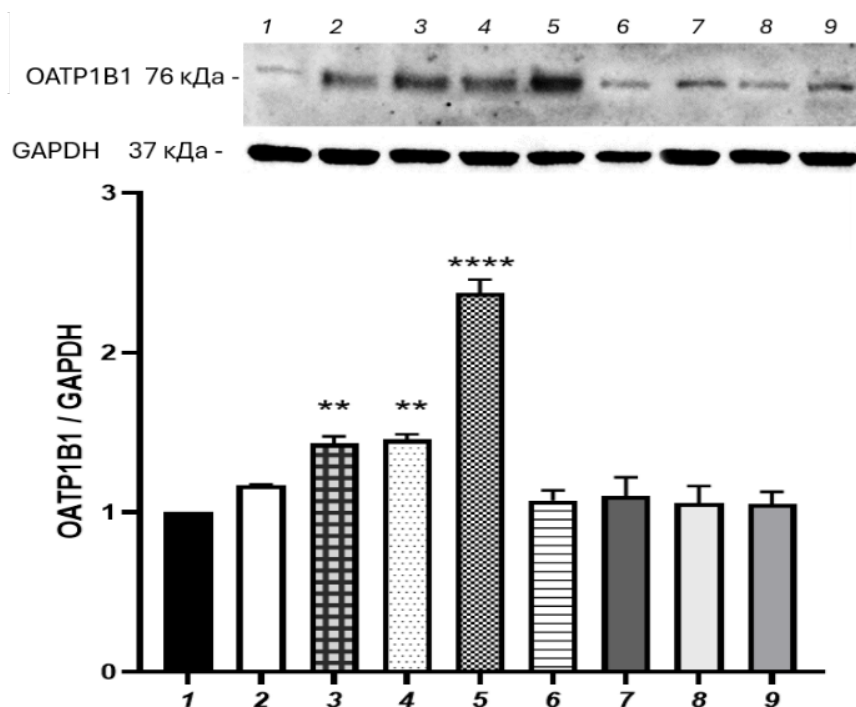


Рис.3. Влияние S-нитрозоглутатиона на относительное количество белка-транспортера OATP1B1 в клетках линии HepG2 самостоятельно и в сочетании с ингибированием фарнезоидного рецептора (тауро- β -холевой кислотой, 200 мкМ).

Примечание: 1 - контроль (без добавления тестируемых веществ);
 2,3,4, 5 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 1,10, 50 100 мкМ соответственно;
 6 - β -таурохолевая кислота, 200 мкМ; 7, 8, 9 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50 100 мкМ в сочетании с тауро- β -холевой кислотой, 200 мкМ. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ относительно значений контрольной группы

OATP1B1 представляет собой инфлюксный белок-транспортер, участвующий в переносе биологически активных молекул и лекарственных веществ внутрь гепатоцитов. В настоящее время известно несколько механизмов регуляции OATP1B1: прямое ингибирование, транскрипционная, пост-транскрипционная и пост-трансляционная регуляция [4].

Фарнезоидный X рецептор является ядерным рецептором, который участвует в сохранении целостности и функций печени при хронических и острых поражениях. Известно, что FXR модулирует экспрессию белков-транспортеров и ферментов, тем самым действуя на стыке метаболизма липидов, лекарственных средств и влияя на начало и прогрессирование гепатотоксичности различных этиопатогенезов [10].

В настоящем исследовании доказано, что при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ происходит увеличение относительного количества OATP1B1. Данные изменения происходят на фоне повышения уровня оксида азота (II), что указывает на вклад NO в механизмы регуляции OATP1B1.

Применение ингибитора фарнезоидного X рецептора - тауро-β-холевой кислоты на фоне воздействия S-нитрозоглутатиона приводило к подавлению индуцирующего эффекта донора оксида азота. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что S-нитрозоглутатион (10, 50, 100 мкМ) способствует увеличению относительного количества OATP1B1 посредством фарнезоидного X рецептора.

Выводы. S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50, 100 мкМ и сроке инкубации 72 ч повышает относительное количество OATP1B1, действуя через фарнезоидный X рецептор.

Литература / References.

1. Mueckler M., Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters // *Mol Aspects Med.* – 2013. - 34(2-3):121-38. doi: 10.1016/j.mam.2012.07.001.
2. Alam A., Locher K.P. Structure and Mechanism of Human ABC Transporters // *Annu Rev Biophys.* – 2023. – 9 (52): 275-300. doi: 10.1146/annurev-biophys-111622-091232.
3. Ciută A.D., Nosol K., Kowal J., et al. Structure of human drug transporters OATP1B1 and OATP1B3 // *Nat Commun.* – 2023. - 14(1):5774. doi: 10.1038/s41467-023-41552-8.
4. Zhou S., Shu Y. Transcriptional Regulation of Solute Carrier (SLC) Drug Transporters. *Drug Metab Dispos.* - 2022. - 50(9):1238–50. doi: 10.1124/dmd.121.000704.
5. Meyer Zu Schwabedissen H.E., Böttcher K., Chaudhry A, et al. Liver X receptor α and farnesoid X receptor are major transcriptional regulators of OATP1B1 // *Hepatology.* – 2010. - 52(5):1797-807. doi: 10.1002/hep.23876.
6. Shchulkin A.V., Abalenikhina Y.V., Sudakova E.A., et al. Mechanisms of Regulation of the P-Glycoprotein Transporter Protein Functioning under the Action of Nitric Oxide // *Biochemistry (Mosc).* – 2022. - 87(4): 366-379. doi: 10.1134/S000629792204006X.
7. Sayin S.I., Wahlström A., Felin J., et al. Gut microbiota regulates bile acid metabolism by reducing the levels of tauro-beta-muricholic acid, a naturally occurring FXR antagonist // *Cell Metab.* – 2013. – 17: 225–235.
8. Marcondes N.A., Terra S.R., Lasta C.S., et al. Comparison of JC-1 and MitoTracker probes for mitochondrial viability assessment in stored canine platelet concentrates: A flow cytometry study // *Cytometry A.* – 2019. - 95(2): 214-218. doi: 10.1002/cyto.a.23567.
9. Huysseune A., Larsen U.G., Larionova D., et al. Bone Formation in Zebrafish: The Significance of DAF-FM DA Staining for Nitric Oxide Detection // *Biomolecules.* – 2023. – 13(12):1780. doi: 10.3390/biom13121780.

10. Rausch M., Samodelov S.L., Visentin M., Kullak-Ublick G.A. The Farnesoid X Receptor as a Master Regulator of Hepatotoxicity // Int J Mol Sci. – 2022. - 23(22):13967. doi: 10.3390/ijmS232213967.

Abstract.

***O.N. Suchkova¹, Yu.V. Abalenikhina¹, A.V. Shchulkin¹,
F.T. Gadzhieva¹, M.G. Uzbekov², E.N. Yakusheva¹***

***Participation of the farnesoid X receptor in the regulation
of the OATP1B1 transporter protein when exposed to S-nitrosoglutathione in vitro***

¹Ryazan State Medical University; ²Moscow Scientific Research Institute of Psychiatry

Polypeptide transporting organic anions (OATP1B1) is an influx transporter protein localized mainly in the liver and transporting xenobiotics and medicinal substances. The farnesoid X receptor (FXR) is one of the main transcription factors regulating the expression of OATP1B1. Nitric oxide is an important signaling molecule, but its effect on the transporter protein has not been studied. The aim is to study the effect of the NO – S-nitrosoglutathione donor on OATP1B1 and the role of FXR in this process. The study was conducted on cells of the HepG2 line. During the experiment, it was found that S-nitrosoglutathione concentrations of 10, 50 and 100 μM (72 h) has no cytotoxic effect, causes an increase in the level of nitric oxide (II) metabolites and causes an increase in the relative amount of OATP1B1, which is suppressed by inhibition of FXR by tauro- β -cholic acid. Thus, the results obtained demonstrate the inducing effect of the nitric oxide (II) donor – S-nitrosoglutathione (10, 50, 100 μM) on the relative amount of OATP1B1, whose participation is mediated by the farnesoid X receptor.

Keywords: polypeptide transporting organic anions (OATP1B1), S-nitrosoglutathione, farnesoid X receptor, HepG2 cell line.

Сведения об авторах: Сучкова Ольга Николаевна – ассистент каф. биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, suchkovaon2102@mail.ru; Абаленихина Юлия Владимировна – д.м.н., доцент, профессор каф. биологической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, abalenikhina88@mail.ru; Щулькин Алексей Владимирович – д.м.н., доцент, профессор каф. фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, alekseyshulkin@rambler.ru; Гаджиева Фидан Тофиковна – студентка ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, fidagadzhieva2003@gmail.com; Узбекиов Марат Галиевич – д.м.н., профессор, руководитель лаборатории биохимии мозга ФГУ Московский научно-исследовательский институт психиатрии, uzbekovmg@gmail.com; Якушева Елена Николаевна – д.м.н., профессор, зав. каф. фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e.yakusheva@rzgmu.ru.