

На правах рукописи

Ярушкин Андрей Александрович

ВИДОСПЕЦИФИЧНЫЙ ЭФФЕКТ ПРОИЗВОДНЫХ
2,4,6-ТРИФЕНИЛДИОКСАНА-1,3 НА КОНСТИТУТИВНЫЙ
АНДРОСТАНОВЫЙ РЕЦЕПТОР И ГЕНЫ ГЛЮКОНЕОГЕНЕЗА

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук.

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Пустыльняк Владимир Олегович

Официальные оппоненты: **Покровский Андрей Георгиевич**
доктор медицинских наук, профессор,
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования «Новосибирский национальный
исследовательский государственный
университет»,
главный научный сотрудник

Сметанина Мария Александровна
кандидат биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт химической
биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии
наук, младший научный сотрудник

Ведущая организация: Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Защита состоится «__» ноября 2014 г. в __:__ на заседании диссертационного совета Д001.034.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт биохимии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2; тел. 8 (383) 333-54-81)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт биохимии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук по адресу: <http://www.niibch.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2014 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Г.С. Русских

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Глюкоза является важным и быстрым источником метаболической энергии для большинства клеток, поэтому ее содержание в крови является одним из самых регулируемых параметров в организме. При гипогликемии глюкагон активирует в печени распад гликогена и синтез глюкозы из неуглеводных предшественников (глюконеогенез), а повышение содержания глюкозы приводит к стимуляции секреции инсулина, который подавляет глюконеогенез и усиливает катаболизм глюкозы (Nelson and Cox, 2008). Ингибирование глюконеогенеза под действием инсулина происходит на уровне транскрипции генов ключевых ферментов данного процесса - фосфоенолпируват карбоксикиназы и глюкозо-6-фосфатазы (Kim *et al.*, 2008). Нарушение этой регуляции приводит к гипергликемии, которая при хроническом течении может привести к серьезным осложнениям, поэтому исследование альтернативных способов регуляции экспрессии генов глюконеогенеза является актуальной задачей.

Недавние исследования показали, что ядерный конститутивный андростановый рецептор CAR, более изученный с точки зрения участия в регуляции метаболизма ксенобиотиков, способен подавлять экспрессию генов ключевых ферментов глюконеогенеза (Ueda *et al.*, 2002). Стоит отметить, что активность данного рецептора изменяется под действием специфичных экзогенных активаторов (Tzamelis and Moore, 2001), которые могут выступать в роли потенциальных лекарственных препаратов. Однако активаторы CAR не всегда являются его лигандами (активация рецептора происходит через косвенные механизмы) и их действие может быть видоспецифично (Пустыльняк и др., 2007). В итоге одно и то же соединение может активировать, ингибировать или вообще не оказывать никакого эффекта на активацию рецептора даже у таких филогенетически близких видов как крысы и мыши (Li and Wang, 2010). Различные способы активации рецептора под действием разнообразных активаторов приводят к тому, что физиологические ответы на

введение этих веществ могут отличаться среди видов. Данная особенность затрудняет экстраполяцию результатов активации CAR с экспериментальных животных на человека. Для решения этой проблемы необходимо универсальное соединение, способное активировать рецептор CAR многих видов, включая человека. Цис-2,4,6-трифенилдиоксан-1,3 (сTPD) – мощный активатор CAR крыс. В нашей лаборатории было показано, что данное соединение обладает несколькими преимуществами для исследования эффектов активации CAR. В отличие от классического активатора фенобарбитала, во-первых, данное соединение не оказывает плейотропный эффект на ферменты биотрансформации ксенобиотиков (Пустыльняк и др., 2006), во-вторых, эффективная доза данного соединения на порядок ниже, и однократного введения достаточно для достижения максимального индуцирующего эффекта на CYP2B (основной мишени рецептора CAR) (Pustylnyak *et al.*, 2005). Ввиду этих особенностей было предположено, что химическая модификация молекулы сTPD позволит получить соединение, способное эффективно активировать рецептор CAR многих видов, включая человека.

Цель работы: исследовать видоспецифичный эффект производных 2,4,6-трифенилдиоксана-1,3 на активацию конститутивного андростанового рецептора и экспрессию ключевых генов ферментов глюконеогенеза *PEPCK* и *G6Pase*.

Для достижения поставленной цели решались следующие **задачи**:

1. Исследовать экспрессию генов *PEPCK* и *G6Pase* в печени крыс при введении сTPD.
2. Синтезировать набор новых структурных производных сTPD и исследовать их способность активировать рецептор CAR крыс и мышей.
3. Проверить способность новых соединений, показавших активирующий эффект на CAR, изменять экспрессию генов *PEPCK* и *G6Pase* в печени крыс. Исследовать молекулярный механизм процесса.
4. Проверить способность производных сTPD активировать рецептор CAR

человека.

Научная новизна работы

Впервые были синтезированы замещенные производные 2,4,6-трифенилдиоксана-1,3 и описаны их биологические эффекты. Показан видоспецифичный эффект соединений на активацию конститутивного андростанового рецептора и, как следствие, экспрессию его генов-мишеней.

Показана способность синтезированных соединений снижать экспрессию ключевых генов глюконеогенеза, *PEPCK* и *G6Pase*, в печени крыс. Впервые показан механизм снижения экспрессии этих генов под действием активаторов CAR *in vivo*. На крысах, содержащихся как на обычной, так и высокожировой диете, продемонстрирован гипогликемический эффект цис-2,4,6-трифенилдиоксана-1,3 и его производного N,N-диметил-4-(4,6-дифенил-1,3-диоксан-2-ил)анилина.

Впервые исследованы эффекты сTPD и его производных на рецептор CAR человека.

Научно-практическая значимость

По своему содержанию работа имеет преимущественно фундаментальный характер. Эндогенные лиганды рецептора CAR до сих пор не идентифицированы, а экзогенные активаторы CAR в большинстве случаев оказывают видоспецифичный эффект. Ввиду данных особенностей исследование эффектов активации рецептора CAR проводят с использованием видоспецифичных активаторов, причем механизм активирующего действия большинства из них неизвестен. Следствием этого является то, что эффекты активации рецептора CAR могут отличаться как среди экспериментальных животных, так и в культурах клеток различных видов. В данной работе были синтезированы производные сTPD, которые были способны активировать CAR как крыс, так и мышей с потенциальным активирующим эффектом на CAR человека. Исследование биологических эффектов данных соединений позволит повысить достоверность экстраполяции эффектов активации рецептора CAR с грызунов на человека. Результаты работы дополняют представления об

эндогенных функциях CAR, более изученного с точки зрения участия в регуляции метаболизма ксенобиотиков. Результаты показывают возможность достижения гипогликемического эффекта *in vivo* у экспериментальных животных под действием новых активаторов CAR, что указывает на перспективность CAR в качестве терапевтической мишени.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Введение заместителей в молекулу cTPD приводит к изменению активности данных соединений по отношению к рецептору CAR крыс и мышей.

2. cTPD и его производные, способные активировать CAR, снижают экспрессию ключевых генов глюконеогенеза *PEPCK* и *G6Pase*, что сопровождается снижением уровня глюкозы в крови лабораторных животных.

3. В основе снижения экспрессии генов глюконеогенеза с участием активированного рецептора CAR лежит его конкуренция с фактором транскрипции HNF-4 α за связывание с участком DR1 в промоторе генов и блокированием транскрипционной активности белка FoxO1.

4. cTPD и его производные не являются лигандами рецептора CAR человека.

Апробация работы

Результаты работы обсуждались на следующих конференциях: 16th North American Regional ISSX Meeting (г. Балтимор, США, 2009), 9th International Meeting of the ISSX (г. Стамбул, Турция, 2010), XLVIII Международная научная студенческая конференция «Студент и научно-технический прогресс» (г. Новосибирск, Россия, 2010); International Conference on Postgenomic Technology for Biomedicine (г. Новосибирск, Россия, 2012); FEBS Advanced Lecture Course: Spetses Summer School on Nuclear Receptor Signaling in Physiology and Disease (о. Спеце, Греция, 2013).

Личный вклад автора

Личный вклад автора заключается в поиске информации, обобщении и систематизации литературных данных, выполнении экспериментов и обработке

данных.

Планирование экспериментов, обсуждение, интерпретация полученных результатов, формулировка выводов работы проводилась совместно с научным руководителем. Подготовка публикаций осуществлялась совместно с соавторами и научным руководителем.

Публикации

Результаты работы изложены в 10 публикациях, из них 5 статей в зарубежных рецензируемых журналах и 5 тезисов докладов в сборниках российских и международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 116 страницах машинописного текста, включает 30 рисунков и 5 таблиц. Библиографический список включает 208 наименований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Синтез сTPD и его производных. Синтез сTPD и его аналогов проводили по методикам (Griengl and Geppert, 1976; A. Mori *et al.*, 1985) с внесением модификаций.

Обработка животных индукторами. Самцам крыс линии Wistar (110–150 г) или самцам мышей линии C57Bl (20–25 г) (питомник Института клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск) внутривентрально вводили соединения в растительном масле (дозы указаны в описании результатов). Животных содержали группами по 3 особи в условиях естественного освещения при свободном доступе к воде и пище. При высокожировой диете крысы получали 45% калорий из жира, в то время как контрольные – 5%.

Введение плазмид мышам и обработка индукторами. Введение плазмид в хвостовую вену мышам (линия ICR, 20-25 г) осуществляли с использованием

системы TransIT *in vivo* gene delivery system («Mirus») согласно рекомендациям производителя. Смесь объемом 2 – 2,5 мл (1/10 массы мыши), содержащей 4 мкг плазмиды 2.2 kb-CYP2B6, 5 мкг плазмиды pCR3-hCAR (или без нее), 4 мкг плазмиды pRL-ТК вводили в хвостовую вену в течение 7 сек. Соединения вводили мышам внутрибрюшинно дважды через 3 ч и 6 ч. Мышей забивали через 16 ч после последнего введения соединений. Измерение активности люцифераз в печени мышей проводили с использованием набора Dual-Luciferase Reporter Assay System («Promega») согласно рекомендациям производителя.

Выделение микросомальной фракции печени животных. Выделение проводили методом дифференциального центрифугирования гомогената печени в среде, содержащей 20 мМ трис-НСl (рН 7,4), 1,15% КСl, из расчета соотношения среды к гомогенату 3:1. В результате двух последовательных центрифугирований гомогената печени при 10000 об/мин и супернатанта при 32000 об/мин, получали осадок микросомальной фракции.

Определение активности CYP2B. Скорость О-деалкилирования 7-пентоксирезорурфина в микросомальной фракции определяли флюориметрическим методом по скорости образования резорурфина (Burke *et al.*, 1985). В качестве стандарта для построения калибровочной кривой использовали резорурфин.

Вестерн-блот анализ. Лизис гомогената печени животных проводили с использованием буфера RIPA. Разделение белков проводили по методу Лэммли (Laemmli, 1970) в денатурирующих условиях с использованием системы Mini-PROTEAN Tetra Cell («BioRad»). Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0,45 μ м). Для блокировки центров неспецифической сорбции мембрану инкубировали в течение часа в 2% BSA. После мембрану инкубировали со специфичными первичными и вторичными антителами. Визуализацию проводили с использованием диаминобензидина или с помощью набора реагентов LuminataTM Western HRP Substrate («Millipore»).

ПЦР с детекцией в реальном времени. Выделение суммарной РНК из

образцов печени крыс проводили с использованием набора RNeasy® Mini Kit («Qiagen») согласно рекомендациям производителя. Обратную транскрипцию проводили в реакционном объеме 20 мкл с помощью набора iScript cDNA Synthesis Kit («BioRad») в соответствии с протоколом производителя. В реакции обратной транскрипции использовали гексануклеотидные случайные праймеры. Измерение уровня экспрессии генов *CYP2B1*, *CYP2B2*, *PEPCK1*, *G6Pase* и *18S рибосомной РНК* («ген домашнего хозяйства») проводили в реальном времени с использованием iTaq SYBR Green Supermix with ROX («BioRad»). Каждая реакция ПЦР (25 мкл) содержала 1 мкл кДНК, 300 нМ специфичных праймеров, буфер для ПЦР. Условия реакции: 95°C – 3 мин; 40 циклов: 95°C – 15 с, 58°C – 20 с, 72°C – 20 с, детекция 80°C – 10 с. Относительный уровень экспрессии генов оценивали с использованием значений пороговых циклов Ct по методу 2 Δ Ct.

Иммунопреципитация хроматина. К гомогенату печени в PBS, содержащим 0,4% NP-40, добавляли формальдегид до 1 %. Реакцию останавливали добавлением глицина. Лизат клеток подвергался озвучиванию для получения фрагментов ДНК ~ 500 п.н. Часть полученного лизата после очистки центрифугированием использовалась для контроля (Input). Супернатант инкубировали сначала со специфичными антителами или нормальной сывороткой кролика (IgG), а потом с суспензией агарозы (Protein G Agarose/ Salmon Sperm DNA («Millipore»)). Далее после серии очисток иммунокомплекс разрушали путем инкубации с NaCl. Белок разрушали протеиназой К. Полученные фрагменты ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Анализ полученной ДНК проводили методом ПЦР.

Определение уровня глюкозы в крови крыс. Образцы крови отбирали из хвостовой вены крыс. Содержание глюкозы в крови животных определяли с помощью прибора One Touch Select («LifeScan») согласно рекомендациям производителя.

Определение активация hCAR *in vitro*. Для оценки активации hCAR использовали LanthaScreen™ TR-FRET CAR Coactivator Assay Kit

(«Invitrogen»). В 96 луночном планшете готовили серию последовательных разведений исследуемых соединений. Измерения проводили при длинах волн 520 нм и 495 нм.

Статистическая обработка результатов. Результаты представлены в виде средней величины и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Статистическая значимость различий между группами оценивалась с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным критерием Tukey (уровень значимости $p < 0,05$). Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным критерием Tukey был проведен с введением поправки Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Видоспецифичный эффект производных сTPD. Цис-2,4,6-трифенилдиоксан-1,3 является видоспецифичным активатором CAR крыс, при этом, не оказывая эффектов на активацию мышинной изоформы. Чтобы нивелировать видоспецифичный эффект данного соединения были синтезированы различные его производные с вариацией в 4-м положении 2-го фенильного заместителя. Синтез диоксанов был осуществлен по реакции Принса, в результате которого было синтезировано 5 новых соединений, в том числе два пространственных изомера TPD (2,4,6-трифенилдиоксан-1,3): цис- и транс изомеры (сTPD и tTPD), 2-(4-метоксифенил)-4,6-дифенил-1,3-диоксан (pMeO), N,N-диметил-4-(4,6-дифенил-1,3-диоксан-2-ил)анилин (pDMA), 2-(4-фторфенил)-4,6-дифенил-1,3-диоксан (pF), 2-(4-нитрофенил)-4,6-дифенил-1,3-диоксан (pNO₂) (Рис. 1).

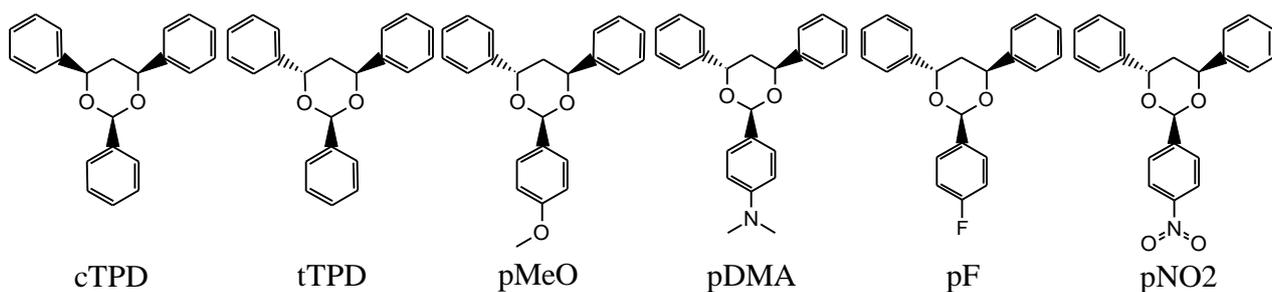
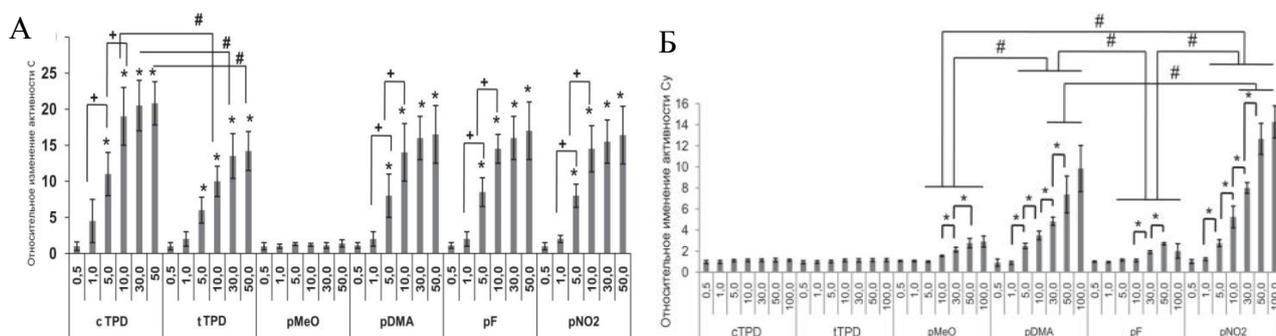


Рисунок 1. Структура синтезированных соединений.

Способность новых синтезированных соединений активировать рецептор CAR крыс и мышей оценивали по индукции фермента CYP2B. Дополнительной задачей было вычисление эффективной дозы индукторов у разных видов. Для этого самцам крыс и мышей вводили исследуемые соединения в различных дозах (от 0,5 мг/кг до 100 мг/кг), и измерялась ПРОД активность, специфичная для CYP2B (Рис.2).



ED ₅₀ (мг/кг)	cTPD	tTPD	pMeO	pDMA	pF	pNO2
мышь	—	—	23,5	27,6	24,5	28,4
крысы	5,1	6,7	—	5,4	5,1	5,2

Рисунок 2. Дозо-зависимый эффект аналогов TPD на активность CYP2B в печени крыс (А) и мышей (Б). Приведено изменение относительно контрольной группы. *Достоверность различий по сравнению с контролем $p < 0,05$. #Достоверность различий между разными группами соединений $p < 0,05$. В таблице приведены значения эффективной дозы (ED₅₀) вводимых соединений.

В результате данного исследования было показано, что соединения pDMA и pNO2 были наиболее мощными индукторами обоих видов, при этом эффективная доза для мышей была в 5 раз выше, чем для крыс (Рис. 2). Чтобы показать, что регуляция индукции CYP2B под действием производных cTPD осуществляется на уровне транскрипции (как это происходит в случае исходного cTPD) было оценено изменение как количества белка CYP2B, так и уровня мРНК CYP2B (Рис. 3).

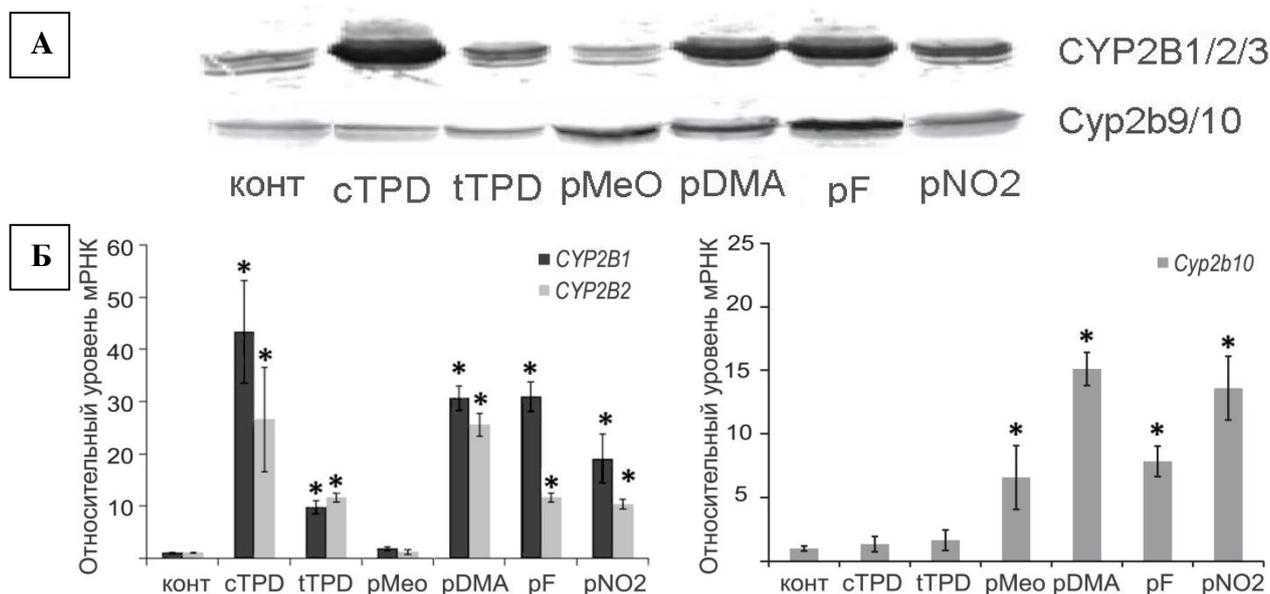


Рисунок 3. (А) Иммуноблот микросомальной фракции печени крыс (детектировались изоформы CYP2B1/2/3) и мышей (детектировались изоформы Cyp2b9/10). На каждую дорожку нанесено 50 мкг белка. (Б) Относительное содержание мРНК CYP2B после введения исследуемых соединений в печени крыс (CYP2B1/2) и мышей (Cyp2b10). * Статистическая значимость различий по сравнению с контролем $p < 0,05$.

Изменение уровня мРНК CYP2B и ее белковых продуктов в печени крыс и мышей хорошо соответствовала изменениям ферментативной активности, что подтверждает регуляцию на уровне транскрипции. Данные результаты говорят в пользу того, что видоспецифичные различия в индукции CYP2B опосредованы различной способностью производных сTPD активировать рецептор CAR крыс и мышей. Для подтверждения данного предположения была проверена способность рецептора CAR взаимодействовать с энхансерным участком PBREM в промоторе генов CYP2B1 и Cyp2b10 под действием исследуемых веществ (Рис. 4).

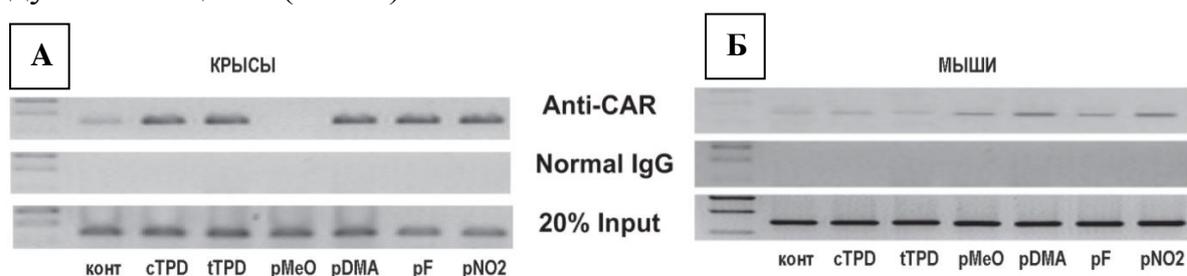


Рисунок 4. Иммунопреципитация хроматина из образцов печени крыс (А) и мышей (Б) после однократного введения соединений. Использовали антитела против CAR (anti-CAR) и нормальных IgG кролика (normal IgG). Анализировалась ДНК последовательность промотора генов CYP2B1 (А) и Cyp2b10 (Б), включающая мотив PBREM.

В контрольных образцах печени крыс детектировалась слабая амплификация фрагмента ДНК, а при введении крысам рМеО соответствующая полоса не обнаруживалась вообще. В тоже время, введение сTPD, tTPD, pDMA, pF, pNO₂ приводило к аккумуляции CAR на промоторе генов *CYP2B* в печени крыс. Взаимодействие CAR с мотивом PBREM в промоторе гена *Cyp2b10* после введения незамещенных изомеров сTPD не происходило, поскольку интенсивность полос визуально не отличалась от контрольного образца (Рис. 4Б). С помощью данного метода было подтверждено, что под действием производных сTPD происходит видоспецифичная активация рецептора CAR, причем три соединения из шести были активны по отношению как к крысам, так и мышам. Поскольку эффекты исследуемых соединений были более выражены для крыс, для оценки роли рецептора CAR в регуляции экспрессии генов, кодирующих ключевые ферменты глюконеогенеза, была использована крысиная модель.

Гипогликемический эффект производных сTPD. Способность исследуемых соединений ингибировать экспрессию генов *PEPCK* и *G6Pase*, кодирующих ключевые ферменты глюконеогенеза, была оценена с помощью метода ПЦР в режиме реального времени. После введения крысам производных сTPD в дозе 10 мг/кг веса наблюдалось достоверное снижение экспрессии гена *PEPCK* под действием всех аналогов, в то время как экспрессия гена *G6Pase* подавлялась только 5-ю соединениями (Рис. 5А). Результаты исследования относительного содержания белков PEPCK и G6Pase хорошо согласовались с данными об изменении экспрессии их генов (Рис. 5Б,В). Содержание G6Pase в печени крыс при введении соединения pF не изменялось в сравнении с контрольными образцами.

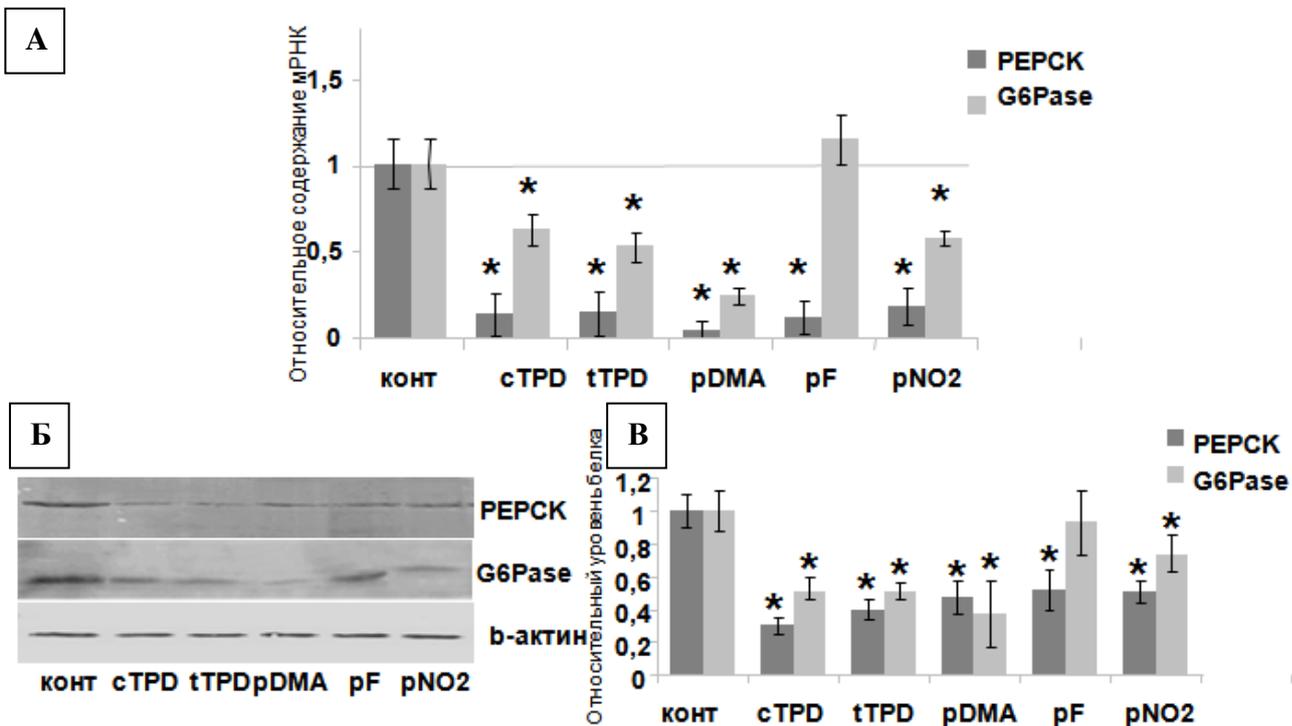


Рисунок 5. (А) Относительное содержание мРНК *PEPCK* и *G6Pase* в печени крыс через 72 ч после однократного введения соединений. (Б) Иммуноблот анализ белков *PEPCK* и *G6Pase* в печени крыс через 72 часа после однократного введения производных *cTPD*. На каждую дорожку нанесено 80 мкг белка. (В) Данные денситометрии. Содержание белков *PEPCK* и *G6Pase* в печени крыс рассчитывали как отношение интенсивности окрашивания специфической полосы гена *PEPCK* или *G6Pase* к интенсивности полосы гена β -actin. Приведены средние значения \pm SD *Статистическая значимость различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Исследование механизма снижения экспрессии генов при введении производных *cTPD* проводили с помощью метода иммунопреципитации хроматина с использованием специфичных антител против транскрипционных факторов FoxO1, HNF-4 α и CAR с целью подтверждения участия рецептора CAR. В контроле не наблюдалось взаимодействия CAR с промоторами генов *PEPCK* и *G6Pase* (Рис. 6). При введении индукторов *cTPD*, *tTPD*, *pDMA*, *pF* и *pNO₂* наблюдалось увеличение количества продукта амплификации в тех случаях, когда в область, ограниченную праймерами, входил участок DR1, с которым специфически взаимодействует HNF-4 α . Кроме того, результаты показывали, что при усилении взаимодействия CAR с DR1, происходит одновременное снижение взаимодействия HNF-4 α с DR1 (Рис 6 А,Б).

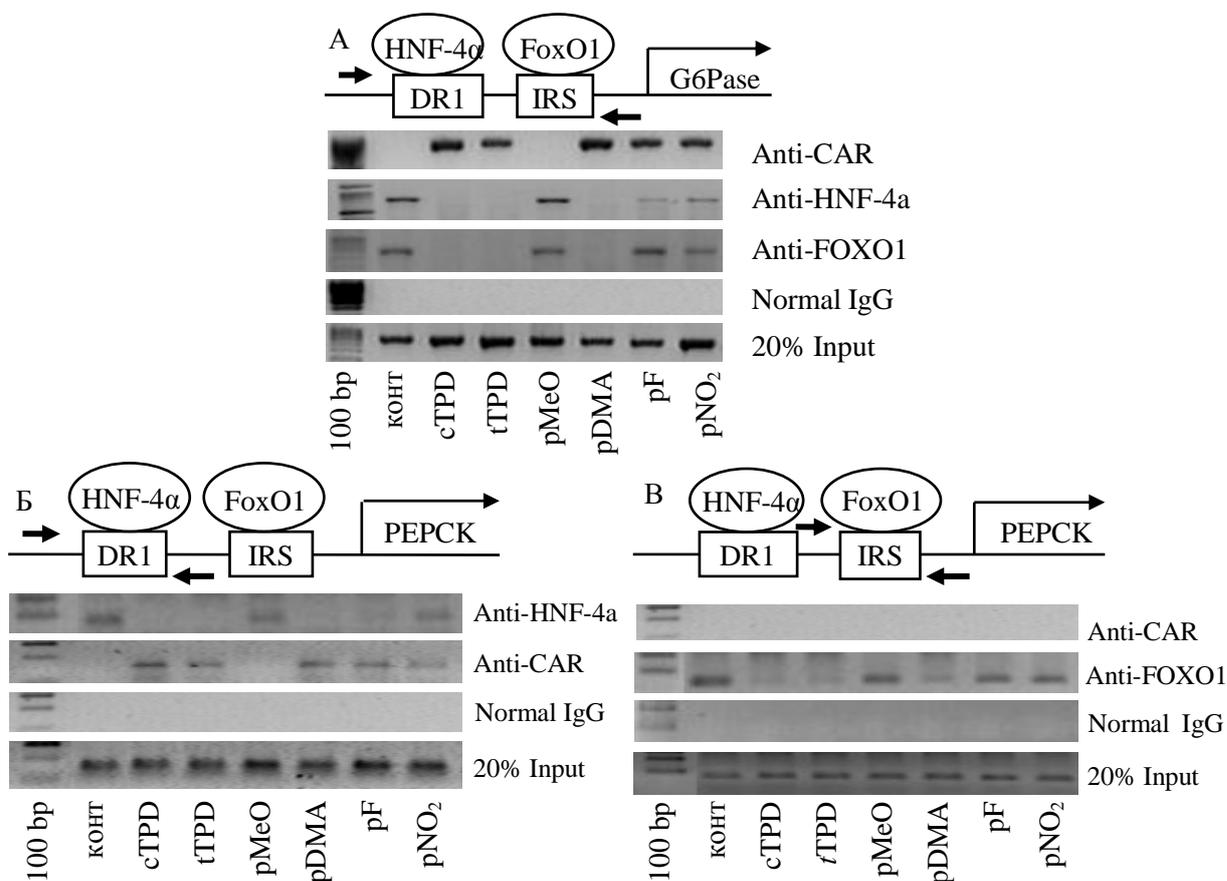


Рисунок 6. Иммунопреципитация хроматина из образцов печени крыс после однократного введения соединений. Использовали антитела против FoxO1 (Anti-FoxO1), HNF-4α (Anti-HNF-4α), CAR (Anti-CAR) и нормальных IgG кролика (Normal IgG). А) Анализировалась ДНК последовательность промотора гена G6Pase, включающая сайты связывания транскрипционных факторов FoxO1 (IRS) и HNF-4α (DR1). Б, В) Анализировалась ДНК последовательность промотора гена PEPCK, включающая сайт связывания HNF-4α или FoxO1 соответственно.

При введении соединений, активирующих рецептор CAR, также происходит снижение взаимодействия FoxO1 со специфической последовательностью IRS. При этом CAR не способен взаимодействовать с последовательностью IRS (Рис. 6 А,В). Полученные на данном этапе работы результаты подтверждают, что производные cTPD снижают экспрессию генов глюконеогенеза путем нарушения взаимодействия основных регуляторов их транскрипции с энхансерными элементами, что подобно действию как их физиологического регулятора инсулина, так и терапевтического гипогликемического препарата метформина (Kim *et al.*, 2008).

Известно, что ожирение связано со многими патологическими

состояниями, в том числе с диабетом 2-го типа (Kahn *et al.*, 2006), поэтому для создания животных с метаболическими нарушениями часто используется модель высокожировой диеты (HFD). С использованием данной модели был исследован гипогликемический эффект соединения pDMA, поскольку в предыдущих экспериментах оно оказалось среди веществ, оказавших наиболее ярко выраженные эффекты, как на крыс, так и мышей. Соединения pF и pNO2 также ингибировали экспрессию генов, однако, как показано на Рис. 6, они намного хуже снижали транскрипционную активность факторов FoxO1 и HNF-4a. Для сравнения эффектов нового соединения pDMA, крысам также вводили cTPD - наиболее эффективный активатор CAR крыс.

Общепринятым показателем при нарушении метаболизма глюкозы является ее уровень в крови натощак. У животных, содержащихся на высокожировой диете в течение 8 недель, наблюдалось достоверное повышение уровня глюкозы натощак. Хроническое введение как cTPD, так и pDMA снижало уровень глюкозы в крови животных как в случае жировой, так и стандартной диеты (Рис. 7).

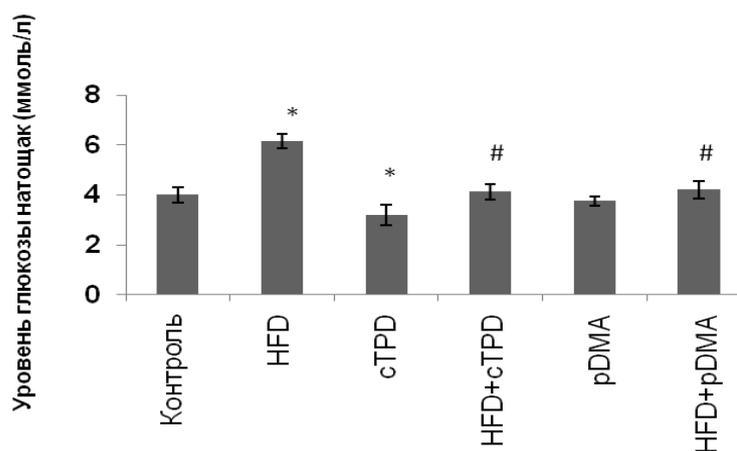


Рисунок 7. Результаты эксперимента с использованием модели высокожировой диеты (HFD), демонстрирующие уровень глюкозы в крови крыс. Приведены средние значения \pm SD * Статистическая значимость различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$). # Статистическая значимость различий по сравнению с группой HFD ($p < 0,05$).

Результаты измерения уровня глюкозы в крови крыс хорошо согласовывались с изменениями в экспрессии генов *PEPCK* и *G6Pase* как на уровне мРНК, так и белка (Рис. 8 А,Б). Таким образом, оба соединения, активирующие CAR, показали способность снижать уровень глюкозы в крови при метаболических нарушениях.

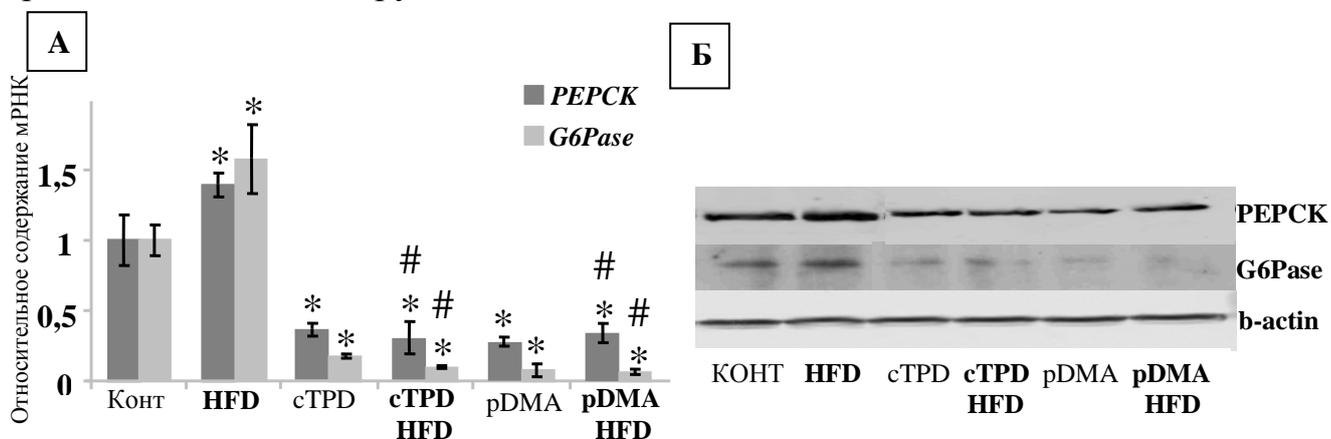


Рисунок 8. Результаты эксперимента с использованием модели высокожировой диеты. **(А)** Относительное содержание мРНК PEPCK и G6Pase в печени крыс. **(Б)** Иммуноблот белков PEPCK и G6Pase печени крыс. На каждую дорожку нанесено 80 мкг белка. Приведены средние значения \pm SD. * Статистическая значимость различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$). # Статистическая значимость различий по сравнению с группой HFD ($p < 0,05$).

Исследование активации рецептора CAR человека. Полученные ранее результаты говорят о том, что синтезированные производные cTPD видоспецифично активируют рецептор CAR. При этом соединение pDMA активировало рецептор как крыс, так и мышей. Более того, оно оказывало гипогликемический эффект у животных с метаболическими нарушениями, индуцированными высокожировой диетой. Однако способность данных соединений оказывать подобные эффекты на человеческий организм не столь очевидна ввиду видоспецифичных особенностей активации рецептора. Исследование активации CAR человека (hCAR) под действием cTPD проводили на мышах, ввиду того что он не активирует CAR мышей (mCAR) (Pustylnyak *et al.*, 2007), а в качестве положительного контроля использовали соединение CITCO (лиганд hCAR, также не активирует mCAR (Moore *et al.*, 2000)). Для выполнения этой задачи мышам в хвостовую вену вводилась плазмида,

несущая ген *hCAR* под конститутивным промотором CMV, и плазида, несущая ген *Luc*, кодирующий люциферазу, перед которым была встроена регуляторная область гена *CYP2B6* человека, содержащая сайт связывания *hCAR* (PBREM). В результате экспрессии плазмиды с конститутивным промотором pCR3-*hCAR* в клетке синтезируется рецептор CAR человека, который в случае активации связывается с промотором гена люциферазы второй плазмиды. Активация промоторной области приводит к инициации транскрипции гена люциферазы, что в конечном итоге приводит к увеличению количества его белка, по изменению ферментативной активности которого можно судить об активации рецептора. В результате исследования было показано увеличение относительной активности люциферазы у мышей после введения как специфичного лиганда CITCO, так и cTPD, что говорит об активации рецептора под действием этих соединений (Рис. 9А).

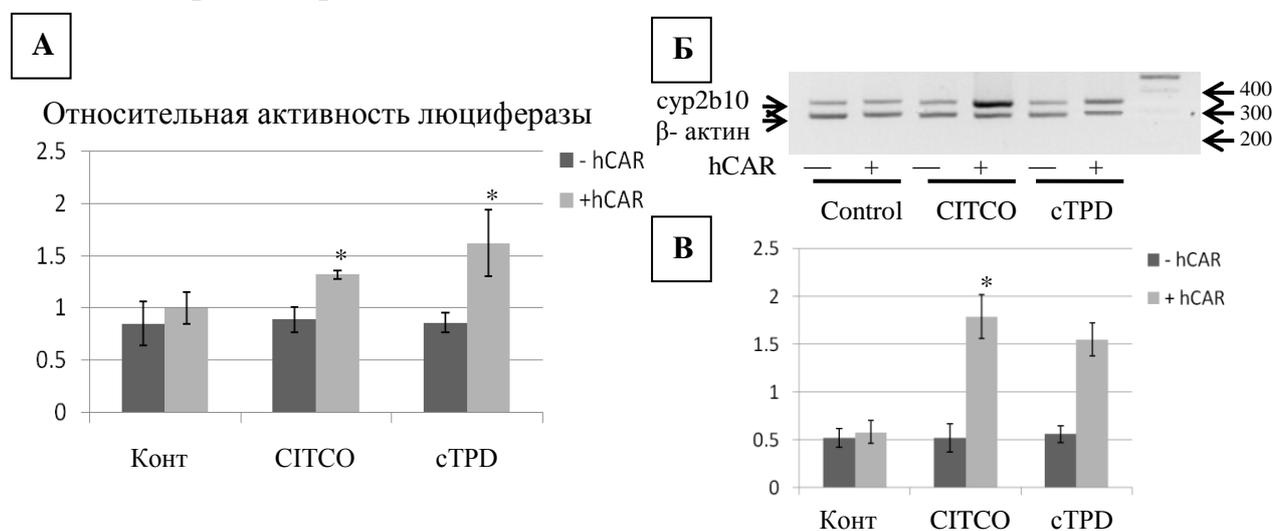


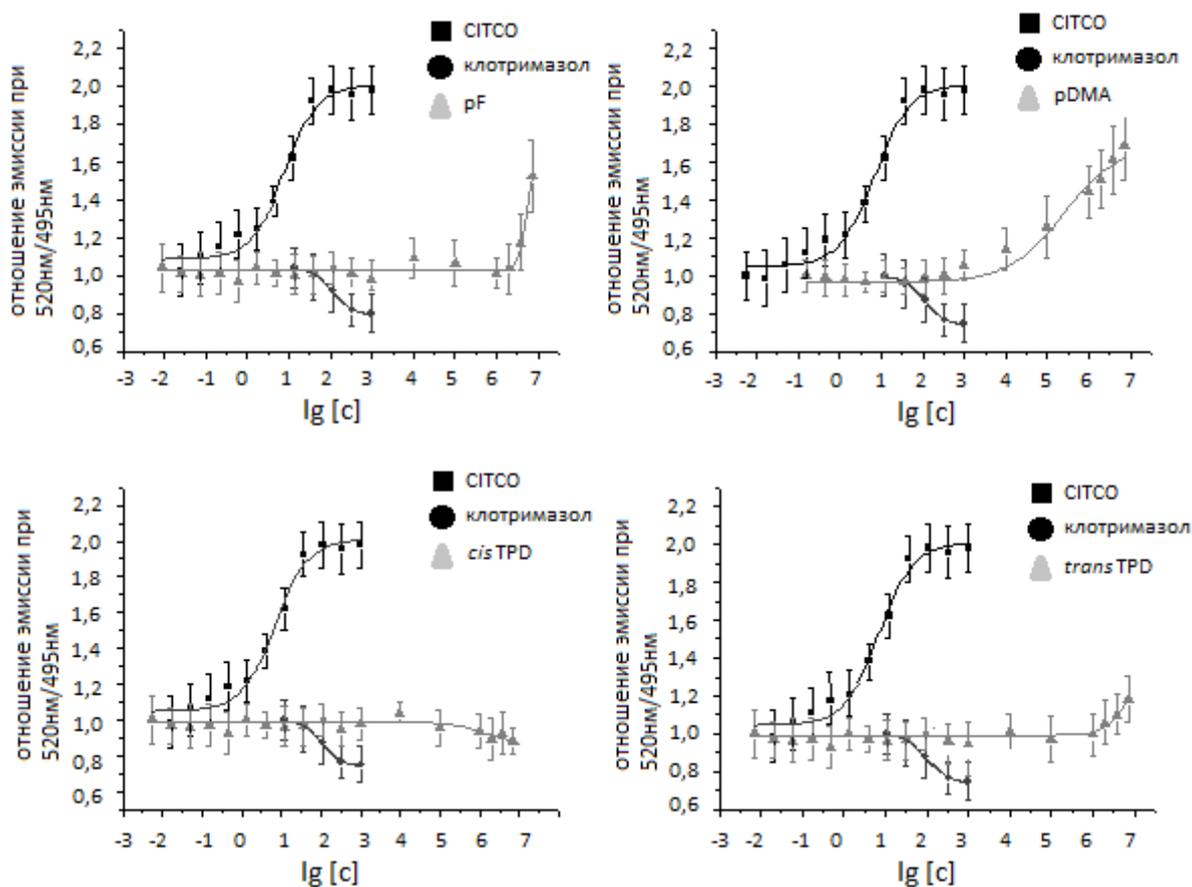
Рисунок 9. Исследование активации *hCAR* в печени мышей под действием CITCO (8 мг/кг) и cTPD (10 мг/кг). -*hCAR* – образцы печени мышей, которым не вводилась плазида pCR3-*hCAR*; +*hCAR* - образцы печени мышей, которым вводилась плазида pCR3-*hCAR*. **(А)** Активация промотора гена *CYP2B6* человека в печени мышей, оцененная по изменению активности люциферазы в печени мышей под действием соединений. **(Б)** Электрофоретическое разделение продуктов амплификации *sup2b10* и β -actin. **(В)** Относительное содержание мРНК *sup2b10* в печени мышей. Данные денситометрии рассчитывали как отношение интенсивности окрашивания специфической полосы гена *sup2b10* к интенсивности полосы гена β -actin. Приведены средние значения \pm SD. * Статистическая значимость различий по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Поскольку регуляторная последовательность PBREM консервативна у человека и мыши и отличается всего на один нуклеотид (Sueyoshi *et al.*, 2001), мы предположили, что активированный hCAR будет способен взаимодействовать с мотивом PBREM в промоторе гена *Cyp2b10* мышей, запуская его экспрессию. Для проверки данного предположения, которое, по сути, также является доказательством активации hCAR под действием исследуемых соединений, была проведена мультиплексная ПЦР с праймерами, 3'-концы которых комплементарны кДНК только *Cyp2b10* мышей. В печени контрольных мышей наблюдалась конститутивная экспрессия гена *Cyp2b10*, а при воздействии CITCO и cTPD происходит статистически значимое увеличение уровня мРНК гена *Cyp2b10* в печени мышей, экспрессирующих ген *hCAR*, но не у животных, которым данная плаزمиды не вводилась (Рис. 9Б,В).

Важно отметить, что для активации рецептора прямое связывание с активатором не всегда является необходимым. Способность исследуемых производных cTPD выступать в качестве лигандов hCAR была проверена *in vitro* с помощью коммерческого набора реагентов, содержащего синтетический лиганд-связывающий домен hCAR. В качестве положительного контроля в данном эксперименте использовали лиганд рецептора CAR человека CITCO, а отрицательного – обратный агонист клотримазол. Связывание с рецептором наблюдалось лишь для двух соединений pF и pDMA (Рис. 10, данные приведены частично). По кривой зависимости детектируемого сигнала от логарифма концентрации была вычислена эффективная концентрация (EC₅₀). Оказалось, что EC₅₀ для данных соединений на 6 порядков выше положительного и отрицательного контролей, на основании чего был сделан вывод, что исследуемые соединения не являются высокоаффинными лигандами для рецептора CAR человека.

Несмотря на то, что cTPD не способен связываться с лиганд-связывающим доменом hCAR, в организме происходит его активация. Объяснением полученных различий в экспериментах *in vivo* и *in vitro* может быть тот факт, что лигандами рецептора выступают не сами соединения, а их метаболиты. С

этой точки зрения, наблюдаемая видоспецифичная разница действия активаторов CAR может быть следствием различий в субстратной специфичности метаболизирующих ферментов.



	pDMA	pF	CITCO
EC ₅₀ (мМ)	0,25	5	7,24*10 ⁻⁶

Рисунок 10. Кривые зависимости эффекта (отношения флуоресценции при 520 нм к флуоресценции при 495 нм) от концентрации производных сTPD. В таблице приведены значения эффективной концентрации EC₅₀ исследуемых соединений после 2 ч инкубации с лиганд-связывающим доменом hCAR.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время ведутся активные исследования физиологической роли орфанового конститутивного андростанового рецептора CAR. Первоначально данный рецептор был описан как транскрипционный регулятор экспрессии генов метаболизма ксенобиотиков, однако сейчас очевидно, что он может

принимать участие в регуляции многих важных физиологических процессов, протекающих в печени. В данной работе продемонстрирован эффект активации рецептора CAR на подавление глюконеогенеза в печени крыс под действием новых синтезированных производных 2,4,6-трифенилдиоксана-1,3. Показана видоспецифичная активация рецептора под действием данных соединений. рDMA, одно из исследуемых производных сTPD, оказывало гипогликемический эффект у крыс с индуцированными метаболическими нарушениями, причем это соединение активировало также и рецептор мышей, с потенциально возможным активирующим эффектом на рецептор CAR человека.

Эффекты активации рецептора могут различаться у разных видов, что может объясняться либо различиями в регуляции исследуемых молекулярных процессов, либо видоспецифичными способами активации рецептора под действием экспериментальных соединений. Видоспецифичное действие экзогенных активаторов CAR и отсутствие детального описанного механизма активации рецептора затрудняет оценку его физиологической роли. В работе идентифицировано соединение с широкой межвидовой активностью по отношению к рецептору CAR, что создает перспективы для проведения дальнейших исследований молекулярных механизмов с участием данного рецептора.

ВЫВОДЫ

1. Хроническое введение сTPD снижает уровень экспрессии генов *PEPCK* и *G6Pase*, что сопровождается уменьшением уровня глюкозы в крови крыс.

2. Впервые синтезированные производные сTPD видоспецифично активируют CAR крыс и мышей. Соединения рDMA, рNO₂ и рF активируют рецептор обоих видов, причем эффективная доза для крыс в 5 раз ниже, чем для мышей.

3. cTPD, tTPD, pDMA, pNO₂ снижают экспрессию генов ключевых ферментов глюконеогенеза *PEPCK* и *G6Pase* в печени крыс через активацию CAR по двум молекулярным механизмам. Во-первых, активированный CAR взаимодействует с мотивом DR1 в промоторе генов глюконеогенеза, тем самым препятствуя связыванию HNF-4α. Во-вторых, активация CAR снижает связывание FoxO1 с IRS в промоторах генов *PEPCK* и *G6Pase*.

4. Исследуемые соединения не являются лигандами рецептора CAR человека, при этом cTPD способен активировать hCAR *in vivo*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Pustyl'nyak V., Yarushkin A., Kachaylo E., Slynko N., Lyakhovich V., Gulyaeva L. Effect of several analogs of 2,4,6-triphenyldioxane-1,3 on constitutive androstane receptor activation. // Chem Biol Interact. – 2011. – V. 192. – N. 3. – P. 177-183.

2. Pustyl'nyak V., Kazakova Y., Yarushkin A., Slynko N., Gulyaeva L. Effect of several analogs of 2,4,6-triphenyldioxane-1,3 on CYP2B induction in mouse liver. // Chem Biol Interact. – 2011. – V. 194. – N. 2-3. – P. 134-138.

3. Kachaylo E.M., Yarushkin A.A., Pustyl'nyak V.O. Constitutive androstane receptor activation by 2,4,6-triphenyldioxane-1,3 suppresses the expression of the gluconeogenic genes. // Eur J Pharmacol. – 2012. – V. 679. – N. 1-3. – P. 139-43.

4. Kachaylo E.M., Yarushkin A.A., Pustyl'nyak V.O. Long-Term Constitutive Androstane Receptor Activation By 2,4,6-Triphenyldioxane-1,3 Improves Glucose Metabolism in High-Fat Diet Rats. // Biochem & Anal Biochem. – 2012. – S4-001. doi:10.4172/2161-1009.S4-001.

5. Yarushkin A.A., Kachaylo EM, Pustyl'nyak VO. The constitutive androstane receptor activator 4-[(4R,6R)-4,6-diphenyl-1,3-dioxan-2-yl]-N,N-dimethylaniline inhibits the gluconeogenic genes *PEPCK* and *G6Pase* through the suppression of HNF4α and FOXO1 transcriptional activity. // Br J Pharmacol. – 2013. – V. 168 – N.

8. – P. 1923-1932.

6. Gulyaeva L.F., Pustyl'nyak V.O., Yarushkin A.A., Slynko N.M. Structure-activity study of CYP2B induction in rat liver // Drug Metabolism Reviews. – 2009. – V. 41. –S. 3. – P. 86 (16th North American Regional ISSX Meeting, Baltimore, USA)

7. Pustyl'nyak V.O., Yarushkin A.A., Kachaylo E.M., Slynko N.M., Gulyaeva L.F. Minor changes in 2,4,6-triphenyldioxane-1,3 inducer structure cause changes in CAR mediated CYP2B induction // Drug Metabolism Reviews. – 2010. – V. 42 – S. 1 – P. 226 (9th International Meeting of the ISSX, Istanbul, Turkey)

8. Ярушкин А.А. Синтез и исследование производных 2,4,6-трифенилдиоксана-1,3. // Материалы XLVIII международной научной студенческой конференции «Студент и научно-технический прогресс». – Россия, Новосибирск, 2010. – С. 42.

9. Yarushkin A.A., Kazakova Y.A., Pustyl'nyak V.O. Constitutive androstane receptor (CAR): xenosensor and target for therapy. // International Conference on Postgenomic Technology for Biomedicine. – Novosibirsk, Russia, 2012. – P. 184

10. Yarushkin A.A., Kazantseva Y.A., Pustyl'nyak V.O. Novel CAR-activated compound 4-[(4R,6R)-4,6-diphenyl-1,3-dioxan-2-yl]-N,N-dimethylaniline decreases gluconeogenic genes expression. // FEBS Advanced Lecture Course. Spetses Summer School on Nuclear Receptor Signalling in Physiology and Disease. – Spetses, Greece, 2013. – P. 57.