

На правах рукописи

Абаленихина Юлия Владимировна

**РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ Р-ГЛИКОПРОТЕИНА В
УСЛОВИЯХ ЭКЗОГЕННОГО И ЭНДОГЕННОГО
ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА *IN VITRO***

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Рязань – 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный консультант:

доктор медицинских наук, профессор **Якушева Елена Николаевна**

Официальные оппоненты:

Давыдов Вадим Вячеславович, доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии Института фармации и медицинской химии

Штиль Александр Альбертович, доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией механизмов гибели опухолевых клеток

Синицкий Антон Иванович, доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой биохимии имени Р.И. Лифшица, ведущий научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Защита состоится «__» _____ 2023 г. в ____ на заседании диссертационного совета 21.2.060.02, созданного на базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по адресу: 390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026 г. Рязань, ул. Шевченко, 34) и на сайте www.rzgmu.ru
Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент

Н.В. Короткова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Молекулы биологически активных веществ проникают через клеточные мембраны не только пассивной диффузией, но и с помощью транспортных систем, связанных с белками-переносчиками. Одной из основных групп таких белков является суперсемейство ABC-транспортеров (*англ.: ATP-binding cassette*) (Cheung K.W.K. et al., 2019). Важнейшим представителем суперсемейства ABC-транспортеров, участвующим в эффлюксе биобiotиков и ксенобиотиков, является P-гликопротеин (Pgp, *англ.: permeability glycoprotein*) (Lanjewar S., 2019; Mora Lagares L. et al., 2021).

Pgp – это белок, характеризующийся низкой субстратной специфичностью, так как он способен распознавать широкий спектр веществ. Pgp обнаружен в эпителии кишечника, печени, почек и эндотелиальных клетках гистогематических барьеров, считается, что данный белок выполняет защитную функцию за счет АТФ-зависимого выведения ксенобиотиков из клеток во внеклеточное пространство или просвет органов (Schinkel A.H. et al., 1997). Pgp также способен блокировать развитие апоптоза в опухолевой клетке за счет модулирования активности ключевых ферментов ее запрограммированной гибели (Cullen K.V. et al., 2001; Sagnou M. et al., 2020). Таким образом, Pgp играет ключевую роль не только в фармакокинетике лекарственных веществ, являющихся его субстратами, но и выполняет важную защитную функцию при физиологических и патологических процессах.

Активность Pgp может значительно изменяться под влиянием факторов внешней и внутренней среды, таких, как генетические особенности организма, концентрация кислорода в крови, кислотно-щелочной баланс, использование ряда лекарственных веществ и др. (Кукес В.Г. и др., 2008). Выделяют следующие основные механизмы регуляции Pgp – модуляция экспрессии гена множественной лекарственной устойчивости (*MDR1, англ.: multidrug resistance gene*) и активности синтезированного белка (Якушева Е.Н. и др., 2014, 2018). При

этом функционирование Pgp может, как понижаться (ингибирование), так и повышаться (индукция) (Callaghan R. et al., 2014; Leopoldo M. et al., 2019).

Экспрессия гена *MDR1* инициируется сигналами от большого количества стимулов, которые сходятся на общей области промотора, называемого «*MDR1 enhanceosome*» (Scotto K.W., 2003). Ядерный прегнан X рецептор (PXR, англ.: *pregnane X receptor*) представляет собой белковый транскрипционный фактор, распознающий специфические последовательности в промоторах или энхансерах генов-мишеней и модулирующий их экспрессию (Harmsen S. et al., 2013; Li Y. et al., 2014). Данный транскрипционный фактор рассматривается как сенсор ксенобиотиков, оказывающий регулирующее воздействие на транскрипцию генов транспортеров лекарственных веществ (в том числе Pgp), а также ключевых ферментов метаболизма (Li Y. et al., 2014). Аналогичную функцию выполняет и конститутивный андростановый рецептор (CAR, англ.: *constitutive androstane receptor*). Показано, что CAR и PXR могут связываться с респонсивным элементом ядерного рецептора в области 7.8 пар килобаз энхансера гена *MDR1* и активируют его экспрессию через DR4 мотив, с которым данные рецепторы взаимодействуют в качестве гетеродимера с рецептором ретиноевой кислоты или в качестве мономера (Burk O. et al., 2005).

Исследования, проведенные в 60–80-х гг. XX века, показали, что повышенная продукция активных форм кислорода (АФК), характеризующая дистресс, играет важную роль в патогенезе наиболее распространенных заболеваний человека, таких, как патология сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной систем, злокачественные новообразования и др. (Калинин Р.Е. и др., 2018; Давыдов В.В. и др., 2019; Ланкин В.З. и др., 2020; Forman H.J. et al., 2021; Pisoschi A.M. et al., 2021). Кроме того, физиологические концентрации АФК (эустресс), образуемые нейрохимическими и биоэнергетическими системами клетки в нормальных условиях, играют существенную роль в различных сторонах ее жизнедеятельности (Беленичев И.Ф. и др. 2005; Ray P.D. et al., 2019; Sies H. et al., 2020; Juan C.A. et al., 2021).

По механизму возникновения можно выделить 2 типа окислительного стресса (ОС): эндогенный и экзогенный. Увеличение количества свободных радикалов, которое вызвано экзогенным воздействием прооксидантов (пероксид водорода, использование препаратов, способствующих генерации супероксида, например, паракват, менадион) приводит к развитию экзогенного ОС. Ингибирование компонентов антиоксидантной системы (DL-бутионинсульфоксимин (БСО) - ингибитор синтеза глутатиона) способствует синтезу АФК в клетке, вызывая эндогенный ОС.

Так как Pgp экспрессируется преимущественно в цитоплазматических мембранах, то можно предположить, что активация свободно-радикального окисления приведет к изменению функционирования данного белка-транспортера. Возможно, что при экзогенном ОС повреждение мембраны является более активным процессом, чем при эндогенном, и, следовательно, этиология развития ОС имеет важное значение в изучении регуляции активности и функционирования Pgp. Кроме этого, образующиеся в результате ОС продукты перекисидации также могут повлиять на функционирование Pgp (напрямую или опосредованно) или являться его субстратами.

Поэтому изучение влияния ОС на активность данного белка-транспортера, а также выявление механизмов его регуляции в условиях ОС позволит оценить роль Pgp в течение патологического процесса, более полно представить патогенез моделируемых нарушений и научно обосновать рациональные методы терапии.

Степень разработанности темы

Pgp является одним из наиболее клинически значимых представителей ABC-транспортеров благодаря участию в транспорте биобиотиков и ксенобиотиков через цитоплазматическую мембрану. Известно, что активность и экспрессия Pgp могут изменяться под воздействием различных химических и лекарственных веществ, факторов внешней среды, патологических процессов.

Окислительный стресс является типовым патологическим состоянием. Именно поэтому определение маркеров ОС является обязательным этапом

исследования. На кафедре биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России был разработан метод оценки уровня карбонильных производных белков и изучено изменение их количества в различных экспериментальных условиях (Фомина М.А. и др., 2018; 2019; Петров Д.С. и др., 2021).

В настоящее время имеются данные о влиянии прооксидантов на экспрессию Pgp. Так, в исследовании 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 (Ziemann C. et al., 1999). В работе других авторов 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 (Felix R.A. et al., 2002).

Научный коллектив кафедры фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России на протяжении нескольких лет занимается изучением транспорта лекарственных веществ внутрь клеток через цитоплазматическую мембрану, а именно исследует лекарственные препараты на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам Pgp (Якушева Е.Н. и др., 2019). Также была изучена активность белка-транспортера при моделировании патологических состояний: нарушение мозгового кровообращения (Черных И.В. и др., 2021), гипоксия (Якушева Е.Н. и др., 2016), неврологические расстройства (Градинарь М.М. и др., 2020), патология эндокринной системы (Якушева Е.Н. и др., 2016). Было установлено, что при окклюзии средней мозговой артерии крыс с последующей реперфузией (модель фокальной ишемии мозга) и билатеральной окклюзии сонной артерии (модель глобальной ишемии мозга) происходит возрастание абсолютного количества Pgp, что коррелирует с уровнем ОС (Черных И.В. и др., 2019). Моделирование острой гипоксической гипобарической гипоксии у крыс Wistar приводило к повышению относительного количества Pgp (Якушева Е.Н. и др., 2016). Показано, что данные патологические процессы сопровождаются активацией перекисного окисления

липидов (ПОЛ) и истощением антиоксидантной защиты в ткани головного мозга. Таким образом, полученные результаты демонстрируют влияние редокс-статуса клетки на количество белка-транспортера Pgp, что согласуется с данными литературы.

Однако, в указанных работах не проводился анализ функционирования белка-транспортера в условиях моделирования ОС *in vitro* в сочетании с оценкой возможных механизмов регуляции Pgp. Так, не установлен механизм экспрессии Pgp и роль в данном процессе транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR. Именно поэтому целесообразно провести экспериментальное исследование, посвященное изучению роли АФК и продуктов ПОЛ в регуляции функционирования Pgp в условиях моделирования ОС *in vitro*.

Цель исследования

Оценить функционирование мембранного белка-транспортера Pgp и роль транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в его регуляции в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*.

Задачи исследования

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Воспроизвести модель экзогенного окислительного эустресса и дистресса *in vitro* с помощью пероксида водорода на клетках линии Caco-2.
2. Воспроизвести модель эндогенного окислительного эустресса и дистресса *in vitro* с помощью ингибитора синтеза глутатиона – DL-бутионинсульфоксимины на клетках линии Caco-2.
3. Оценить количество и активность Pgp в условиях экзогенного окислительного стресса *in vitro*.
4. Исследовать принадлежность DL-бутионинсульфоксимины к модуляторам активности Pgp.
5. Оценить количество и активность Pgp в условиях эндогенного окислительного стресса *in vitro*.
6. Изучить роль транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Pgp *in vitro* при экзогенном окислительном стрессе.

7. Изучить роль транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Pgp *in vitro* при эндогенном окислительном стрессе.

8. Исследовать принадлежность малонового диальдегида к субстратам и модуляторам активности Pgp.

9. Оценить роль Pgp в выживаемости клеток при развитии окислительного стресса.

Научная новизна

В ходе выполнения работы впервые показано, что:

1. При развитии эустресса, вызванного воздействием H₂O₂ и БСО, происходит повышение количества и активности Pgp, а при возникновении дистресса, напротив, количество и активность белка-транспортера снижаются.

2. БСО является прямым ингибитором Pgp с IC₅₀ (концентрация, ингибирующая активность Pgp на 50%) 17,21 \pm 2,46 мкМ.

3. В механизмах повышения количества Pgp при развитии экзогенного ОС, вызванного H₂O₂, доминирующая роль принадлежит сигнальному пути Nrf2-keap1; HIF1 α и CAR также принимают участие в данном процессе. PXR не оказывает существенного влияния на регуляцию белка-транспортера при экзогенном ОС.

4. При моделировании эндогенного ОС с помощью ингибитора синтеза глутатиона - БСО, все протестированные транскрипционные факторы и сигнальные пути (Nrf2-keap1, HIF1 α , PXR, CAR) вносят вклад в индукцию Pgp.

5. Малоновый диальдегид в концентрации 10 мкМ транспортируется Pgp.

6. Малоновый диальдегид, являясь сигнальной молекулой, повышает относительное количество и активность Pgp, действуя через транскрипционные факторы CAR и PXR.

7. Индукция Pgp при развитии ОС имеет защитную функцию и способствует увеличению выживаемости клеток.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе настоящего исследования установлено, что активность и количество Pgp в условиях экзогенного (воздействие пероксида водорода) и

эндогенного (ингибирование синтеза глутатиона DL-бутионинсульфоксимином) ОС возрастает при умеренном воздействии (эустресс), и снижается при выраженном и более продолжительном стрессе (дистресс). Однако, имеются различия в регуляции белка-транспортера. При развитии экзогенного ОС в повышении количества Pgp, вызванного инкубацией клеток линии Caco-2 с H₂O₂, вероятно, доминирующая роль принадлежит сигнальному пути Nrf2-Keap1, который участвует в регуляции белка-транспортера при длительности воздействия и 24, и 72 ч. Транскрипционный фактор HIF 1 α принимает участие в регуляции Pgp при воздействии H₂O₂ в течение 24 ч, а транскрипционный фактор CAR – при времени инкубации 72 ч. PXR, видимо, не вносит существенный вклад в регуляцию белка-транспортера при данной модели ОС.

При моделировании эндогенного ОС на клетках Caco-2 с помощью ингибитора синтеза глутатиона БСО установлено, что Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR участвуют в индукции Pgp. Регуляция активности Pgp в условиях ОС имеет сложный молекулярный механизм, основанный на сигнальной функции продуктов пероксидации, причем, наибольшее значение имеет МДА, а также прямом и опосредованном влиянии транскрипционных факторов, которые могут взаимодействовать между собой и быть взаимозаменяемыми и/или дублирующими в отношении Pgp. Активация транскрипционных факторов и Pgp имеет важное адаптивное значение в условиях ОС, направленное на сохранение жизнеспособности клеток и поддержание их функционирования. В представленном исследовании впервые была выявлена важная биологическая функция Pgp – транспорт МДА из клетки, опосредующая цитопротекторный эффект. В работе установлено, что БСО обладает бимодальным действием: с одной стороны, является ксенобиотиком, который напрямую ингибирует Pgp, с другой стороны, вызывает индукцию белка-транспортера опосредованно через изученные транскрипционные факторы.

Полученные результаты могут иметь практическое значение. Проникновение веществ через монослой клеток линии Caco-2 является классической модельной системой абсорбции веществ в тонком кишечнике

(Shah P. et al., 2006; Sun H. et al., 2008). Выявленное в нашем исследовании снижение активности Pgp и повышение проницаемости монослоя клеток для субстрата белка-транспортера фексофенадина при развитии ОС может свидетельствовать о повышении абсорбции веществ-субстратов Pgp в тонком кишечнике при развитии заболеваний, сопровождающихся ОС, что, в свою очередь, может приводить к увеличению их концентрации в плазме крови и сопровождаться развитием побочных эффектов фармакотерапии.

Ингибирующее действие БСО может использоваться для подавления активности Pgp в ткани опухоли, что приведет к снижению множественной лекарственной устойчивости, опосредованной гиперфункцией белка-транспортера и повышению эффективности химиотерапии.

Методология и методы исследования

Уровень внутриклеточных АФК определяли с помощью флуоресцентных зондов MitoTracker Red CM-H₂ XRos. Степень развития ОС оценивали фотометрическими методами по концентрации карбонильных производных белков, продуктов перекисного окисления липидов, белковых и небелковых SH-групп. Функциональную активность Pgp оценивали в экспериментах *in vitro* по проникновению маркерного субстрата Pgp – фексофенадина через билипидную мембрану клеток. Концентрацию фексофенадина определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием. Абсолютное количество Pgp, Nrf2 и глутатионпероксидазы оценивали методом гетерогенного иммуноферментного анализа. Относительное количество Pgp и транскрипционных факторов HIF1 α , CAR, PXR анализировали методом вестерн-блот. Определение концентрации МДА в транспортной среде выполняли методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием хроматографической системы «Dionex Ultimate 3000» и тандемного масс-селективного детектора TSQ Fortis. Для изучения механизмов влияния экзогенного и эндогенного ОС на количество Pgp в клетках линии Caco-2 были использованы селективные ингибиторы транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR, PXR. Полученные результаты обрабатывали статистическими методами.

Положения, выносимые на защиту

1. Пероксид водорода в концентрациях 5-50 мкМ и длительности инкубации 3, 24 и 72 ч на клетках линии Сасо-2 вызывает развитие компенсированного ОС (эустресса). Концентрация H_2O_2 100 мкМ при всех сроках экспозиции является токсичной для линии клеток Сасо-2 и приводит к возникновению некомпенсированного ОС (дистресса) и гибели клеток.

2. БСО в концентрациях 10; 50; 100 мкМ на клетках линии Сасо-2 при длительности экспозиции 24 и 72 ч вызывает развитие компенсированного ОС (эустресса) только с 24 ч экспозиции. Концентрация БСО 500 мкМ является токсичной для клеток линии Сасо-2 и приводит к возникновению некомпенсированного ОС (дистресса) и гибели клеток.

3. Развитие экзогенного окислительного эустресса сопровождается повышением, а дистресса – снижением количества и активности Pgp.

4. БСО в диапазоне концентраций 50-500 мкМ и сроке воздействия 30 мин является прямым ингибитором Pgp.

5. Развитие эндогенного окислительного эустресса вызывает повышение количества Pgp, без изменения его активности за исключением концентрации БСО 10 мкМ при инкубации 24 ч, а развитие дистресса сопровождается снижением активности и количества белка-транспортера.

6. В повышении количества Pgp при развитии экзогенного ОС доминирующая роль принадлежит сигнальному пути Nrf2-keap1. Транскрипционные факторы HIF1 α и CAR также принимают участие в данном процессе. PXR не вносит существенного вклада в регуляцию белка-транспортера.

7. При моделировании эндогенного ОС все протестированные транскрипционные факторы и сигнальные пути (Nrf2-keap1, HIF1 α , PXR, CAR) вносят свой вклад в индукцию Pgp.

8. МДА в концентрации 10 мкМ может транспортироваться Pgp в клетках линии Сасо-2. МДА в концентрациях 10 и 50 мкМ и длительности экспозиции 24

ч повышает относительное количество и активность Pgp, действуя через транскрипционные факторы CAR и PXR.

9. Индукция Pgp при развитии ОС имеет защитную функцию, опосредуя увеличение жизнеспособности клеток.

Степень достоверности

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных на иммортализованной клеточной линии Сасо-2 (закупленной в ФГБУН ИНЦ РАН) и на современном аналитическом оборудовании с применением адекватных и информативных биохимических методик, и реактивов, обладающих необходимыми паспортами качества. Компьютерная и математическая обработка полученных данных выполнена с использованием лицензионного программного обеспечения и адекватных статистических критериев. Общие подходы к оценке активности Pgp соответствуют международным рекомендациям (FDA и ЕМА) и рекомендациям Международного консорциума по изучению транспортеров (International Transporter Consortium).

Апробация результатов

Основные положения диссертации доложены, обсуждены и опубликованы в материалах Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине» (Санкт-Петербург, 2020); Международной конференции NT+M&Ec`2020 «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Гурзуф, 2020, 2021, 2022); VI, VII и VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2020, 2021, 2022); ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, посвящённой 70-летию основания ВУЗа на Рязанской земле (Рязань, 2020, 2021); 24-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2020); Международной

конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2021); 45-го конгресса Европейских Биохимических Обществ (FEBS) «Molecules of Life: towards new horizons» (Ljubljana, 2021); VII съезда биохимиков России, X Российского симпозиума «Белки и пептиды» (Сочи, Дагомыс, 2021); XXVII и XXVIII Всероссийских конференциях молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины - 2021» (Санкт-Петербург, 2021, 2022); VI Всероссийской конференции по молекулярной онкологии «Успехи молекулярной онкологии» (Москва, 2021); XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2022); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2022); 25-й Пушкинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2022); 76-й международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Достижения фундаментальной, прикладной медицины и фармации» (Самарканд, 2022); Всероссийского конгресса молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, 2022); VI Сеченовского международного биомедицинского саммита (SIBS-2022) (Москва, 2022); Международной научно-практической конференции «Педиатрия и фармация XXI века» (Самарканд, 2022); V Национального конгресса по регенеративной медицине (Москва, 2022).

Апробация работы состоялась 19 декабря 2022 года на заседании центральной научно-исследовательской лаборатории и кафедр фармакологии, биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО, нормальной физиологии с курсом психофизиологии, фармацевтической химии, фармацевтической технологии, биологии, онкологии, сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики, управления и экономики фармации, фармакогнозии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России,

Московского НИИ психиатрии – филиала ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России.

Внедрение результатов исследования в практику

Основные положения работы используются в учебном процессе при обучении студентов на кафедрах биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО и фармакологии, а также при выполнении научно-исследовательских работ на базе центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно подготовлен аналитический обзор литературы по изучаемой проблеме, составлена программа исследования, проведены эксперименты *in vitro*, биохимические исследования, обработка и интерпретация данных, подготовка публикаций по диссертационной работе. В целом, личный вклад автора в исследование превышает 90%.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 48 научных трудов, из них 16 статей – в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 13 – в изданиях, входящих в международную цитатноаналитическую базу данных Scopus, получено 3 патента на изобретение, внедрено 4 рационализаторских предложения.

Конфликт интересов

Часть работы выполнена при поддержке гранта Президента РФ (МК-1856.2020.7), часть работы – за счет бюджета ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Иных финансовых и других конфликтных интересов, получения вознаграждения ни в какой форме от фирм-производителей лабораторного и диагностического оборудования нет.

Структура и объем диссертации

Объем работы составляет 249 страниц печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения полученных результатов, выводов, практических

рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка условных сокращений и обозначений, списка использованной литературы.

Диссертация иллюстрирована 75 рисунками, 30 таблицами. Список литературы содержит 446 источников, из которых 44 – отечественных и 402 – зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на линии клеток Сасо-2 (клетки аденокарциномы ободочной кишки человека, *англ.: cancer coli, colon cancer*), полученной из ФГБУН ИНЦ РАН (Санкт-Петербург). Клетки линии Сасо-2 культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) («Sigma-Aldrich», Германия), содержащей L-глутамин (4 мМ) («Sigma-Aldrich», Германия), 15% эмбриональной бычьей сыворотки («Sigma-Aldrich», Германия), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина («Sigma-Aldrich», Германия) соответственно. После достижения 70-90% конфлюентности клетки снимали с фласка добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия) и высевали в лабораторную посуду. 96-луночные планшеты использовали для определения жизнеспособности клеток, 24-луночные планшеты – для анализа уровня АФК, 6-луночные планшеты – для оценки выраженности ОС, количества Pgp, Nrf2, HIF1 α , CAR, PXR, трансвеллы, состоящие из двух камер базолатеральной - *b* и апикальной - *a* (дно камеры представлено полупроницаемой мембраной, на которую высевали клетки с плотностью 10⁵/см²) – для определения активности Pgp. Клетки культивировали в течение 21 сут, поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, гиперэкспрессирующие Pgp (Hilgers A.R. et al., 1990). На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения (n=3), при экспозиции 72 ч смену питательной среды проводили каждые 24 ч.

Уровень внутриклеточных АФК определяли с помощью флюоресцентных зондов MitoTracker Red CM-H₂ XRos. Степень развития ОС анализировали

фотометрическими методами по концентрации карбонильных производных белков, продуктов перекисного окисления липидов, белковых и небелковых SH-групп на планшетном фотометре Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США).

Целостность клеточного монослоя в трансвеллах оценивали по величине трансэпителиального сопротивления (TEER), которое определяли с помощью вольтметра Millicell ERS-2 («Millipore», США). При его значении выше 500 мОм×см² к клеткам добавляли тестируемые вещества и проводили транспортные эксперименты. Функциональную активность Pgp оценивали по проникновению маркерного субстрата Pgp – фексофенадина («Sigma-Aldrich», Германия) через билипидную мембрану клеток. Фексофенадин добавляли в апикальную камеру (*b-a* транспорт, обусловленный пассивной диффузией и функционированием Pgp) и базолатеральную (*a-b* транспорт, обусловленный пассивной диффузией против функционирования Pgp) в конечной концентрации 150 мкМ.

Транспорт фексофенадина рассчитывали по формуле (Elsby R. et al, 2008):

$$P_{app} = dQ/dt \times 1/A \times C_0,$$

где P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости (см/сек), dQ/dt – изменение концентрации субстрата в камере-реципиенте за время инкубации (мкМ/сек), A – площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе (см²), C_0 – начальная концентрация субстрата в камере-доноре (мкМ).

Концентрацию фексофенадина определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием (хроматограф «Стайер», Россия). Абсолютное количество Pgp, Nrf2 и глутатионпероксидазы оценивали методом гетерогенного иммуноферментного анализа (ГИФА) (Stat Fax 2100, «Awareness Technology», США). Относительное количество Pgp и транскрипционных факторов HIF1 α , CAR, PXR, белка домашнего хозяйства GAPDH анализировали методом вестерн-блот. Определение концентрации МДА в транспортной среде выполняли методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием хроматографической системы «Dionex Ultimate 3000» и tandemного масс-селективного детектора TSQ Fortis («ThermoFisher», США).

Экспериментальные группы и серии

Было сформировано 7 экспериментальных групп:

Первая группа – изучение влияния экзогенного ОС на активность и количество Pgp.

Вторая группа – исследование влияния эндогенного ОС на активность и количество Pgp.

Третья группа – оценка принадлежности DL-бутионинсульфоксимиона (БСО, 2-амино-4-(бутилсульфонимидоил)бутановая кислота) к модуляторам активности Pgp (Hussein A.S. et al., 1996).

Четвертая группа – изучение роли транскрипционных факторов Nrf2, NIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Pgp при экзогенном ОС.

Пятая группа – исследование роли транскрипционных факторов Nrf2, NIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Pgp при эндогенном ОС.

Шестая группа – оценка принадлежности МДА к субстратам и модуляторам активности Pgp.

Седьмая группа – оценка роли Pgp при развитии ОС.

Первая группа – изучение влияния экзогенного окислительного стресса на активность и количество Р-гликопротеина

Экзогенный ОС моделировали добавлением в питательную среду H₂O₂ в концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5; 10, 50 и 100 мкМ. Длительность экспозиции составила 3 ч, 24 ч и 72 ч. Серии экспериментов данной группы:

Первая серия – контроль – интактные клетки, которые инкубировали в питательной среде с добавлением в эквивалентном объеме воды для инъекций (растворитель H₂O₂).

Вторая серия – моделирование ОС – клетки, которые инкубировали в питательной среде с добавлением H₂O₂.

Вторая группа – исследование влияния эндогенного окислительного стресса на активность и количество Р-гликопротеина

Эндогенный ОС воспроизводили с помощью ингибитора синтеза глутатиона – БСО (ингибитор γ -глутамилцистеинсинтетазы) в конечных

концентрациях в питательной среде 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ. Длительность экспозиции составила 3 ч, 24 ч и 72 ч. Серии экспериментов данной группы:

Первая серия – контроль – интактные клетки, которые инкубировали в питательной среде с добавлением в эквивалентном объеме воды для инъекций (растворитель БСО).

Вторая серия – моделирование ОС – клетки, которые инкубировали в питательной среде с добавлением БСО.

Третья группа – оценка принадлежности DL-бутионинсульфоксимины к модуляторам активности Р-гликопротеина

Данная группа экспериментов выполнена на трансвеллах и включала следующие серии экспериментов:

Первая серия – контроль – интактные клетки, на которых оценивали транспорт субстрата Pgp – фексофенадина после предварительной преинкубации в течение 30 мин с водой для инъекций (растворитель БСО).

Вторая серия – клетки, на которых оценивали транспорт субстрата Pgp – фексофенадина после предварительной преинкубации в течение 30 мин с БСО в концентрациях 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ.

Третья серия – клетки, на которых оценивали транспорт субстрата Pgp – фексофенадина после предварительной преинкубации в течение 30 мин с хинидином (классическим ингибитором белка-транспортера) в концентрациях 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ.

Четвертая серия – клетки, на которых оценивали транспорт субстрата Pgp – фексофенадина после предварительной преинкубации в течение 30 мин с верапамилом (классическим ингибитором белка-транспортера) в концентрациях 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ.

Четвертая группа – изучение роли транскрипционных факторов Nrf2, Nrf1 α , CAR и PXR в изменении количества Р-гликопротеина при экзогенном окислительном стрессе

Данная группа включала 7 серий экспериментов:

Первая серия – контроль – клетки инкубировали в питательной среде с

добавлением в эквивалентном объеме воды для инъекций (растворитель H_2O_2).

Вторая серия – индукция Pgr в условиях моделирования экзогенного ОС.

Экзогенный ОС моделировали добавлением в питательную среду H_2O_2 в концентрациях 0,1; 0,5; 1 мкМ сроком инкубации 24 ч и 10 мкМ сроком инкубации 72 ч. Выбор концентраций прооксиданта и длительности экспозиции был обусловлен результатами, полученными в первой группе экспериментов (в которой было показано повышение количества Pgr под действием H_2O_2).

Третья серия – ингибирование ОС – одновременно с добавлением прооксиданта в питательную среду вносили антиоксидант глутатион в концентрации 1 мМ (Rao R.K. et al., 2000).

Четвертая серия – оценка роли Nrf2-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления H_2O_2 вносили ингибитор Nrf2 N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин (AEM1, «Sigma-Aldrich», Германия) в концентрации 5 мкМ (Bollong M.J. et al., 2015).

Пятая серия – оценка роли HIF1 α -опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления H_2O_2 вносили ингибитор HIF1 α N,N'-(дисульфандиилбис(этан-2,1-диил))бис(2,5-дихлорбензолсульфонамид (KC7F2, «Sigma-Aldrich», Германия) в концентрации 7,5 мкМ (Ke Q. et al., 2006).

Шестая серия – оценка роли CAR-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления H_2O_2 вносили ингибитор CAR 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-добензо[b,f]азепин-3-ил]этиловый эфир карбаминовой кислоты (CINPA 1, «Tocris», Великобритания) в концентрации 10 мкМ (Cherian M.T. et al., 2015).

Седьмая серия – оценка роли PXR-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления H_2O_2 вносили ингибитор PXR – кетоконазол в концентрации 10 мкМ («Sigma Aldrich», Германия) (Kota V.P. et al., 2009).

Пятая группа – изучение роли транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Р-гликопротеина при эндогенном окислительном стрессе

Данная группа включала 7 серий экспериментов:

Первая серия – контроль – клетки инкубировали в питательной среде с добавлением в эквивалентном объеме воды для инъекций (растворитель БСО).

Вторая серия – индукция Pgr в условиях моделирования эндогенного ОС. Эндогенный ОС воспроизводили с помощью ингибитора синтеза глутатиона – БСО в конечных концентрациях в питательной среде 10, 50 и 100 мкМ. Срок инкубации 24 ч. Выбор концентраций прооксиданта и длительности экспозиции был обусловлен результатами, полученными во второй группе экспериментов, в которой было показано повышение количества Pgr под действием БСО.

Третья серия – ингибирование ОС – одновременно с добавлением прооксиданта в питательную среду вносили антиоксидант глутатион в концентрации 1 мМ (Rao R.K. et al., 2000).

Четвертая серия – оценка роли Nrf2-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления БСО вносили ингибитор Nrf2 (AEM1, «Sigma Aldrich», Германия) в концентрации 5 мкМ (Bollong M.J. et al., 2015).

Пятая серия – оценка роли HIF1 α -опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления БСО вносили ингибитор HIF1 α (KC7F2, «Sigma-Aldrich», Германия) в концентрации 7,5 мкМ (Ke Q. et al., 2006).

Шестая серия – оценка роли CAR-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления БСО вносили ингибитор CAR (CINPA 1, «Tocris», Великобритания) в концентрации 10 мкМ (Cherian M.T. et al., 2015).

Седьмая серия – оценка роли PXR-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления

БСО вносили ингибитор PXR - кетоконазол в концентрации 10 мкМ («Sigma Aldrich», Германия) (Kota B.P. et al., 2010).

Шестая группа – оценка принадлежности малонового диальдегида к субстратам и модуляторам активности P-гликопротеина

Данная группа включала 6 серий экспериментов:

Первая серия – оценка транспорта МДА через монослой клеток линии Caco-2 – клетки культивировали в трансвеллах и анализировали транспорт МДА в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ через монослой клеток линии Caco-2.

Вторая серия – оценка влияния верапамила – ингибитора Pgp на транспорт МДА через монослой клеток линии Caco-2 – клетки культивировали в трансвеллах и оценивали влияние верапамила в концентрации 200 мкМ на транспорт МДА в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ через монослой клеток линии Caco-2 (Hunt T.L. et al., 2021).

Третья серия – оценка влияния МДА на активность Pgp – клетки культивировали в трансвеллах и оценивали влияние МДА в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ на транспорт субстрата Pgp фексофенадина в концентрации 150 мкМ через монослой клеток линии Caco-2 (Petri N. et al., 2004).

Четвертая серия – оценка влияния МДА на количество Pgp – клетки инкубировали в питательной среде с добавлением МДА в концентрациях 10, 50, 100, 150 мкМ в течение 24 ч и оценивали количество Pgp.

Пятая серия – оценка роли CAR-опосредованного механизма в индукции Pgp при воздействии МДА. К клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления МДА вносили ингибитор CAR (CINPA 1, «Tocris», Великобритания) в концентрации 10 мкМ и инкубировали 24 ч (Cherian M.T. et al., 2015).

Шестая серия – оценка роли PXR-опосредованного механизма в индукции Pgp при воздействии МДА. К клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления МДА вносили ингибитор PXR кетоконазол в концентрации 10 мкМ («Sigma-Aldrich», Германия) и инкубировали 24 ч (Kota B.P. et al., 2010).

Седьмая группа – оценка роли Р-гликопротеина при развитии окислительного стресса

Данная группа включала следующие серии экспериментов:

Первая серия – контроль – клетки инкубировали в питательной среде с добавлением в эквивалентном объеме воды для инъекций (растворитель H₂O₂ и БСО).

Вторая серия – моделирование ОС – клетки культивировали в питательной среде в течение 24 ч с добавлением H₂O₂ в концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5; 10, 50 и 100 мкМ или БСО в концентрациях 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ и оценивали их выживаемость по результатам МТТ-теста.

Третья серия – влияние ингибирования Pgp на выживаемость клеток под действием H₂O₂/БСО. За 30 мин до добавления H₂O₂/БСО в питательную среду вносили ингибитор Pgp – верапамил в концентрации 200 мкМ.

Четвертая серия – влияние индукции Pgp на выживаемость клеток под действием H₂O₂/БСО. За 24 ч до добавления H₂O₂/БСО в питательную среду вносили индуктор Pgp – рифампицин в концентрации 10 мкМ (Haslam I.S. et al., 2008; Zárýbnický T. et al., 2019).

Статистический анализ данных проводили с помощью программ StatSoft Statistica 13,0, Microsoft Excel, GraphPad Prism8. Статистическую значимость различий оценивали дисперсионным анализом (ANOVA), парные сравнения с контролем выполняли с помощью теста Даннетта. При анализе двух групп оценку проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Результаты в таблицах и на графиках приведены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения (M±SD). Статистически значимыми считали различия при p<0,05. Условные обозначения представлены в виде: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001; **** – p<0,0001 статистически значимые отличия от показателей контроля. Для анализа взаимосвязи признаков использовали коэффициент корреляции Пирсона (r). Расчет значений IC₅₀ (концентрация полумаксимального ингибирования) Pgp выполняли с помощью встроенного модуля программы GraphPad Prism8.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование и динамика развития экзогенного окислительного стресса

Экспозиция клеток линии Сасо-2 с H_2O_2 в диапазоне концентраций 0,1-100 мкМ в течение 3 ч приводила к повышению интенсивности флюоресценции в лизате клеток после окраски Mito tracker Red CM H_2XROS , что свидетельствует о генерации АФК. Увеличение срока воздействия до 24 ч сопровождалось снижением флюоресценции в концентрациях прооксиданта 50 и 100 мкМ, при длительности экспозиции 72 ч интенсивность флюоресценции снижалась при концентрациях H_2O_2 10, 50 и 100 мкМ относительно соответствующих контрольных значений.

Инкубация клеток линии Сасо-2 с H_2O_2 продолжительностью 3 ч в концентрации 100 мкМ, 24 и 72 ч в концентрациях 50 мкМ и 100 мкМ приводила к увеличению уровня продуктов ПОЛ в лизате клеток по сравнению с контролем (Таблица 1). Повышение содержания карбонильных производных белков отмечалось при воздействии H_2O_2 в концентрациях 50 и 100 мкМ при длительности воздействия 3 ч, при инкубации 24 ч – в концентрациях H_2O_2 5, 10, 50 и 100 мкМ, 72 ч – в концентрациях H_2O_2 50 и 100 мкМ (Таблица 1).

Таблица 1 – Изменение концентрации продуктов перекисного окисления липидов (МДА и 4-гидроксиолефинов, мкмоль/мг белка) и карбонильных производных белков (нмоль/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода (H_2O_2) в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Конц. H_2O_2 , мкМ	Продукты перекисного окисления липидов			Карбонильные производные белков		
	Время эксперимента			Время эксперимента		
	3 часа	24 часа	72 часа	3 часа	24 часа	72 часа
Конт-роль	2,25±0,24	2,40±0,12	2,18±0,13	0,27±0,03	0,27±0,084	0,30±0,05
0,1	2,22±0,41	2,62±0,19	1,96±0,16	0,33±0,18	0,24±0,07	0,29±0,02
0,5	1,78±0,23	2,08±0,20	2,06±0,34	0,34±0,03	0,36±0,06	0,28±0,05
1	1,91±0,05	2,36±0,21	2,27±0,19	0,28±0,09	0,32±0,03	0,25±0,01
5	2,16±0,36	2,49±0,33	2,42±0,20	0,32±0,03	0,53±0,06**	0,27±0,01
10	2,12±0,07	2,66±0,31	2,66±0,26	0,38±0,05	0,64±0,06**	0,30±0,02
50	2,29±0,22	3,41±0,30**	6,44±0,58***	0,51±0,02***	0,74±0,09***	0,41±0,05***
100	3,05±0,35*	3,77±0,20**	9,24±0,59***	0,64±0,04***	0,67±0,02***	0,63±0,04***

Уровень небелковых SH-групп при инкубации с H₂O₂ в течение 3 ч не отличался от показателей контрольной группы. При воздействии H₂O₂ в течение 24 ч уровень небелковых SH-групп возрастал в концентрациях H₂O₂ 0,1; 0,5; 1 мкМ, а в концентрациях 5, 10, 50 и 100 мкМ снижался по сравнению с контролем. После 72 ч инкубации с H₂O₂ в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ содержание небелковых SH-групп снижалось (Таблица 2). При сроке воздействия H₂O₂ 3 ч изменений в уровне белковых SH-групп зафиксировано не было, при инкубации 24 ч их уровень был статистически значимо ниже, чем в контрольной группе в диапазоне концентраций 0,1-100 мкМ. При воздействии H₂O₂ в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ в течение 72 ч наблюдалось снижение уровня белковых SH-групп по сравнению с показателями контроля (Таблица 2).

Таблица 2 – Изменение концентрации небелковых и белковых SH-групп (мкмоль/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода (H₂O₂) в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч, (M±SD, n=3).

Конц. H ₂ O ₂ , мкМ	Небелковые SH-группы			Белковые SH-группы		
	Время эксперимента			Время эксперимента		
	3 часа	24 часа	72 часа	3 часа	24 часа	72 часа
Контроль	0,11±0,01	0,09±0,01	0,11±0,01	0,21±0,01	0,19±0,01	0,21±0,03
0,1	0,13±0,03	0,15±0,02**	0,13±0,03	0,19±0,01	0,10±0,01***	0,22±0,09
0,5	0,13±0,05	0,17±0,05**	0,13±0,05	0,18±0,03	0,09±0,02***	0,21±0,07
1	0,15±0,08	0,15±0,03**	0,15±0,08	0,18±0,04	0,07±0,02***	0,17±0,02
5	0,10±0,03	0,05±0,004*	0,10±0,03	0,18±0,01	0,09±0,02***	0,18±0,02
10	0,16±0,03	0,03±0,002**	0,22±0,01*	0,16±0,03	0,11±0,03***	0,10±0,01*
50	0,16±0,01	0,02±0,002**	0,03±0,001*	0,16±0,02	0,14±0,02**	0,13±0,01*
100	0,16±0,03	0,02±0,01**	0,02±0,003*	0,16±0,02	0,12±0,01***	0,13±0,01*

Действие H₂O₂ во всех тестируемых концентрациях в течение 3 ч достоверно не изменяло количество транскрипционного фактора Nrf2. Увеличение срока воздействия прооксиданта способствовало повышению уровня Nrf2 по сравнению с контролем при концентрациях H₂O₂ 0,1; 0,5; 1 мкМ (инкубация 24 ч), 10 и 50 мкМ (инкубация 72 ч), а при концентрации 100 мкМ – количество Nrf2 снижалось (Таблица 3).

Выявлено, что при инкубации клеток Сасо-2 с H₂O₂ в концентрациях 0,1-100 мкМ во все сроки эксперимента количество Nrf2 было обратно пропорционально концентрации белковых SH-групп: r=-0,33, p=0,0045.

При воздействии H_2O_2 в концентрации 100 мкМ в течение 3 ч содержание антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы снижалось по сравнению с контролем. Увеличение длительности экспозиции приводило к повышению количества глутатионпероксидазы при концентрациях H_2O_2 0,1; 0,5 и 1 мкМ (инкубация 24 ч) и 10 мкМ (инкубация 72 ч) (Таблица 3).

Таблица 3 – Изменение количества фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) и глутатионпероксидазы (нг/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода (H_2O_2) в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Конц. H_2O_2 , мкМ	Nrf2			Глутатионпероксидаза		
	Время эксперимента			Время эксперимента		
	3 часа	24 часа	72 часа	3 часа	24 часа	72 часа
Конт- роль	0,37±0,04	0,34±0,04	0,40±0,10	30,14±1,47	30,82±1,91	30,12±1,57
0,1	0,39±0,07	1,68±0,59	0,39±0,10	29,73±1,63	36,13±0,22**	32,21±1,85
0,5	0,43±0,19	1,41±0,31	0,42±0,24	31,32±1,94	40,46±6,62**	28,96±3,34
1	0,48±0,12	1,07±0,11	0,40±0,17	28,71±2,16	36,17±1,92**	29,13±1,63
5	0,43±0,09	0,55±0,06	0,56±0,28	30,85±1,70	31,59±0,63	36,78±3,27
10	0,32±0,17	0,43±0,23**	1,61±0,75*	30,98±1,88	31,23±0,86	53,84±6,23***
50	0,50±0,18	0,47±0,10**	1,31±0,43*	31,67±1,92	31,34±0,91	34,13±3,35
100	0,45±0,15	0,43±0,17*	0,45±0,11*	21,35±1,11**	31,18±1,22	28,52±2,34

Моделирование экзогенного ОС пероксидом водорода в концентрациях 50 и 100 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч приводило к статистически значимому снижению жизнеспособности клеток относительно контроля, что сопровождалось нарушением целостности клеточного монослоя, которую контролировали по величине трансэпителиального сопротивления TEER.

Таким образом, H_2O_2 в концентрациях 5, 10, 50 мкМ при длительности воздействия 24 ч вызывает развитие компенсированного ОС (эустресса), что проявляется повышением уровня продуктов окисления липидов и белков, количества транскрипционного фактора Nrf2 и антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы, снижением содержания небелковых и белковых SH-групп. Активация антиоксидантной системы защиты приводит к снижению выраженности ОС при увеличении длительности экспозиции до 72 ч. Концентрация H_2O_2 100 мкМ является токсичной для линии клеток Сасо-2 и вызывает развитие некомпенсированного ОС и гибель клеток (дистресс).

Моделирование и динамика развития эндогенного окислительного стресса

Эндогенный ОС моделировали с помощью ингибитора синтеза глутатиона – DL-бутионинсульфоксими́на (БСО, ингибитор γ -глутамилцистеинсинтетазы) в конечных концентрациях в питательной среде 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ. Воздействие БСО в течение 3 ч не приводило к изменению уровня АФК. При воздействии БСО в концентрациях 10, 50, 100 мкМ в течение 24 ч и 50, 100 мкМ в течение 72 ч возрастала интенсивность флюоресценции клеток Сасо-2 после окраски Mitotracker Red CM-H2 XROs, что подтверждает генерацию АФК.

Инкубация клеток линии Сасо-2 в течение 3 и 72 ч с БСО в концентрации 500 мкМ вызывала повышение уровня МДА и 4-гидроксиолефинов, а в течение 24 ч – не оказывала статистически значимое изменение данных показателей. Экспозиция клеток линии Сасо-2 с БСО в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ в течение 24 и 72 ч приводила к увеличению уровня карбонильных производных белков относительно показателей контроля, при сроке инкубации с БСО 3 ч – изменений не зафиксировано (Таблица 4).

Таблица 4 – Изменение концентрации продуктов перекисного окисления липидов (МДА и 4-гидроксиолефинов, мкмоль/мг белка) и карбонильных производных белков (нмоль/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса DL-бутионинсульфоксими́ном (БСО) в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Конц. БСО, мкМ	Продукты перекисного окисления липидов			Карбонильные производные белков		
	Время эксперимента			Время эксперимента		
	3 часа	24 часа	72 часа	3 часа	24 часа	72 часа
Конт-роль	2,46±0,01	2,49±0,03	2,42±0,08	0,29±0,02	0,30±0,05	0,29±0,02
1	2,43±0,04	2,45±0,04	2,52±0,01	0,26±0,01	0,31±0,03	0,33±0,03
5	2,48±0,05	2,46±0,04	2,47±0,03	0,27±0,01	0,27±0,09	0,36±0,04
10	2,46±0,02	2,42±0,06	2,54±0,09	0,28±0,01	0,35±0,07**	0,41±0,01**
50	2,53±0,01	2,49±0,06	2,63±0,17	0,29±0,02	0,36±0,03**	0,41±0,06**
100	2,56±0,11	2,43±0,01	2,62±0,05	0,31±0,01	0,37±0,05**	0,49±0,01***
500	2,63±0,05*	2,53±0,02	2,75±0,05*	0,34±0,04	0,75±0,02***	0,50±0,01***

Инкубация с БСО в течение 3 ч не влияла на уровень белковых и небелковых SH-групп в диапазоне концентраций 1-500 мкМ, а при воздействии 24 и 72 ч в концентрациях БСО 10-500 мкМ их уровень снижался (Таблица 5).

Таблица 5 – Изменение концентрации небелковых и белковых SH-групп (мкмоль/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса DL-бутионинсульфоксимином (БСО) в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч, (M±SD, n=3).

Конц. БСО, мкМ	Небелковые SH-группы			Белковые SH-группы		
	Время эксперимента			Время эксперимента		
	3 часа	24 часа	72 часа	3 часа	24 часа	72 часа
Контроль	0,12±0,02	0,12±0,02	0,12±0,02	0,21±0,02	0,21±0,02	0,21±0,02
1	0,13±0,01	0,12±0,02	0,13±0,01	0,21±0,02	0,17±0,03	0,21±0,03
5	0,12±0,02	0,12±0,02	0,12±0,02	0,19±0,06	0,19±0,03	0,19±0,06
10	0,11±0,01	0,07±0,01**	0,08±0,01***	0,17±0,03	0,16±0,01*	0,17±0,01
50	0,11±0,01	0,05±0,01***	0,06±0,01***	0,17±0,01	0,14±0,01**	0,13±0,03*
100	0,12±0,03	0,04±0,01***	0,05±0,01***	0,18±0,03	0,10±0,01***	0,07±0,01**
500	0,12±0,02	0,05±0,01***	0,05±0,01***	0,16±0,02	0,12±0,02**	0,09±0,01**

При длительности воздействия 3 ч БСО во всех тестируемых концентрациях достоверно не влиял на уровень Nrf2 и глутатионпероксидазы. Инкубация клеток линии Сасо-2 в течение 24 и 72 ч с БСО в концентрациях 10, 50, 100 мкМ и 50, 100 мкМ соответственно приводила к увеличению уровня Nrf2 (Таблица 5), который был обратно пропорционален содержанию белковых SH-групп: $r=-0,56$, $p=0,00001$. При действии БСО в течение 24 ч в концентрациях 1-100 мкМ и в течение 72 ч в концентрациях 10 и 50 мкМ количество глутатионпероксидазы увеличивалось, а при концентрации 500 мкМ – снижалось (Таблица 6).

Таблица 6 – Изменение количества фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) и глутатионпероксидазы (нг/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса DL-бутионинсульфоксимином (БСО) в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч (M±SD, n=3)

Конц. БСО, мкМ	Nrf2			Глутатионпероксидаза		
	Время эксперимента			Время эксперимента		
	3 часа	24 часа	72 часа	3 часа	24 часа	72 часа
Конт-роль	0,40±0,11	0,45±0,02	0,46±0,11	33,5±2,9	33,5±2,9	33,4±2,9
1	0,43±0,16	0,43±0,09	0,64±0,17	34,2±3,1	39,5±1,6**	30,2±1,4
5	0,45±0,14	0,44±0,07	0,69±0,04	32,3±2,4	45,3±1,6***	37,6±3,1
10	0,50±0,23	1,16±0,09	0,64±0,19	31,9±3,1	51,1±3,2***	40,3±2,8**
50	0,61±0,21	1,11±0,02**	1,36±0,07	32,5±2,7	57,3±1,9***	38,8±3,8**
100	0,58±0,14	1,19±0,23***	1,43±0,03***	32,7±2,1	55,1±1,1***	34,8±4,4
500	0,49±0,18	0,55±0,11**	0,83±0,23***	29,7±3,6	30,1±0,4	28,2±1,3*

По результатам МТТ-теста установлено, что для клеток линии Сасо-2 БСО токсичен в концентрации 500 мкМ и сроке воздействия 24 и 72 ч.

Таким образом, БСО в концентрациях 10, 50, 100 мкМ на клетках линии Сасо-2 при длительности экспозиции 24 и 72 ч приводит к развитию компенсированного ОС (эустресса) начиная с 24 ч экспозиции, что проявляется повышением концентрации продуктов ПОЛ и белков, уровней транскрипционного фактора Nrf2 и антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы. Активация защитных факторов не приводит к снижению выраженности ОС, что, скорее всего, связано с истощением эндогенного пула глутатиона. Концентрация БСО 500 мкМ вызывает развитие некомпенсированного ОС и гибель клеток (дистресс).

Влияние экзогенного окислительного стресса на количество и активность Р-гликопротеина

Количество Pgp снижалось по сравнению с контролем при инкубации клеток Сасо-2 с H₂O₂ в концентрации 100 мкМ в течение 3 ч. При воздействии H₂O₂ в течение 24 ч в концентрациях 0,1-1 мкМ количество Pgp увеличивалось относительно контроля, а при 100 мкМ – снижалось. При сроке инкубации 72 ч и концентрации H₂O₂ 10 мкМ уровень Pgp статистически значимо возрастал, а при концентрациях 50 и 100 мкМ снижался (Таблица 7).

Таблица 7 – Изменение количества Р-гликопротеина (нг/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции экзогенного окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–100 мкМ в течение 24 ч (M±SD, n=3)

Время инкубации	Конт-роль	Концентрация пероксида водорода, мкМ						
		0,1	0,5	1	5	10	50	100
3 ч	125±15	114±10	128±10	126±24	124±54	112±34	114±39	56±9**
24 ч	110±15	197±27**	184±20*	159±9*	125±21	105±29	104±38	38±16*
72 ч	111±14	103±38	108±18	121±19	128±12	187±24**	38±11**	80±26**

Активность Pgp оценивали по транспорту его субстрата фексофенадина через монослой клеток линии Сасо-2. Перед выполнением транспортных экспериментов анализировали плотность межклеточных контактов до добавления H₂O₂ и после окончания экспозиции по величине трансэпителиального сопротивления (TEER) монослоя клеток. Воздействие H₂O₂ в течение 3 ч в концентрации 100 мкМ вызывало снижение TEER. При инкубации в течение 24 и 72 ч H₂O₂ в концентрациях 5-100 мкМ вызывал

снижение TEER относительно исходного уровня, зафиксированного до начала экспозиции.

При изучении активности Pgp были получены следующие результаты. При сроке воздействия 3 ч в концентрациях 10 и 50 мкМ H_2O_2 вызывал снижение Rapp $b-a$ и повышение Rapp $a-b$, значения Rapp $b-a$ и Rapp $a-b$ фексофенадина выравнивались. При увеличении концентрации прооксиданта до 100 мкМ происходило повышение Rapp $b-a$ и Rapp $a-b$ (Таблица 8). Данные показатели между собой также не различались. При концентрациях H_2O_2 10, 50 и 100 мкМ отношение Rapp $b-a$ /Rapp $a-b$ статистически значимо снижалось по сравнению с контролем. Выявленные изменения свидетельствуют об усилении транспорта фексофенадина через монослой клеток линии Caco-2 как в эффлюксном направлении, обусловленном функционированием Pgp, так и в противоположном, то есть, проницаемость клеточного монослоя повышается, что согласуется с полученными данными плотности клеточных контактов.

При сроке воздействия 24 ч H_2O_2 в концентрации 10 мкМ повышал Rapp $a-b$ фексофенадина по сравнению со значениями контроля и не влиял на Rapp $b-a$. Полученные результаты свидетельствуют о снижении активности Pgp и повышении проницаемости клеточного монослоя. Увеличение концентрации H_2O_2 до 50 и 100 мкМ вызывало повышение как Rapp $b-a$, так и Rapp $a-b$. Отношение Rapp $b-a$ /Rapp $a-b$ при воздействии H_2O_2 в концентрациях 0,1-5 мкМ не изменялось. При концентрациях прооксиданта 10, 50 и 100 мкМ отношение Rapp $b-a$ /Rapp $a-b$ статистически значимо снижалось по сравнению с контролем. Уменьшение отношения Rapp $b-a/a-b$ по сравнению с контролем отражает нарушение асимметрии транспорта маркерного субстрата Pgp – фексофенадина и является следствием увеличения проницаемости клеточного монослоя в обоих направлениях, что согласуется с показателями плотности межклеточных контактов (Таблица 8). При экспозиции в течение 72 ч в концентрации 10 мкМ H_2O_2 вызывал повышение Rapp $b-a$ фексофенадина по сравнению с контролем и не влиял на Rapp $a-b$, что характеризует увеличение активности Pgp. При повышении концентрации H_2O_2 до 50 и 100 мкМ зафиксировано увеличение Rapp

b-a и *Rpp a-b* фексофенадина по сравнению с контролем, показатели *Rpp b-a* и *Rpp a-b* выравнивались, отношение *Rpp b-a* к *Rpp a-b* снижалось (Таблица 8).

Таблица 8 – Влияние пероксида водорода (H₂O₂) в диапазоне концентраций 0,1–100 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч на транспорт субстрата Р-гликопротеина (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток Сасо-2 (M±SD, n=3)

Конц. H ₂ O ₂ , мкМ	Время эксперимента, ч								
	3	24	72	3	24	72	3	24	72
	Rpp <i>b-a</i> , ×10 ⁻⁶ см/с			Rpp <i>a-b</i> , ×10 ⁻⁶ см/с			Rpp <i>b-a</i> / Rpp <i>a-b</i>		
Конт- роль	3,1±0,1	3,1±0,4	3,1±0,9	1,2±0,2	1,0±0,3	1,1±0,6	2,7±0,3	3,4±1	3,0±0,7
0,1	3,1±0,1	2,9±0,3	3,0±0,9	0,9±0,2	0,9±0,1	1,2±0,6	3,5±0,7	3,2±0,4	2,7±0,7
0,5	2,9±0,6	3,7±0,8	3,2±0,5	1,2±0,03	1,2±0,1	1,3±0,3	2,5±0,5	3,1±0,5	2,5±0,5
1	2,8±0,4	3,6±0,6	3,7±1,3	1,2±0,1	1,4±0,4	1,8±0,1	2,5±0,3	2,9±1,7	2,1±0,9
5	2,5±0,4	2,9±0,8	3,4±0,4	1,7±0,1	1,2±0,1	1,2±0,5	2,1±0,3	2,4±0,6	3,3±1,8
10	1,4±0,1 ***	3,8±0,7	6,1±0,8 *	1,8±0,2 **	2,5±0,4 *	2,6±1,4	0,7±0,2 ****	1,6±0,3 **	2,8±1,4
50	2,5±0,2 **	5,2±0,5 **	11,1±2,9 ***	2,9±0,7 **	5,5±0,4 ***	12,8±3,4 ***	0,9±0,2 ****	0,9±0,2 ***	0,9±0,1 *
100	4,9±0,9 *	7,8±0,2 ***	11,3±3,1 ***	5,2±1,9 *	8,9±1,1 ***	17,2±3,7 ***	1,1±0,6 ***	0,9±0,1 ***	0,7±0,03 *

Таким образом, при воздействии H₂O₂ в течение 3 ч в концентрациях выше 10 мкМ происходит снижение активности Rgp, а в концентрации 100 мкМ – также повышение проницаемости клеточного монослоя в обоих направлениях для субстрата Rgp – фексофенадина, что сопровождается снижением количества белка-транспортера. Увеличение длительности экспозиции до 24 ч не только снижает активность Rgp, но и повышает проницаемость клеточного монослоя для субстрата Rgp уже в концентрации прооксиданта 10 мкМ. Количество Rgp в этих условиях возрастает при концентрациях H₂O₂ 0,1-1 мкМ и снижается при 100 мкМ. Воздействие H₂O₂ при сроке инкубации 72 ч в концентрации 10 мкМ повышает активность Rgp клеток линии Сасо-2 и сопровождается увеличением количества белка-транспортера, при более высокой концентрации H₂O₂ 50 и 100 мкМ происходит повреждение, как клеточной мембраны, так и Rgp, что подтверждается снижением его количества в лизате клеток и существенным повышением проницаемости мембраны в обоих направлениях.

Оценка принадлежности DL-бутионинсульфоксимиона к модуляторам активности Р-гликопротеина

Активность Rgp оценивали по транспорту его маркерного субстрата –

фексофенадина. БСО в концентрациях 50, 100 и 500 мкМ при преинкубации 30 мин снижал $P_{app} b-a$ и отношение $P_{app} b-a/P_{app} a-b$, $P_{app} a-b$ фексофенадина при этом достоверно не изменялся, что свидетельствует о снижении активности P_{gr} в указанном диапазоне концентраций БСО (Таблица 9).

Таблица 9 – Влияние DL-бутионинсульфоксимиона (БСО), хинидина, верапамила в диапазоне концентраций 1-500 мкМ после 30 мин преинкубации на транспорт субстрата Р-гликопротеина фексофенадина через билипидную мембрану клеток Сасо-2 ($M \pm SD$, $n=3$)

	Тестируемое вещество								
	БСО	хинидин	верапамил	БСО	хинидин	верапамил	БСО	хинидин	верапамил
	$P_{app} b-a, \times 10^{-6}$ см/с			$P_{app} a-b, \times 10^{-6}$ см/с			$P_{app} b-a / P_{app} a-b$		
контроль	3,0±0,1	3,0±0,1	3,1±0,1	1,1±0,4	1,1±0,4	1,1±0,4	2,9±0,9	2,9±0,9	2,9±0,9
1	3,5±1,0	2,9±0,4	3,6±0,9	1,3±0,2	1,5±0,2	1,3±1,1	2,8±1,4	1,9±0,1*	2,7±0,1
5	3,1±0,7	2,0±0,1**	3,5±0,4	1,4±0,2	1,3±0,1	1,3±1,1	2,2±0,5	1,6±0,1**	2,0±0,3
10	2,9±0,2	0,9±0,1***	2,4±0,2*	1,4±0,2	1,2±0,1	1,2±0,3	2,1±0,5	0,8±0,1***	2,0±0,3*
50	1,9±0,3*	0,7±0,2***	1,4±0,2**	1,3±0,3	1,3±0,4	1,0±0,1	1,5±0,3*	0,5±0,1***	1,4±0,1**
100	1,6±0,3*	0,7±0,1***	1,2±0,1***	1,7±0,3	1,3±0,4	1,3±0,1	1,0±0,3*	0,5±0,1***	0,9±0,1***
500	1,6±0,3*	0,6±0,1***	0,9±0,4****	1,7±0,2	1,5±0,8	1,1±0,2	0,9±0,2*	0,5±0,1***	0,9±0,1***

В качестве препаратов сравнения использовали классические ингибиторы P_{gr} – хинидин и верапамил в эквивалентных БСО концентрациях. Хинидин в концентрациях 5-500 мкМ снижал $P_{app} b-a$ фексофенадина, $P_{app} a-b$ достоверно не отличался от уровня контроля во всем диапазоне изученных концентраций, снижение отношения $P_{app} b-a/P_{app} a-b$ отмечено при концентрациях хинидина 1–500 мкМ. Верапамил в концентрациях 10-500 мкМ снижал $P_{app} b-a$ фексофенадина, $P_{app} a-b$ достоверно не отличался от уровня контроля при всем диапазоне использованных концентраций, снижение отношения $P_{app} b-a/P_{app} a-b$ наблюдалось при концентрациях верапамила 10–500 мкМ (Таблица 9).

Следует отметить, что хинидин ингибировал активность P_{gr} в более низких концентрациях по сравнению с БСО: IC_{50} , рассчитанная по коэффициенту кажущейся проницаемости $b-a$ фексофенадина для хинидина составила $5,16 \pm 0,59$ мкМ, для верапамила – $9,6 \pm 3,98$ мкМ, для БСО – $17,21 \pm 2,46$ мкМ.

Влияние эндогенного окислительного стресса на количество и активность Р-гликопротеина

При воздействии БСО в течение 3 ч в концентрациях 1-500 мкМ количество Рgp в клетках Сасо-2 статистически значимо не изменялось. При увеличении длительности экспозиции до 24 ч БСО в концентрациях 10; 50 и 100 мкМ увеличивал количество Рgp в клетках Сасо-2, при экспозиции в течение 72 ч и концентрации БСО 500 мкМ количество Рgp снижалось (Таблица 10).

Таблица 10 – Изменение количества Р-гликопротеина (нг/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции эндогенного окислительного стресса DL-бутионинсульфоксимином в концентрациях 1–500 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Время инкубации	Контроль	Концентрация DL-бутионинсульфоксимины, мкМ					
		1	5	10	50	100	500
3 ч	133±31	129±38	131±17	121±8	122±10	122±8	120±9
24 ч	117±7	114±5	138±40	202±6**	179±9**	148±16*	138±76
72 ч	114±6	134±37	102±6	100±8	73±2	91±26	104±26**

Перед выполнением транспортных экспериментов анализировали плотность межклеточных контактов до добавления БСО и после окончания экспозиции по величине TEER монослоя клеток. Снижение TEER клеточного монослоя определялось при воздействии БСО в течение 3 ч в концентрации 500 мкМ, при инкубации в течение 24 ч с БСО в концентрациях 100 и 500 мкМ, при экспозиции в течение 72 ч с БСО в концентрациях 100 и 500 мкМ.

При изучении активности Рgp были получены следующие результаты. БСО в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ и длительности экспозиции 3 ч достоверно не влиял на изучаемые параметры транспорта фексофенадина через монослой клеток линии Сасо-2, что характеризует сохранение функциональной активности Рgp на исходном уровне. Воздействие БСО в концентрациях 50, 100 и 500 мкМ в течение 3 ч приводило к снижению $R_{app} b-a$ и отношения $R_{app} b-a/a-b$, $R_{app} a-b$ при этом достоверно не изменялся. Полученные результаты свидетельствуют о снижении активности белка-транспортера. БСО в концентрациях 1 и 5 мкМ и сроке инкубации 24 ч достоверно не влиял на $R_{app} b-a$ и $a-b$, в концентрации 10 мкМ вызывал повышение $R_{app} b-a$ и $R_{app} b-a/a-b$ по сравнению с контролем, что характеризует повышение активности Рgp. В концентрации БСО 50 мкМ через

24 ч отмечалось снижение отношения $\text{Papp } b-a/a-b$, а в концентрации 100 мкМ уменьшение $\text{Papp } b-a$ и отношения $\text{Papp } b-a/a-b$ по сравнению с контролем, что свидетельствует о снижении активности Pgp . Дальнейшее повышение концентрации БСО до 500 мкМ приводило к увеличению $\text{Papp } b-a$ и $a-b$, снижению $\text{Papp } b-a/a-b$ относительно контрольных значений, что свидетельствует не только о снижении активности Pgp , но и повреждении клеточного монослоя и увеличении транспорта фексофенадина через мембрану в обе стороны (Таблица 11).

В концентрациях 1-10 мкМ при экспозиции 72 ч БСО достоверно не влиял на показатели транспорта фексофенадина. Воздействие БСО в концентрациях 50 и 100 мкМ при инкубации в течение 72 ч приводило к снижению $\text{Papp } b-a$ и отношения $\text{Papp } b-a/a-b$, что характеризует уменьшение активности белка-транспортера. При концентрации БСО 500 мкМ отмечалось повышение $\text{Papp } b-a$ и $a-b$, отношение $\text{Papp } b-a/a-b$ понижалось по сравнению с контролем, что свидетельствует об уменьшении активности Pgp , а также о повреждении клеточного монослоя и увеличении транспорта фексофенадина через мембрану в двух направлениях (Таблица 11).

Таблица 11 – Влияние DL-бутионинсульфоксимиона (БСО) в диапазоне концентраций 1-500 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч на транспорт субстрата Pgp (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток Caco-2 ($M \pm SD$, $n=3$)

Конц. БСО, мкМ	Время эксперимента, ч								
	3			24			72		
	$\text{Papp } b-a, \times 10^{-6} \text{ см/с}$			$\text{Papp } a-b, \times 10^{-6} \text{ см/с}$			$\text{Papp } b-a / \text{Papp } a-b$		
конт- роль	3,0±0,1	2,8±0,8	2,9±0,7	1,1±0,4	0,7±0,2	0,7±0,2	2,9±0,9	3,7±0,4	3,2±0,3
1	3,2±1,4	2,8±0,5	3,3±0,3	1,4±0,4	0,7±0,2	0,7±0,2	2,2±0,8	3,9±0,3	2,8±1,0
5	3,1±0,5	2,8±0,1	1,9±0,9	1,3±0,8	0,7±0,1	0,7±0,1	4,2±2,5	3,9±0,5	2,5±1,3
10	2,7±0,4	4,1±0,1 *	2,1±0,7	1,4±0,4	0,7±0,1	0,8±0,03	1,9±0,5	5,4±0,4 *	2,9±0,7
50	1,9±0,5 ***	2,2±0,6	1,1±0,3 ***	1,3±0,3	1,1±0,3	1,1±0,3	1,4±0,4 *	2,0±0,1 **	1,3±0,3 **
100	1,6±0,3 ***	1,5±0,5 *	1,0±0,1 **	1,5±0,3	1,1±0,4	1,1±0,4	1,1±0,04 *	1,4±0,2 **	1,1±0,2 **
500	1,3±0,2 **	3,7±0,1 *	4,1±0,5 *	1,3±0,2	2,8±0,3 ***	2,8±0,3 ***	0,9±0,1 *	1,3±0,1 ***	1,2±0,2 **

Таким образом, при кратковременном воздействии БСО (3 ч) в концентрациях 50, 100 и 500 мкМ отмечается ингибирующее действие на Pgp , не

связанное с изменением его количества (прямое ингибирование). При увеличении срока инкубации до 24 ч и концентрации БСО 10 мкМ активность Pgp возрастает и сопровождается повышением его количества. При увеличении концентрации БСО до 50 и 100 мкМ и длительности воздействия до 24 и 72 ч наблюдается снижение активности Pgp, что может быть обусловлено повреждением молекулы белка-транспортера, а также прямой ингибирующей активностью БСО. При концентрации БСО 500 мкМ и длительности воздействия 24 и 72 ч происходит усиление ОС, повреждение целостности клеточного монослоя и увеличение транспорта фексофенадина – субстрата белка-транспортера через мембрану в двух направлениях.

Изучение роли транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Р-гликопротеина *in vitro* при экзогенном окислительном стрессе

На следующем этапе исследования изучались механизмы повышения количества Pgp при развитии экзогенного ОС. Добавление глутатиона в концентрации 1 мМ в питательную среду с H₂O₂ предотвращало повышение количества Pgp, его уровень достоверно не отличался от показателей контроля - это подтверждает, что индукция Pgp связана именно с развитием ОС.

Ингибитор Nrf2 – АЕМ1 при совместной инкубации с H₂O₂ во всех концентрациях и сроках экспозиции предотвращал повышение относительного количества Pgp, его уровень достоверно не отличался от показателей контроля. Ингибитор HIF1 α КС7F2 при длительности воздействия H₂O₂ 24 ч во всех концентрациях прооксиданта препятствовал повышению уровня транспортера, а при инкубации 72 ч не оказывал статистически значимого эффекта на относительное количество Pgp. Ингибитор CAR СІNРА 1 при добавлении к H₂O₂ и сроке инкубации 24 ч не подавлял эффект прооксиданта: относительное количество Pgp увеличивалось, при длительности воздействия 72 ч СІNРА 1 препятствовал повышению уровня Pgp под действием H₂O₂ в концентрации 10 мкМ. Ингибитор PXR кетоконазол при сочетанном применении с H₂O₂ в течение 24 и 72 ч не подавлял эффект индуктора ОС: относительное количество Pgp

возрастало по сравнению со значениями контроля (Рисунок 1).

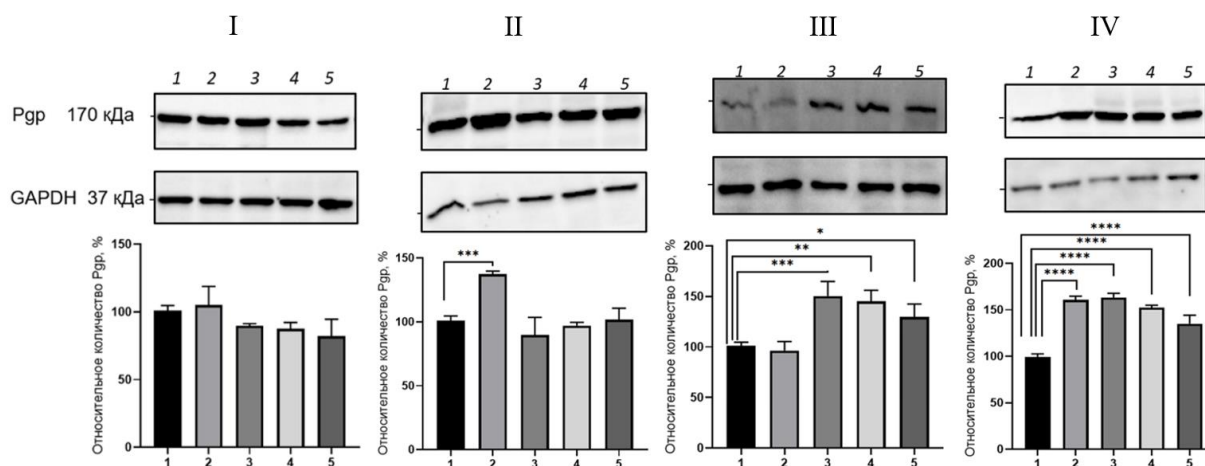


Рисунок 1 – Относительное количество Р-гликопротеина (Pgp) в клетках линии Caco-2 при воздействии ингибиторов Nrf2 (I, АЕМ1, 5 мкМ), NIF1 α (II, КС7F2, 7,5 мкМ), CAR (III, СІNРА 1, 10 мкМ), PXR (IV, кетоконазол, 10 мкМ) в сочетании с пероксидом водорода (H₂O₂): 1- контроль; 2, 3, 4, 5 – H₂O₂ в концентрациях 10 мкМ (72 ч), 0,1, 0,5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно

Примечание: здесь и далее представлены результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab, и фото бендов, полученных с помощью ChemiDocXRS+ («Bio Rad», США).

Таким образом, в повышении количества Pgp при развитии экзогенного ОС, вызванного H₂O₂, вероятно, доминирующая роль принадлежит сигнальному пути Nrf2-keap1, который принимает участие в регуляции белка-транспортера при длительности воздействия 24 и 72 ч. Транскрипционный фактор NIF1 α участвует в регуляции Pgp при длительности воздействия H₂O₂ 24 ч, а транскрипционный фактор CAR – при воздействии 72 ч. PXR, видимо, не вносит существенный вклад в регуляцию белка-транспортера при использованной модели патологии.

Изучение роли транскрипционных факторов Nrf2, NIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Р-гликопротеина *in vitro* при эндогенном окислительном стрессе

Глутатион (1 мМ) предотвращал повышение уровня Pgp, вызванное воздействием БСО в течение 24 ч в концентрациях 10 и 50 мкМ, что указывает на вклад ОС в регуляцию Pgp.

Добавление к клеткам ингибитора Nrf2 АЕМ1 в сочетании с БСО в

концентрациях 10, 50 и 100 мкМ и сроке инкубации 24 ч препятствовало повышению относительного количества Pgp (уровень белка-транспортера не отличался от значений контроля). Ингибитор Nrf2 KC7F2 при добавлении к БСО в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ также приводил к нормализации относительного количества Pgp в клетках линии Сасо-2, его уровень достоверно не отличался от контроля. Ингибитор CAR CINPA 1 при сочетанном применении с БСО в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ предотвращал повышение относительного количества Pgp, уровень белка-транспортера в клетках Сасо-2 достоверно не отличался от показателей контроля. Ингибитор PXR кетоконазол предотвращал повышение количества Pgp в клетках Сасо-2 под действием БСО в концентрации 100 мкМ, и не влиял на эффекты прооксиданта в концентрациях 10 и 50 мкМ – уровень Pgp повышался по сравнению с контролем (Рисунок 2).

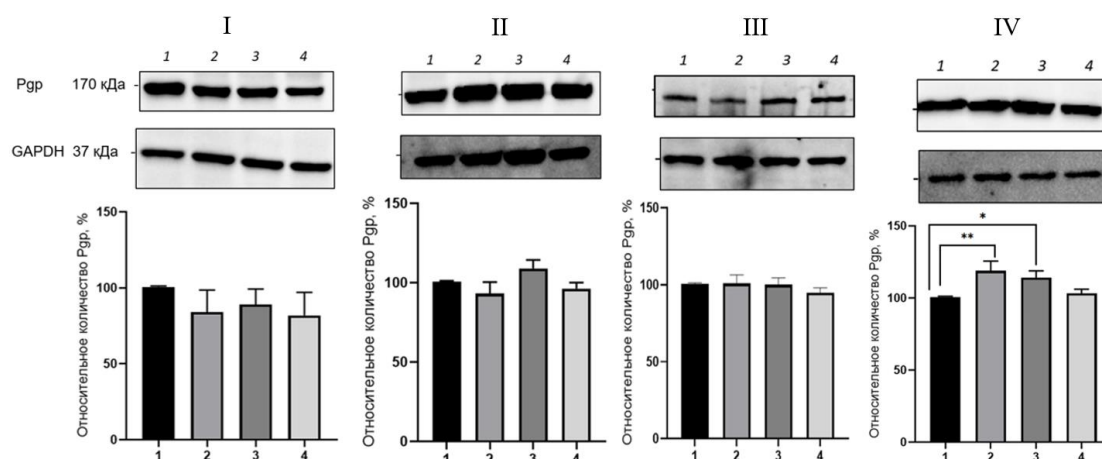


Рисунок 2 – Относительное количество Р-гликопротеина (Pgp) в клетках линии Сасо-2 при воздействии ингибиторов Nrf2 (I, АЕМ1, 5 мкМ), Nrf1α (II, КС7F2, 7,5 мкМ), CAR (III, CINPA 1, 10 мкМ), PXR (IV, кетоконазол, 10 мкМ) в сочетании с DL-бутионинсульфоксимином (БСО): 1 – контроль; 2, 3, 4 - БСО в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно

Таким образом, при моделировании эндогенного ОС с помощью ингибитора синтеза глутатиона БСО, все протестированные транскрипционные факторы и сигнальные пути вносят вклад в индукцию Pgp. Скорее всего, это связано с бимодальным влиянием БСО на Pgp: с одной стороны, он вызывает развитие ОС, с другой стороны, являясь ксенобиотиком, способен стимулировать транскрипционные факторы PXR и CAR.

Исследование принадлежности малонового диальдегида к субстратам и модуляторам активности Р-гликопротеина

Воздействие МДА на клетки линии Сасо-2 в концентрациях 10 и 50 мкМ в течение 24 ч приводило к повышению уровня Рgp. В ходе исследования было установлено, что ингибитор CAR – CINPA 1 предотвращал повышение количества Рgp при воздействии МДА на клетки Сасо-2 в концентрации 10, 50, 100 мкМ в течение 24 ч. Ингибитор PXR - кетоконазол не изменял индуцирующее действие МДА (10 мкМ) на количество Рgp и препятствовал его индукции в концентрации МДА 50 мкМ (Рисунок 3).

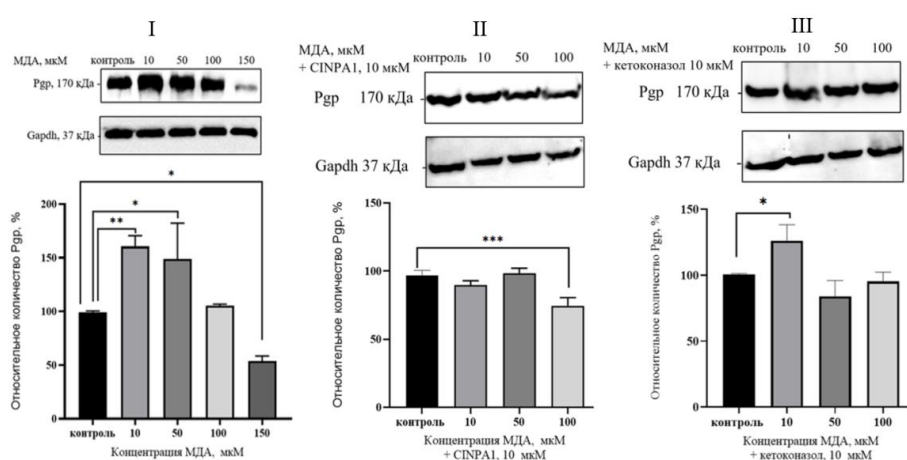


Рисунок 3 – Относительное количество Р-гликопротеина (Рgp) в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии малонового диальдегида в концентрациях 10, 50, 100, 150 мкМ в течение 24 ч (I), и в присутствии ингибиторов CAR (II, CINPA 1, 10 мкМ) и PXR (III, кетоконазол, 10 мкМ)

Изменение количества Рgp в клетках Сасо-2 под действием МДА сопровождалось следующей динамикой его активности. Кратковременное воздействие МДА на клетки в течение 30 мин не влияло на Рарр *a-b* и Рарр *b-a* субстрата Рgp фексофенадина. Полученные результаты свидетельствуют о том, что МДА не является прямым ингибитором или активатором молекулы Рgp. В то же время увеличение длительности воздействия МДА до 24 ч в концентрациях 10 и 50 мкМ приводило к увеличению Рарр *b-a*, отношения Рарр *b-a*/Рарр *a-b* и снижению Рарр *a-b* по сравнению с контролем. Полученные данные свидетельствуют о повышении количества и активности Рgp в клетках Сасо-2 под действием МДА в концентрациях 10 и 50 мкМ при длительности воздействия 24 ч (Таблица 12).

Таблица 12 – Влияние малонового диальдегида (МДА) в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ в течение 30 мин и 24 ч на транспорт субстрата Pgr - фексофенадина через билипидную мембрану клеток линии Caco-2 (M±SD, см/сек)

Время инкубации	Экспериментальная группа	Papp <i>b-a</i> , ×10 ⁻⁶ , см/с	Papp <i>a-b</i> , ×10 ⁻⁶ , см/с	Papp <i>b-a</i> /Papp <i>a-b</i>
	Контроль	5,43±0,13	1,93±0,19	2,81±0,2
30 мин	МДА 10 мкМ	5,45±0,20	1,96±0,16	2,78±0,15
	МДА 50 мкМ	5,51±0,26	2,04±0,11	2,7±0,17
	МДА 100 мкМ	5,98±1,18	1,76±0,13	3,39±0,18
24 ч	МДА 10 мкМ	7,37±0,26****	1,33±0,18*	5,5±0,2**
	МДА 50 мкМ	6,23±0,23**	1,32±0,05*	4,72±0,71**
	МДА 100 мкМ	5,64±0,92	1,89±0,57	2,98±0,6

При 30 мин воздействия МДА в концентрации 10 мкМ на клетки Caco-2 Papp *b-a* МДА, характеризующий транспорт данного продукта ПОЛ за счет функционирования Pgr и пассивной диффузии, почти вдвое превышал Papp *a-b*, характеризующий его транспорт за счет пассивной диффузии против работы Pgr, что демонстрирует асимметрию транспорта МДА, характерную для субстратов Pgr. Ингибитор Pgr – верапамил снижал Papp *b-a* для МДА, что сопровождалось выравниванием уровня МДА по обе стороны мембраны (Таблица 13).

Таблица 13 – Транспорт малонового диальдегида (МДА) в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ при инкубации в течение 30 мин через билипидную мембрану клеток линии Caco-2 без и в присутствии ингибитора Р-гликопротеина верапамила (200 мкМ) (M±SD, см/сек)

Экспериментальные группы	Papp <i>b-a</i> , ×10 ⁻⁶ см/с	Papp <i>a-b</i> , ×10 ⁻⁶ см/с	Papp <i>b-a</i> /Papp <i>a-b</i>
МДА 10 мкМ	19,42±2,37	9,97±0,88	1,96±0,37
МДА 10 мкМ + верапамил	13,82±2,15*	17,01±4,92	0,86±0,32*
МДА 50 мкМ	14,38±0,84	10,14±3,1	1,54±0,64
МДА 50 мкМ + верапамил	12,88±1,81	13,88±1,66	0,93±0,02
МДА 100 мкМ	8,54±0,75	6,17±1,67	1,44±0,31
МДА 100 мкМ + верапамил	5,83±0,63**	4,02±0,64	1,46±0,29

Таким образом, МДА в концентрации 10 мкМ транспортируется Pgr. При увеличении концентрации МДА до 50 и 100 мкМ вклад Pgr в транспорт МДА уменьшается, поскольку, видимо, увеличивается его перенос путем пассивной диффузии. МДА в концентрациях 10 и 50 мкМ и длительности экспозиции 24 ч повышает относительное количество и активность Pgr, действуя через транскрипционные факторы CAR и PXR.

Оценка роли Р-гликопротеина при развитии окислительного стресса

На заключительном этапе исследования оценивалась роль Рgp при развитии ОС. Для этого изучалась выживаемость клеток линии Сасо-2 при воздействии H_2O_2 (0,1-100 мкМ) и БСО (1-500 мкМ) в течение 24 ч на фоне индукции и ингибирования Рgp. Ингибирование белка-транспортера вызывали преинкубацией клеток Сасо-2 в течение 30 мин с верапамилом (200 мкМ), индукцию – преинкубацией клеток Сасо-2 в течение 24 ч с рифампицином (10 мкМ). Жизнеспособность контрольных клеток принимали за 100%. Воздействие H_2O_2 и БСО приводило к снижению жизнеспособности клеток при концентрациях прооксидантов 50 и 100 мкМ и 500 мкМ соответственно.

Предварительная индукция Рgp повышала резистентность клеток к ОС, о чем свидетельствовало меньшее снижение их жизнеспособности, а при ингибировании белка-транспортера устойчивость и жизнеспособность клеток дополнительно снижались. Полученные результаты показывают, что Рgp играет защитную роль при развитии экзогенного и эндогенного окислительного стресса, что способствует увеличению жизнеспособности клеток (Рисунок 4).

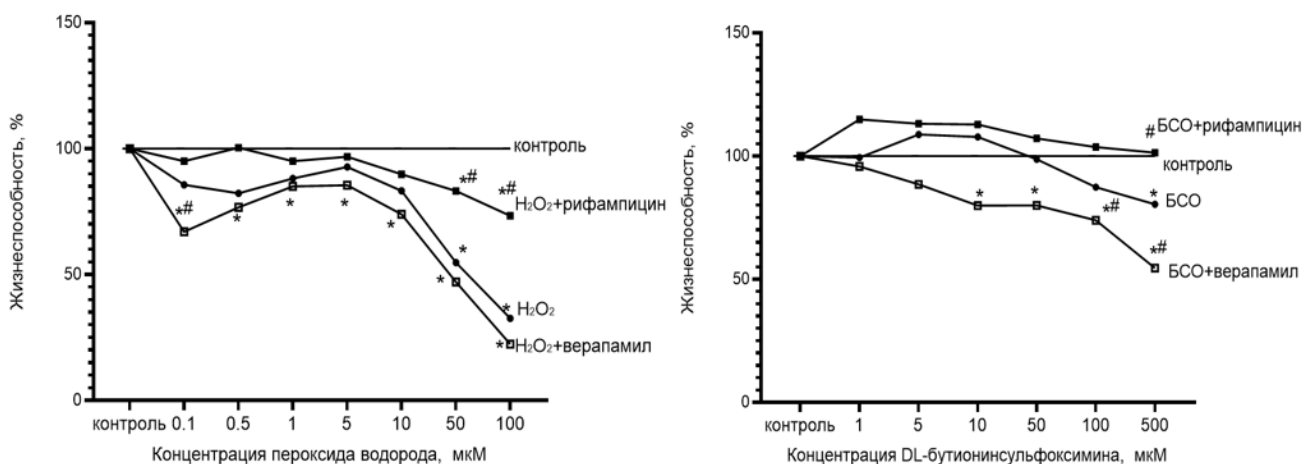


Рисунок 4 – Изменение жизнеспособности клеток в условиях моделирования экзогенного (слева) и эндогенного (справа) окислительного стресса, предварительной индукции рифампицином и ингибирования верапамилом активности Р-гликопротеина в сочетании с действием H_2O_2 /БСО

Примечание: * – $p < 0,05$ статистически значимые отличия относительно контроля; # – $p < 0,05$ статистически значимые отличия относительно группы H_2O_2 /БСО

ВЫВОДЫ

1. Пероксид водорода в концентрациях 5-10 мкМ и длительности инкубации 3, 24 и 72 ч на клетках линии Сасо-2 вызывает развитие компенсированного окислительного стресса (эустресса), что проявляется в значимом повышении уровня свободных радикалов, карбонильных производных белков, продуктов липопероксидации, снижении содержания белковых и небелковых SH-групп, повышении уровня транскрипционного фактора Nrf2 и антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы. Концентрации H_2O_2 50-100 мкМ при всех сроках экспозиции являются токсичными для линии клеток Сасо-2 и вызывают развитие некомпенсированного экзогенного окислительного стресса и существенное снижение жизнеспособности клеток.

2. DL-бутионинсульфоксимин в концентрациях 10; 50; 100 мкМ на клетках линии Сасо-2 только при длительности экспозиции 24 и 72 ч вызывает развитие компенсированного окислительного стресса (эустресса) с 24 ч экспозиции, что проявляется в повышении уровня свободных радикалов, концентрации карбонильных производных белков, продуктов липопероксидации, снижении содержания белковых и небелковых SH-групп, повышении уровня транскрипционного фактора Nrf2, и антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы. Концентрация DL-бутионинсульфоксимины 500 мкМ является токсичной для линии клеток Сасо-2, вызывает развитие некомпенсированного эндогенного окислительного стресса и гибель клеток.

3. Пероксид водорода на клетках линии Сасо-2 при длительности воздействия 3 ч в концентрациях 10 и 50 мкМ снижает активность Pgp, в концентрации 100 мкМ – и активность, и количество белка-транспортера. При длительности воздействия 24 ч H_2O_2 в концентрациях 0,1–1 мкМ (эустресс) увеличивает количество Pgp без изменения его активности, при концентрации 10 мкМ активность Pgp снижается, при концентрациях 50–100 мкМ (дистресс) происходит снижение и количества, и активности Pgp. При инкубации клеток в течение 72 ч H_2O_2 в концентрациях 0,1-5 мкМ не влияет на уровень и активность Pgp, в концентрации 10 мкМ (эустресс) увеличивает содержание и активность

белка-транспортера, в концентрациях 50-100 мкМ (дистресс) вызывает снижение количества и активности Pgp.

4. DL-бутионинсульфоксимин является прямым ингибитором Pgp с IC_{50} $17,21 \pm 2,46$ мкМ, что подтверждается снижением активности белка-транспортера (без изменения количества) при воздействии БСО на клетки линии Caco-2 в течение 30 мин.

5. DL-бутионинсульфоксимин в концентрациях 10-100 мкМ при увеличении длительности воздействия до 24 ч вызывает повышение количества Pgp, что сопровождается ростом активности белка-транспортера при концентрации прооксиданта 10 мкМ. В концентрации 100 мкМ отмечается снижение активности Pgp, что может быть связано с окислительным повреждением белковой молекулы транспортера и прямой ингибирующей активностью БСО. При увеличении длительности экспозиции клеток с БСО до 72 ч количество Pgp не изменяется, при концентрациях прооксиданта 50-100 мкМ отмечается снижение активности белка-транспортера.

6. В механизмах повышения количества Pgp при развитии экзогенного ОС, вызванного H_2O_2 , доминирующая роль принадлежит сигнальному пути Nrf2, который принимает участие в регуляции белка-транспортера при двух изученных сроках воздействия прооксиданта - 24 и 72 ч. Транскрипционный фактор NIF1 α участвует в регуляции Pgp при инкубации клеток с H_2O_2 в течение 24 ч, а транскрипционный фактор CAR – в течение 72 ч. PXR не вносит существенный вклад в регуляцию белка-транспортера при использованной экспериментальной модели окислительного стресса.

7. При моделировании эндогенного окислительного стресса с помощью ингибитора синтеза глутатиона – БСО, все протестированные транскрипционные факторы и сигнальные пути (Nrf2, NIF1 α , PXR, CAR) вносят вклад в индукцию Pgp. Вероятнее всего, это связано с бимодальным влиянием БСО на Pgp за счет развития окислительного стресса и способности стимулировать PXR и CAR в качестве ксенобиотика.

8. Малоновый диальдегид в концентрациях 10 и 50 мкМ и длительности экспозиции 24 ч повышает относительное количество и активность Pgr, действуя через транскрипционные факторы CAR и PXR. Малоновый диальдегид в концентрации 10 мкМ транспортируется Pgr в клетках Caco-2.

9. Выживаемость клеток Caco-2 при развитии окислительного стресса увеличивается на фоне индуктора Pgr рифампицина и снижается на фоне ингибитора белка-транспортера – верапамила. Индукция Pgr при манифестации окислительного стресса имеет защитную функцию, обеспечивая выведение малонового диальдегида как продукта пероксидации из клеток во внеклеточное пространство и ограничивая рост проницаемости клеточной мембраны для субстратов белка-транспортера, что опосредует увеличение жизнеспособности клеток.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Полученные нами результаты демонстрируют повышение количества и активности Pgr в клетках линии Caco-2 на фоне моделирования умеренного экзогенного и эндогенного окислительного стресса и создают предпосылки для корректировки доз лекарственных средств-субстратов данного транспортера (в сторону повышения) при фармакотерапии заболеваний, протекающих на фоне окислительного эустресса.

2. Продемонстрированное снижение количества и активности Pgr в клетках линии Caco-2 в условиях дистресса свидетельствуют о том, что в данных условиях белок-транспортер не играет существенной роли в фармакокинетике лекарственных веществ и, поэтому, его не следует рассматривать в качестве фармакологической мишени для повышения доставки веществ-субстратов белка-транспортера.

3. Доказанные нами пути регуляции активности Pgr могут использоваться в целях повышения или снижения функционирования белка-транспортера через транскрипционные факторы Nrf, HIF1 α , CAR и PXR.

4. Разработана и валидирована методика количественного анализа МДА методом ВЭЖХ-МС/МС, которая может быть рекомендована для оценки

выраженности окислительного стресса и распределения продуктов перекисного окисления липидов между внутриклеточным и внеклеточным пространством.

5. Выявленные свойства БСО ингибировать активность Pgp могут быть использованы для снижения активности данного белка-транспортера, например, при терапии онкологических заболеваний с целью преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, обусловленной гиперэкспрессией Pgp.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Проведенное исследование позволило получить убедительные доказательства влияния окислительного стресса на количество и активность Pgp, а также определить механизмы его регуляции, опосредованные транскрипционными факторами Nrf, HIF1 α , CAR и PXR. Однако, исходя из полученных данных, вытекает целый ряд предположений, проверка которых может стать основой дальнейших работ по смежным тематикам.

1. Выявление механизмов взаиморегуляции изученных транскрипционных факторов.

2. Оценка способности БСО ингибировать Pgp *in vivo* в экспериментальных и клинических исследованиях.

3. Проверка полученных экспериментальных данных о влиянии окислительного стресса на активность Pgp *in vivo* в экспериментальных и клинических исследованиях.

4. Проверка гипотезы о роли состояния цитоплазматической мембраны в функционировании Pgp на фоне использования мембраностабилизирующих веществ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России

1. Дозозависимое влияние пероксида водорода на уровень транскрипционного фактора Nrf2 *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин, П.Д. Ерохина [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2020. – Т. 23, № 10. – С. 12-17.

2. Белок множественной лекарственной устойчивости Р-гликопротеин в условиях ингибирования синтеза глутатиона *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин, А.А. Сеидкулиева [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // **Технологии живых систем.**

– 2021. – Т. 18, № 3. – С. 43-51.

3. Влияние окислительного стресса на транспорт субстрата Р-гликопротеина через клеточный монослой / А.В. Шулькин, **Ю.В. Абаленихина**, А.А. Сеидкулиева [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // **Биологические мембраны**. – 2021. – Т. 38, № 4. – С. 292-305.

4. Индукция конститутивного андростанового рецептора при развитии окислительного стресса / А.В. Шулькин, **Ю.В. Абаленихина**, А.А. Сеидкулиева [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2021. – Т. 171, № 5. – С. 588-591.

5. Роль Р-гликопротеина в ограничении проницаемости клеточных мембран при окислительном стрессе / А.В. Шулькин, **Ю.В. Абаленихина**, И.В. Черных [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // **Биохимия**. – 2021. – Т. 86, № 2. – С. 236-247.

6. Внутриклеточная локализация и функция ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* / **Ю.В. Абаленихина**, П.Д. Ерохина, А.А. Сеидкулиева [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // **Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова**. – 2022. – Т. 30, № 3. – С.296-304.

7. Ингибирующее действие DL-бутионинсульфоксимида на активность Р-гликопротеина *in vitro* / **Ю.В. Абаленихина**, П.Ю. Мыльников, А.В. Шулькин [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // **Казанский медицинский журнал**. – 2022. – Т.103, №5. – С. 780-787.

8. Клетки линии Сасо-2 как модель для изучения абсорбции лекарственных веществ / А.В. Шулькин, Ю.С. Транова, **Ю.В. Абаленихина** [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // **Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология**. – 2022. – Т. 206, №10. – С. 63-69.

9. Механизмы регуляции Р-гликопротеина в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro* / **Ю.В. Абаленихина**, А.В. Шулькин, П.Ю. Мыльников [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // **Acta naturae**. – 2022. – Т.14, № 3 (54). – С. 69-78.

10. Моделирование и динамика развития экзогенного и эндогенного окислительного стресса / **Ю.В. Абаленихина**, С.К. Правкин, А.В. Шулькин [и др.] – Текст (визуальный): непосредственный // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2022. – Т. 25, № 12. – С. 10-17.

11. Разработка и валидация методики количественного определения малонового диальдегида методом ВЭЖХ-МС/МС / П.Ю. Мыльников, А.В. Шулькин, **Ю.В. Абаленихина** [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // **Клиническая лабораторная диагностика**. – 2022. – Т. 67, № 7. – С. 369-373.

12. Регуляция и роль фактора, индуцируемого гипоксией 1-альфа (HIF-1α), в условиях эндогенного окислительного стресса *in vitro* / **Ю.В. Абаленихина**, П.Ю. Мыльников, А.В. Шулькин [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины**. – 2022. – Т. 173, № 3. – С. 301-306.

13. Регуляция конститутивного андростанового рецептора в клетках линии Сасо-2 при моделировании окислительного стресса *in vitro* / **Ю.В. Абаленихина**, А.В. Шулькин, А.А. Сеидкулиева [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // **Биомедицинская химия**. – 2022. – Т.68, № 4. – С. 297-301.

14. Функционирование мембранного белка-транспортера Р-гликопротеина в условиях ингибирования синтеза глутатиона / **Ю.В. Абаленихина**, П.Д. Ерохина, П.Ю. Мыльников [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // **Прикладная биохимия и микробиология**. – 2022. – Т. 58, № 3. – С. 232-243.

15. Функционирование прегнан Х рецептора в условиях окислительного стресса /

Ю.В. Абаленихина, Е.А. Судакова, А.А. Слепнев [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // **Биологические мембраны**. – 2022. – Т.39, № 2. – С. 107-115.

16. Assessment of Malondialdehyde Belonging to Modulators and Substrates of the P-Glycoprotein Transporter Protein / A.V. Shchulkin, **Yu.V. Abalenikhina**, P.Y. Mylnikov [et al.]. – Text : visual // **Biochemistry, biophysics, and molecular biology**. – 2022. – Vol. 507. – P. 247–255.

Статьи в других изданиях

17. **Абаленихина, Ю.В.** Изменение концентрации белковых SH-групп в условиях окислительного стресса *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, П.Д. Ерохина, А.В. Шулькин. – Текст (визуальный): непосредственный // Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста: сб. докл. VI Всерос. науч. конф. молодых специалистов, аспирантов, ординаторов. – Рязань: ОТСиОП, 2020. – С. 16-18.

18. **Абаленихина, Ю.В.** Оценка окислительного стресса при экзогенном воздействии пероксида водорода *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин, П.Д. Ерохина. – Текст (визуальный): непосредственный // Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине: сб. науч. тр. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием / под ред. А.В. Силина, Л.Б. Гайковой. – СПб.: Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова, 2020. – С. 8-13.

19. Влияние пероксида водорода на функционирование белка-транспортера гликопротеина-P *in vitro* / **Ю.В. Абаленихина**, П.Д. Ерохина, И.В. Черных, А.В. Шулькин. – Текст (визуальный): непосредственный // Сборник тезисов 24-й Междунар. Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». – Пушкино, 2020. – С. 84.

20. Выживаемость и тиоловый статус клеток линии Сасо-2 в условиях окислительного стресса / **Ю.В. Абаленихина**, А.В. Шулькин, П.Д. Ерохина [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Междунар. конф. NT + M&Ec`2020 (Весенняя сессия (Гурзуф)). – Москва: Б.и., 2020. – С. 83-87.

21. Роль транскрипционного фактора Nrf2 в регуляции белка-транспортера Р-гликопротеина при окислительном стрессе / **Ю.В. Абаленихина**, П.Д. Ерохина, А.В. Шулькин [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Материалы ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, посвященной 70-летию основания ВУЗа на Рязанской земле. – Рязань: ОТСиОП, 2020. – С. 109-110.

22. **Абаленихина, Ю.В.** Изменение количества конститутивного андростанового рецептора (CAR) в условиях моделирования экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, П.Д. Ерохина, А.А. Сеидкулиева. – Текст (визуальный): непосредственный // Актуальные проблемы биомедицины – 2021: материалы XXVII Всерос. конф. молодых учёных с междунар. участием. – СПб., 2021. – С. 201-202.

23. Влияние окислительного и нитрозативного стресса на функционирование прегнан Х рецептора / А.В. Шулькин, **Ю.В. Абаленихина**, Е.А. Судакова [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Материалы международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 24-28 мая 2021 г.) / под ред. А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. – Пушкино: Изд-во ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2021. – С. 310-313.

24. Изменение количества прегнан Х рецептора в условиях моделирования экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro* / **Ю.В. Абаленихина**, П.Д. Ерохина, А.А. Сеидкулиева, А.В. Шулькин. – Текст (визуальный): непосредственный // Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста: сб. докл. VII Всерос. науч. конф. молодых специалистов, аспирантов, ординаторов / под ред. Р.Е. Калинина, И.А. Сучкова, И.А. Федотова, Ю.В. Абаленихиной. – Рязань, 2021. – С. 201-202.

25. Особенности функционирования белка-транспортера Р-гликопротеина при моделировании эндогенного окислительного стресса *in vitro* / **Ю.В. Абаленихина**, П.Д.

Ерохина, А.А. Сеидкулиева [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Материалы ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, посвящённой Году науки и технологий в Российской Федерации: материалы конференции. – Рязань, 2021. – С. 76-77.

26. Роль конститутивного андростанового рецептора в защите клетки при индукции окислительного стресса пероксидом водорода / **Ю.В. Абаленихина**, П.Д. Ерохина, А.А. Сеидкулиева [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Материалы международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 24-28 мая 2021 г.) / под ред. А.В. Бережнова, В.П. Зинченко. – Пушино: Изд-во ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», 2021. – С. 301-303.

27. Роль прегнан Х рецептора в резистентности клеток к нитрозативному и окислительному стрессу / **Ю.В. Абаленихина**, Е.А. Судакова, П.Д. Ерохина [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Материалы Международной конференции NT + M&Eс`2020 (Крым, Ялта-Гурзуф 31 мая – 10 июня 2021 г.) (Весенняя сессия). – Москва: Изд-во: ООО Институт новых информационных технологий, 2021. – С. 76-77.

28. Функционирование орфановых рецепторов в клетках аденокарциномы ободочной кишки человека при моделировании окислительного стресса *in vitro* / **Ю.В. Абаленихина**, А.А. Сеидкулиева, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева. – Текст (визуальный): непосредственный // Успехи молекулярной онкологии: материалы VI Всерос. конф. по молекулярной онкологии (Москва, 21-23 декабря 2021). – Москва, 2021. – С. 35.

29. Функционирование эффлюксного белка-транспортера Р-гликопротеина в условиях окислительного стресса / **Ю.В. Абаленихина**, П.Д. Ерохина, П.Ю. Мыльников [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. VII съезд биохимиков России. X Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Сочи, Дагомыс, 3–8 октября 2021): научные труды.– М.: Издательство «Перо», 2021. – Т. 2. – С. 72.

30. **Абаленихина, Ю.В.** Защитная роль Р-гликопротеина в условиях эндогенного окислительного стресса *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин. – Текст (визуальный): непосредственный // Журнал гепато-гастроэнтерологических исследований. – 2022. – Т. 1 (Спец. вып.). (Самарканд, 18-19 ноября, 2022) – С. 8-11.

31. Влияние продуктов окислительного и нитрозативного стресса на количество конститутивного андростанового рецептора / А.А. Сеидкулиева, **Ю.В. Абаленихина**, Е.А. Судакова [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева: тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием.– Рязань: ОТСиОП, 2022.– С. 74-77.

32. Определение количества Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 на различных сроках культивирования методом вестерн-блот / **Ю.В. Абаленихина**, А.В. Щулькин, А.А. Слепнев, Е.Н. Якушева. – Текст (визуальный): непосредственный // Проблемы биологии и медицины: материалы 76-й междунар. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых «Достижения фундаментальной, прикладной медицины и фармации» (Самарканд, 20-21 мая 2022) / под. ред. профессора Ж.А. Ризаева. – Самарканд, 2022. – Спецвыпуск. – С. 349-340.

33. Роль малонового диальдегида в регуляции прегнан Х рецептора в клетках линии Сасо-2 / **Ю.В. Абаленихина**, А.А. Сеидкулиева, П.Д. Ерохина, А.В. Щулькин. – Текст (визуальный): непосредственный // Актуальные проблемы биомедицины: материалы XXVIII Всерос. конф. молодых учёных с междунар. участием (СПб., 24-26 марта 2022). – СПб., 2022. – С. 238-239.

34. Роль транскрипционного фактора Nrf2 в регуляции Р-гликопротеина в условиях эндогенного окислительного стресса / **Ю.В. Абаленихина**, П.Д. Ерохина, А.В. Щулькин [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева: тез. докл. Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием.–

Рязань: ОТСиОП, 2022.– С. 5-7.

35. Роль фактора, индуцируемого гипоксией (HIF) в регуляции Р-гликопротеина при ингибировании синтеза глутатиона *in vitro* / **Ю.В. Абаленихина**, П.Ю. Мыльников, А.А. Сеидкулиева [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины: сборник материалов конгресса молодых ученых (Томск, 26-27 мая 2022). – Томск, 2022. – С. 367-369.

36. Сеидкулиева, А.А. Функционирование прегнан Х рецептора в условиях окислительного и нитрозативного стресса / А.А. Сеидкулиева, **Ю.В. Абаленихина**, Е.А. Судакова. – Текст (визуальный): непосредственный // Актуальные проблемы биомедицины - 2022: материалы XXVIII Всерос. конф. молодых учёных с междунар. участием (СПб., 24-26 марта 2022). – СПб., 2022. – С. 127-128.

37. Участие конститутивного андростанового и прегнан Х рецепторов в регуляции Р-гликопротеина при моделировании эндогенного окислительного стресса DL-бутионинсульфоксимином *in vitro* / **Ю.В. Абаленихина**, А.А. Сеидкулиева, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева. – Текст (визуальный): непосредственный // Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста в медицине: сб. докл. VIII Всерос. науч. конф. молодых специалистов, аспирантов, ординаторов (Рязань, 21 октября, 2022). – Рязань, 2022. – С. 122-123.

38. Участие конститутивного андростанового рецептора в регуляции Р-гликопротеина при воздействии пероксида водорода *in vitro* / **Ю.В. Абаленихина**, А.А. Сеидкулиева, П.Ю. Мыльников [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Биология – наука XXI века: сб. тез. 25-й Пущинской школы-конференции молодых ученых с междунар. участием (Пущино, 18-22 апреля). – Пущино: ФИЦ ПНЦБИ РАН, 2022.– С. 154.

39. Участие транскрипционных факторов NRF2, HIF, CAR, PXR в регуляции Р-гликопротеина при моделировании окислительного стресса на клетках линии Сасо-2 / **Ю.В. Абаленихина**, А.В. Щулькин, П.Д. Ерохина [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Гены и клетки. – 2022. – Т.17, № 3. – С. 6-7. – (Содерж. журн.: Материалы V национального конгресса по регенеративной медицине (Москва, 23-25 ноября)).

40. Участие ядерного фактора эритроидного происхождения-2 в регуляции Р-гликопротеина при моделировании эндогенного окислительного стресса / **Ю.В. Абаленихина**, А.А. Сеидкулиева, Е.Д. Рокунов [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный // Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Междунар. конф. NT + ME'22 (Весенняя сессия) (Москва, 29 мая – 08 июня 2022). – Москва: Изд-во Общество с ограниченной ответственностью "Институт новых информационных технологий", 2022. – С. 251-257.

41. Функционирование Р-гликопротеина при кратковременном окислительном стрессе *in vitro* / **Ю.В. Абаленихина**, П.Д. Ерохина, А.А. Сеидкулиева, А.В. Щулькин. – Текст (визуальный): непосредственный // Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье: материалы XXV Междунар. медико-биол. конф. молодых исследователей (СПб., 16 апреля 2022). – СПб.: Изд-во: Общество с ограниченной ответственностью «Издательский дом «Сциентиа», 2022.– С. 336-337.

Патенты

42. Патент №2755507 Российская Федерация, МПК С12N 1/00(2006.01). Способ повышения количества конститутивного андростанового рецептора : № 2021105606 : заявл. 04.03.2021 : опубл. 16.09.2021 / Щулькин А.В., **Абаленихина Ю.В.**, Ерохина П.Д. [и др.] ; Патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU). – Бюл. № 26. – Текст (визуальный): непосредственный.

43. Патент №2779177 Российская Федерация, СПК А61К 31/10 (2022.05); А61К 31/195 (2022.05); А61К 2121/00 (2022.05). Способ ингибирования гликопротеина-Р в

эксперименте *in vitro* : №2021133649 : заявл. 18.11.2021 : опубл. 05.09.2022 / **Абаленихина Ю.В.**, Ерохина П.Д., Мыльников П.Ю. [и др.]; Патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU). – Бюл. № 25. – Текст (визуальный): непосредственный.

44. Патент №2762853 Российская Федерация, МПК C12N 5/07(2010.01), C12N 5/09(2010.01). Способ повышения количества прегнан X рецептора : №2021117153 : заявл. 11.06.2021 : 23.12.2021 / **Абаленихина Ю.В.**, Судакова Е.А., Слепнев А.А. [и др.]; Патентообладатель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU). – Бюл. № 36. – Текст (визуальный): непосредственный.

Рационализаторские предложения

45. Способ количественной оценки глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH) методом вестерн-блот в гомогенате тканей и лизате клеток: рационализаторское предложение №1435 от 08.04.2021 / **Ю.В. Абаленихина**, А.В. Щулькин, П.Д. Ерохина [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный.

46. Способ количественной оценки конститутивного андростанового рецептора (CAR) методом вестер-блот в гомогенате тканей и лизате клеток: рационализаторское предложение №1440 от 19.05.2021 / А.В. Щулькин, **Ю.В. Абаленихина**, И.В. Черных [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный.

47. Способ количественной оценки прегнан-Х-рецептора (PXR) методом вестер-блот в гомогенате тканей и лизате клеток: рационализаторское предложение №1439 от 19.05.2021 / А.В. Щулькин, **Ю.В. Абаленихина**, И.В. Черных [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный.

48. Способ количественной оценки Р-гликопротеина (P-gp) методом вестер-блот в гомогенате тканей и лизате клеток: рационализаторское предложение №1438 от 19.05.2021 / А.В. Щулькин, **Ю.В. Абаленихина**, И.В. Черных [и др.]. – Текст (визуальный): непосредственный.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

БСО – DL-бутионинсульфоксимин

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГИФА – гетерогенный иммуноферментный анализ

МДА – малоновый диальдегид

ОС – окислительный стресс

Caco-2 – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека (англ.: cancer coli, colon cancer)

CAR – конститутивный андростановый рецептор (англ.: constitutive androstane receptor)

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (англ.: glyceraldehyde3-phosphate dehydrogenase)

HIF – фактор, индуцируемый гипоксией (англ.: hypoxia-inducible factor)

Nrf2 – ядерные факторы, родственные эритроидному 2 (англ.: nuclear factor E2-related factor 2)

Papp *b-a* – коэффициент кажущейся проницаемости *b-a*

Papp *a-b* – коэффициент кажущейся проницаемости *a-b*

Papp *b-a*/Papp *a-b* - отношение коэффициентов кажущейся проницаемости *b-a*/ *a-b*

Pgp – Р-гликопротеин (англ.: permeability glycoprotein)

PXR – прегнан Х рецептор (англ.: pregnane X receptor)

TEER – трансэпителиального сопротивления монослоя клеток (англ.: transepithelial / transendothelial electrical resistance)