

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«РЯЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА И.П. ПАВЛОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

СУДАКОВА Елена Александровна

**ВЛИЯНИЕ ДОНОРА ОКСИДА АЗОТА (II)
S-НИТРОЗОГЛУТАТИОНА НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ
P-ГЛИКОПРОТЕИНА *IN VITRO***

1.5.4. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Щулькин Алексей Владимирович

Рязань – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Физиологические и патологические эффекты оксида азота (II).....	14
1.1.1. Синтез оксида азота (II).....	14
1.1.2. NO-pГЦ-цГМФ-сигнальный путь.....	16
1.1.3. Физиологическая и патофизиологическая роль NO-pГЦ-цГМФ сигнального пути.....	20
1.1.4. Гиперпродукция оксида азота (II).....	21
1.1.5. Доноры оксида азота (II) в экспериментальных исследованиях.....	24
1.2. Р-гликопротеин: структура, функции и механизмы регуляции.....	29
1.2.1. Структура и функции Р-гликопротеина.....	29
1.2.2. Механизмы регуляции Р-гликопротеина.....	32
1.3. Влияние оксида азота (II) на функционирование Р-гликопротеина.....	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	39
2.1. Объект экспериментальных исследований.....	39
2.2. Культивирование клеток линии Сасо-2.....	39
2.3. Дизайн исследования.....	39
2.4. Изучение цитотоксического действия S-нитрозоглутатиона.....	40
2.5. Оценка выраженности нитрозативного стресса.....	41
2.6. Оценка относительного количества белка-транспортера Р-гликопротеина.....	43
2.7. Анализ активности белка-транспортера Р-гликопротеина.....	45
2.8. Анализ концентрации фексофенадина в транспортной среде.....	46
2.9. Статистический анализ.....	47
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	48
3.1. Влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на биохимические изменения в клетках линии Сасо-2	48
3.2. Влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на относительное	

количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2.....	56
3.3. Влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на активность Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2.....	59
3.4. Изучение механизмов повышения относительного количества Р-гликопротеина под действием донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона.....	66
ОБСУЖДЕНИЕ	76
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	84
ВЫВОДЫ	85
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	87
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	88
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	89
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	93

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

P-гликопротеин (P-gp, *ABCB1*) – АТФ-зависимый белок-транспортер, относящийся к суперсемейству ABC-транспортеров и обеспечивающий выведение субстратов из клеток во внеклеточное пространство и биологические жидкости. P-gp экспрессируется в энтероцитах кишечника, гепатоцитах, эпителии почечных канальцев, эндотелии гистогематических барьеров, а также в опухолевых клетках [42, 107, 170, 180]. Благодаря такой локализации основными функциями данного белка-транспортера являются: участие в фармакокинетике лекарственных веществ и резистентности опухолей к химиотерапии [157].

Активность P-gp может изменяться под воздействием различных факторов и веществ. При этом индукторы (рифампицин, карбамазепин) повышают активность белка-транспортера [172], а ингибиторы (кетоконазол, верапамил) ее снижают [167].

P-gp обладает низкой субстратной специфичностью, то есть его субстратами является широкий спектр лекарственных веществ: противоопухолевые препараты, новые пероральные антикоагулянты, сердечные гликозиды, блокаторы кальциевых каналов и т.д. [120]. Изменение активности P-gp может повлиять на эффективность и безопасность терапии данными веществами.

Механизмы регуляции P-gp продолжают активно изучаться, в частности, постоянно ведется поиск эндогенных и экзогенных веществ, модулирующих активность белка-транспортера [67, 167].

Согласно современным представлениям ключевую роль в регуляции активности P-gp играет уровень экспрессии гена *MDR1* (multidrug resistance gene), кодирующего данный белок-транспортер, и изменение активности уже синтезированного белка. Экспрессия гена *MDR1* инициируется сигналами от большого количества стимулов, которые сходятся на общей области промотора, называемого «*MDR1 enhanceosome*» [117]. Транскрипционные факторы, такие как прегнан X рецептор (PXR), конститутивный андростановый рецептор (CAR),

транскрипционный фактор эритроидного происхождения 2 (Nrf2), могут активировать синтез P-gr [103, 109, 138, 167].

Оксид азота II (NO) – сигнальная молекула, обладающая широким спектром физиологических эффектов. Показано, что NO участвует в синаптической передаче сигнала, нейрогенезе, вазодилатации, развитии воспаления, повреждении клеток и т.д. [67].

Основные физиологические функции NO реализуются через NO-pГЦ-цГМФ (оксид азота II-растворимая гуанилатциклаза-циклический гуанозинмонофосфат)-сигнальный каскад.

В то же время, гиперпродукция данной молекулы может привести к развитию нитрозативного стресса. Нитрозативный стресс (НС) представляет собой совокупность биохимических реакций, в ходе которых NO и активные формы азота (АФА) вызывают повреждение биомакромолекул белков, жиров, углеводов и нуклеиновых кислот и, как следствие, формирование патологии [76, 84, 156, 187].

В ряде исследований оценивалось влияние доноров NO на количество и активность P-gr. Однако в данных работах получены противоречивые результаты [114, 117, 118, 125]. Кроме того, не было изучено дозозависимое действие NO и, что самое главное, механизмы его реализации.

Поэтому изучение влияния оксида азота (II) на активность P-gr, а также выявление механизмов данного влияния является актуальной проблемой биохимии, решение которой позволит более полно оценить молекулярные механизмы регуляции данного белка-транспортера и разработать подходы к направленной модуляции его активности.

Степень разработанности проблемы

Показано, что NO может влиять на активность P-gr. На изолированных мембранах клеток, содержащих P-gr, донор NO пропиламин-пропиламина ноноат (PPNO) в концентрациях 0,02–200 мкМ при длительности воздействия 30 мин снижал АТФ-азную активность P-gr. В клетках рака яичника NCI/ADR-RES, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, PPNO в

концентрациях 50, 100 и 200 мкМ и экспозиции 1 ч вызывал увеличение накопления в клетках субстрата Р-gp адриамицина, что свидетельствует об ингибировании белка-транспортера [118]. Аналогичные результаты были получены и с другим донором NO – [O₂-(2,4-динитрофенил)-1-[(4-этоксикарбонил)-пиперазин-1ил]-диазен-1-иум-1-2-диолат] (JS-K) [145].

На клетках аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2 было показано, что донор NO S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин (SNAP) в концентрациях 0,1 – 5 мМ с длительностью воздействия 6 ч снижал накопление циклоспорина А (субстрата Р-gp) не менее чем на 30% (p=0,05), что свидетельствует о повышении активности белка-транспортера. При концентрации SNAP 1 мМ также отмечалось и повышение количества Р-gp, оцененное методом вестерн-блот [117].

На клеточной линии GPNT, представляющей собой иммортализованную линию эндотелиальных клеток головного мозга крысы, было выявлено, что донор NO SNAP в концентрации 1 мМ повышал уровни мРНК генов *mdr1a* и *mdr1b*, кодирующих Р-gp у грызунов, а также количество самого белка через 24 ч воздействия [114].

В исследовании на клетках линии аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2 было выявлено, что нитропруссид натрия (SNP) – донор NO, в концентрациях 0,1 или 2 мМ при краткосрочном воздействии (4 ч) снижал активность и количество Р-gp, а 24-часовая экспозиция, напротив, повышала активность и количество белка-транспортера. В данном исследовании также было высказано предположение, что повышение активности Р-gp (количество при этом не оценивалось) связано с влиянием NO на протеинкиназу С (ПКС), фосфоинозитид-3-киназу/протеинкиназу В (PI3K/Akt), митоген-активируемую протеинкиназу p38 (p38 MAPK) [38].

Таким образом, на данный момент полученные результаты о влиянии NO на количество и активность Р-gp носят противоречивый характер, и механизм данного влияния не установлен.

На кафедре фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России более 10

лет изучаются особенности функционирования белка-транспортера Р-gp. В частности, установлены механизмы влияния половых и тиреоидных гормонов на активность и количество Р-gp, оценена принадлежность этилметилгидроксипиридина, фабомотизола, этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина на принадлежность к субстратам, индукторам, ингибиторам белка-транспортера [3, 13, 14, 25, 26].

На кафедре биологической химии с курсом КЛД ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России в течение многих лет изучается роль оксида азота (II), его дефицита и гиперпродукции в патогенезе развития ряда заболеваний [4, 12, 20].

Таким образом, изучение механизмов влияния NO на количество и активность Р-gp является логичным продолжением научных направлений исследований в ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Цель исследования

Изучить влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на количество и активность белка-транспортера Р-гликопротеина и оценить роль цГМФ-сигнального пути, ядерного фактора эритроидного происхождения 2, прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора в данном процессе.

Задачи исследования

1. Изучить влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на относительное количество белка-транспортера Р-гликопротеина на клетках линии Сасо-2 *in vitro*.
2. Изучить влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на активность белка-транспортера Р-гликопротеина на клетках линии Сасо-2 *in vitro*.
3. Установить роль нитрозативного стресса в механизме влияния донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на количество и активность белка-транспортера Р-гликопротеина.
4. Оценить роль цГМФ-сигнального пути в механизме влияния донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на количество белка-транспортера Р-

гликопротеина.

5. Оценить роль ядерного фактора эритроидного происхождения 2 в механизме влияния донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на количество белка-транспортера Р-гликопротеина.

6. Оценить роль прегнан X рецептора в механизме влияния донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на количество белка-транспортера Р-гликопротеина.

7. Оценить роль конститутивного андростанового рецептора в механизме влияния донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на количество белка-транспортера Р-гликопротеина.

Научная новизна

В ходе выполнения работы на клетках линии Caco-2 *in vitro* впервые:

1. показано разнонаправленное действие донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на количество и активность белка-транспортера Р-гликопротеина в зависимости от концентрации и длительности воздействия;

2. установлено, что снижение количества и активности Р-гликопротеина под действием донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона связано с повреждением его молекулы вследствие развития нитрозативного стресса;

3. выявлено, что повышение относительного количества Р-гликопротеина при воздействии низких концентраций донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь и конститутивный андростановый рецептор, а при увеличении концентрации S-нитрозоглутатиона – через ядерный фактор эритроидного происхождения 2;

4. доказано, что прегнан X рецептор не участвует в регуляции Р-гликопротеина под действием донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе исследования на клетках линии Caco-2 установлены механизмы разнонаправленного влияния донора NO S-нитрозоглутатиона (GSNO) на

количество и активность белка-транспортера P-gr. В частности, показано, что снижение количества и активности P-gr связано с повреждением его молекулы вследствие развития НС.

Повышение количества P-gr при воздействии низких концентраций донора NO – GSNO реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь и CAR, а при увеличении концентрации – через Nrf2.

Результаты работы имеют важное практическое значение. Проникновение веществ через монослой клеток линии Caco-2 является классической модельной системой абсорбции веществ в тонком кишечнике.

Изменение активности P-gr под действием донора NO расширяет представление об абсорбции веществ-субстратов белка-транспортера в тонком кишечнике при развитии заболеваний, сопровождающихся НС (заболевания желудочно-кишечного тракта [123], нервной системы [91], органов дыхания [70]), а также при их совместном назначении с лекарственными препаратами – донорами NO, например нитратами, что, в свою очередь, повысит эффективность и безопасность проводимой фармакотерапии.

Методология и методы исследования

Работа выполнена *in vitro* с использованием клеточной линии аденокарциномы ободочной кишки человека (линии Caco-2).

В качестве донора NO использовали GSNO.

Цитотоксическое действие GSNO оценивали по результатам МТТ-теста.

Уровень метаболитов NO, концентрацию пероксинитрита, белковых и безбелковых SH-групп в лизате клеток оценивали спектрофотометрически, содержание битирозина – спектрофлуориметрическим методом.

Относительное количество P-gr анализировали методом вестерн-блот. Активность белка-транспортера оценивали по транспорту его субстрата – фексофенадина через монослой клеток. Концентрацию фексофенадина в транспортной среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ детектированием.

Роль цГМФ-сигнального пути, Nrf2, PXR, CAR в регуляции функционирования P-гр была изучена с помощью применения специфических ингибиторов данных факторов.

Полученные результаты анализировались с помощью программ «Statsoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и GraphPad Prism 8.

Положения, выносимые на защиту

1. На клетках линии Caco-2 донор оксида азота (II) S-нитрозоглутатион в концентрациях 10-100 мкМ при 24 ч инкубации и в концентрации 10 мкМ при 72 ч воздействии вызывает индукцию P-гликопротеина, а в концентрации 500 мкМ при 24 ч экспозиции и концентрациях 100 и 500 мкМ при 72 ч воздействии снижает количество белка-транспортера.

2. Изменение количества P-гликопротеина под действием донора оксида (II) азота S-нитрозоглутатиона сопровождается аналогичным по направленности изменением его активности.

3. Снижение количества и активности P-гликопротеина под действием донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона связано с повреждением его молекулы вследствие развития нитрозативного стресса.

4. Повышение относительного количества P-гликопротеина под действием низких концентраций донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона (10-50 мкМ) осуществляется через цГМФ-сигнальный путь и конститутивный андростановый рецептор (10 мкМ).

5. При увеличении концентрации S-нитрозоглутатиона (50-100 мкМ) в механизм индукции P-гликопротеина под действием оксида азота (II) вносит вклад фактор эритроидного происхождения 2.

6. Прегнан X рецептор не участвует в регуляции P-гликопротеина под действием донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена

достаточным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием адекватных и современных методов исследования с последующей систематизацией и статистической обработкой.

Основные положения диссертации представлены, обсуждены и опубликованы в материалах конференций: XXIV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2021); XXIV Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2021); III Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Естественнонаучные основы медико-биологических знаний» (Рязань, 2021); «XXIX Международной конференции и дискуссионном научном клубе. Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Весенняя сессия NT + ME`2020» (Республика Крым, Ялта-Гурзуф, 2021); Научно-практического круглого стола с международным участием «Актуальные проблемы фундаментальных и прикладных исследований», посвященного 80-летию юбилею доктора медицинских наук, профессора, академика российской академии естествознания, члена европейской академии естествознания, заслуженного деятеля науки и образования, заслуженного профессора НАО «Медицинский университет Семей» С.О. Тапбергенова (Семей, 2021); VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2021); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2022); XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2022); XXVIII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2022» (Санкт-Петербург, 2022); «XXX Международной конференции и дискуссионного научного клуба. Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. New Information

Technology in Medicine, Pharmacology, Biology and Ecology. NT + ME`2022» (Республика Крым, Ялта-Гурзуф, 2022); VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2022).

Апробация работы состоялась 19 декабря 2022 года на заседании кафедр ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России: фармакологии; биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО; фармацевтической химии; фармацевтической технологии; биологии; онкологии; сердечно-сосудистой и рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики; управления и экономики фармации; фармакогнозии.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации № МК-1856.2020.7.

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты диссертационной работы успешно внедрены и используются в учебном процессе при обучении студентов и клинических ординаторов на кафедрах биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО и фармакологии, а также в деятельность центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Автор самостоятельно подготовил обзор литературы по направлению темы диссертационной работы; провел эксперименты *in vitro*; выполнил биохимические исследования; обработал и интерпретировал полученные результаты; подготовил печатные работы по изучаемой проблематике. В целом личный вклад автора в исследование превышает 90%.

Сведения о публикациях по теме диссертации

По результатам диссертационной работы опубликовано 13 работ: 3 статьи в

рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и входящих в базы Web of Science и Scopus; 10 тезисов докладов – в материалах Российских и международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 113 страницах и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы.

Диссертация иллюстрирована 25 рисунками и 8 таблицами. Список литературы представлен 188 источниками, из них 27 отечественных и 161 зарубежных авторов.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность к.б.н., доценту Абаленихиной Ю.В. и к.б.н. Мыльникову П.Ю. за всестороннюю помощь на всех этапах исследования, при подготовке и публикации печатных работ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Физиологические и патологические эффекты оксида азота (II)

Молекула оксида азота (NO) была открыта в 1722 г. английским исследователем J. Priestley [82].

Спустя почти 200 лет R. Furchgott и J. Zawadzki выявили сигнальную функцию NO в биологических системах [77], а в 1998 г. R. Furchgott, L. Ignarro и F. Murad была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине за установление роли NO в регуляции работы сердечно-сосудистой системы [24].

На сегодняшний день доказано, что данная молекула обладает широким спектром действия, принимая участие в клеточном сигналинге [1, 18, 79, 139, 163, 184], в частности, модулирует функционирование органов желудочно-кишечного тракта [184], дыхательной [163], мочевыделительной систем [139], выступая нейротрансмиттером как в центральной, так и периферической нервной системе, контролирует секрецию нейромедиаторов (катехоламинов, серотонина, ацетилхолина), благодаря антимикробному эффекту участвует в иммунном ответе [1].

NO регулирует как пролиферацию, так и запрограммированную гибель клеток, участвует в секреторной, гормональной и репродуктивной функциях организма [18].

1.1.1. Синтез оксида азота (II)

Синтез NO может осуществляться ферментативным и неферментативным путем. В основном синтез NO протекает по пути ферментативного окисления бокового радикала аминокислоты L-аргинина с помощью синтаз оксида азота (NOS) (КФ 1.14.13.39) [9, 99, 156].

В ходе реакции атом азота гуанидиногруппы L-аргинина окисляется молекулярным кислородом при участии никотинамидного кофермента НАДФН₂ с образованием новой аминокислоты L-цитрулина и собственно NO (Рисунок 1) [32].

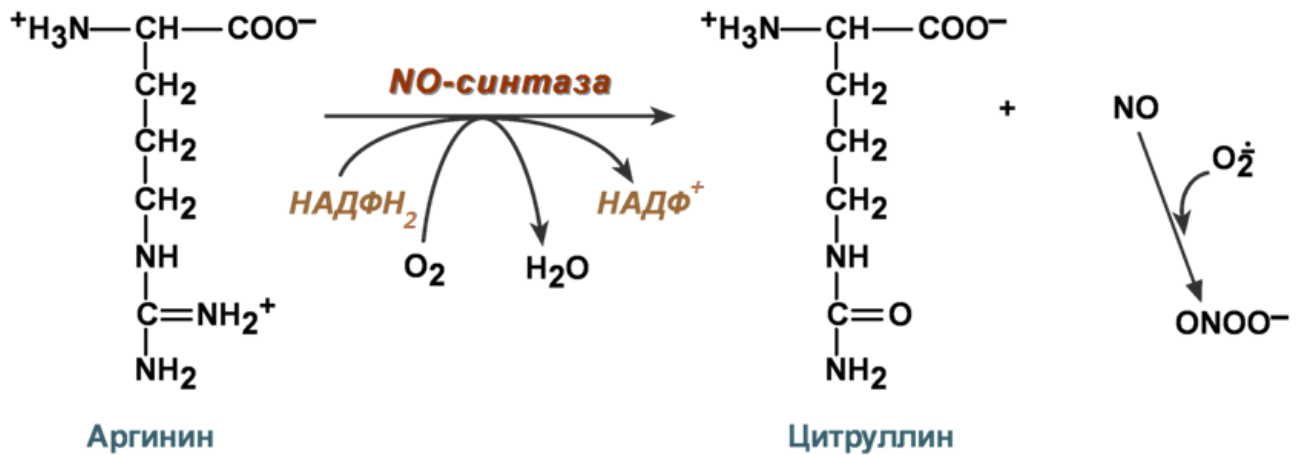


Рисунок 1 – Ферментативный синтез оксида азота из L-аргинина

В настоящее время известны следующие формы NOS:

1) конститутивная NOS (kNOS, кальмодулин/ Ca^{2+} -зависимая) – базальный синтез этого фермента довольно высокий и не зависит от стрессовых воздействий на клетки. К ней относится нейрональная (nNOS или NOS I) и эндотелиальная (eNOS или NOS III) NOS.

2) индуцибельная NOS (iNOS или NOS II, Ca^{2+} -независимая) – находится в тканях в малых количествах, но при воздействии стрессовых агентов на клетки синтез фермента резко возрастает [8, 73, 95].

Регуляция активности NOS может осуществляться несколькими путями, такими как фосфорилирование, нитрозилирование, взаимодействие с другими протеинами, доступность ко-фактора/субстрата и изменения в транскрипции генов, кодирующих NOS [74, 133].

Основным механизмом активации синтеза NO служит регуляция на уровне транскрипции гена, кодирующего iNOS, через сайты связывания ядерного фактора каппа В (NF- κ B) и белка, связывающего элемент ответа фосфорилированного циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) (pCREB) в его промоторной области [92].

Как только экспрессия гена, кодирующего iNOS, запускается, происходит увеличение генерации NO в течение длительного периода времени [92].

Фактор некроза опухоли- α , интерлейкин- 1β , интерферон- γ , липополисахарид и РНК являются пусковыми факторами для повышения экспрессии iNOS [95, 124].

Неферментативный синтез NO возможен при взаимодействии гуанидиноаминокислоты аргинина с H_2O_2 . Еще один вариант синтеза NO, не зависящий от NOS, это восстановление нитрита при изменении клеточного гомеостаза и в кислых условиях [2, 188].

Таким образом, образование оксида азота (II) может происходить разными способами, что позволяет данной молекуле участвовать в многочисленных физиологических и патологических процессах и гибко реагировать на изменение условий внутренней среды.

1.1.2. NO-pГЦ-цГМФ-сигнальный путь

NO-pГЦ-цГМФ (оксид азота II-растворимая гуанилатциклаза-циклический гуанозинмонофосфат)-сигнальный каскад является классическим механизмом передачи информации от NO внутрь клеток.

Осуществляется он посредством гемсодержащего белка – NO-чувствительной растворимой гуанилатциклазы (pГЦ) (Рисунок 2) [95].

Фермент гуанилатциклаза (ГЦ) (КФ 4.6.1.2), называемый так же как гуанилциклаза или гуанилилциклаза [162], катализирует превращение пуринового нуклеотида гуанозинтрифосфата (ГТФ) в его циклическую форму – 3',5'-циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) и пирофосфат. цГМФ представляет собой вторичный мессенджер при передаче сигнала внутрь клетки от различных лигандов [85].

В отсутствие лигандов наблюдается низкий базовый уровень активности pГЦ. При добавлении NO или низкомолекулярных доноров NO наблюдается увеличение активности pГЦ [70].

Это объясняется тем, что pГЦ является физиологическим сенсором NO. При связывании NO с pГЦ скорость образования цГМФ существенно увеличивается, эффективно усиливая исходный сигнал NO.

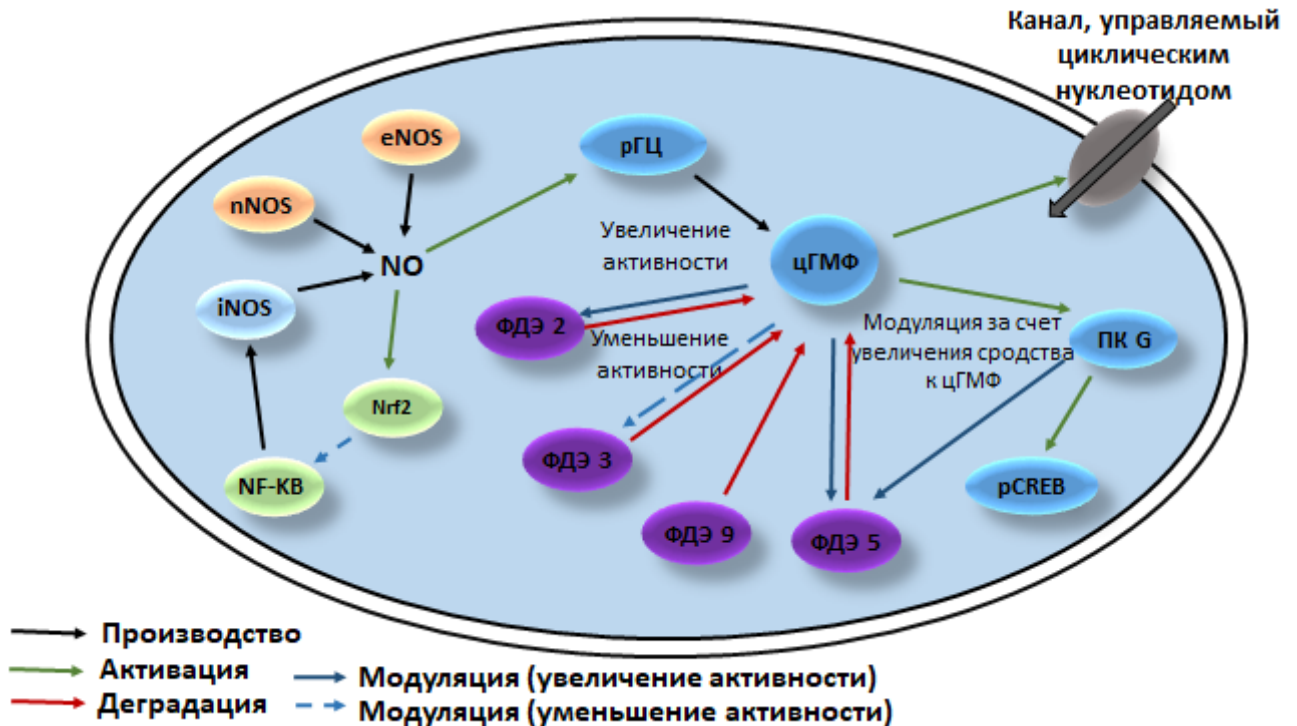


Рисунок 2 – Сигнальный путь NO-рГЦ-цГМФ (цит. по: Jehle A. et al., 2022) [95]

Примечание: nNOS: нейрональная NOS; eNOS: эндотелиальная NOS; iNOS: индуцибельная NO; рГЦ: растворимая гуанилатциклаза; Nrf2: ядерный фактор эритроидного происхождения 2; NF-κB: ядерный фактор каппа В; цГМФ: 3',5'-циклический гуанозинмонофосфат; ФДЭ: фосфодиэстераза; ПК G: протеинкиназа G; pCREB: белок связывающий элемент ответа фосфорилированного циклического аденозинмонофосфата.

Выступая посредником NO, рГЦ участвует в регуляции клеточного гомеостаза. Она контролирует различные патофизиологические процессы во многих органах и тканях. Еще в конце 20-го столетия было установлено, что данный фермент принимает участие в регуляции артериального давления, тонуса сосудов, агрегации тромбоцитов [64, 102].

Более современные исследования выявили роль рГЦ как нейротрансмиттера [154], в частности в результате белок-белковых взаимодействий, опосредуя передачу гормональных сигналов, а также ответы на абиотические и биотические стрессы, регулирует ионный гомеостаз [56, 110]. Нарушение сигналинга NO-рГЦ обуславливает развитие ряда заболеваний, таких как артериальная гипертензия

[43], эректильная дисфункция [129], нейродегенеративные заболевания [159]. Кроме того, рГЦ увеличивает уровни мРНК и белков прегнан Х рецептора (PXR) и рецептора ретиноевой кислоты (RXR), что усиливает опосредованную ксенобиотическими рецепторами индукцию экспрессии ферментов CYP2B6, CYP2C9, CYP3A4 (изоформы монооксигеназы цитохрома P 450) [103].

Образующийся в результате работы рГЦ цГМФ выступает универсальным вторичным мессенджером, активирующим ряд биохимических каскадов и обуславливающим биологические эффекты NO, тем самым регулируя функцию многих типов клеток, включая клетки тонкого кишечника, гладкомышечные клетки, кардиомиоциты, фибробласты, адипоциты и нейроны [35, 46].

Дальнейшее инициирование сигнальных путей в клетке протекает по типу белок-белковых взаимодействий. Мишенями для цГМФ являются 3 класса протеинов. Это сериновые и/или треониновые специфические киназы: протеинкиназы G (PKG-1, PKG-2), кодируемые генами *Prkg 1* и *Prkg 2* [47, 95, 161], цГМФ-регулируемая фосфодиэстераза (ФДЭ) и ионные каналы (Рисунок 2) [74, 93].

Высокий уровень экспрессии PKG-1 представлен в сердечно-сосудистой системе, экспрессия PKG-2 встречается в клетках костной ткани, кишечника, головного мозга и почек. Так же, PKG-1 и PKG-2 были выделены в остеобластах и хондробластах [48]. Доказано, что PKG-2 оказывает нейротропный эффект на светочувствительные рецепторы сетчатки (колбочки) мыши [161]. Она участвует в регуляции секреции электролитов и воды эпителиальными тканями, а также, в секреции ренина почками, альдостерона надпочечниками и в регуляции биологических часов [176].

После получения сигнала от цГМФ PKG-1 и PKG-2 приобретают фосфотрансферазную активность, что способствует активации дальнейших мишеней в клетках в результате фосфорилирования [95]. Мишенями выступают белковые молекулы, контролирующие различные биохимические процессы. Ярким примером служит сердечно-сосудистая система, где PKG контролирует расслабление гладкой мускулатуры сосудов. Еще одним из примеров выступает

нервная система, где, фосфорилируя протеины, PKG контролирует многие функции мозга, включая поведенческие реакции [143] и контроль долговременной памяти [80]. Данный фермент также активирует сигнальный путь фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3k/Akt), который обеспечивает нейропротекцию посредством ингибирования апоптоза [58]. В клетках рака молочной железы (SUM159) активированная PKG усиливает индуцированный апоптоз [30]. По механизму отрицательной обратной связи PKG может ингибировать сигнал от NO-pГЦ [95, 132].

PKG является центральным посредником сигнального пути NO-pГЦ-PKG, который регулирует многие важные клеточные процессы.

ФДЭ – ключевые внутриклеточные ферменты (КФ 3.1.4), гидролизующие циклические нуклеотиды (цАМФ и цГМФ), которые имеют структурные и функциональные особенности.

Специфичность ФДЭ к своим субстратам различна. Из 11 известных семейств этих ферментов только 3 являются цГМФ-зависимыми. Это 5, 6 и 9 типы ФДЭ. ФДЭ 4, 7, 8 – цАМФ-зависимые, остальные типы могут гидролизовать как цАМФ, так и цГМФ [30, 58, 140].

Обнаружены эти ферменты в большинстве клеток и тканей. Высокий базальный уровень экспрессии ФДЭ выявлен в центральной нервной системе. Примером служат цГМФ-зависимые ФДЭ 5 и 9 типов [95]. Также эти типы локализованы в кавернозном теле [54, 130]. Считается, что ФДЭ 5 улучшает гемодинамические показатели [55], а экспрессия и активность ФДЭ 9 увеличивается у пациентов с сердечной недостаточностью [86]. ФДЭ 6 экспрессируется только в сетчатке [95].

Еще одной мишенью для цГМФ служат ионные каналы. Эти белковые структуры обладают внутриклеточным лиганд-связывающим доменом, к которому могут присоединяться циклические нуклеотиды, что приводит к притоку ионов Na^+ и Ca^{2+} и оттоку K^+ [36]. Также цГМФ может запускать фосфорилирование водного канала – аквапорина 2 типа и индуцировать его накопление в мембранах независимо от вазопрессина [160].

В начале XXI века было показано, что в палочках и колбочках сетчатки может возникать как снижение, так и увеличение уровня цГМФ под действием кванта света. Свет активирует ФДЭ для уменьшения уровня цГМФ, вследствие этого закрываются неселективные катионные каналы для нециклических нуклеотидов, что приводит к гиперполяризации мембраны [126, 186]. И напротив, активация ГЦ под действием света у морского гребешка вызывает гиперполяризацию мембраны, за счет повышения концентрации цГМФ, что приводит к открытию K^+ -селективных каналов [57].

Таким образом, передача сигнала NO осуществляется посредством ряда белок-белковых взаимодействий, в результате которых изменяется функциональная активность различных ферментов, регулирующих многие важные клеточные процессы.

1.1.3. Физиологическая и патофизиологическая роль NO-pГЦ-цГМФ сигнального пути

NO-pГЦ-цГМФ сигнальный каскад является критическим регулятором энергетического обмена миокарда, функций эндотелия [178], играет важную роль в вазодилатации и ремоделировании сосудов [81], а также работе почек [168], включая контроль почечного кровотока, гломерулярной гемодинамики, транспорта воды и солей в канальцевой системе [98, 151].

Повышение уровня цГМФ может оказывать антифибротическое действие за счет прямого влияния на фибробласты и миофибробласты [140].

цГМФ участвует в релаксации и моторике гладкой мускулатуры желудочно-кишечного тракта. Кроме того, NO и pГЦ регулируют локальный кровоток в ЦНС в ответ на активность нейронов посредством процесса, известного как функциональная гиперемия [68].

В экспериментах на мышях выявлено участие NO-pГЦ-цГМФ пути в антидепрессантоподобном эффекте пиридоксина за счет повышения уровня серотонина и снижения уровня нитрита в мозге мышей [104]. Передавая сигналы через цГМФ, NO вызывает периферическую анальгезию и может быть вовлечен в

обезболивающий эффект эндогенных веществ [74].

В результате нарушения регуляции сигнального пути NO-pГЦ-цГМФ возникают различные патологические состояния, как хронического, так и острого характера, включая артериальную гипертензию и другие сердечно-сосудистые заболевания, нейродегенеративные заболевания, бронхиальную астму [182]. Снижение уровня NO играет центральную роль в патогенезе легочной гипертензии [44, 81]. Дефицит цГМФ вызывает системную, коронарную и почечную микроциркуляторную дисфункцию, что может привести к прогрессирующему повреждению клеток миокарда и почек и дальнейшему воспалению [178].

На мышинных моделях синдрома Марфана и у пациентов с тем же заболеванием было показано, что активация сигнального пути NO-pГЦ-ПКГ опосредует развитие аортопатий [35]. В других исследованиях на животных моделях нарушение сигналинга от NO к цГМФ приводило к изменениям в поведенческих реакциях, связанных с тревогой [181]. У мышей, лишенных pГЦ, развивалась фатальная желудочно-кишечная непроходимость [69], а также офтальмологическая патология, похожая на глаукому [152].

Таким образом, имеющиеся в мировой литературе данные демонстрируют многогранную роль NO-pГЦ-цГМФ сигнального пути в клетках, как в условиях нормы, так и при развитии патологических процессов.

1.1.4. Гиперпродукция оксида азота (II)

NO обладает высокой реакционной способностью за счет наличия неспаренного электрона на внешней π -орбитали [84]. NO относительно медленно реагирует с большинством биологических молекул, но активно взаимодействует со свободными радикалами: гидроксильным ($\text{OH}\cdot$), супероксид-анионом ($\text{O}_2^{\cdot-}$), пероксильным ($\text{ROO}\cdot$), тиильным ($\text{RS}\cdot$) и радикалом тирозина ($\text{Tир}\cdot$). Основными конечными продуктами окисления оксида азота (II) являются химически инертные нитратные ионы, способные вновь превращаться в NO при восстановлении [2].

Данными химическими свойствами обусловлена двойственная роль оксида азота в клетках. В низких концентрациях 1 нМ - 1 мкМ NO оказывает регуляторное

действие (подробно описана в подразделах 1.1.2 и 1.1.3) (Таблица 1) [185].

Таблица 1 – Эффекты оксида азота в клетке в зависимости от его концентрации (цит. по: Yang T. et al., 2018) [185]

Концентрация NO	Механизм передачи сигнала
<1-30 нМ	Фосфорилирование киназ, регулируемых внеклеточным сигналом
30-60 нМ	Фосфорилирование протеинкиназы B
100 нМ	Стабилизация фактора, индуцируемого гипоксией 1 α
400 нМ	Фосфорилирование и ацетилирование p53
>1 мкМ	Нитрозилирование белков (полимеразы, каспазы)

В то же время, при повышении концентрации, увеличении длительности экспозиции и гиперпродукции свободных радикалов, NO может вызывать повреждение клеток [84, 156].

Избыточные концентрации NO, взаимодействуя с супероксидным анион-радикалом O₂⁻, превращаются в активные формы азота (АФА): NO[•], NO⁻, ONOO⁻, NO₂[•]. Повышение концентрации NO и АФА обуславливает развитие нитрозативного стресса [76]. Нитрозативный стресс (НС) – это процесс, характеризующийся изменением клеточного гомеостаза, развитием комплекса патологических процессов и ответных реакций вследствие увеличения концентрации NO, АФА, которые обладают цитотоксическим действием [15]. Накопление АФА при НС влечет за собой биохимические и метаболические перестройки в клетке.

Пероксинитрит (ONOO⁻) является преобладающей из образующихся молекул АФА. ONOO⁻ в малых концентрациях может биотрансформироваться или оказывать сигнальное действие через протеинкиназу B (ПКВ), протеинкиназу C (ПКС), внеклеточный киназный сигнальный каскад (ERK), митоген-активируемую

протеинкиназу (МАРК), NF- κ B.

При высоких концентрациях ONOO^- выступает в качестве цитотоксического агента. ONOO^- может ковалентно модифицировать белки посредством окисления или нитрозилирования остатков цистеина, метионина, триптофана и тирозина [2, 160].

Важной характеристикой НС является процесс S-нитрозилирования, что представляет собой неферментативную посттрансляционную модификацию белков по тиольным группам (промежуточные соединения NO, ковалентно присоединяются к сульфгидрильным группам остатков цистеина и метионина) [78, 79, 158].

В результате данного процесса тиолы белков образуют различные окислительные модификации, такие как сульфеновая кислота, сульфиновая кислота, сульфоновая кислота, дисульфидные связи, S-глутатионилированные и S-нитрозилированные производные. Эти окислительные модификации тиолов запускают множество клеточных процессов, таких как экспрессия генов, изменение энергетического метаболизма, фосфорилирование белков [28, 115, 126]. Также было показано, что нитрозилирование протеинов модулирует их активность и стабильность [135, 147].

Под воздействием ONOO^- происходит нитрозилирование по аминокислотным остаткам триптофана и тирозина в зависимости от условий, в которых протекают данные химические реакции. В присутствии гемсодержащих пероксидаз и H_2O_2 происходит модификация триптофана с образованием преобладающего продукта 6-нитротриптофана. При наличии CO_2 и активных форм кислорода (АФК) увеличивается скорость нитрозилирования тирозина с образованием 3-нитротирозина. Оба метаболита (6-нитротриптофан и 3-нитротирозин) служат маркерами НС [2, 61, 150, 174].

Считается, что самой распространенной модификацией является нитрозилирование по остаткам тирозина, так как 3-нитротирозин и образующийся из него в реакции конденсирования битирозин наиболее стабильны [76].

Кроме этого, ONOO^- способен нитрозилировать нуклеиновые кислоты и

липиды с образованием 8-нитро-цГМФ и ROONO^- соответственно [77].

Образование токсичного ONOO^- значительно нарушает баланс между про- и антиоксидантами, за счет инактивации антиоксидантных ферментов, катализирующих окислительно-восстановительные реакции, например, Mn-супероксиддисмутазы (КФ 1.15.1.1) в результате модификаций по аминокислотным остаткам тирозина; глутатионпероксидазы (КФ 1.11.1.12) – в результате модификаций по остаткам цистеина [2, 16].

АФА также модулируют функции ферментов, таких как оксидоредуктазы (КФ. 1.6), трансферазы (метилтрансферазы (КФ 2.1), киназы (КФ 2.7)), гидролазы (металлопротеиназы (КФ 3.4.24), ФДЭ (КФ 3.1.4)), а также изменяют работу ионных каналов и ядерных рецепторов [16].

В результате таких молекулярных перестроек может повыситься риск повреждения не только наружных мембран клеток, но и внутриклеточных структур [2]. Так, синтез в митохондриях ONOO^- приводит к ингибированию работы митохондриальной цепи переноса электронов. Изменение редокс-потенциала комплексов дыхательной цепи, повреждение липидов и ферментов митохондриальной мембраны приводит к снижению синтеза аденозинтрифосфата [18, 183], что приводит к развитию гипохорических состояний клеток.

Таким образом, NO может оказывать разнонаправленное воздействие на биологические системы. С одной стороны, NO-биохимический каскад играет важную роль в регуляции функционирования организма, с другой стороны, гиперпродукция NO может приводить к образованию АФК, развитию НС и гибели клеток за счет повреждения нуклеиновых кислот, белков, липидов.

1.1.5. Доноры оксида азота (II) в экспериментальных исследованиях

Молекула оксида азота (II) является короткоживущей (период полураспада NO от 0,1 до 5 с в водных растворах), поэтому в экспериментальных исследованиях для повышения уровня оксида азота используют ряд его доноров (Рисунок 3) [11, 33, 53, 134]. Основными классами доноров NO являются: *производные гуанидина, органические нитраты (RONO_2) и нитриты (RONO), комплексы*

нитрозилированных металлов, *S*-нитрозотиолы (*RSNO*) [11, 84, 134, 148].



Рисунок 3 – Экзогенные доноры оксида азота (цит. по: Граник В.Г. и др., 1996)

[11]

Производные гуанидина. На данный момент известен целый ряд *N*-гидроксигуанидинов, которые синтезированы взаимодействием соответствующих цианамидов с гидроксиламином. В водных растворах соединения разлагаются с различной скоростью и высвобождением NO (без участия NOS), при этом оптимальный pH – 1–1,5, что резко отличается от физиологических значений. Кроме этого, производные гуанидина дают аддукты неизвестной природы. По биологическому действию данная группа доноров NO значительно уступает другим производным. Так, *S*-метилтиогуанидин существенно слабее активирует рГЦ и обладает меньшим эффектом, чем тиоловые производные [10, 71].

Кроме того, другое производное гуанидина, N^G -гидрокси-L-аргинин ингибирует пролиферацию клеток Caco-2. N^G -гидрокси-L-аргинин вызывает цитостаз клеток посредством различных механизмов, например, ингибирования аргиназы и орнитиндекарбоксилазы, которые участвуют в превращении аргинина

в полиамины, необходимые для пролиферации клеток [112]. Следовательно, гуанидины и родственные им соединения можно с осторожностью рассматривать в качестве доноров NO.

Органические нитраты (RONO₂) представляют собой сложные эфиры азотной кислоты одно- и многоатомных спиртов. Основными представителями являются нитроглицерин, тетранитрат пентаэритрита, изосорбида динитрат. Органические нитраты получают путем этерификации соответствующих спиртов или замещения между реакционноспособными алкилгалогенидами и AgNO₃. Большинство RONO₂ мало растворимы в воде, поэтому нуждаются в предварительной обработке этанолом или диметилсульфоксидом (ДМСО). Биологические эффекты нитратов связаны с синтезом NO, образование которого может происходить ферментативным (NOS) и неферментативным путем. Предполагается, что клеточные тиолы участвуют в неферментативном образовании NO из нитроглицерина [116].

При использовании органических нитратов стоит учитывать, что их активность значительно ослабевает после длительного или повторного воздействия, что описано в литературе как «толерантность к нитратам» и связано с истощением тиолов [83].

Применение нитроглицерина на клетках линии Caco-2 приводит к снижению митохондриального дыхания, при этом не оказывает прямого воздействия на целостность клеточного монослоя [121]. Таким образом, потребность в специфических тиолах и/или ферментативной биоактивации для высвобождения NO делает органические нитраты не очень удобными соединениями для образования NO *in vitro*.

Органические нитриты (RONO) представляют собой сложные эфиры спиртов и азотистой кислоты. По химической природе и синтезу они схожи с органическими нитратами: нитриты также реагируют с тиолами, но менее стабильны, чем нитраты [11].

Комплексы нитрозилированных металлов (NO-металло-комплексы). NO – лиганд для ионов металлов, обладающий большей константой связывания по

сравнению с CO и O₂ [10, 116]. С одной стороны, для NO мишенью являются металлоцентры (например, железо), с другой стороны, комплексы нитрозилированных металлов могут быть донорами NO. Наиболее изученным нитрозилком металла является нитропруссид натрия (SNP) (Na₂[Fe(CN)₅NO]). Нитрозилированные металлы характеризуются изменчивой природой лиганда NO, что проявляется переходом от Me-NO⁻ к Me-NO⁺ с увеличением степени окисления металла и это во многом определяет реакционную способность NO. Стоит учитывать, что SNP способен усиливать токсическое действие прооксидантов, например, H₂O₂. В то же время, динитрозильные комплексы железа с глутатионовыми лигандами ингибируют свободнорадикальное перекисное окисление липидов, а также перехватывают супероксидный радикал [7]. Таким образом, NO-металло-комплексы, в большей степени выступают в качестве депо NO.

S-нитрозотиолы представляют собой природный, эндогеннообразующийся класс доноров NO и естественных депо NO в биологических системах [122, 135]. Данные вещества обнаружены в клетках при физиологических условиях в низких, но поддающихся измерению количествах. Индукция iNOS при патологических состояниях (например, ишемии) вызывает увеличение уровня *S*-нитрозотиолов [41].

Наиболее распространенным *S*-нитрозотиолом в клетках, является *S*-нитрозоглутатион (GSNO). GSNO представляет собой *S*-нитрозилированное производное глутатиона и считается важным медиатором сигнальных эффектов оксида азота (II) [41].

Синтез нитрозотиолов *in vitro* представляет собой несколько реакций между тиолами и NO₂, а также N₂O₃ и нитрит-анионом. Самый применяемый метод – это нитрозирование с использованием азотной кислоты в кислой среде. В физиологических условиях данный процесс происходит ферментативно, так как энергия разрыва связи может снижаться на несколько порядков [10, 116].

Также GSNO может образовываться в результате взаимодействия ONOO⁻ с глутатионом, которое представляет собой путь детоксикации ONOO⁻. Реакция идет

при участии селенсодержащей глутатионпероксидазы (GPx КФ 1.11.1.9) (Рисунок 4) [96].

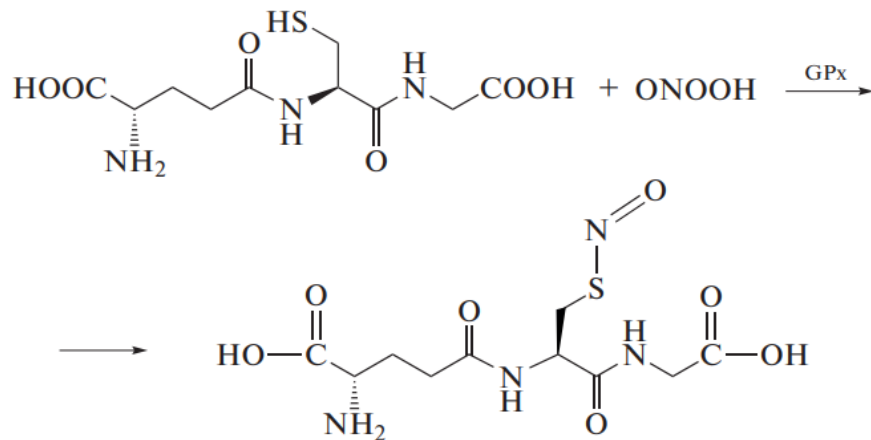


Рисунок 4 – Взаимодействие пероксинитритной кислоты с глутатионом в присутствии селенсодержащей глутатионпероксидазы (GPx КФ 1.11.1.9) (цит. по: Абаленихина Ю.В. и др., 2020) [2]

Под действием S-нитрозоглутатионредуктазы (КФ 1.2.1.1.46) GSNO быстро и необратимо разлагается на NO и глутатион [136], поэтому гомеостатический уровень GSNO в клетке низкий.

Некоторые авторы считают, что GSNO может непосредственно вызывать активацию классического рГЦ-цГМФ-зависимого пути или нитрозилирование определенных белков [149].

GSNO может оказывать протекторное действие при гиперпродукции свободных радикалов [131]. Показано, что GSNO защищает от окислительного стресса клетки сердечно-сосудистой и нервной систем через активацию сигнальных путей активатора транскрипции 3 (STAT3) [137, 147, 153].

Эффекты GSNO могут зависеть от концентрации и времени воздействия. При добавлении GSNO к клеточной линии immortalized preadipocytes 3 (T3-L1) показано, что концентрации донора NO ≥ 500 мкМ проявляют токсический эффект: жизнеспособность клеток, концентрация белка и триацилглицеридов снижается. Концентрации ниже 500 мкМ приводят к запуску процесса нитрозилирования, что представляет собой важный физиологический

регуляторный механизм созревания жировых клеток [146]. Концентрация GSNO 50 мкМ также проявляет регуляторное действие: при обработке В-клеток селезенки количество образующихся интерлейкинов возрастает [136]. Следовательно, концентрации GSNO от 1 до 100 мкМ оказывают регуляторное действие [136, 149], а концентрации выше 500 мкМ являются токсичными [146].

Таким образом, доноры NO пролонгируют физиологическое время жизни данной молекулы и защищают ее от окисления. Данные вещества отличаются физико-химическими свойствами, кинетикой высвобождения NO, токсичностью, биологической активностью. Вследствие естественного образования S-нитрозотиолов в клетках, эти молекулы являются менее токсичными для биологических систем [116]. Именно поэтому GSNO в последние годы все шире применяется в виде донора NO.

1.2. Р-гликопротеин: структура, функции и механизмы регуляции

1.2.1. Структура и функции Р-гликопротеина

Р-гликопротеин (Р-gp) (*ABCB1/MDR1*) – трансмембранный белок, относящийся к семейству ABC-транспортеров, надсемейству АТФ-связывающих переносчиков и представляющий собой ксенобиотический эффлюксный насос, который ограничивает внутриклеточное накопление субстратов путем их выведения из клеток в межклеточное пространство [52].

Впервые Р-gp был идентифицирован в 1976 году Juliano R.L. и Ling V. в опухолевых клетках яичника китайского хомячка. При изучении данных клеток исследователи обнаружили мембранный гликопротеин, который изменял проницаемость для противоопухолевых препаратов, поэтому белок назвали Р-гликопротеином (permeability) [97].

В конце 80-х годов прошлого столетия были клонированы гены, кодирующие множественную лекарственную устойчивость (multidrug resistance, *MDR*-гены) и показано, что продуктом гена *MDR1* выступает Р-gp [165].

Синтез Р-gp осуществляется в эндоплазматическом ретикулуле в виде

неактивного предшественника с молекулярной массой 150 кДа. Последующее созревание происходит в комплексе Гольджи в процессе гликозилирования белковой молекулы транспортера. Далее зрелая молекула P-gp диффундирует на клеточную поверхность [101].

P-gp гиперэкспрессируется в опухолевых клетках, где опосредует развитие резистентности опухолей к химиотерапии, в том числе, принимает участие в формировании множественной лекарственной устойчивости [42, 107, 170, 180].

P-gp также обнаружен на апикальной мембране гепатоцитов, энтероцитов, клеток проксимальных канальцев почек, эндотелиоцитов капилляров головного мозга и ряда других тканей. Благодаря данной локализации P-gp препятствует чрезмерному всасыванию субстратов в системный кровоток из кишечника, способствует их гепатобилиарной и почечной элиминации и ограничивает проникновение через гематоэнцефалический [109] и плацентарный [107] барьеры.

Таким образом, P-gp играет важную роль в фармакокинетике лекарственных веществ (всасывании, распределении, выведении), ограничивая их системное воздействие [107]. Также P-gp участвует в транспорте эндогенных веществ (стероидных, тиреоидных гормонов, некоторых аминокислот) [7, 27].

По химической природе P-gp является сложным белком с молекулярной массой 170 кДа. Полипептидная цепь человеческого P-gp состоит из 1280 аминокислотных остатков, мышинового – из 1276 [52, 158, 180], 87% из которых идентичны человеческому P-gp [162]. Белок имеет доменное строение: два трансмембранных (transmembrane domains – TMD 1 и 2) и два цитозольных (nucleotide-binding domains – NBD 1 и 2) домена (Рисунок 5) [52, 158].

Вторичная структура TMD представлена шестью гидрофобными α -спиралями, которые пронизывая биполярный слой мембраны, проникают внутрь клетки, образуя внутриклеточные петли. Домены TMD образуют канал, по которому субстраты белка-транспортера проходят сквозь клеточную мембрану.

NBD имеют в своем составе 3 участка, в которых происходит гидролиз молекулы аденозинтрифосфата (АТФ). Это мотивы Walker A и Walker B и сигнатурный мотив ABC [52, 158]. Предполагается, что основные

конформационные изменения в Р-гр, открывающие сайт связывания во внеклеточную среду и ведущие к транспорту субстрата, происходят после связывания АТФ, а не после ее гидролиза. Подобным образом снижение аффинности связывания веществ с Р-гр, возможно, обусловлено изменением взаимодействия с АТФ, а не с нарушением ее гидролиза [60]. Гидролиз АТФ может быть ответственен за возврат транспортера к исходной конформации [141], позволяя произойти новому каталитическому циклу.

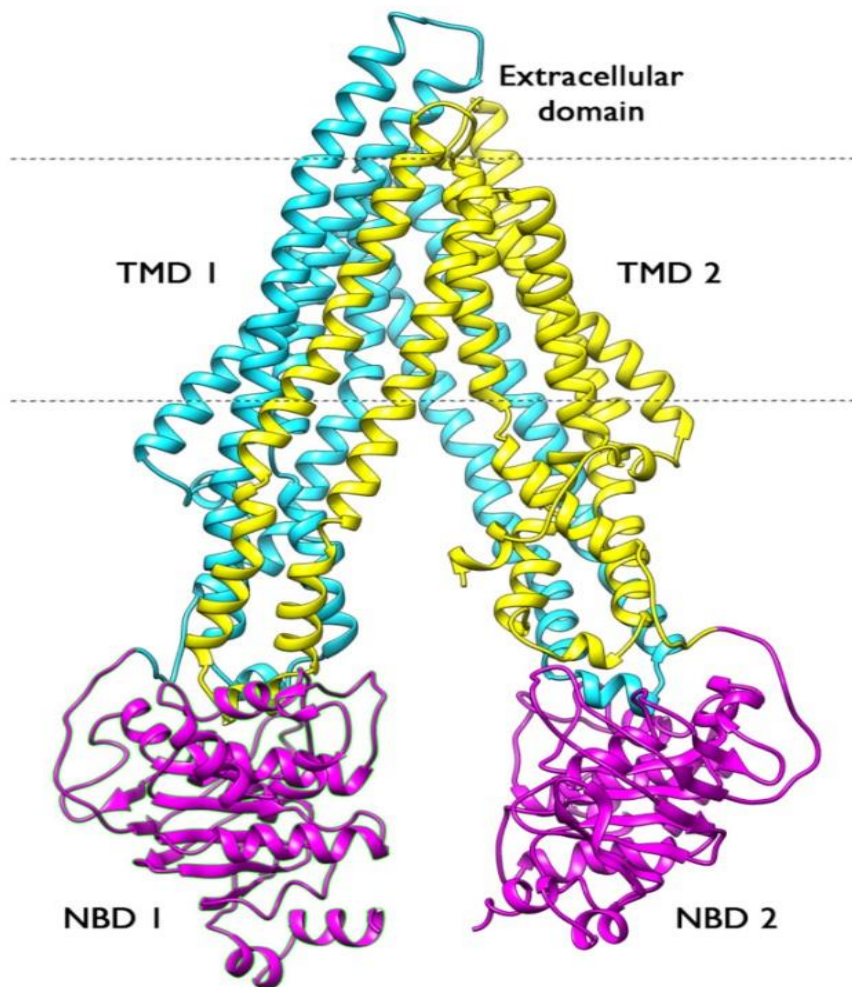


Рисунок 5 – Кристаллическая структура мышинового Р-гликопротеина в конформации, обращенной внутрь (Обозначения: NBD показаны пурпурным цветом, а TMD – голубым и желтым) (цит. по: Mora Lagares L et al., 2021) [158]

Р-гр имеет субстратную полиспецифичность и транспортирует через мембраны широкий спектр структурно неродственных веществ с молекулярной

массой от 330 до 4000 Да [183]. Это обусловлено наличием в молекуле белка-транспортера множественных сайтов для связывания вещества [89]. Субстраты Р-гр включают противоопухолевые препараты, блокаторы кальциевых каналов, антибиотики, сердечные гликозиды, антикоагулянты, а также иммунодепрессанты [38, 166].

Активность Р-гр может изменяться под воздействием различных факторов и веществ. При этом индукторы (рифампицин, карбамазепин) повышают активность белка-транспортера [172], а ингибиторы (кетоконазол, верапамил) ее снижают [157].

Изменение активности Р-гр может повлиять на эффективность и безопасность терапии его субстратами. Например, индукция Р-гр в клетках тонкого кишечника, а также почек и печени приводит к снижению биодоступности лекарственных препаратов, увеличению их почечного и печеночного клиренса и уменьшению распределения в периферических клетках соответственно [109]. Ингибиторы Р-гр, наоборот, увеличивают системное воздействие субстратов белка-транспортера, что приводит к побочным эффектам фармакотерапии.

Таким образом, Р-гр является эффлюксным белком с модулируемой активностью и широкой субстратной специфичностью, что обуславливает его участие в фармакокинетике (всасывании, распределении и выведении) эндогенных и экзогенных веществ, а также в развитии резистентности опухолей к химиотерапии.

1.2.2. Механизмы регуляции Р-гликопротеина

Описаны следующие основные механизмы регуляции функционирования Р-гр: изменение экспрессии гена *MDR1*, кодирующего белок-транспортер, посредством влияния на его промотор; полиморфизм гена *MDR1*; увеличение дозы гена – амплификация участка генома, содержащего ген *MDR1*; стабилизация мРНК гена *MDR1*; влияние микроРНК на экспрессию Р-гр; передача Р-гр между клетками; изменение активности синтезированного белка-транспортера. При этом основную роль играет регуляция экспрессии гена *MDR1* и изменение активности

синтезированного белка-транспортера [25].

Среди веществ, влияющих на Р-гр, различают ингибиторы, индукторы и активаторы. Соединения, которые нарушают транспортную функцию Р-гр, называются ингибиторами [107].

Для ингибиторов белка-транспортера на данный момент выявлено три механизма действия:

- 1) блокада сайта связывания субстратов по механизму конкурентного, неконкурентного или аллостерического ингибирования;
- 2) ингибирование гидролиза АТФ;
- 3) изменение текучести клеточных мембран [128, 183].

При конкурентном и неконкурентном механизме ингибирования вещество взаимодействует с центрами связывания субстратов, а при аллостерическом – с аллостерическим центром [51, 72, 111].

Выделяют 3 центра связывания субстратов: D (дигоксин), R (родамин-123) и H (хекст-33342) [111].

Многие лекарственные препараты при взаимодействии с Р-гр могут уменьшать связывание субстрата посредством отрицательной аллостерической регуляции [107]. Однако наличие множественных сайтов связывания в белке делает исто

Ингибирование Р-гр по второму механизму (ингибирование гидролиза АТФ) является наиболее эффективным, поскольку может быть реализовано при низких концентрациях ингибитора. Этот процесс наиболее выгоден, когда требуется местный ингибирующий эффект Р-гр, например, в кишечнике [128].

Ингибиторы, которые действуют согласно третьему механизму, вызывают модификацию структурной организации белковых молекул и нарушение целостности липидов, входящих в состав мембран, что в свою очередь приводит к изменению их текучести. В целом это сопровождается изменением гидрофобной среды и ингибированием опосредованного Р-гр оттока субстратов [183].

Ингибиторы Р-гр обладают различной эффективностью. Для достижения ингибирующего действия одних веществ необходимы очень высокие

концентрации, которые могут вызывать токсический эффект. Другие субстанции были намерено подвергнуты структурным модификациям, для того чтобы повысить ингибирующую Р-gr активность. Данные соединения обладают более высоким сродством к белку-транспортеру и поэтому имеют меньшую токсичность [169].

Экспрессия гена *MDR1* может регулироваться на уровне его промотора под действием широкого спектра как эндо-, так и экзогенных веществ [87].

В опытах *in vitro* и *in vivo* было показано, что повышение транскрипции *MDR1* определяется наличием в его промоторной зоне таких сложных элементов, как ГЦ-бокс, Y-бокс, сайтов связывания белка p53, инвертированного элемента mediator-1, белка-активатора 1, элемента теплового шока и стероидных ксенобиотических рецепторов [45].

На данный момент установлен ряд ядерных факторов, с которыми может взаимодействовать промотор гена *MDR1*. К таким транскрипционным факторам относятся прегнан X рецептор (PXR), конститутивный андростановый рецептор (CAR), Nrf2, ядерный фактор Y (NFY) и другие [106, 183].

Сигнальный путь Nrf2-Keap1 играет важную роль в поддержании окислительно-восстановительного статуса клеток [6, 23]. Это обусловлено повышением синтеза защитных ферментов (например, оксидоредуктаз, глутатионпероксидазы) под действием Nrf2, которые предохраняют клетки от повреждений нуклеофильными субстратами [108]. Также было показано, что Nrf2 принимает участие в повышении активности и количества Р-gr при развитии окислительного стресса [167].

CAR (NR1I3, подсемейство 1, группа I, член 3) и PXR (steroid and xenobiotic receptor – SXR, NR1I2 – Nuclear Receptor Subfamily 1, Group I, Member 2) являются представителями суперсемейства ядерных рецепторов, которые контролируют экспрессию генов, принимающих участие в защите клеток от ксенобиотиков (ферменты I и II фазы биотрансформации).

CAR и PXR экспрессируются в основном в клетках печени и кишечника и работают как сенсоры ксенобиотиков, а также их токсичных продуктов [155, 164].

CAR и PXR активируются различными соединениями, отличными друг от друга по химической структуре (Таблица 2). Связывание CAR и PXR с мотивом DR4 в промоторной зоне *MDR1* человека приводит к активации транскрипции P-gr [62, 138].

Таблица 2 – Индукторы Р-гликопротеина и их влияние на PXR/CAR (модифиц. по: Elmeliegy M. et al., 2020) [62]

Индукторы Р-гликопротеина	
Лекарственные препараты	Влияние на PXR/CAR
Рифампин	Сильный агонист PXR
Фенитоин	Сильный агонист CAR Слабый агонист PXR
Карбамазепин	Сильный агонист CAR Слабый агонист PXR
Экстракт зверобоя	Сильный агонист PXR
Рифабутин	Агонист PXR
Кверцетин	Агонист PXR и CAR
Куркумин	Агонист PXR

PXR, CAR-опосредованная индукция P-gr на мембране желчных канальцев потенциально может усиливать желчную экскрецию субстратов белка-транспортера [127]. PXR-опосредованная активация P-gr в энтероцитах может ограничивать всасывание субстратов P-gr [94].

Имеется ряд веществ, способных повышать активность P-gr без увеличения его экспрессии. Данные вещества получили название активаторы. Связываясь с активатором белок-транспортер претерпевает конформационные изменения, что служит стимулом к транспорту его субстратов [31, 106]. Предположительно механизм активации опосредован доменом NBD, увеличением сродства к АТФ и скорости его гидролиза [106, 183].

Также активаторы могут действовать по аллостерическому механизму, влияя на транспорт субстратов Р-гр, взаимодействующих с Н- и R-центрами связывания. В данных участках может происходить ускоренная транслокация лекарственных препаратов через клеточную мембрану [59, 183].

Таким образом, изучение механизмов модуляции Р-гр является важным аспектом в понимании функционирования белка-транспортера, а также позволит целенаправленно изменять его активность.

1.3. Влияние оксида азота (II) на функционирование Р-гликопротеина

В ряде исследований оценивалось влияние NO и его доноров на функционирование Р-гр.

На клетках карциномы ободочной кишки человека Сасо-2 было показано, что донор NO S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин (SNAP) в концентрациях 0,1-5 мМ и длительностью воздействия 6 ч уменьшает накопление циклоспорина А (субстрата Р-гр) не менее чем на 30%, что свидетельствует о повышении активности белка-транспортера. При концентрации SNAP 1 мМ отмечается и повышение количества Р-гр, оцененное методом вестерн-блот [117].

На клеточной линии GPNT, представляющей собой иммортализованную линию эндотелиальных клеток головного мозга крысы, было выявлено, что донор NO SNAP в концентрации 1 мМ увеличивает уровни мРНК генов *mdr1a* и *mdr1b*, кодирующих Р-гр у грызунов, а также количество самого белка через 24 ч воздействия [114].

На линии клеток Сасо-2 было показано, что интерферон- γ увеличивает экспрессию белка-транспортера и его функциональную активность. Предположительно, NO необходим для интерферон- γ -опосредованных эффектов на кишечный Р-гр и может действовать как биохимический регулятор транскрипции гена *ABCB1*. Индуцированное цитокинами высвобождение NO изменяет связывание ДНК с NF- κ B, что может усиливать транскрипцию гена *ABCB1* [117]. При активации iNO-синтазы происходит увеличение экспрессии и

функционирования P-гр в человеческих интерферонпродуцирующих клетках кишечника.

В экспериментах на крысах было показано, что НС, индуцированный NO, стимулирует функциональную активность и экспрессию P-гр в гематоэнцефалическом барьере животных с сахарным диабетом [75]. Активация гена *ABCBI* в почках крыс, индуцированная введением липополисахаридов, по мнению авторов, обусловлена изменением синтеза NO под действием iNOS [115].

Однако в эксперименте на эпителиальной клеточной линии толстой кишки человека HT29 и доксорубицин-резистентной линии клеток HT29-dx выявлен противоположный эффект: под действием NO уменьшается резистентность клеток к доксорубицину. Авторы предположили, что данное явление осуществляется за счет снижения функционирования белка-транспортера P-гр [119].

На изолированных мембранах клеток, содержащих P-гр, было установлено, что донор NO пропиламин-пропиламина ноноат (PPNO) в концентрациях 0,02-200 мкМ и длительностью воздействия 30 мин снижает АТФ-азную активность P-гр. На клетках рака яичника NCI/ADR-RES, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, выявлено, что PPNO в концентрациях 50, 100, 200 мкМ и экспозиции 1 ч вызывает увеличение накопления в клетках субстрата P-гр адриамицина (Adriamycin), что свидетельствует об ингибировании белка-транспортера [118]. Аналогичные результаты были получены и с другим донором NO [O₂-(2,4-динитрофенил)-1-[(4-этоксикарбонил)-пиперазин-1ил]-диазен-1-иум-1-2-диолат] (JS-K) [145].

SNP в концентрации 0,1 мкг/мл при перфузии изолированной печени крыс в течении 2 ч, существенно снижал активность P-гр. Авторами было высказано предположение, что ингибирующий эффект, вызванный SNP, обусловлен NO-независимым механизмом [125].

Сообщалось, что NO участвует в снижении экспрессии кишечного P-гр на ранних стадиях интестинальной ишемии и реперфузии [65].

Другие исследования показали двунаправленный эффект NO на P-гр. В исследовании на клетках линии Caco-2 установлено, что SNP – донор NO, в

концентрациях 0,1 или 2 мМ при краткосрочном воздействии (4 ч) снижает активность и количество Р-gp, а 24 ч экспозиция, напротив, повышает активность и количество белка-транспортера. В данном исследовании также было высказано предположение, что повышение активности Р-gp (количество при этом не оценивалось) связано с влиянием NO на ПКС, фосфоинозитид-3-киназу / протеинкиназу В (PI3K/Akt), митоген-активируемую протеинкиназу p38 (p38 MAPK) [38].

Выявлено уменьшение активности белка-транспортера в кишечнике у мышей на ранних стадиях диабета, индуцированного стрептозотоцином, и увеличение на более поздних стадиях заболевания. При этом уровень экспрессии кишечного Р-gp снижался посредством механизма, опосредованного iNOS, на ранних стадиях диабета [110].

Показано, что NO снижает АТФ-азную активность топоизомеразы II. Это группа белков, представляющая собой ядерные ферменты, ответственные за поддержание топологии ДНК и многих ее функций в клетках [144]. Поскольку Р-gp является АТФ-зависимым эффлюксным белком, можно предположить, что NO будет ингибировать его активность за счет ингибирования АТФ-азной или модулирования транспортной активности [118].

Таким образом, при изучении влияния NO и его доноров на функционирование Р-gp получены противоречивые результаты, а механизмы данного воздействия практически не изучены. Учитывая важную роль NO в физиологических и патологических процессах, выяснение направленности и механизмов модуляции Р-gp под действием NO является важной и актуальной задачей.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объект экспериментальных исследований

Работа выполнена с использованием клеточной линии аденокарциномы ободочной кишки человека (линии Caco-2), которая была закуплена в ФГБУН ИНЦ РАН, Санкт-Петербург. При культивировании в течение 21 суток данные клетки спонтанно дифференцируются в клетки, сходные с тонкокишечными энтероцитами и гиперэкспрессирующие P-gp. Учитывая представленные свойства, их широко используют для изучения функционирования P-gp и оценки абсорбции лекарственных веществ *in vitro* [175, 177].

2.2. Культивирование клеток линии Caco-2

Клетки культивировали в 96-луночных, 6-луночных планшетах и трансвеллах при 37°C и 5% уровне CO₂ в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) («Sigma-Aldrich», США), с добавлением L-глутамина (4 мМ) («Sigma-Aldrich», США), 15% эмбриональной бычьей сыворотки («Sigma-Aldrich», США), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина («Sigma-Aldrich», США) соответственно [88].

2.3. Дизайн исследования

В качестве донора NO использовали GSNO («Sigma-Aldrich», США), который добавляли к клеткам линии Caco-2 до получения конечных концентраций 1, 10, 50, 100 и 500 мкМ. Длительность воздействия составляла 3, 24 и 72 ч. К контрольным клеткам в эквивалентном объеме прибавляли воду для инъекций (растворитель GSNO). На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения.

В исследовании были сформированы следующие экспериментальные серии:
Первая серия – изучение цитотоксического действия GSNO на клетки линии

Caco-2;

Вторая серия – изучение влияния GSNO на биохимические показатели, характеризующие выраженность HС в клетках линии Caco-2;

Третья серия – изучение влияния GSNO на относительное количество белка-транспортера P-gp;

Четвертая серия – изучение влияния GSNO на трансэпителиальное сопротивление монослоя клеток линии Caco-2 и активность белка-транспортера P-gp;

Пятая серия – изучение роли NO-цГМФ сигнального пути и транскрипционных факторов Nrf2, PXR, CAR в механизме влияния GSNO на P-gp.

В пятой серии при оценке механизмов индукции P-gp под действием GSNO в питательную среду за 30 мин до добавления донора NO вносили: ингибитор рГЦ – 1H-[1,2,4]оксадиазоло-[4,3-а]хиноксалин-1-ОН (ODQ, «Sigma-Aldrich», США) в концентрации 10 мкМ [90], ингибитор Nrf2 – N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин (AEM1, «Sigma-Aldrich», США) в концентрации 5 мкМ [29], ингибитор PXR – кетоконазол, в концентрации 10 мкМ («Sigma-Aldrich», США) [49], ингибитор CAR – 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-дибензо[b,f]азепин-3-ил]этиловый эфир карбаминовой кислоты (CINPA 1, «TOCRIS», Великобритания) в концентрации 10 мкМ [50]. GSNO использовался в концентрациях, которые вызывали повышение относительного количества P-gp. Перед изучением механизмов повышения содержания P-gp под действием GSNO, оценивали самостоятельное влияние ингибиторов на уровень белка-транспортера при их изолированной экспозиции с клетками линии Caco-2.

2.4. Изучение цитотоксического действия S-нитрозоглутатиона

Цитотоксическое действие GSNO оценивали по результатам МТТ-теста. Клетки высевали в 96-луночный планшет из расчета 10^4 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 суток, затем добавляли питательную среду с тестируемым веществом. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли

по 20 мкл 0,5% раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1% раствора диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия) [171]. Светопоглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для микропланшетов Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США).

Жизнеспособность клеток Сасо-2 в присутствии GSNO рассчитывали по формуле:

$$\text{Жизнеспособность} = \frac{\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}}{\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}} \times 100\%, \quad (1)$$

где ОП — оптическая плотность.

2.5. Оценка выраженности нитрозативного стресса

Клетки культивировали в 6-луночных планшетах в течение 21 суток, затем добавляли питательную среду с GSNO. После окончания экспозиции, клетки снимали с лунок раствором трипсин–ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», США).

Клетки из расчета 1×10^6 промывали изотоническим раствором натрия хлорида («Медпро», Россия) и ресуспендировали в 150 мкл ледяного буфера для лизиса (50 мМ трис-НСl, рН 7,4, 150 мМ КСl, 0,5% тритон X-100, смесь ингибиторов протеиназ (аминоэтилбензолсульфонилфторид гидрохлорид (АЕBSF) 2 мМ; апротинин 0,3 мкМ; бестатин 130 мкМ; ЭДТА 1 мМ; эпоксисукциниллейцингуанидинобутиламид (Е-64) 14 мкМ; лейпептин 1 мкМ («Sigma-Aldrich», США)), встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g (СМ-50, «Eppendorf», Германия). Супернатант переносили в отдельные пробирки.

Определение уровня метаболитов оксида азота (суммарная концентрация нитратов и нитритов NOx) проводили спектрофотометрическим методом, основанном на восстановлении нитратов в нитриты в присутствии VCl₃ и

последующей реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса («Нева Реактив», Россия). Интенсивность образующейся розовой окраски определяли в видимой области спектра на микропланшетном анализаторе Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США) при длине волны 540 нм. Полученные результаты рассчитывали с помощью калибровочного графика (в качестве стандарта использовался нитрит натрия, «Химмед», Россия) и выражали в нмоль/мг белка [17].

Концентрацию пероксинитрита анализировали спектрофотометрическим методом. Оптические спектры записывали на спектрофотометре СФ 2000, «ОКБ Спектр», Россия. Интенсивность сигнала оценивали по характерной полосе поглощения ONOO^- при длине волны 302 нм и пересчитывали в нмоль/мг белка с использованием молярного коэффициента $\epsilon_{302} = 1670 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [1, 100].

Образование битирозина оценивали спектрофлуориметрическим методом. Приготовленные лизаты объемом 100 мкл доводили до 2 мл фосфатным буфером (рН 7,4). Битирозин обладает типичной голубой флуоресценцией, интенсивность которой регистрировали при длине волны возбуждения $\lambda_{\text{exc}} = 325$ нм и длине волны испускания $\lambda_{\text{em}} = 415$ нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-6000 (Япония). Полученные результаты рассчитывали с помощью калибровочного графика (в качестве стандарта использовался битирозин, «Cambridge Isotope Laboratories», Франция) и выражали в нмоль/мг белка [34].

Определение концентрации тиоловых (SH-) групп. Концентрацию белковых тиоловых групп определяли по разнице между уровнем общих и безбелковых SH-групп. Анализ содержания общих SH-групп в лизате клеток проводили по методу Элмана с 5,5'-дитиобис(2-нитро)-бензоатом (DTNB) в неденатурирующих условиях в буфере, содержащем 150 мМ KCl [1]. Анализ проводили при 412 нм на спектрофотометре Stat Fax 1904 («Awareness Technology», США). Концентрацию SH-групп рассчитывали исходя из коэффициента молярной экстинкции $\epsilon_{412} = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [66]. Для определения содержания безбелковых SH-групп пробу предварительно смешивали с охлажденной 5% трихлоруксусной кислотой («Химмед», Россия), инкубировали на льду 15 мин, затем центрифугировали при

11000 g (СМ-50, «Eppendorf», Германия) 5 мин при +4°C. Полученный супернатант нейтрализовали с помощью 1% NaOH («Химмед», Россия) и использовали для определения низкомолекулярных (безбелковых) SH-групп по реакции с DTNB. Полученные результаты выражали в мкмоль/мг белка.

Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus («Bradford») Assay Kit, «ThermoFisher», США). Метод основан на связывании красителя Coomassie brilliant Blue G250 с остатками основных и ароматических аминокислот, с последующим развитием синей окраски. Количество белка оценивалось спектрофотометрическим методом по интенсивности окраски на микропланшетном анализаторе Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США) при длине волны 595 нм [40]. Полученные результаты рассчитывали с помощью калибровочного графика (в качестве стандарта использовался бычий сывороточный альбумин, входящий в состав набора) и выражали в мг/мл белка [34].

2.6. Оценка относительного количества белка-транспортера Р-гликопротеина

Оценку относительного количества белка-транспортера Р-gp проводили методом вестерн-блот.

Клетки культивировали в 6-луночных планшетах. После окончания экспозиции с тестируемыми веществами клетки снимали с поверхности лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», США), трижды промывали раствором фосфатного буфера («Bio-Rad», США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo («Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ: 2 мМ (4-(2-аминоэтил)бензенсульфонил флуорида гидрохлорида (AEBSF)), 0,3 мкМ апротинина, 130 мкМ бестатина, 1 мМ ЭДТА, 14 мкМ транс-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4гуанидино)бутана (E-64), 1 мкМ лейпептина («Sigma-Aldrich», США) в течение 30 минут при +4°C и постоянном

перемешивании из расчета 10^7 клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 5000 g (СМ-50, «Eppendorf», Германия). Супернатант использовали для выполнения биохимических анализов.

20 мкг белков супернатанта подвергали электрофорезу с использованием 7,5%-ного TGX Stain-Free FastCat Acrylamide Kit («Bio-Rad», США). Образцы смешивали с 4-х кратным буфером Laemmli («Bio-Rad», США), содержащим 50 мМ β-меркаптоэтанола («Bio-Rad», США) в соотношении 3:1, инкубировали 10 мин при температуре 70°C. Гели прогоняли при 100 В в течение 90 мин.

Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану «Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose» («Bio-Rad», США) с использованием Mini Trans-Blot («Bio-Rad», США) в течение 10 мин при 25 В и 1,3 А.

Мембрану блокировали 1%-ным раствором Casein Blocker («Bio-Rad», США), содержащим 0,1% Tween 20 («Sigma-Aldrich», США), при инкубации в течение 1 ч и комнатной температуре. Детекцию белка Р-гр проводили с использованием первичных мышинных моноклональных антител (P-Glycoprotein Antibody MA5-13854, «Invitrogen», США) в разведении 1:200 в блокирующем растворе Casein blocker («Bio-Rad», США), содержащем 0,1% Tween 20, в течение 2 ч при 37 °С.

Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit-Anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen», США) в разведении 1:4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Хемилюминесценцию фиксировали с помощью ChemiDocXRS+ («Bio-Rad», США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad», США).

Молекулярная масса Р-гр была подтверждена путем сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, «Bio-Rad», США).

Содержание Р-гр оценивали относительно уровня белка домашнего хозяйства GAPDH (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы) (первичные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 («Invitrogen», США),

разведение 1:1000, вторичные антитела – Rabbit-anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP («Invitrogen», США), разведение 1:4000).

2.7. Анализ активности белка-транспортера Р-гликопротеина

Активность Р-гр оценивали по транспорту субстрата белка-транспортера H1-гистаминолитика – фексофенадина («Sigma-Aldrich», США) через монослой клеток линии Caco-2 в специальных трансвеллах [63]. Трансвеллы состоят из двух камер: апикальной и базолатеральной (Рисунок 6). Дно апикальной камеры представлено полупроницаемой мембраной, на которую высевали клетки линии Caco-2 с плотностью $10^5/\text{см}^2$ и культивировали в течение 21 суток.

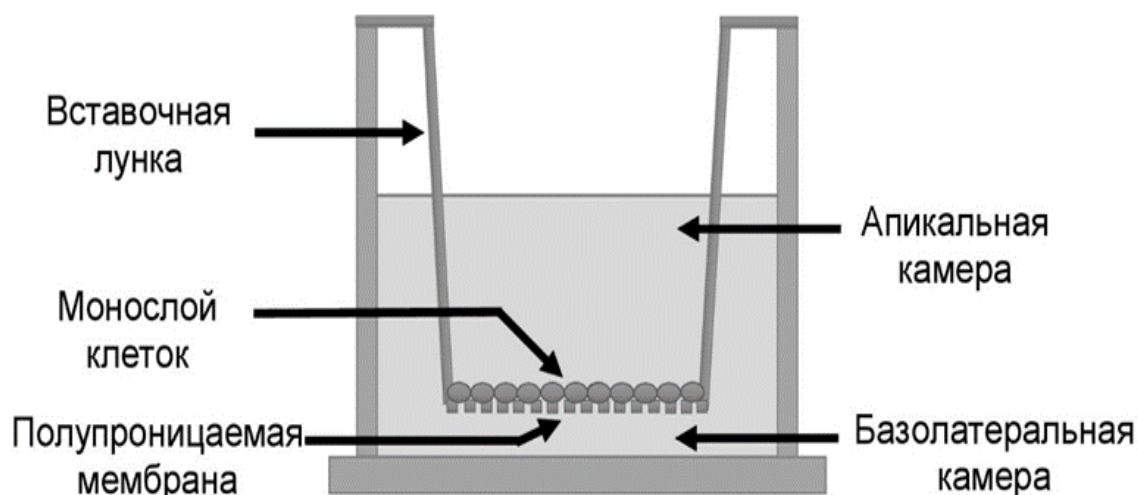


Рисунок 6 – Строение трансвелла

Целостность клеточного монослоя оценивали по величине трансэпителиального сопротивления, которое определяли с помощью вольтметра Millicell ERS-2 («Millipore», США). При его значении выше $500 \text{ мОм} \times \text{см}^2$ к клеткам добавляли тестируемые концентрации GSNO в питательной среде. После окончания инкубации вновь оценивали трансэпителиальное сопротивление и заменяли питательную среду на транспортную среду, представляющую собой

раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich», США) с 25 мМ Хепес («Sigma-Aldrich», США) и 1% диметилсульфоксида. Затем добавляли субстрат Р-гр – фексофенадин, в базолатеральную камеру в концентрации 150 мкМ [173]. Через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из апикальной камеры-реципиента для определения концентрации субстрата (*b-a*-транспорт, обусловленный пассивной диффузией и работой транспортера). Затем в других трансвеллах анализировали транспорт фексофенадина из апикальной камеры в базолатеральную (*a-b* транспорт, обусловленный пассивной диффузией против работы Р-гр). Для этого субстрат в той же концентрации 150 мкМ добавляли в апикальную камеру, а затем через 1, 2 и 3 ч забирали по 50 мкл образцов из базолатеральной камеры для определения концентрации фексофенадина.

Транспорт фексофенадина рассчитывали по формуле, предложенной Elsbury et al. [177]:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{(A \times C_0)}, \quad (2)$$

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

Дополнительно рассчитывали отношение коэффициентов кажущейся проницаемости: *b-a* к *a-b*:

$$\text{Отношение коэффициентов} = \frac{P_{app} \ b - a}{P_{app} \ a - b} \quad (3)$$

2.8. Анализ концентрации фексофенадина в транспортной среде

Концентрации фексофенадина в транспортной среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием при длине волны 220 нм. Исследование выполняли на хроматографе «Стайер»

(«Аквилон», Россия) по оригинальной методике [13]. Полученную пробу транспортной среды (50 мкл), содержащую фексофенадин, разводили в 150 мкл подвижной фазы и 100 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

При анализе использовали хроматографическую колонку Phenomenex Synergy 4u Polar-RP 80A (250 × 4,6) («Phenomenex», США) с зернением 4 мкм. Температура разделения – 45 °С. Скорость потока – 1 мл/мин.

Состав подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила, 267,4 мл деионизированной воды, 6,33 мл ледяной уксусной кислоты с добавлением триэтиламина до pH 6,7 (все составляющие производства «PanReac AppliChem», Испания). Время удерживания фексофенадина в данных условиях составляло 12,8 мин. Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составлял 1,2-57,4 мкМ. Методика была валидирована по следующим параметрам: специфичность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, устойчивость образцов.

2.9. Статистический анализ

Полученные результаты анализировались с помощью программ «Statsoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и GraphPad Prism 8. Для оценки статистической значимости различий между двумя группами использовали t-критерий Стьюдента, при сравнении более чем двух групп применяли дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена-Кейлса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Данные в таблицах и на графиках представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$) [19].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на биохимические изменения в клетках линии Caco-2

На первом этапе исследования для подтверждения повышения уровня NO в клетках линии Caco-2 под действием GSNO оценивался уровень метаболитов оксида азота (NO_x) в клеточных лизатах после завершения экспериментальных воздействий.

На рисунке 7 изображено изменение уровня исследуемого показателя при воздействии GSNO во всех тестируемых концентрациях и экспозиции в течение 3, 24 и 72 ч.

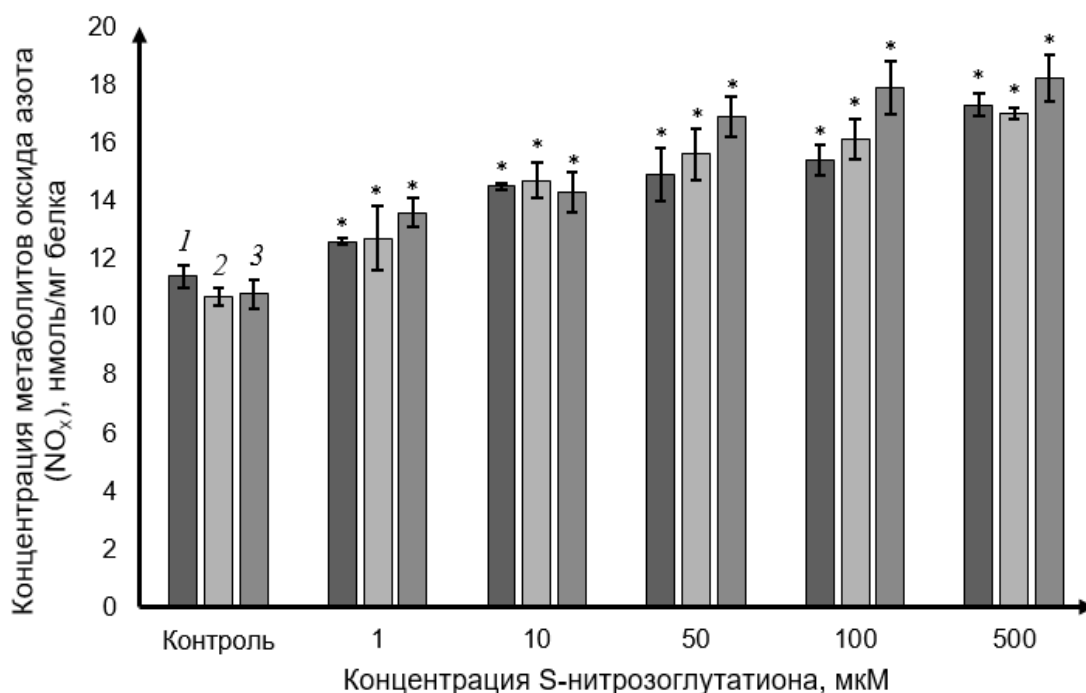


Рисунок 7 – Изменение концентрации метаболитов оксида азота (NO_x) в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч (M±SD, n=3 – для каждой серии экспериментов)

Примечание: * – статистически значимые различия с контролем, p<0,05 (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса)

Уровень NOx возрастал при всех концентрациях GSNO (1-500 мкМ) и всех сроках эксперимента. Так, при действии GSNO в концентрациях 1; 10; 50; 100 и 500 мкМ концентрация метаболитов оксида азота (II) в клетках Caco-2 возрастала относительно контроля: во время 3-х часовой инкубации – на 10,5% ($p=0,001$), 27,2% ($p=0,0002$), 30,7% ($p=0,0002$), 35,1% ($p=0,0002$), 51,8% ($p=0,0002$); при длительности инкубации 24 ч – на 18,7% ($p=0,006$), 37,4% ($p=0,0002$), 45,8% ($p=0,0002$), 50,5% ($p=0,0002$), 58,9% ($p=0,0002$); при экспозиции 72 ч – на 25,9% ($p=0,0006$), 32,4% ($p=0,0003$), 56,5% ($p=0,0002$), 65,7% ($p=0,0002$) и 68,5% ($p=0,0002$) соответственно (Рисунок 7).

При сравнении данных в зависимости от срока инкубации достоверных различий выявлено не было.

Полученные результаты свидетельствуют об адекватности используемой экспериментальной модели.

Для оценки выраженности НС в лизатах клеток Caco-2 анализировали концентрации пероксинитрита (ONOO^-) и битирозина, уровни белковых и безбелковых SH-групп.

Анализ данных изменения уровня ONOO^- в клетках линии Caco-2 при воздействии донора NO GSNO выявил следующие результаты (рисунок 8).

При длительности эксперимента 3 ч и концентрации GSNO 100 мкМ и 500 мкМ содержание ONOO^- в клетках Caco-2 увеличивалось на 68,1% ($p=0,001$) и 92,6% ($p=0,0002$) по сравнению с контролем, а при экспозиции 24 ч – на 34,0% ($p=0,01$) и 53,6% ($p=0,001$) соответственно (Рисунок 8).

В остальных концентрациях (1-50 мкМ) GSNO достоверного эффекта на уровень ONOO^- не оказал при сроках инкубации 3 и 24 ч.

При увеличении длительности экспозиции до 72 ч содержание ONOO^- в клетках Caco-2 возрастало при концентрациях GSNO 1-500 мкМ: при 1 мкМ – на 50,8% ($p=0,0006$), 10 мкМ – на 67,2% ($p=0,0004$), 50 мкМ – на 67,2% ($p=0,0003$), 100 мкМ – на 83,6% ($p=0,0002$), максимально – на 84,4% ($p=0,0002$) при концентрации 500 мкМ (Рисунок 8).

При анализе данных в зависимости от срока инкубации были получены

следующие результаты.

Уровень ONOO^- в клетках Caco-2 повышался при инкубации в течение 72 ч с GSNO в концентрации 1 мкМ на 65,8% ($p=0,0002$) и на 64,3% ($p=0,0002$), 10 мкМ – на 72,9% ($p=0,002$) и 72,9% ($p=0,0002$), 50 мкМ – на 65,9% ($p=0,0001$) и 68,6% ($p=0,0001$), 100 мкМ – на 41,8% ($p=0,0002$) и 72,3% ($p=0,0001$), 500 мкМ – на 24,3% ($p=0,009$) и 50,0% ($p=0,0001$) относительно срока воздействия 3 и 24 ч соответственно (Рисунок 8).

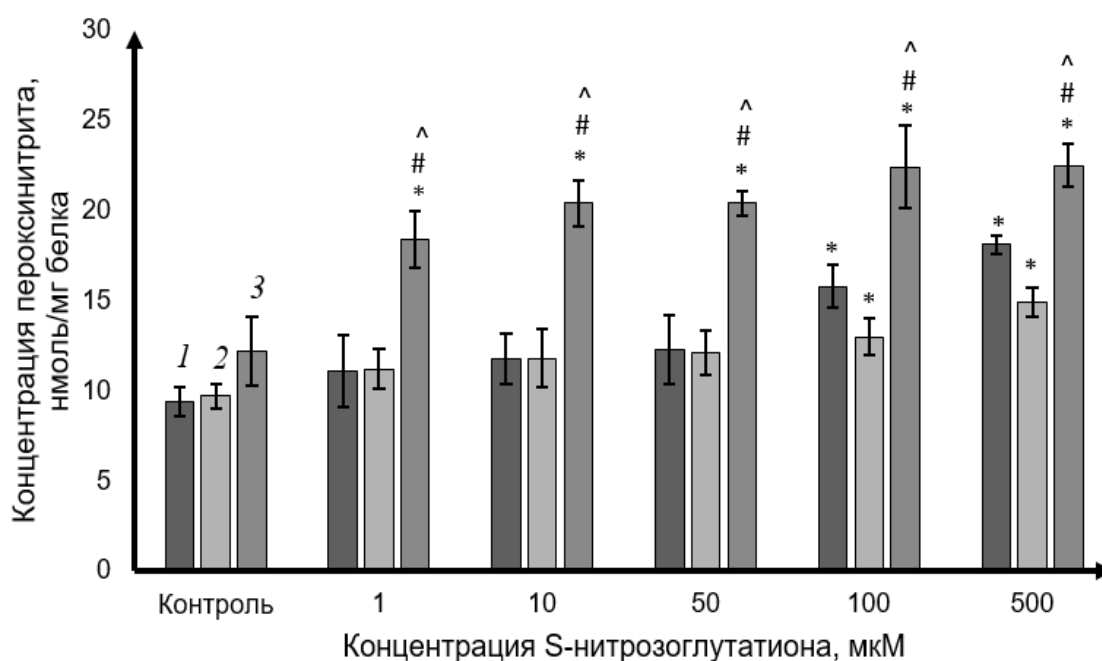


Рисунок 8 – Изменение концентрации пероксинитрита в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Примечание: * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$; # – статистически значимые различия относительно 3 ч инкубации, $p < 0,05$; ^ – статистически значимые различия относительно 24 ч инкубации, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса)

При оценке изменения уровня битирозина в лизате клеток Caco-2 под влиянием GSNO были получены следующие результаты (рисунок 9).

Содержание битирозина в клетках линии Caco-2 не изменялось при воздействии GSNO в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3 ч, а также при

концентрации 1 мкМ и длительности экспозиции 24 и 72 ч по сравнению с контролем (Рисунок 9).

Количество битирозина в клетках линии Сасо-2 статистически значимо возрастало при действии GSNO в концентрациях 10-500 мкМ и сроках инкубации 24 и 72 ч: при концентрации 10 мкМ увеличение отмечалось на 18,3% ($p=0,006$) и 30,3% ($p=0,001$), 50 мкМ – на 22,1% ($p=0,003$) и 27,3% ($p=0,007$), 100 мкМ – на 29,4% ($p=0,001$) и 32,6% ($p=0,005$) по сравнению с контролем соответственно. При этом максимальное увеличение битирозина фиксировалось при концентрации GSNO 500 мкМ – на 34,9% ($p=0,0002$) при инкубации 24 ч и на 38,3% ($p=0,0003$) при инкубации 72 ч (Рисунок 9).

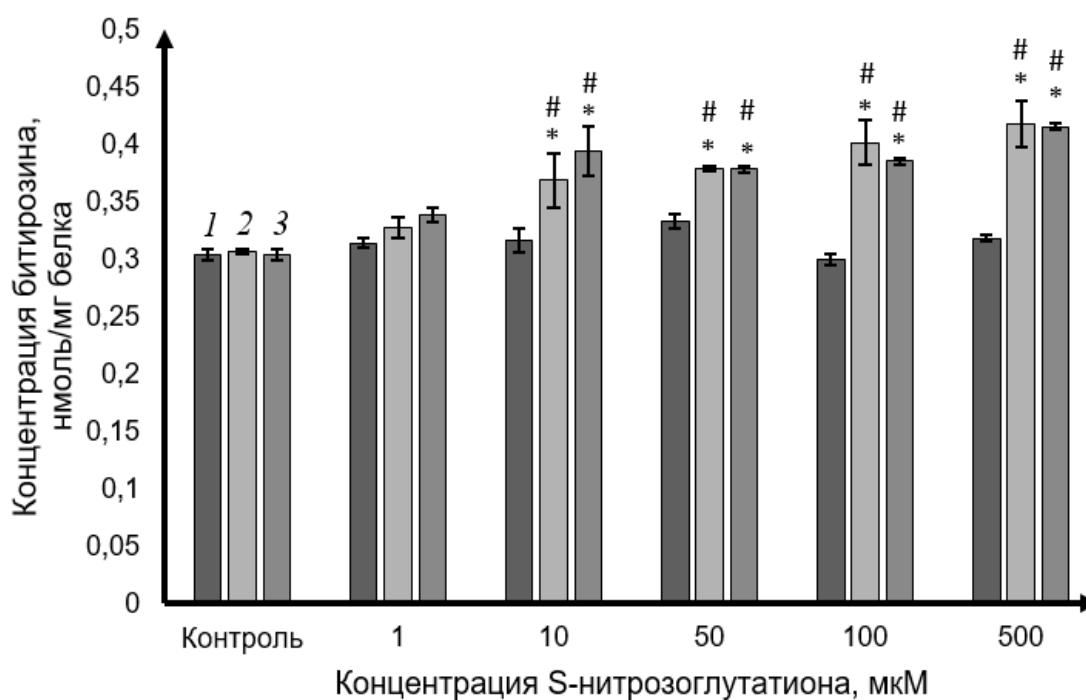


Рисунок 9 – Изменение концентрации битирозина в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Примечание: * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$; # – статистически значимые различия относительно 3 ч инкубации, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса)

При анализе данных в зависимости от срока инкубации были получены

следующие результаты.

Содержание битирозина в клетках линии Caco-2 статистически значимо увеличивалось на 16,1% ($p=0,0002$) и на 24,7% ($p=0,0002$) при инкубации с GSNO в концентрации 10 мкМ в течение 24 и 72 ч соответственно относительно экспозиции 3 ч. GSNO в концентрации 50 мкМ способствовал повышению уровня битирозина на 13,8% ($p=0,0006$) и на 13,5% ($p=0,0005$) при экспозиции 24 и 72 ч относительно инкубации 3 ч, а в концентрации 100 мкМ – на 34,1% ($p=0,0001$) и 28,8% ($p=0,0002$) соответственно.

При использовании GSNO в концентрации 500 мкМ наблюдалось увеличение концентрации битирозина в клетках Caco-2 на 34,1% ($p=0,0001$) и на 30,5% ($p=0,0002$) при инкубации 24 и 72 ч соответственно относительно срока воздействия 3 ч (Рисунок 9).

Анализ концентрации белковых SH-групп в лизате клеток линии Caco-2 при действии донора NO выявил следующую динамику (рисунок 10).

Содержание белковых SH-групп в клетках Caco-2 достоверно не изменялось по сравнению с показателями контроля при 3-х часовой инкубации с GSNO в концентрациях 1-10 мкМ, а при увеличении концентрации GSNO до 50, 100 и 500 мкМ данный показатель снижался на 27,8% ($p=0,003$), 33,2% ($p=0,002$) и 54,1% ($p=0,0002$) соответственно.

При экспозиции клеточной культуры Caco-2 с GSNO в течение 24 ч наблюдалось достоверное уменьшение уровня белковых SH-групп относительно контроля при концентрации GSNO 100 мкМ на 32,8% ($p=0,004$) и при концентрации 500 мкМ – на 60,9% ($p=0,0002$).

Повышение времени воздействия GSNO до 72 ч так же приводило к снижению белковых SH-групп при концентрациях донора NO 10, 50, 100 и 500 мкМ на 12,9% ($p=0,04$), 16,9% ($p=0,02$), 36,3% ($p=0,0002$) и 67,7% ($p=0,0002$) соответственно (Рисунок 10).

При анализе данных в зависимости от срока инкубации были получены следующие результаты.

Концентрация белковых SH-групп достоверно снижалась при воздействии

GSNO в течении 72 ч в концентрации 1 мкМ на 28,9% ($p=0,0002$), в концентрации 10 мкМ – на 30,0% ($p=0,0002$), в концентрации 100 мкМ – на 24,5% ($p=0,04$) и в концентрации 500 мкМ – на 41,9% ($p=0,0049$) относительно 3 ч экспозиции. По сравнению с 24 ч инкубацией данный показатель не изменялся (Рисунок 10).

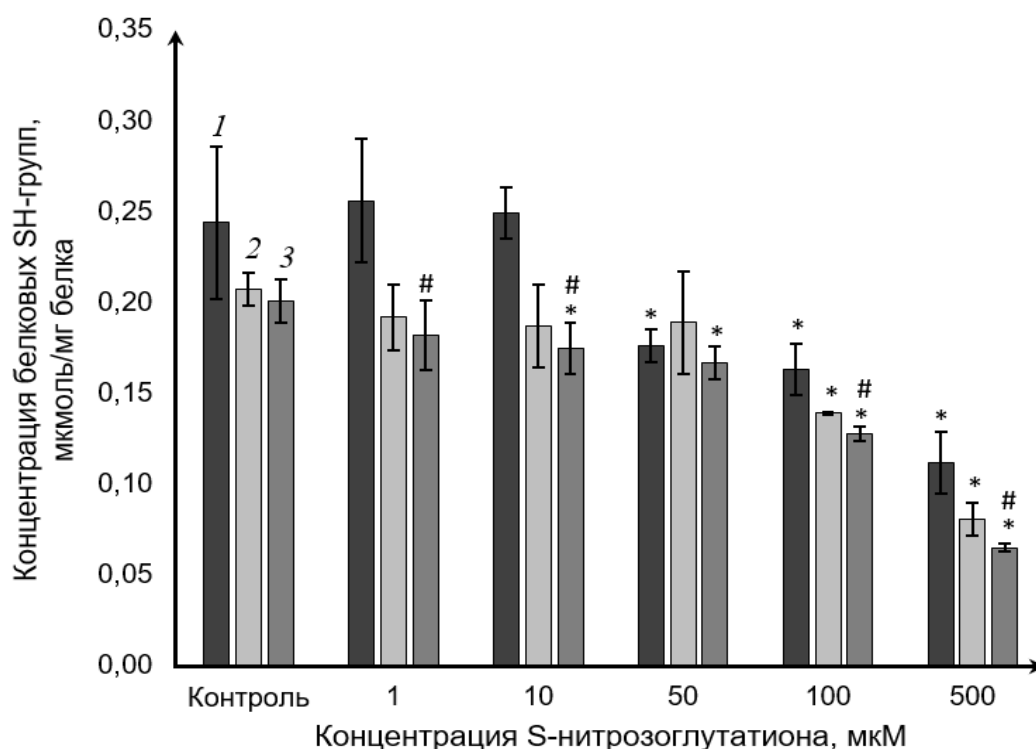


Рисунок 10 – Изменение концентрации белковых SH-групп в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Примечание: * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$; # – статистически значимые различия относительно 3 ч инкубации, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса)

На рисунке 11 представлено изменение уровня безбелковых SH-групп в клеточной линии Caco-2 под влиянием GSNO во всех изучаемых концентрациях донора NO и при всех сроках экспозиции.

Содержание безбелковых SH-групп достоверно не изменялось относительно контрольных значений при 3-х часовой экспозиции клеток линии Caco-2 с GSNO в концентрациях 1-10 мкМ. С увеличением концентрации GSNO до 50, 100 и 500

мкМ исследуемый показатель снижался на 25,4% ($p=0,02$), на 34,2% ($p=0,006$) и на 47,4% ($p=0,001$) соответственно (Рисунок 11).

Инкубация клеток Caco-2 на протяжении 24 ч приводила к достоверному снижению безбелковых SH-групп относительно контроля при концентрации GSNO 100 мкМ на 41,4% ($p=0,002$) и при концентрации 500 мкМ – на 69,4 % ($p=0,0002$).

Повышение времени воздействия до 72 ч также сопровождалось уменьшением содержания безбелковых SH-групп в клетках Caco-2 при воздействии GSNO в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ на 45,05% ($p=0,008$), 33,3% ($p=0,02$), 36,9% ($p=0,02$) и 57,7% ($p=0,002$) соответственно (Рисунок 11).

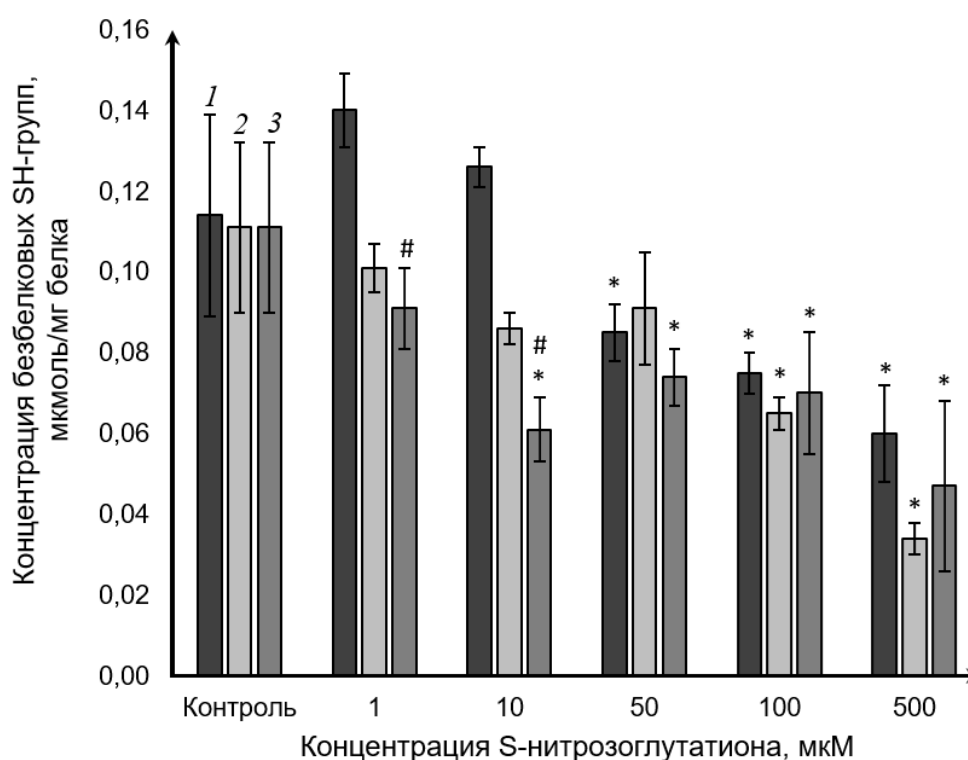


Рисунок 11 – Изменение концентрации безбелковых SH-групп в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Примечание: * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$; # – статистически значимые различия относительно 3 ч инкубации, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса)

При анализе результатов в зависимости от срока инкубации были получены

следующие результаты. Содержание безбелковых SH-групп статистически значимо снижалось при инкубации клеток линии Сасо-2 в течение 72 ч с S-нитрозоглутатионом в концентрации 1 мкМ на 35% ($p=0,0002$), с S-нитрозоглутатионом в концентрации 10 мкМ – на 51,8% ($p=0,0002$) относительно срока воздействия 3 ч.

Уровень безбелковых SH-групп достоверно не различался при инкубации с GSNO в течение 24 ч относительно 72 ч инкубации (Рисунок 11).

В заключении было оценено цитотоксическое действие GSNO по результатам МТТ-теста. Полученные результаты представлены на рисунке 12.

Жизнеспособность контрольных клеток была принята за 100%.

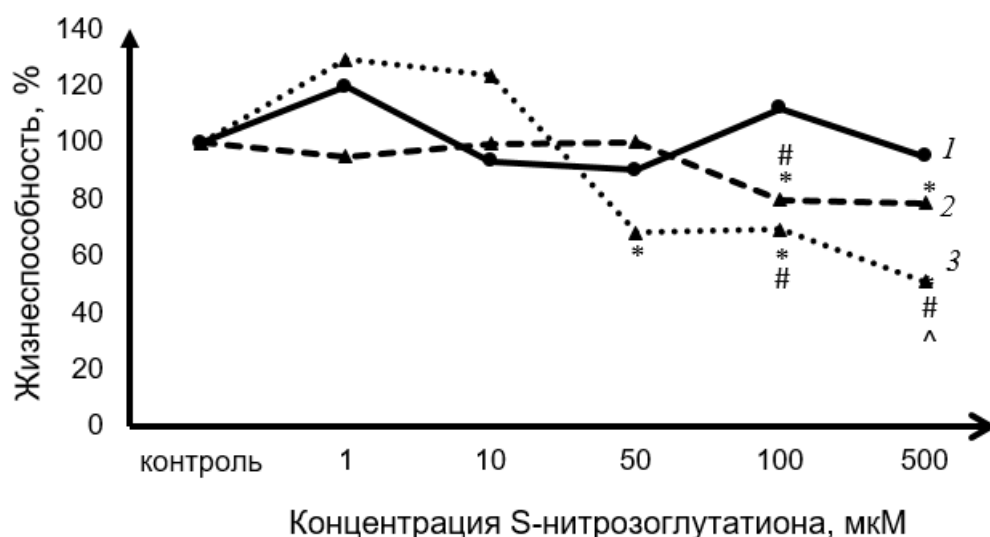


Рисунок 12 – Изменение жизнеспособности клеток линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов). Определение жизнеспособности проводили по результатам МТТ-теста

Примечание: * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$; # – статистически значимые различия относительно 3 ч инкубации, $p < 0,05$; ^ – статистически значимые различия относительно 24 ч инкубации, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса)

GSNO в концентрациях 1-500 мкМ и длительности инкубации 3 ч достоверно

не влиял на жизнеспособность клеток линии Сасо-2. Данный показатель составил в среднем $102,4 \pm 5,6\%$. При воздействии GSNO в концентрациях 1-50 мкМ и длительности экспозиции 24 ч жизнеспособность клеток Сасо-2 также не изменялась, а при концентрациях 100 и 500 мкМ снижалась до $79,9 \pm 6,7\%$ ($p=0,02$) и $78,8 \pm 7,2\%$ ($p=0,03$) соответственно. Увеличение длительности экспозиции до 72 ч приводило к снижению жизнеспособности до $68,4 \pm 11,4\%$ ($p=0,0004$), $69,5 \pm 6,1\%$ ($p=0,0004$) и $50,9 \pm 7,5\%$ ($p=0,0003$) при концентрациях GSNO 50, 100 и 500 мкМ соответственно и не влияло на данный показатель при концентрациях GSNO 1-10 мкМ (Рисунок 12).

При анализе данных в зависимости от срока инкубации были получены следующие результаты.

GSNO в концентрации 100 мкМ при длительности экспозиции 24 и 72 ч снижал выживаемость клеток Сасо-2 на 28,6% ($p=0,025$) и на 37,9% ($p=0,002$) относительно инкубации 3 ч, а в концентрации 500 мкМ и длительности воздействия 72 ч на 46,3% ($p=0,0005$) и на 35,4% ($p=0,019$) относительно 3 и 24 ч экспозиции (Рисунок 12).

Таким образом, GSNO во всех исследуемых концентрациях и сроках экспозиции является донором NO. При этом в концентрациях 100 и 500 мкМ при экспозиции 24 ч и в концентрациях 50-500 мкМ и экспозиции 72 ч данное вещество инициирует развитие НС и вызывает снижение жизнеспособности клеток.

3.2. Влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2

Относительное количество Р-гр в клетках линии Сасо-2 оценивали методом вестерн-блот. Полученные результаты представлены на рисунках 13-15.

При воздействии донора оксида азота (II) GSNO на клетки в течение 3 ч количество Р-гр достоверно не изменялось по сравнению с контролем ($p>0,05$) (Рисунок 13).

При увеличении длительности эксперимента до 24 ч относительное

количество Р-гр увеличивалось при концентрациях GSNO 10, 50 и 100 мкМ – на 46,2% ($p=0,01$), 38,1% ($p=0,02$) и 25,8% ($p=0,045$) соответственно по сравнению с показателями контрольных значений.

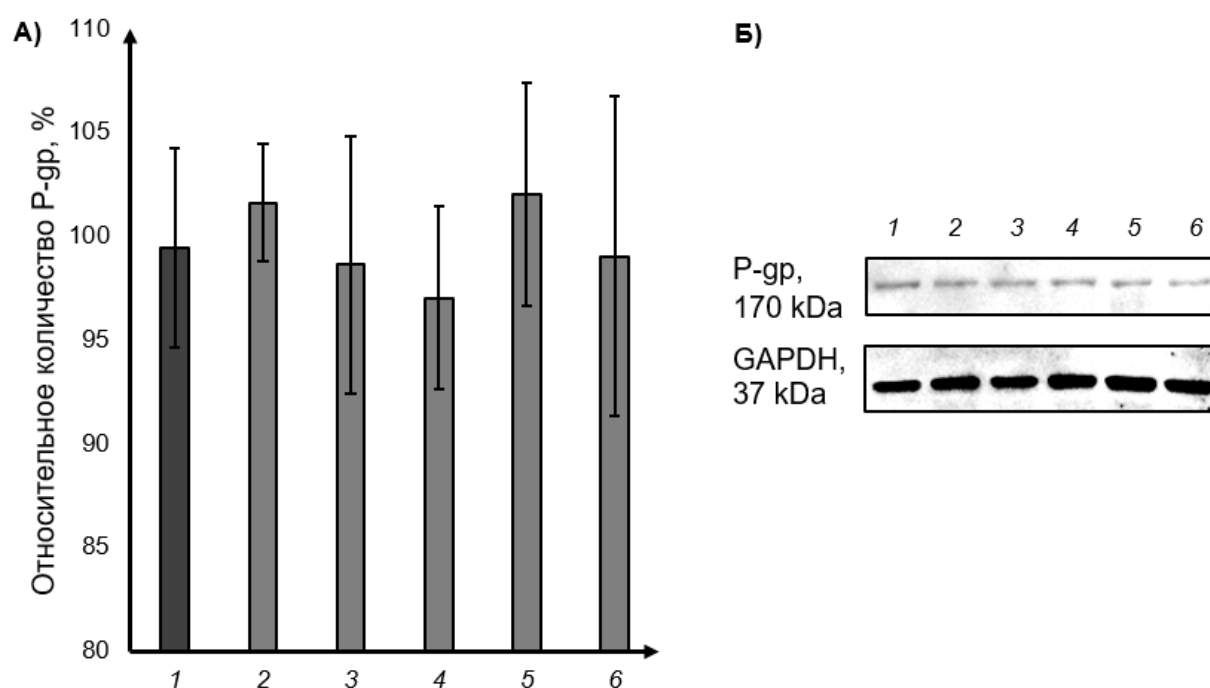


Рисунок 13 – Изменение относительного количества Р-гр в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Примечание: * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса), 1 – контроль, 2, 3, 4, 5, 6 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 1, 10, 50, 100, 500 мкМ соответственно.

А) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab; Б) – результаты детекции Р-гр и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+

При повышении концентрации GSNO до 500 мкМ отмечалось снижение уровня Р-гр на 54,9% ($p=0,002$) (Рисунок 14).

При длительности воздействия 72 ч донор оксида азота (II) GSNO в концентрациях 1 и 50 мкМ не влиял на уровень Р-гр, в концентрации 10 мкМ повышал его относительное количество на 23,1% ($p=0,0002$), а в концентрации

донора NO 100 мкМ и 500 мкМ вызывал его уменьшение на 37,0% ($p=0,0002$) и 47,1% ($p=0,0002$) по сравнению с контрольными значениями соответственно (Рисунок 15).

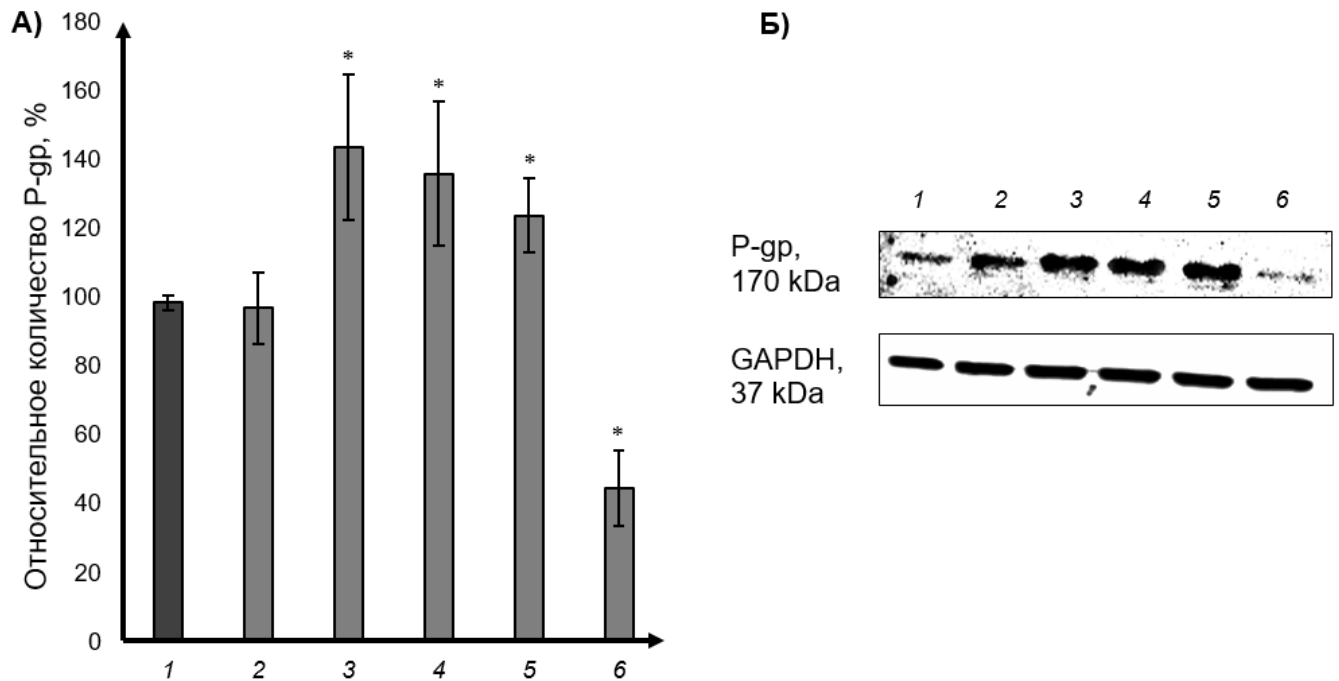


Рисунок 14 – Изменение относительного количества P-гр в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Примечание: * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса); 1 – контроль, 2, 3, 4, 5, 6 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 1, 10, 50, 100, 500 мкМ соответственно.

А) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab; Б) – результаты детекции P-гр и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+

Таким образом, донор оксида азота (II) GSNO при 24 ч инкубации в концентрациях 10-100 мкМ и при 72 ч экспозиции в концентрации 10 мкМ приводит к повышению относительного количества P-гр. Однако при 24 ч воздействии GSNO в концентрации 500 мкМ и при 72 ч – в концентрациях 100 и 500 мкМ вызывает снижение уровня белка-транспортера. GSNO при 3 ч экспозиции не влияет на содержание P-гр.

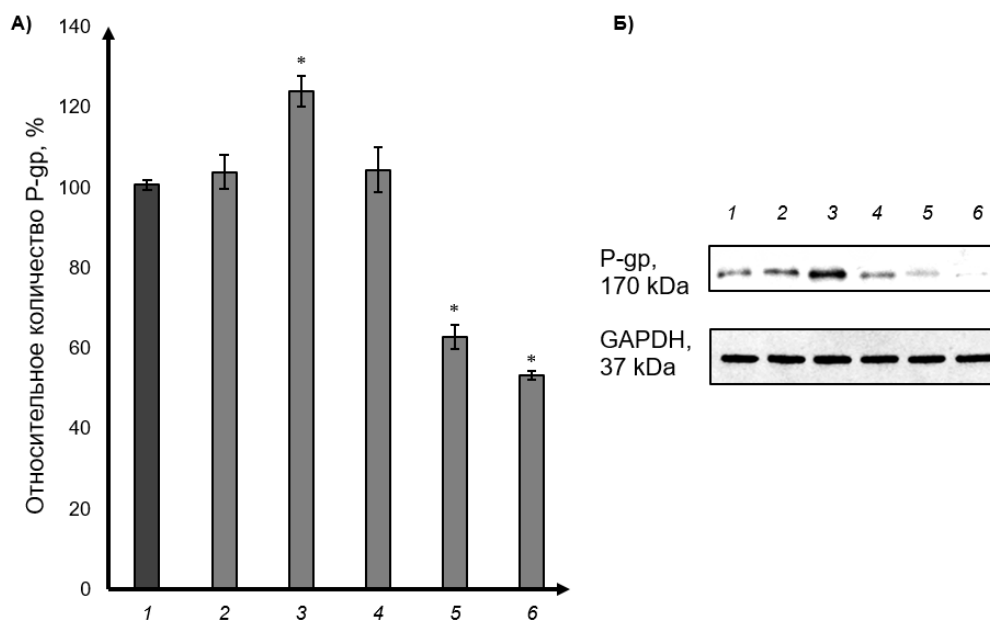


Рисунок 15 – Изменение относительного количества Р-гр в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Примечание: * – значимые различия с контролем, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса); 1 – контроль, 2, 3, 4, 5, 6 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 1, 10, 50, 100, 500 мкМ соответственно.

А) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab; Б) – результаты детекции Р-гр и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+ статистически

3.3. Влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на активность Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2

Активность Р-гр оценивали по транспорту его маркерного субстрата – фексофенадина через монослой клеток линии Сасо-2.

Перед выполнением транспортных экспериментов до и после воздействия донора оксида азота (II) – GSNO оценивали целостность клеточного монослоя по величине трансэпителиального сопротивления (TEER). При его значении выше 500

мОм \times см² к клеткам Сасо-2 добавляли GSNO в изучаемых концентрациях и инкубировали в течение 3, 24 и 72 ч. Полученные результаты представлено в таблицах 3-5.

Воздействие GSNO во всех тестируемых концентрациях в течение 3 ч не оказало достоверного эффекта на величину TEER, данный показатель статистически значимо не отличался от значений до начала влияния донора NO ($p > 0,05$) (Таблица 3).

Таблица 3 – Изменение трансэпителиального сопротивления монослоя клеток линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 ч ($M \pm SD$, $n=6$ – для каждой серии экспериментов)

Концентрация GSNO	Трансэпителиальное сопротивление, мОм \times см ²	
	До эксперимента	После эксперимента
Контроль	640,0 \pm 60,99	657,5 \pm 36,84
1 мкМ	700,0 \pm 35,78	697,0 \pm 112,88
10 мкМ	738,33 \pm 60,14	736,67 \pm 39,83
50 мкМ	693,33 \pm 46,76	686,67 \pm 43,67
100 мкМ	595,0 \pm 50,49	602,83 \pm 115,62
500 мкМ	664,83 \pm 55,10	655,00 \pm 164,77

Примечание: * – статистически значимые различия между значениями трансэпителиального сопротивления до и после эксперимента (t-критерий Стьюдента)

Увеличение длительности экспозиции с донором оксида азота (II) до 24 ч сопровождалось снижением TEER монослоя клеток линии Сасо-2 при воздействии GSNO в концентрации 500 мкМ на 27,7% ($p=0,004$), а в остальных концентрациях достоверного эффекта не оказывало ($p > 0,05$) (Таблица 4).

Таблица 4 – Изменение трансэпителиального сопротивления монослоя клеток линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=6$ – для каждой серии экспериментов)

Концентрация GSNO	Трансэпителиальное сопротивление, мОм \times см ²	
	До эксперимента	После эксперимента
Контроль	646,67 \pm 76,59	707,5 \pm 64,87
1 мкМ	696,67 \pm 99,13	728,17 \pm 102,25
10 мкМ	720,0 \pm 90,77	698,33 \pm 65,55
50 мкМ	636,67 \pm 68,02	603,33 \pm 45,02
100 мкМ	663,33 \pm 87,10	605,5 \pm 137,69
500 мкМ	700,33 \pm 91,07	506,67 \pm 91,14 *

Примечание: * – статистически значимые различия между значениями трансэпителиального сопротивления до и после эксперимента (t-критерий Стьюдента)

Дальнейшее увеличение продолжительности воздействия GSNO до 72 ч вызывало уменьшение TEER монослоя клеток линии Сасо-2 уже при концентрациях донора NO 100 и 500 мкМ на 26,7% ($p=0,001$) и 33,6% ($p=0,004$) соответственно по сравнению со значениями до начала эксперимента, а в остальных концентрациях достоверного эффекта не оказывало ($p>0,05$) (Таблица 5).

Таблица 5 – Изменение трансэпителиального сопротивления монослоя клеток линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=6$ – для каждой серии экспериментов)

Концентрация GSNO	Трансэпителиальное сопротивление, мОм \times см ²	
	До эксперимента	После эксперимента
Контроль	723,33 \pm 42,27	716,67 \pm 56,45
1 мкМ	711,67 \pm 96,42	761,5 \pm 78,15
10 мкМ	665,00 \pm 95,24	656,67 \pm 69,19
50 мкМ	646,67 \pm 65,93	620,00 \pm 36,33
100 мкМ	673,33 \pm 68,61	493,33 \pm 73,67 *
500 мкМ	665,33 \pm 105	441,67 \pm 119,57 *

Примечание: * – статистически значимые различия между значениями трансэпителиального сопротивления до и после эксперимента (t-критерий Стьюдента)

После оценки целостности клеточного монослоя переходили к изучению транспорта субстрата Р-гр – фексофенадина.

Анализировали коэффициент кажущейся проницаемости фексофенадина $P_{app} b-a$, характеризующий его проникновение из базолатеральной камеры в апикальную за счет пассивной диффузии и функционирования Р-гр, и коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} a-b$, характеризующий его транспорт из апикальной камеры в базолатеральную за счет пассивной диффузии против работы Р-гр и их соотношение $P_{app} b-a / P_{app} a-b$.

Полученные результаты представлены в таблицах 6-8.

Таблица 6 – Изменение транспорта субстрата Р-гликопротеина фексофенадина через монослой клеток линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Концентрация GSNO	$P_{app} b-a, \times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} a-b, \times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} b-a / P_{app} a-b$
Контроль	1,25±0,12	0,42±0,13	3,25±1,3
1 мкМ	0,98±0,27	0,47±0,217	2,27±0,64
10 мкМ	1,19±2,24	0,93±0,94	3,20±3,71
50 мкМ	1,27±0,23	0,42±0,29	3,79±1,86
100 мкМ	0,98±0,15	0,65±0,73	3,56±3,10
500 мкМ	0,87±0,22*	1,97±0,82*	0,51±0,25*

Примечание: * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса)

В контроле коэффициент кажущейся проницаемости фексофенадина $P_{app} b-a$ превышал коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} a-b$ более чем в 2 раза ($p < 0,001$), что свидетельствует об адекватности используемой модельной системы.

Донор оксида азота (II) GSNO в концентрациях 1-100 мкМ при воздействии на клетки линии Сасо-2 в течение 3 ч достоверно не влиял на значения

коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$, $P_{app} a-b$ и их отношения, а в концентрации 500 мкМ вызывал уменьшение коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ фексофенадина на 30,4% ($p=0,05$), повышение коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} a-b$ фексофенадина на 369,1% ($p=0,009$) и уменьшение отношения коэффициентов $P_{app} b-a / P_{app} a-b$ на 84,3% ($p=0,05$) по сравнению с контролем (Таблица 6). Полученные результаты свидетельствуют о снижении активности белка-транспортера при воздействии максимальной дозы донора NO.

При длительности эксперимента 24 ч GSNO в концентрации 1 мкМ достоверно не влиял на изучаемые показатели, а в концентрациях 10 и 50 мкМ повышал коэффициент кажущейся проницаемости фексофенадина $P_{app} b-a$ на 429,4% ($p=0,0009$) и 266,9% ($p=0,02$) по сравнению с контролем, при этом коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} a-b$ не изменялся (Таблица 7).

Таблица 7 – Изменение транспорта субстрата Р-гликопротеина фексофенадина через монослой клеток линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Концентрация GSNO	$P_{app} b-a, \times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} a-b, \times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} b-a / P_{app} a-b$
Контроль	1,09±0,084	0,51±0,07	2,16±0,47
1 мкМ	1,77±0,38	0,92±0,64	2,49±1,24
10 мкМ	5,77±0,69*	1,38±0,82	5,35±2,93
50 мкМ	4,00±0,21*	1,53±0,08	3,14±1,52
100 мкМ	2,43±1,64	1,06±0,08	4,74±4,87
500 мкМ	2,55±1,53	2,60±0,42*	1,06±0,82

Примечание: * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса)

Полученные результаты свидетельствуют об увеличении активности Р-gr

под действием GSNO в концентрациях 10 и 50 мкМ.

При концентрации GSNO 100 мкМ не было выявлено статистически значимых различий с показателями коэффициентов кажущейся проницаемости контроля.

Увеличение концентрации GSNO до 500 мкМ приводило к нормализации коэффициента кажущейся проницаемости фексофенадина $\text{Papp } b-a$ (он достоверно не отличался от контроля), но повышало коэффициент кажущейся проницаемости фексофенадина $\text{Papp } a-b$ на 409,8% ($p=0,02$) (Таблица 7).

Отношение коэффициентов кажущейся проницаемости фексофенадина $\text{Papp } b-a / \text{Papp } a-b$ при 24 ч эксперименте достоверно не изменялось по сравнению с контролем при влиянии донора NO во всех концентрациях, однако при воздействии GSNO в концентрации 500 мкМ коэффициенты $\text{Papp } b-a$ и $\text{Papp } a-b$ достоверно между собой не различались, что свидетельствует о выравнивании транспорта фексофенадина через монослой клеток Caco-2 в обе стороны.

Инкубация клеток линии Caco-2 с GSNO в течение 72 ч приводила к повышению коэффициента кажущейся проницаемости фексофенадина $\text{Papp } b-a$ при концентрации донора NO 10 мкМ на 138,9% ($p=0,014$) по сравнению со значением контроля, а в остальных концентрациях достоверного эффекта не оказывала (Таблица 8).

Коэффициент кажущейся проницаемости фексофенадина $\text{Papp } a-b$ увеличивался при воздействии GSNO в концентрациях 50, 100 и 500 мкМ на 227,5% ($p=0,012$), 317,6% ($p=0,001$), 431,9% ($p=0,001$) по сравнению с контролем соответственно (Таблица 8).

При этом отношение коэффициентов кажущейся проницаемости фексофенадина $\text{Papp } b-a / \text{Papp } a-b$ увеличивалось на 112,2% ($p=0,065$) при воздействии GSNO в концентрации 10 мкМ и снижалось на 76,4% ($p=0,05$) в концентрации донора NO 500 мкМ (Таблица 8).

Таблица 8 – Изменение транспорта субстрата Р-гликопротеина фексофенадина через монослой клеток линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Концентрация GSNO	$P_{app} \text{ } b-a, \times 10^{-6} \text{ см/с}$	$P_{app} \text{ } a-b, \times 10^{-6} \text{ см/с}$	$P_{app} \text{ } b-a / P_{app} \text{ } a-b$
Контроль	$1,18 \pm 0,66$	$0,455 \pm 0,144$	$2,46 \pm 0,89$
1 мкМ	$1,07 \pm 0,13$	$0,469 \pm 0,16$	$2,44 \pm 0,68$
10 мкМ	$2,82 \pm 0,91^*$	$0,65 \pm 0,24$	$5,22 \pm 3,89^*$
50 мкМ	$2,24 \pm 0,48$	$1,49 \pm 0,29^*$	$1,53 \pm 0,38$
100 мкМ	$1,50 \pm 0,20$	$1,9 \pm 0,59^*$	$0,81 \pm 0,21$
500 мкМ	$1,30 \pm 0,19$	$2,42 \pm 0,76^*$	$0,58 \pm 0,16^*$

Примечание: * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса)

В совокупности с данными о влиянии GSNO на величину TEER полученные результаты свидетельствуют о повышении активности Р-гр при воздействии GSNO в течение 72 ч в концентрации 10 мкМ и об уменьшении активности белка-транспортера, повреждении клеточного монослоя и повышении проницаемости фексофенадина при концентрациях донора NO 100 и 500 мкМ.

Таким образом, GSNO при длительности воздействия 3 ч в концентрации 500 мкМ снижает активность Р-гр; при длительности экспозиции 24 ч в концентрациях 10 и 50 мкМ – повышает активность белка-транспортера, а в концентрации 500 мкМ – уменьшает ее и нарушает целостность клеточного монослоя; при длительности эксперимента 72 ч – в концентрации 10 мкМ увеличивает активность Р-гр, а в концентрациях 100-500 мкМ снижает ее и нарушает целостность клеточного монослоя.

3.4. Изучение механизмов повышения относительного количества Р-гр под действием донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона

Для изучения механизмов повышения относительного количества Р-гр под действием GSNO выполнены эксперименты с ингибиторами факторов, стимулирующих экспрессию гена *MDR1*, кодирующего Р-гр: ингибитором рГЦ – ODQ, ингибитором транскрипционного фактора Nrf2 – АЕМ1, с ингибиторами транскрипционных факторов PXR – кетоконазолом и CAR – CINPA1.

Донор оксида азота (II) GSNO использовался в концентрациях, которые вызывали увеличение относительного количества Р-гр в клетках линии Сасо-2.

Ингибиторы вносили в питательную среду за 30 мин до добавления донора оксида азота (II).

Перед изучением механизмов повышения содержания Р-гр под действием GSNO было проверено самостоятельное влияние ингибиторов на уровень белка-транспортера при их изолированной экспозиции с клетками линии Сасо-2 в течение 72 ч.

Полученные результаты представлены на рисунке 16.

Было показано, что ингибитор рГЦ ODQ в концентрации 10 мкМ, ингибитор транскрипционного фактора Nrf2 – АЕМ1 в концентрации 5 мкМ, ингибитор транскрипционного факторов PXR – кетоконазол в концентрации 10 мкМ при воздействии на клетки линии Сасо-2 в течении 72 ч достоверного эффекта на количество Р-гр не оказывали ($p > 0,05$) (Рисунок 16).

Однако ингибитор транскрипционного фактора CAR – CINPA1 в концентрации 10 мкМ и экспозиции 72 ч приводил к снижению уровня Р-гр в клетках линии Сасо-2 на 19,02% ($p = 0,0002$) относительно контрольных значений (Рисунок 16).

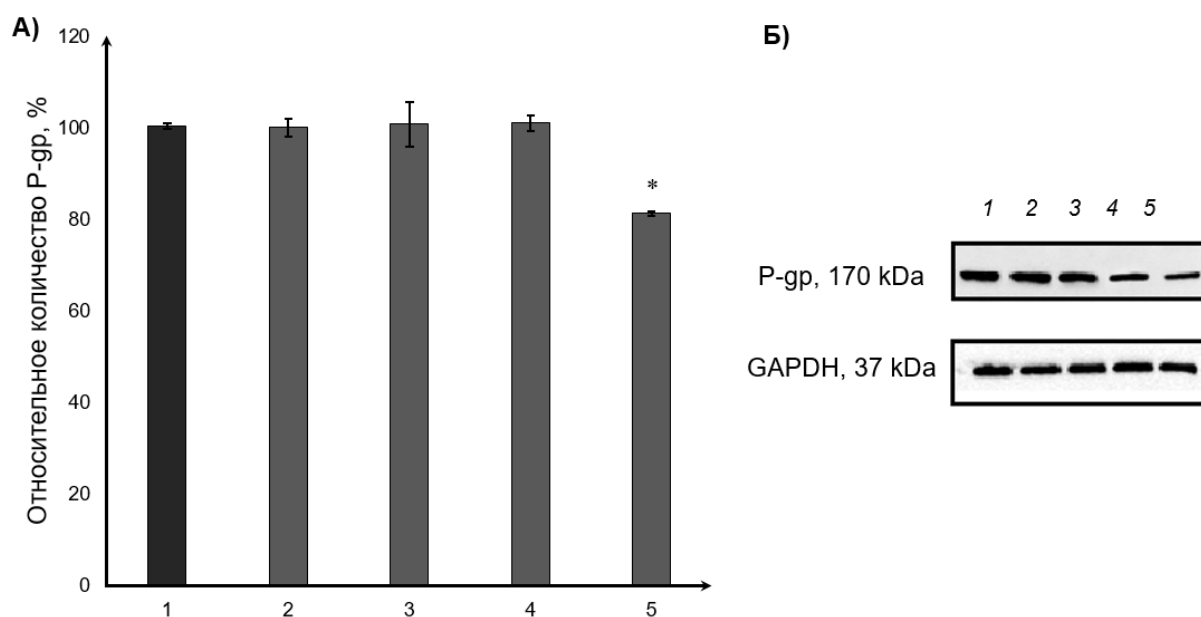


Рисунок 16 – Изменение относительного количества P-гр в клетках линии Caco-2 при изолированном воздействии ингибиторов растворимой гуанилатциклазы и транскрипционных факторов в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Примечание: 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2 – ингибитор растворимой гуанилатциклазы – ODQ, в концентрации 10 мкМ, 3- ингибитор транскрипционного фактора эритроидного происхождения 2 – АЕМ1, в концентрации 5 мкМ, 4 - ингибитор транскрипционного фактора прегнан X рецептора – кетоконазол, в концентрации 10 мкМ, 5 – ингибитор транскрипционного фактора конститутивного андростанового рецептора – CINPA1, в концентрации 10 мкМ; * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса); А) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab; Б) – результаты детекции P-гр и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+

На следующем этапе исследования была оценена роль NO-цГМФ-сигнального пути в механизме повышения относительного количества P-гр в клеточной линии Caco-2 под действием донора оксида азота (II) GSNO. Полученные результаты представлены на рисунках 17 и 18.

Ингибитор рГЦ ODQ при совместном инкубировании с GSNO в течение 24 ч предотвращал повышение относительного количества P-гр в клетках линии Caco-

2 при концентрации донора NO 10 и 50 мкМ (уровень белка-транспортера достоверно от контроля не отличался) и не оказывал влияния при концентрации GSNO 100 мкМ (Рисунок 17): количество Р-гр превышало показатели контроля на 24,9% ($p=0,03$).

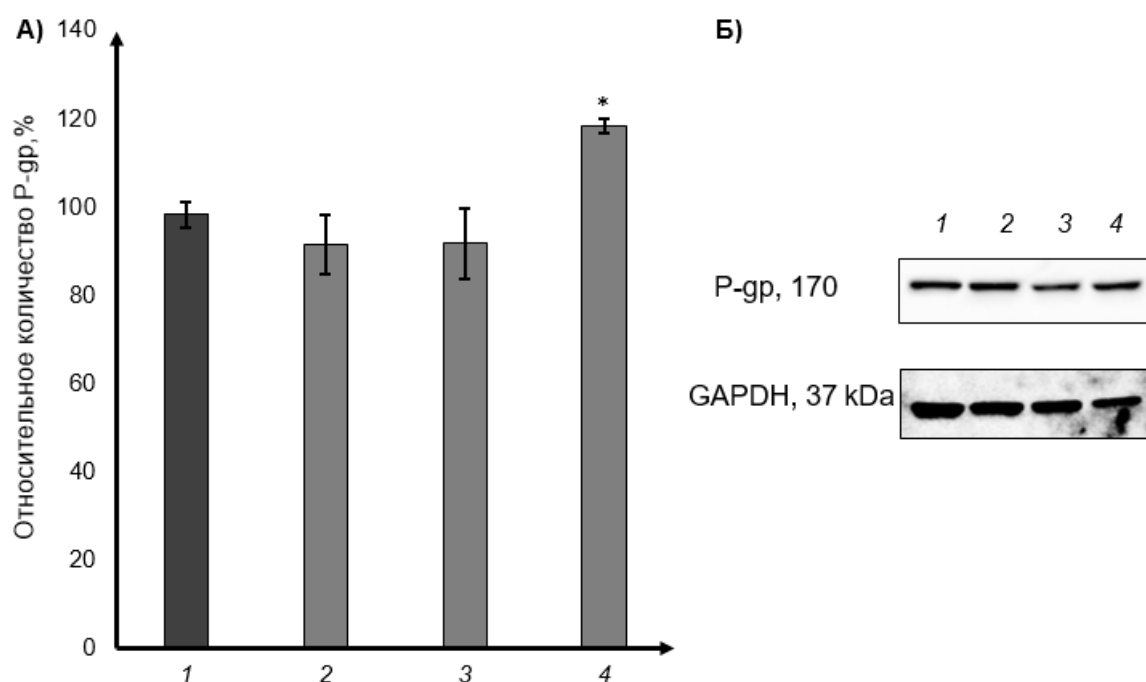


Рисунок 17 – Изменение относительного количества Р-гр в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием растворимой гуанилатциклазы (ODQ, 10 мкМ) в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Примечание: 1- контроль (без добавления тестируемых веществ), 2, 3 и 4 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50, 100 мкМ соответственно в сочетании с ODQ в концентрации 10 мкМ; * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса).

А) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab; Б) – результаты детекции Р-гр и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+

При длительности эксперимента 72 ч ODQ также предотвращал увеличение уровня Р-гр в клетках Сасо-2 при концентрации GSNO 10 мкМ, данный показатель не отличался от значений контроля (Рисунок 18).

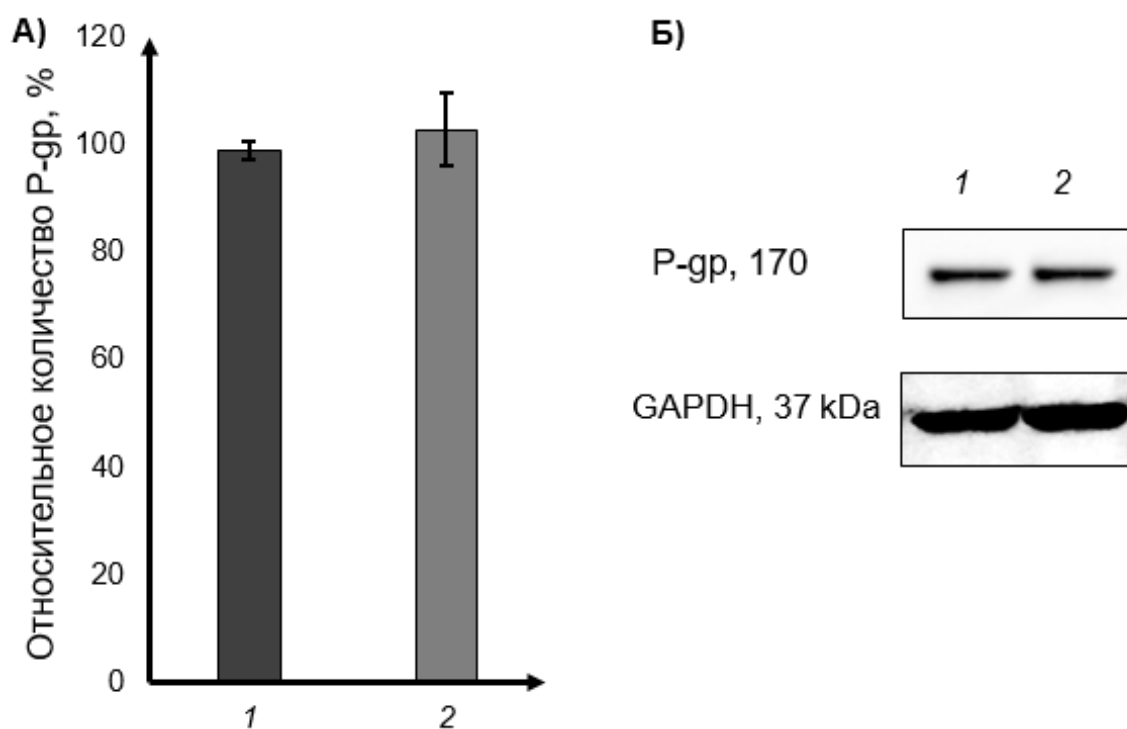


Рисунок 18 – Изменение относительного количества Р-гр в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием растворимой гуанилатциклазы (ODQ, 10 мкМ) в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Примечание: 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2 – S-нитрозоглутатион в концентрации 10 мкМ в сочетании с ODQ в концентрации 10 мкМ; * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса).

А) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab; Б) – результаты детекции Р-гр и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+

Следующим транскрипционным фактором, роль которого была оценена в механизме повышения относительного количества Р-гр в клеточной линии Сасо-2 под действием GSNO был Nrf2.

Полученные результаты представлены на рисунках 19-20.

Ингибитор Nrf2 – АЕМ1 не оказывал влияния на содержание Р-гр в клетках линии Сасо-2 при воздействии GSNO в концентрации 10 мкМ и экспозиции 24 (Рисунок 19) и 72 ч (Рисунок 20), относительное количество Р-гр превышало показатели контроля на 41,5% ($p=0,001$) и 19,5% ($p=0,0004$) соответственно.

В то же время АЕМ1 предотвращал повышение относительного количества Р-гр в клетках Сасо-2 при влиянии GSNO в концентрациях 50 и 100 мкМ и длительности инкубации 24 ч (Рисунок 19), данный показатель достоверно от значений контроля не отличался.

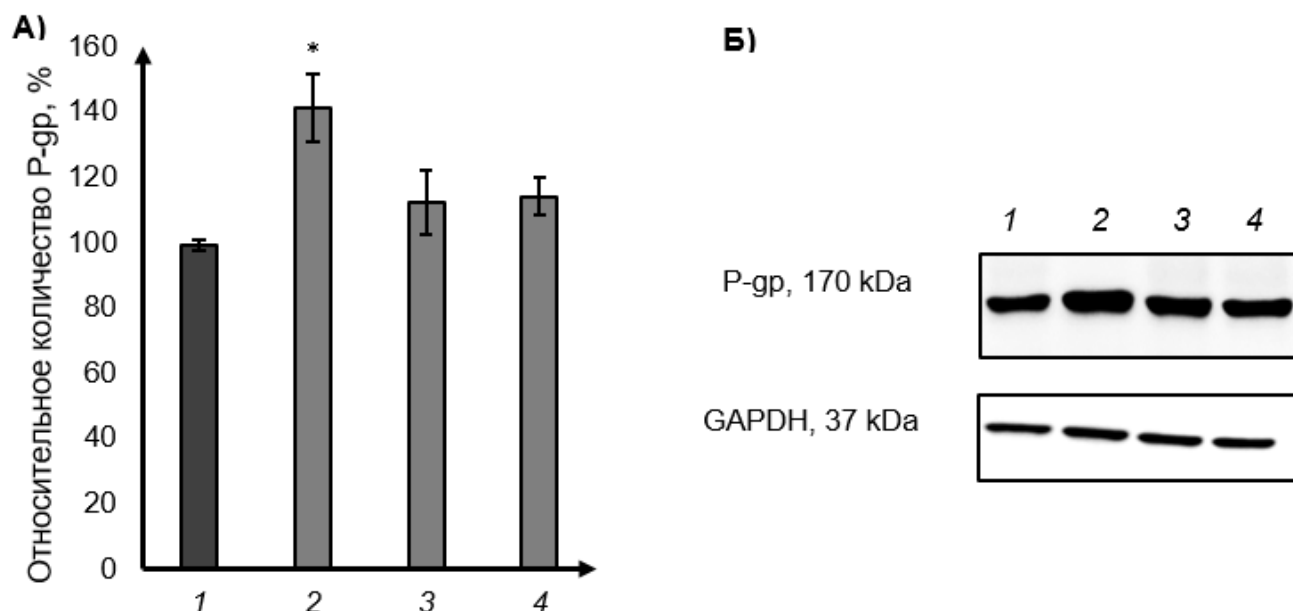


Рисунок 19 – Изменение относительного количества Р-гр в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (АЕМ1, 5 мкМ) в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Примечание: 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2, 3 и 4 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50, 100 мкМ соответственно в сочетании с АЕМ1 в концентрации 5 мкМ; * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса).

А) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab; Б) – результаты детекции Р-гр и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+

На следующем этапе исследования была изучена роль транскрипционных факторов PXR и CAR в механизме повышения относительного количества Р-гр в клеточной линии Сасо-2 под действием донора оксида азота (II) GSNO.

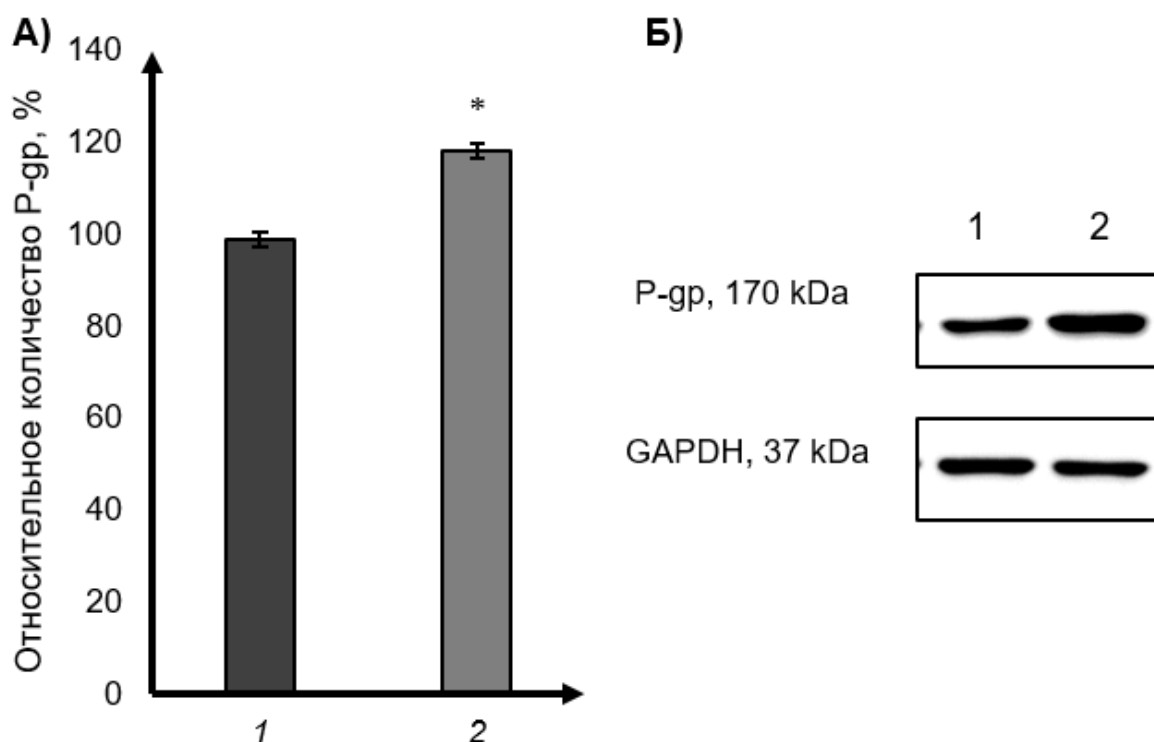


Рисунок 20 – Изменение относительного количества Р-гр в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (АЕМ1, 5 мкМ) в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Примечание: 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2 – S-нитрозоглутатион в концентрации 10 мкМ в сочетании с АЕМ1 в концентрации 5 мкМ; * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса).

А) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab; Б) – результаты детекции Р-гр и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+

Влияние ингибитора PXR кетоконазола на действие GSNO представлено на рисунках 21, 22, воздействие ингибитора CAR CINPA1 – на рисунках 23, 24.

Кетоконазол – ингибитор PXR не предотвращал повышения содержания Р-гр в клетках Сасо-2 под действием GSNO во всех концентрациях и длительности инкубации 24 (Рисунок 21) и 72 ч (Рисунок 22).

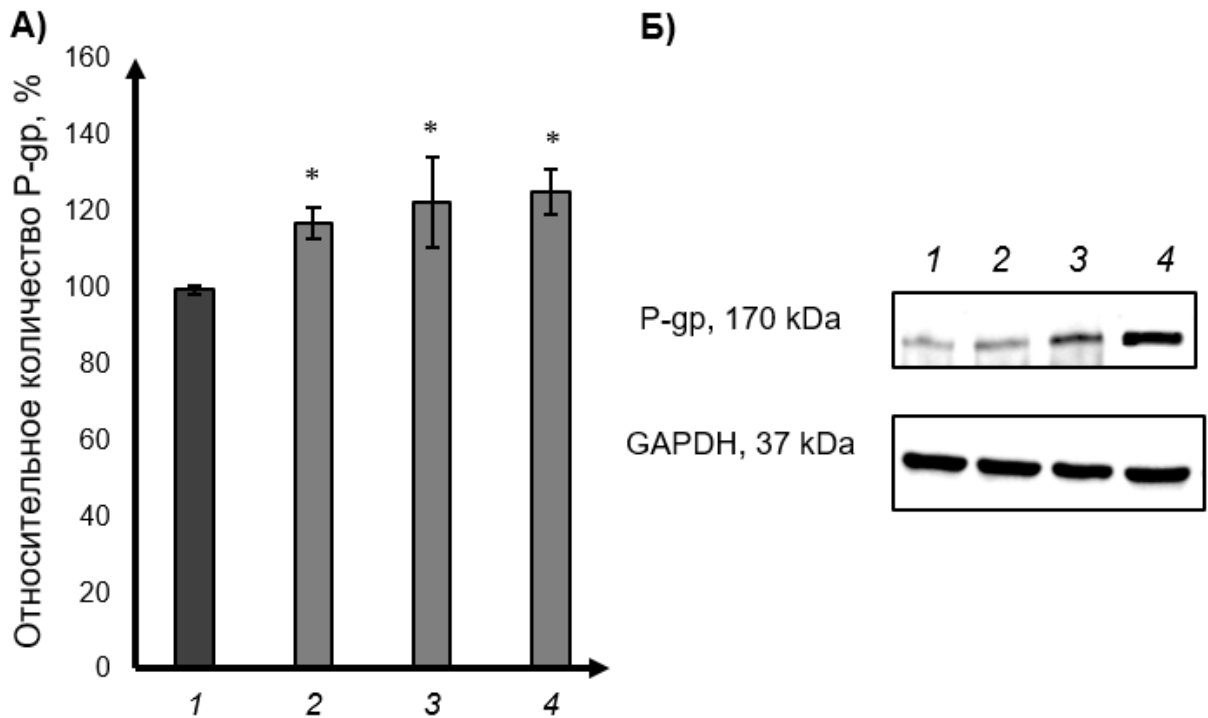


Рисунок 21 – Изменение относительного количества Р-гр в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием прегнан X рецептора (кетоконазол, 10 мкМ) в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$ – для каждой серии экспериментов)

Примечание: 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2, 3 и 4 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50, 100 мкМ соответственно в сочетании с кетоконазолом в концентрации 10 мкМ; * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса). А) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab; Б) – результаты детекции Р-гр и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+

Так, относительное количество Р-гр при воздействии донора оксида азота (II) в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ на фоне кетоконазола при инкубации 24 ч возрастало на 17,5% ($p=0,02$), 22,9% ($p=0,009$) и 25,6% ($p=0,008$) относительно значений контроля, а при инкубации 72 ч и концентрации GSNO 10 мкМ – на 22,9% ($p=0,03$).

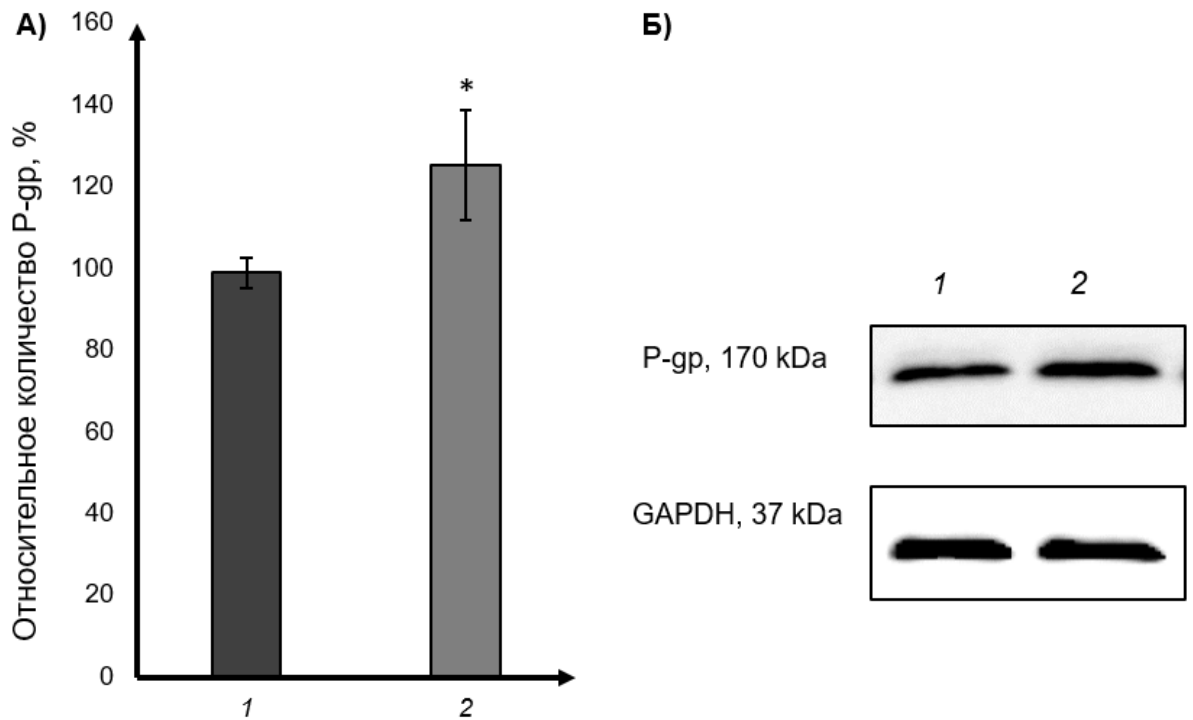


Рисунок 22 – Изменение относительного количества P-gr в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием прегнан X рецептора (кетоконазол, 10 мкМ) в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2 – S-нитрозоглутатион в концентрации 10 мкМ в сочетании с кетоконазолом в концентрации 10 мкМ; * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса).

А) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab; Б) – результаты детекции P-gr и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+

Еще одним транскрипционным фактором, роль которого была изучена в механизме влияния донора NO на повышение относительного количества P-gr в клеточной линии Caco-2 был ядерный рецептор CAR.

CINPA1 – ингибитор CAR не влиял на индукцию относительного количества P-gr при воздействии GSNO в концентрации 50-100 мкМ в течение 24 ч, которое превышало значения контроля на 23,6% ($p=0,03$) и на 25,4% ($p=0,03$) соответственно (Рисунок 23). При концентрации GSNO 10 мкМ и экспозиции 24 ч (Рисунок 23) и 72 ч (Рисунок 24) CINPA1 предотвращал повышение уровня P-gr.

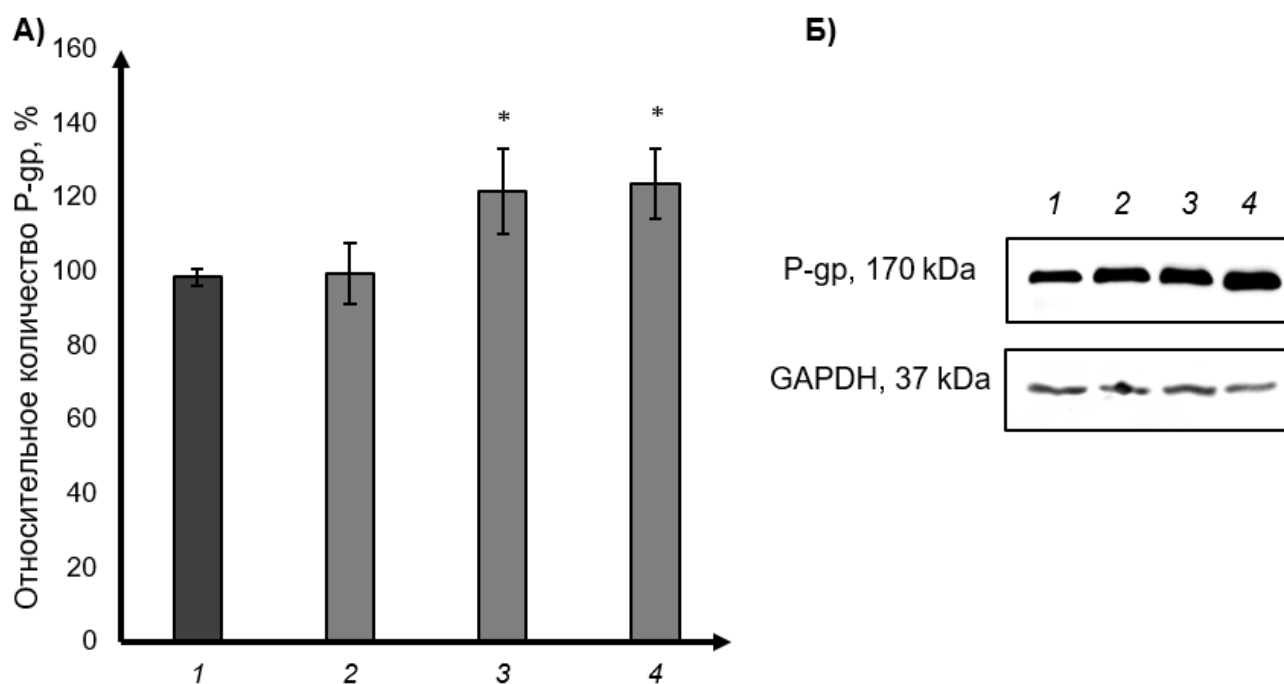


Рисунок 23 – Изменение относительного количества P-гр в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием конститутивного андростанового рецептора (CINPA1, 10 мкМ) в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2, 3 и 4 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50, 100 мкМ соответственно в сочетании с CINPA1 в концентрации 10 мкМ; * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса). А) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab; Б) – результаты детекции P-гр и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+

Таким образом, повышение относительного количества белка-транспортера P-гр при воздействии низких концентраций донора оксида азота (II) GSNO реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь (10-50 мкМ) и CAR (10 мкМ), а при увеличении концентрации GSNO до 50-100 мкМ, развитии и прогрессировании НС – через Nrf2.

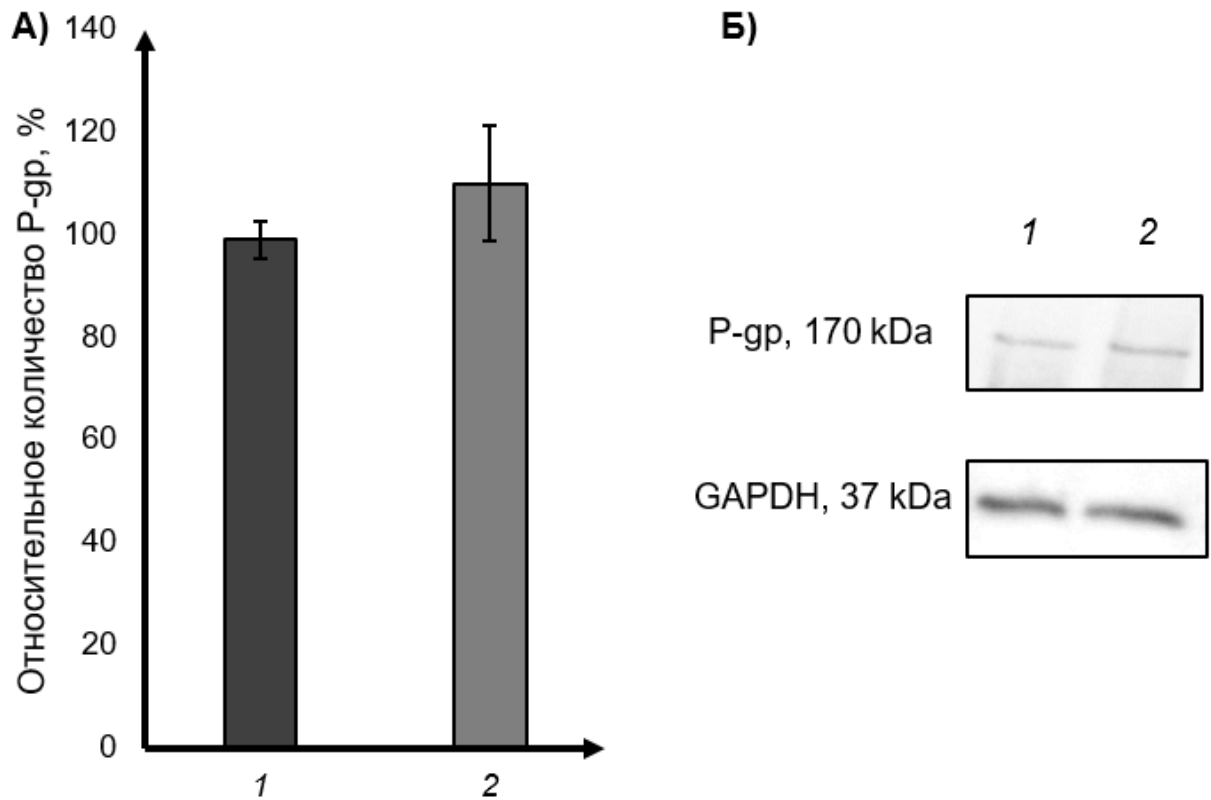


Рисунок 24 – Изменение относительного количества Р- гр в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитроглютамина в сочетании с ингибированием конститутивного андростанового рецептора (CINPA1, 10 мкМ) в течение 72 ч (M±SD, n=3)

Примечание: 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2 – S-нитроглютамин в концентрации 10 мкМ в сочетании с CINPA1 в концентрации 10 мкМ; * – статистически значимые различия с контролем, $p < 0,05$ (дисперсионный анализ «ANOVA», критерий Ньюмена-Кейлса).

А) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab; Б) – результаты детекции Р-гр и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+

ОБСУЖДЕНИЕ

P-gr – это АТФ-зависимый трансмембранный белок-транспортер, отвечающий за выведение эндогенных и экзогенных субстратов из клеток во внеклеточное пространство и биологические жидкости.

Благодаря экспрессии в кишечнике, печени, почках, гистогематических барьерах данный белок-транспортер играет важную роль в фармакокинетике (всасывании, распределении и выведении) лекарственных и ряда эндогенных веществ. В то же время, высокие уровни P-gr в опухолевых клетках лежат в основе развития резистентности опухолей к химиотерапии, в том числе и феномене множественной лекарственной устойчивости [107, 170].

P-gr представляет собой белок с регулируемой активностью. Вещества, которые ее модулируют, могут выступать как в роли ингибиторов, так и индукторов/активаторов, то есть либо снижать, либо повышать активность данного белка-транспортера соответственно [107, 183].

Модулирование активности P-gr может приводить к изменению фармакокинетики его субстратов, при ингибировании – к повышению системной экспозиции, при индукции – к ее уменьшению, что в свою очередь проявится либо развитием побочных эффектов, либо снижением эффективности проводимой терапии [128, 157, 169, 172, 183].

Целенаправленное снижение активности P-gr имеет важное практическое значение. Например, его можно использовать для преодоления резистентности опухолевых клеток к химиотерапии и повышения проникновения субстратов белка-транспортера в забарьерные органы, например, в головной мозг [109, 113].

Несмотря на многочисленные исследования в данной области, механизмы, лежащие в основе модуляции P-gr, продолжают активно изучаться с целью направленной регуляции белка-транспортера, а также повышения эффективности и безопасности проводимой фармакотерапии.

NO является сигнальной молекулой, принимающей участие в регуляции сосудистого гомеостаза [79], работе органов желудочно-кишечного тракта [184],

дыхательной [163] и мочевыделительной систем [139], функционировании центральной и периферической нервной системы, контролируя секрецию катехоламинов, серотонина, ацетилхолина, в иммунном ответе [1]. Основные физиологические функции NO реализуются через NO-pГЦ-цГМФ-сигнальный каскад.

В то же время, гиперпродукция оксида азота (II) может привести к развитию НС, повреждению биомакромолекул белков, липидов, углеводов и нуклеиновых кислот и как следствие, формированию патологии [76, 84, 156].

В ряде исследований оценивалось влияние доноров NO на количество и активность P-гp. Однако в данных работах были получены противоречивые результаты [114, 117, 118, 125], не анализировалась зависимость эффекта от дозы и длительности воздействия, не изучались механизмы выявленных изменений.

На ликвидацию данных пробелов и было направлено настоящее исследование.

В проделанной работе в качестве донора NO использовали GSNO. Он представляет собой S-нитрозилированное производное глутатиона [41], характеризующееся эндогенным присутствием в клетках и минимальной токсичностью, а также участием в различных биохимических процессах, контролирующих гомеостаз. Считается, что он является донором NO, а также может активировать классический pГЦ-цГМФ-зависимый сигнальный путь или вызывать нитрозилирование определенных белков [149].

Следовательно, GSNO является адекватным донором оксида азота (II), который можно использовать в экспериментальных исследованиях для изучения физиологической и патологической роли NO.

На первом этапе исследования для подтверждения повышения уровня NO в клетках линии Сасо-2 под действием GSNO оценивалось содержание метаболитов оксида азота (II) в лизате клеток после завершения экспериментальных воздействий.

В ходе работы было показано, что GSNO в диапазоне концентраций 1-500 мкМ и длительностью экспозиции 3, 24 и 72 ч вызывал повышение уровня метаболитов

NO, что свидетельствуют об адекватности используемой экспериментальной модели.

Известно, что NO в зависимости от концентрации может оказывать как физиологическое, так и патологическое воздействие, поэтому, на следующем этапе исследования оценивалась выраженность НС в зависимости от концентрации донора NO GSNO. Для этого в лизате клеток Caco-2 анализировалось содержание пероксинитрита (ONOO^-), битирозина, уровни белковых и безбелковых SH-групп.

В условиях избыточного образования NO при его взаимодействии с супероксидом O_2^- образуются АФА, в частности ONOO^- [1, 18, 156, 179]. ONOO^- , в свою очередь, взаимодействует с биомакромолекулами, вызывая их повреждение и развитие НС [105].

В нашем исследовании при инкубации клеточной линии Caco-2 с GSNO в течение 3 и 24 ч уровень ONOO^- возрастал лишь при воздействии донора NO в максимальных концентрациях 100 мкМ и 500 мкМ. При увеличении экспозиции с GSNO до 72 ч отмечалось увеличение исследуемого показателя во всех экспериментальных сериях, с максимальными уровнями ONOO^- при высоких концентрациях GSNO – 100 мкМ и 500 мкМ.

В условиях действия АФА нитрозилирование тирозина представляет собой наиболее специфичную окислительную модификацию. Нитротирозин частично диссоциирует до фенолята, но основное его количество конденсируется до 3,3-дитирозина (битирозина) [37]. Доказано, что образование битирозина превалирует над нитротирозином при длительном воздействии и/или более высоких концентрациях АФА, что позволяет рассматривать его в качестве маркера НС [39]. В нашем исследовании содержание битирозина статистически значимо возрастало при действии GSNO в концентрациях 10-500 мкМ и сроках инкубации 24 и 72 ч.

SH-группы тиоаминокислот также являются высокочувствительными к высоким уровням нитрозантов. Реакционноспособные сульфгидрильные SH-группы, в то же время, являются регуляторными центрами белковых молекул, на уровне которых возможна регуляция активности протеинов. Воздействие высоких уровней АФА на серосодержащие аминокислотные остатки может приводить к

посттрансляционному нитрозилированию белков и снижению их активности [15].

Концентрации безбелковых и белковых SH-групп изменялись аналогичным образом: при 3-х часовой инкубации клеток линии Caco-2 с GSNO отмечалось их снижение в концентрациях донора NO 50, 100 и 500 мкМ, при экспозиции 24 ч – в концентрациях 100 и 500 мкМ, а при длительности воздействия 72 ч – в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ соответственно.

В заключении было оценено цитотоксическое действие GSNO по результатам МТТ-теста. Было показано, что GSNO в диапазоне концентраций 1-500 мкМ и длительности экспозиции 3 ч не влиял на жизнеспособность клеток, в то время как GSNO в концентрациях 100-500 мкМ при длительности воздействия 24 ч и в концентрациях 50-500 мкМ при экспозиции 72 ч являлся токсичным и вызывал снижение их жизнеспособности.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что GSNO в высоких концентрациях вызывал развитие НС, что совпадало со снижением выживаемости клеток.

На следующем этапе эксперимента было изучено влияние GSNO на относительное количество Р-гр. При воздействии донора NO на клетки Caco-2 в течение 3 ч количество Р-гр достоверно не изменялось по сравнению с контролем. При увеличении длительности эксперимента до 24 ч относительное количество Р-гр повышалось при концентрациях GSNO 10-100 мкМ по сравнению с контролем, а при увеличении концентрации донора NO до 500 мкМ отмечалось снижение уровня белка-транспортера. При длительности воздействия 72 ч GSNO в концентрации 10 мкМ повышал содержание Р-гр в клетках Caco-2, а в концентрациях 100 мкМ и 500 мкМ вызывал его уменьшение по сравнению с контролем.

Повышение количества Р-гр, скорее всего, связано с увеличением синтеза белка-транспортера, в то время как снижение его уровня, видимо, обусловлено развитием НС, а именно повреждением молекулы белка под действием ONOO^- , уровень которого как раз достигал максимальных значений в данных сериях.

При повышении концентрации ONOO^- может нитрозилировать белки по

аминокислотным остаткам в следующей последовательности: метионин, цистеин, триптофан, тирозин [1]. По литературным данным известно, что P-gp богат SH-группами и в его составе имеются аминокислоты: метионин, цистеин, триптофан, тирозин [27, 142]. Следовательно, по вышеперечисленным аминокислотным остаткам могло произойти нитрозилирование белка-транспортера, что, в свою очередь, привело к снижению его количества.

При оценке активности P-gp были получены следующие результаты. GSNO при воздействии в течение 3 ч в концентрациях 1-100 мкМ не влиял на активность P-gp, а в концентрации 500 мкМ вызывал ее снижение, при сохранении целостности клеточного монослоя, оцениваемого по величине TEER. При длительности эксперимента 24 ч GSNO в концентрациях 10 и 50 мкМ повышал активность белка-транспортера, а при увеличении концентрации до 500 мкМ вызывал уменьшение активности P-gp и нарушение целостности клеточного монослоя, о чем свидетельствовало снижение TEER. Увеличение длительности экспозиции до 72 ч приводило к повышению активности P-gp под действием GSNO в концентрации 10 мкМ и ее уменьшению в концентрациях 100 и 500 мкМ. В высоких концентрациях донора NO также отмечалось и снижение целостности клеточного монослоя.

Таким образом, повышение активности P-gp под влиянием донора NO GSNO было связано с увеличением количества белка-транспортера в клетках Caco-2, а уменьшение активности и нарушение целостности клеточного монослоя, видимо, обусловлено развитием НС под влиянием высоких концентраций GSNO.

На заключительном этапе исследования были изучены механизмы увеличения относительного количества P-gp под влиянием NO. Для этого были выполнены эксперименты с ингибитором рГЦ – ODQ, ингибиторами транскрипционных факторов Nrf2 – AEM1, PXR – кетоконазолом и CAR – CINPA1, стимулирующих экспрессию гена *MDR1*, кодирующего P-gp. GSNO использовался в концентрациях (10, 50 и 100 мкМ), которые вызывали повышение относительного количества P-gp.

Первоначально было оценено самостоятельное влияние ингибиторов на количество P-gp, при изолированной экспозиции клеток Caco-2 с вышеописанными

веществами. Выявлено, что только ингибитор транскрипционного фактора CAR – CINPA1 (10 мкМ), приводил к снижению уровня P-gr в клетках Caco-2. Остальные ингибиторы на количество белка-транспортера не повлияли.

Далее были выполнены серии экспериментов при сочетанном инкубировании клеток Caco-2 с GSNO и ингибиторами сигнальных путей.

NO-цГМФ-сигнальный путь является основным механизмом реализации физиологических эффектов NO. NO активирует рГЦ, которая превращает ГТФ в цГМФ. цГМФ, в свою очередь, активирует нижестоящие элементы сигнального пути, включая PKG I и II, цГМФ-управляемые катионные каналы и ФДЭ, регулируемые цГМФ. Данный физиологический путь реализуется при низких, наномолярных концентрациях NO. В качестве ингибитора NO-цГМФ сигнального пути применялся специфический блокатор рГЦ – ODQ. Известно, что ODQ окисляет молекулу гема в ГЦ без влияния на каталитический домен, тем самым снижая ее активность [105].

В ходе исследования было показано, что ингибитор рГЦ ODQ при совместном инкубировании с GSNO в течение 24 ч предотвращал повышение количества P-gr при концентрации донора NO 10-50 мкМ, и не оказывал влияния при концентрации GSNO 100 мкМ. При длительности эксперимента 72 ч ODQ также предотвращал увеличение уровня P-gr при концентрации GSNO 10 мкМ, данный показатель не отличался от значений контроля.

Nrf2 – редокс-чувствительный транскрипционный фактор, действие которого направлено на защиту клетки от воздействия свободных радикалов. В условиях нормы данный транскрипционный фактор находится в комплексе с белком-репрессором Keap 1 (их связывание регулируется рядом протеинкиназ), который, с одной стороны, способствует убиквитированию и протеосомальной деградации Nrf2 (необходимым условием для этого процесса является наличие двух остатков цистеина в молекуле Keap 1), а с другой – предотвращает его проникновение из цитоплазмы в ядро. После активации комплекс Nrf2-Keap 1 диссоциирует и Nrf2 транслоцируется в ядро, где связывается с ARE и активирует транскрипцию защитных ферментов [6, 105].

Для ингибирования Nrf2 применялся AEM1 (ARE expression modulator 1), блокирующий взаимодействие Nrf2 с ARE и подавляющий экспрессию генов, контролируемых данным транскрипционным фактором. Ингибитор Nrf2 – AEM1 не оказывал влияния на действие GSNO на P-гр в концентрации 10 мкМ и экспозиции 24 и 72 ч, количество изучаемого белка-транспортера превышало показатели контроля. В то же время AEM1 предотвращал повышение уровня P-гр при воздействии GSNO в концентрации 50 и 100 мкМ и длительности инкубации 24 ч.

PXR (steroid and xenobiotic receptor – SXR, NR1I2 – Nuclear Receptor Subfamily 1, Group I, Member 2) и CAR (NR1I3, подсемейство 1, группа I, член 3) – члены суперсемейства ядерных рецепторов, которое в основном включает факторы транскрипции [155, 164].

Данные рецепторы локализуются преимущественно в печени и кишечнике и регулируют экспрессию ферментов I фазы биотрансформации, таких как изоферменты цитохрома P450 CYP3A и CYP2B, а также белков-транспортеров, в частности P-гр.

Ранее было доказано, что накопление продуктов окислительного и НС приводит к повышению количества PXR и CAR [3, 21, 22].

Ингибирование PXR осуществляли с применением кетоконазола, а CAR – с помощью CINPA1. Кетоконазол (противогрибковый препарат группы азолов) связывается с AF-2 (мотив activation function – участок, расположенный на С-конце белка, ответственный за активацию транскрипционных функций) областью лиганд-связывающего домена PXR и, таким образом, подавляет его активацию [105]. CINPA1 (CAR inhibitor not PXR activator 1) блокирует лиганд связывающий домен CAR, а также снижает его взаимодействие с ко-активаторами [50, 105].

В ходе исследования было показано, что кетоконазол – ингибитор PXR не предотвращал повышения количества P-гр под действием донора оксида азота (II) GSNO во всех концентрациях и длительности инкубации 24 и 72 ч.

CINPA1 – ингибитор CAR не влиял на изменение количества P-гр при воздействии GSNO в концентрации 50-100 мкМ в течение 24 ч. Однако, при

концентрации GSNO 10 мкМ и экспозиции 24 и 72 ч CINPA1 предотвращал повышение уровня Р-гр.

Таким образом, увеличение относительного количества Р-гр в клетках Сасо-2 при влиянии низких концентраций GSNO реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь (10-50 мкМ) и CAR (10 мкМ), а при повышении концентрации GSNO до 50-100 мкМ, развитии и прогрессировании НС – через Nrf2 (Рисунок 25).

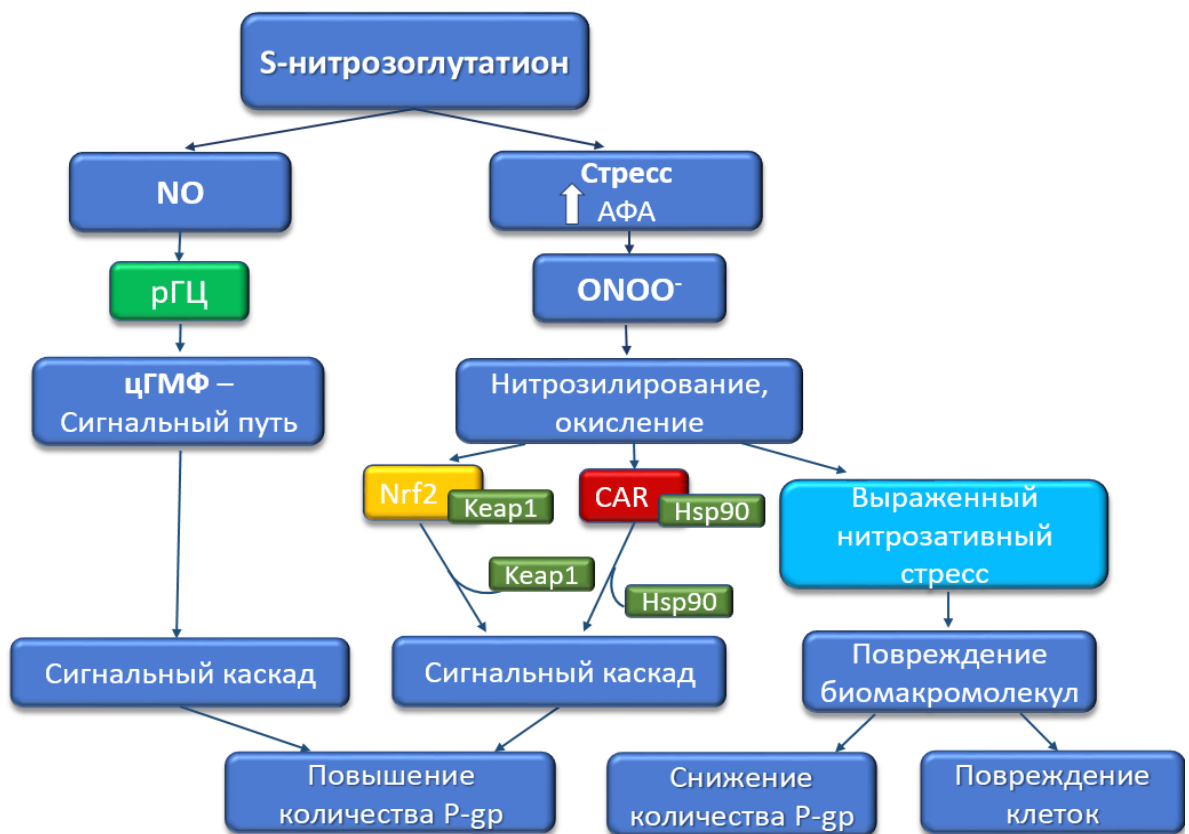


Рисунок 25 – Механизмы повышения относительного количества Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 под влиянием донора оксида азота (II) – S-нитрозоглутатиона

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе настоящего исследования на клетках линии Caco-2 было показано, что донор оксида азота (II) S-нитрозоглутатион при длительности воздействия 3 ч в концентрации 500 мкМ снижает активность Р-гликопротеина (без изменения количества), в диапазоне концентраций 10-100 мкМ при 24 ч инкубации и в концентрации 10 мкМ при 72 ч экспозиции повышает относительное количество и активность белка-транспортера, а в концентрации 500 мкМ при 24 ч воздействии и в концентрациях 100 и 500 мкМ при 72 ч эксперименте вызывает их снижение.

Уменьшение активности и относительного количества Р-гликопротеина под действием высоких концентраций S-нитрозоглутатиона, скорее всего, связано с развитием нитрозативного стресса и повреждением его молекулы. Увеличение содержания белка-транспортера под действием донора NO реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь (10-50 мкМ) и CAR (10 мкМ), а при повышении концентрации S-нитрозоглутатиона до 50-100 мкМ – через Nrf2.

ВЫВОДЫ

1. Донор оксида азота (II) S-нитрозоглутатион в концентрациях 1-500 мкМ и при длительности воздействия 3 ч не влияет на количество Р-гликопротеина. S-нитрозоглутатион в диапазоне концентраций 10-100 мкМ при 24 ч инкубации и в концентрации 10 мкМ при 72 ч воздействии повышает уровень белка-транспортера, а в концентрации 500 мкМ при 24 ч экспозиции и в концентрациях 100 и 500 мкМ при 72 ч воздействии – снижает количество Р-гликопротеина.

2. Донор оксида азота (II) S-нитрозоглутатион при длительности воздействия 3 ч в концентрации 500 мкМ снижает активность Р-гликопротеина. При длительности воздействия 24 ч S-нитрозоглутатион в концентрациях 10 и 50 мкМ повышает активность белка-транспортера, а в концентрации 500 мкМ ее снижает и нарушает целостность клеточного монослоя. При длительности воздействия 72 ч донор NO в концентрации 10 мкМ увеличивает активность белка-транспортера, а в концентрациях 100-500 мкМ ее снижает и также нарушает целостность монослоя клеток линии Сасо-2.

3. Донор оксида азота (II) S-нитрозоглутатион в концентрации 500 мкМ и при длительности воздействия 3 и 24 ч, в концентрациях 100 и 500 мкМ и экспозиции 72 ч вызывает развитие нитрозативного стресса, что приводит к снижению активности (воздействие 3, 24 и 72 ч) и количества (воздействие 24 и 72 ч) Р-гликопротеина.

4. Индукция Р-гликопротеина под действием донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона в концентрациях 10-50 мкМ и длительности воздействия 24 ч и в концентрации 10 мкМ и длительности экспозиции 72 ч осуществляется через цГМФ - сигнальный путь.

5. Индукция Р-гликопротеина под действием донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона в концентрациях 50-100 мкМ и длительности воздействия 24 ч осуществляется с участием транскрипционного фактора эритроидного происхождения 2.

6. Прегнан X рецептор не участвует в регуляции Р-гликопротеина при действии донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона в диапазоне концентраций

1-500 мкМ и длительности воздействия 3 ч, 24 ч и 72 ч.

7. Конститутивный андростановый рецептор участвует в индукции Р-гликопротеина под действием донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона в концентрации 10 мкМ и длительности воздействия 24 и 72 ч, а также регулирует его базальный уровень в норме.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Совместное назначение лекарственных препаратов, которые являются донорами NO (например, нитроглицерин, изосорбида динитрат, нитропруссид натрия), с лекарственными веществами-субстратами Р-гр с малой широтой терапевтического действия проводить с осторожностью, с учетом возможных фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне данного белка-транспортера.

2. Применение лекарственных веществ-субстратов Р-гр с малой широтой терапевтического действия у пациентов, страдающих заболеваниями, сопровождающимися развитием НС или повышением продукции NO, проводить с осторожностью, с учетом возможного изменения активности данного белка-транспортера.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Для подтверждения клинической значимости полученных результатов об изменении активности Р-гр под действием донора NO необходимо проведение аналогичных клинических исследований с использованием лекарственных препаратов – источников NO.

2. Выявленное индуцирующее действие NO-цГМФ сигнального пути на активность и количество Р-гр может являться фармакологической мишенью для модулирования активности белка-транспортера.

3. Учитывая показанное *in vitro* влияние донора NO на активность и количество Р-гр, целесообразно продолжить изучение функционирования белка-транспортера при заболеваниях, сопровождающихся гиперпродукцией NO или развитием НС.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфат;
- АФА – активные формы азота;
- АФК – активные формы кислорода;
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ГТФ – гуанозинтрифосфат;
- ГЦ – гуанилатциклаза;
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДМСО – диметилсульфоксид;
- мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота
- МТТ – раствора бромиды 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия;
- НАДФН₂ – восстановленный никотинамиддинуклеотид фосфат;
- НС – нитрозативный стресс;
- ПКВ – протеинкиназа В;
- ПКС – протеинкиназа С;
- ПКГ-1, ПКГ-2 – протеинкиназы G;
- рГЦ – растворимая гуанилатциклаза;
- РНК – рибонуклеиновая кислота;
- ФДЭ – фосфодиэстераза;
- цАМФ – циклический аденозинмонофосфат;
- цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат;
- ЦНС – центральная нервная система
- ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;
- 3Т3-L1 – клеточная линия иммортализованных преадипоцитов;
- ABC (adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette) – АТФ – связывающие кассетные транспортеры;
- ABCВ1* – ген семейства В1 АТФ – связывающих кассетных транспортеров;
- АЕBSF – аминоэтилбензолсульфонилфторид гидрохлорид;
- АЕМ1 – ингибитор ядерного фактора эритроидного происхождения 2 – N-(1,3-

бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин;

AF-2 (transcription activation function 2) – область лиганд-связывающего домена, расположенная на С-конце белковой молекулы прегнан X рецептора;

Akt – протеинкиназа В;

ARE (antioxidant-response elements) – антиоксидант респонсивный элемент;

Caco-2 – клеточная линия аденокарциномы ободочной кишки человека;

CAR – конститутивный андростановый рецептор;

CINPA1 – ингибитор конститутивного андростанового рецептора – 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5Н-дибензо[b,f]азепин-3-ил]этиловый эфир карбаминовой кислоты;

CYP3A, CYP3A4, CYP2B, CYP2B6, CYP2C9 – монооксигеназы (изоформы) группы цитохрома Р 450;

DMEM – Дульбекко модифицированная среда Игла;

DTNB – 5,5'-дителиобис(2-нитро)-бензоат;

eNOS или NOS-III – эндотелиальная синтаза оксида азота;

E-64 – транс-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4гуанидино)бутан;

ERK – внеклеточный киназный сигнальный каскад;

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа;

GPNT – иммортализованная линия эндотелиальных клеток головного мозга крыс;

GPx – глутатионпероксидаза;

GSNO – S-нитрозоглутатион;

GST – глутатион-S-трансфераза;

HT29 – эпителиальная клеточная линия толстой кишки человека;

HT29-dx – доксорубицин-резистентная эпителиальная клеточная линия толстой кишки человека;

iNOS или NOS-II – индуцибельная синтаза оксида азота;

JS-K – [O2-(2,4-динитрофенил)-1-[(4-этоксикарбонил)-пиперазин-1 ил]-диазен-1-иум-1-2-диолат];

Keap 1 – белок-репрессор;

kNOS – конститутивная NOS;

M – медиана;

MDR1 ((multidrug resistance protein 1) *MDR1a* и *MDR1b*) – ген множественной лекарственной устойчивости, кодирующий Р-гликопротеин;

NBD (nucleotide-binding domains) – нуклеотидсвязывающие домены;

NCI/ADR-RES – клеточная линия рака яичника;

NFY – ядерный фактор Y;

NF- κ B – ядерный фактор каппа В;

nNOS или NOS-I – нейрональная синтаза оксида азота;

NO – оксид азота II;

NOS – синтазы оксида азота;

NO_x – суммарная концентрация нитратов и нитритов;

NR (Nuclear Receptor) – ядерный рецептор;

Nrf2 (related factor 2) – ядерный фактор эритроидного происхождения 2;

ODQ – ингибитор растворимой гуанилатциклазы – 1H-[1,2,4]оксадиазоло-[4,3-а]хиноксалин-1-ОН;

p38 MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа 38;

p53 MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа 53;

Papp (apparent permeability coefficient) – коэффициент кажущейся проницаемости;

pCREB – белок связывающий элемент ответа фосфорилированного цАМФ;

P-gp – Р-гликопротеин;

PI3K – фосфоинозитид-3-киназа

PPNO – пропиламин-пропиламина ноноат;

Prkg 1 и *Prkg 2* – гены кодируемые протеинкиназой G;

PXR – прегнан X рецептор;

RONO₂ – органические нитраты и нитриты;

RSNO – S-нитрозотиолы;

RXR – рецептор ретиноевой кислоты;

SD – стандартное отклонение;

SNAP – S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин;

SNP – нитропруссид натрия;

STAT3 – активаторы транскрипции 3;

SUM159 – клетки рака молочной железы;

SXR – стероидный ксенобиотический рецептор;

$T_{1/2}$ – период полувыведения;

TEER – трансэпителиальное сопротивление;

TMD (transmembrane domains) – трансмембранные домены;

UGT – уридиндифосфат-глюкуронозилтрансфераза.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S-нитрозоглутатион в высоких концентрациях (75 : 1) ингибирует кислородсвязывающую функцию оксигемоглобина человека / О.В. Путинцева, Е.А. Калаева, В.Г. Артюхов, Е.В. Гостева. – Текст : непосредственный // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – № 4. – С. 66-72.
2. Абаленихина, Ю. В. Пероксинитрит: токсический агент и сигнальная молекула (обзор) / Ю. В. Абаленихина, О. В. Космачевская, А. Ф. Топунов. – Текст : непосредственный // Прикладная биохимия и микробиология. – 2020. – Т. 56, № 6. – С. 523-535.
3. Анализ принадлежности препарата Ноопепт к субстратам и модуляторам функциональной активности *ABCBI*-белка в эксперименте *in vivo* / И.В. Черных, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева [и др.]. – Текст : непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2017. – Т. 25, №1. – С. 30-41.
4. Арапова, А.И. Окислительная модификация белков сердечной и скелетной мускулатуры крыс под влиянием субстрата синтеза оксида азота / А.И. Арапова, М.А. Фомина. – Текст : непосредственный // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2016. – №1. – С. 75-80.
5. Влияние донора оксида азота s-нитрозоглутатиона на экспрессию конститутивного андростанового рецептора / Ю. В. Абаленихина, Е. А. Судакова, А. А. Сеидкулиева [и др.]. – Текст : непосредственный // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. – 2022. – Т. 58, № 5. – С. 410-420.
6. Влияние новых водорастворимых фенольных антиоксидантов на активность NRF2-подконтрольных ферментов, систему глутатиона и транслокацию NRF2 в ядро / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, П.М. Кожин [и др.]. – Текст : непосредственный // Сибирский научный медицинский журнал. - 2020. - Т. 40, № 6. - С. 58-69.
7. Возможный механизм антиоксидантного действия динитрозильных

комплексов железа / К.Б. Шумаев, О.В. Космачевская, Д.И. Грачев [и др.]. – Текст : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2021. – Т. 67, №2. – С. 162-168.

8. Гликопротеин-Р: структура, физиологическая роль и молекулярные механизмы модуляции функциональной активности / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Щулькин, Н.М. Попова. – Текст : непосредственный // Успехи физиологических наук. – 2014. – Т. 45, № 4. – С. 90-98.

9. Гончаров, Н.П. Оксид азота (NO): физиология и метаболизм (лекция) / Н.П. Гончаров. – Текст : непосредственный // Андрология и генитальная хирургия. – 2020. – Т. 21, №3. – С. 75–79.

10. Граник, В.Г. Оксид азота (NO). Новый путь к поиску лекарств / В.Г. Граник, Н.Б. Григорьев. – М.: Вузовская книга, 2004. – 360 с. – Текст : непосредственный.

11. Граник, В.Г. Экзогенные доноры оксида азота и ингибиторы его образования (химический аспект) / В.Г. Граник, С.Ю. Рябова, Н.Б. Григорьев. – Текст : непосредственный // Успехи химии. – 1997. – Т. 66, №. 8. – С. 792-807.

12. Изменение спектра поглощения продуктов окислительной модификации белков печени крыс в условиях дефицита синтеза оксида азота различной выраженности / С.А. Теплов, А.В. Абаленихина, М.А. Фомина, И.В. Матвеева. – Текст : непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2016. - №1. – С. 50-54.

13. Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-Р *in vitro* / П.Д. Ерохина, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин [и др.]. – Текст : непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2020. – Т. 28, №2. – С. 135-42.

14. Изучение принадлежности фабомотизола к субстратам гликопротеина-Р / И.В. Черных, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева [и др.]. – Текст : непосредственный // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. – 2017. – Т. 25, №4. – С. 538-550.

15. Космачевская, О.В. Карбонильный стресс: от бактерий до человека / О.В. Космачевская, К.Б. Шумаев, А.Ф. Топунов. – Петрозаводск: ИП Марков Н.А.,

2018. – 255 с. – Текст : непосредственный.

16. Кузнецова, В.Л. Оксид азота: свойства, биологическая роль, механизмы действия / В.Л. Кузнецова, А.Г. Соловьева. – Текст : непосредственный // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №4. – С. 1-9.

17. Метельская, В.А. Скрининг — метод определения уровня метаболитов оксида азота сыворотке человека / В.А. Метельская, Н.Г. Гуманова. – Текст : непосредственный // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – №6. – С. 15-18.

18. Молекулярный стресс и хронические нарушения обмена веществ / Э.А. Юрьева, Н.Н. Новикова, В.В. Длин, Е.С. Воздвиженская. – Текст : непосредственный // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2020. – Т. 65, №5. – С. 12-22.

19. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с. – Текст : непосредственный.

20. Фомина, М.А. Изменения субклеточного распределения активности лизосомальных цистеиновых протеиназ паренхиматозных органов крыс под действием модуляторов синтеза оксида азота / М.А. Фомина, А.А. Терентьев. – Текст : непосредственный // Исследования и практика в медицине. – 2018. – Т. 5, №3. – С. 28-39.

21. Функционирование прегнан X рецептора в условиях нитрозативного стресса / Ю.В. Абаленихина, Е.А. Судакова, А.А. Сеидкулиева [и др.]. – Текст : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2021. – Т. 67, №5. – С. 394-401.

22. Функционирование прегнан X рецептора в условиях окислительного стресса / Ю.В. Абаленихина, Е.А. Судакова, А.А. Слепнев [и др.]. – Текст : непосредственный // Биологические мембраны. – 2022. – Т. 39, №1. – С. 1-9.

23. Хемосенсибилизация опухолевых клеток фенольными антиоксидантами: роль фактора транскрипции NRF2 / Г.Г. Мартинович, И.В. Мартинович, А.В. Вчерашняя [и др.]. – Текст : непосредственный // Биофизика. – 2020. – Т. 65, № 6. – С. 1081-1092.

24. Цитоархитектоника и спектральные свойства эритроцитов, модифицированных лекарственным препаратом "Кардикет" / Л.О. Соколова, О.В. Путинцева, Е.А. Калаева, В.Г. Артюхов. – Текст : непосредственный // Вестник воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2021. – №1. – С. 122-132.

25. Экспрессия гликопротеина-Р при экспериментальной дисфункции щитовидной железы / А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева, И.В. Черных [и др.]. – Текст : непосредственный. // Клиническая и экспериментальная тиреоидология. – 2015. – Т. 11, № 3. – С. 11-16.

26. Якушева, Е.Н. Оценка принадлежности мексидола к субстратам, ингибиторам или индукторам гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, И.В. Черных. – Текст : непосредственный // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2015. – Т. 78, №5. – С. 19-23.

27. Якушева, Е.Н. Структура и функционирование белка множественной лекарственной устойчивости 1 / Е.Н. Якушева, Д.С. Титов. – Текст : непосредственный // Биохимия. – 2018. – Т. 83, №5.– С. 1148-1172.

28. A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from Escherichia Coli / S. Boschi-Muller, S. Azza, S. Sanglier-Cianferani [et al.]. – Text : visual // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275. – P. 35908-35913.

29. A small molecule inhibits deregulated NRF2 transcriptional activity in cancer / M.J. Bollong, H. Yun, L. Sherwood [et al.]. – Text : visual // ACS Chem. Biol. – 2015. – Vol. 10. – P. 2193-2198.

30. Activation of the cGMP/protein kinase G system in breast cancer by the dopamine receptor-1 / N. Ben-Jonathan, D.C. Borcharding, S. Fox, E.R. Hugo. – Text : visual // Cancer Drug Resist. – 2019. – Vol. 2, №4. – P. 933-947.

31. Activators of P-glycoprotein: Structure-activity relationships and investigation of their mode of action / K. Sterz, L. Möllmann, A. Jacobs [et al.]. – Text : visual // Chem Med Chem. – 2009. – Vol. 4, №11. – P. 1897-911.

32. Alderton, W.K. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition /

W. Alderton, C. Cooper, R. Knowles. – Text : visual // *Biochem. J.* – 2001. – Vol. 357. – P. 593-615.

33. Al-Sa'doni, H.H. S-nitrosothiols as nitric oxide-donors: chemistry, biology and possible future therapeutic applications / H.H. Al-Sa'doni, A. Ferro. – Text : visual // *Curr Med Chem.* – 2004. – Vol. 11, №20. – P. 2679-90.

34. Amado, R. Dytirosine: in vitro production and characterization / R. Amado, R. Aeschbach, H. Neukom. – Text : visual // *Methods Enzymol.* – 1984. – Vol. 107. – P. 377–388.

35. Aortic+ disease in Marfan syndrome is caused by overactivation of sGC-PRKG signaling by NO / A. de la Fuente-Alonso, M. Toral, A. Alfayate [et al.]. – Text : visual // *Nat. Commun.* – 2021. – Vol. 12, №1. – P. 2628.

36. Biel, M. Molecular diversity of cyclic nucleotide-gated cation channels / M. Biel, X. Zong, F. Hofmann. – Text : visual // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* – 1995. – Vol. 353. – P. 1–10.

37. Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration / G. Ferrer-Sueta, N. Campolo, M. Trujillo [et al.]. – Text : visual // *Chem Rev.* – 2018. – Vol. 118, №3. – P. 1338-1408.

38. Biphasic regulation of P-glycoprotein function and expression by NO donors in Caco-2 cells / R. Duan, N. Hu, H.Y. Liu [et al.]. – Text : visual // *Acta Pharmacol Sin.* – 2012. – Vol. 33, №6. – P. 767-74.

39. Boer, T.R. Peroxynitrite-mediated dimerization of 3-nitrotyrosine: unique chemistry along the spectrum of peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine / T.R. Boer, R.I. Palomino, P.K. Mascharak. – Text : visual // *Med One.* – 2019. – Vol. 4. – P. e:190003.

40. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford. – Text : visual // *Anal Biochem.* – 1976. – Vol. 7, №72. – P. 248-54.

41. Broniowska, A.K. S-Nitrosoglutathione / A.K. Broniowska, A.R. Diers, N. Hogg. – Text : visual // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* – 2013. – Vol. 1830, №5. – P. 3173-3181.

42. Bukowski, K. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy / K. Bukowski, M. Kciuk, R. Kontek. – Text : visual // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, №9. – P. e:3233.
43. Buys, E. New insights into the role of soluble guanylate cyclase in blood pressure regulation / E. Buys, P. Sips. – Text : visual // *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* – 2014. – Vol. 23. – P. 135–142.
44. Cai, Y.M. NO donors and NO delivery methods for controlling biofilms in chronic lung infections / Y.M. Cai, Y.D. Zhang, L. Yang. – Text : visual // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2021. – Vol. 105, №10. – P. 3931-3954.
45. Cellular models and in vitro assays for the screening of modulators of P-gp, MRP1 and BCRP / M. Gameiro, R. Silva, C. Rocha-Pereira [et al.]. – Text : visual // *Molecules.* – 2017. – Vol. 22, №4. – P. 600.
46. cGMP regulated protein kinases (cGK) / F. Hofmann, D. Bernhard, R. Lukowski, P. Weinmeister. – Text : visual // *Handb. Exp. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 191. – P. 137-162.
47. cGMP regulated protein kinases (cGK) / F. Hofmann, D. Bernhard, R. Lukowski, P. Weinmeister. – Text : visual // *Handb Exp Pharmacol.* – 2009. – P. 137–162.
48. cGMP-dependent protein kinase-2 regulates bone mass and prevents diabetic bone loss / G. Ramdani, N. Schall, H. Kalyanaraman [et al.]. – Text : visual // *J Endocrinol.* – 2018. – Vol. 238, №3. – P. 203-219.
49. Characterization of PXR mediated P-glycoprotein regulation in intestinal LS174T cells / B.P. Kota, V.H. Tran, J. Allen [et al.]. – Text : visual // *Pharm. Res.* – 2010. – Vol. 62. – P. 426-431.
50. CINPA1 is an inhibitor of constitutive androstane receptor that does not activate pregnane X receptor / M.T. Cherian, W. Lin, J. Wu, T. Chen. – Text : visual // *Mol. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 87, №5. – P. 878-89.
51. Communication between multiple drug binding sites on p-glycoprotein [Text] / C. Martin, G. Berridge, C.F. Higgins [et al.]. – Text : visual // *Mol. Pharmacol.* – 2000. – Vol. 58. – P. 624–632.

52. Computational insights into allosteric conformational modulation of P-glycoprotein by substrate and inhibitor binding / J. Xing, S. Huang, Y. Heng [et al.]. – Text : visual // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, №24. – P. e:6006.
53. Controlled delivery of nitric oxide for cancer therapy / H. Alimoradi, K. Greish, A. Gamble, G. Giles. – Text : visual // *Pharm Nanotechnol.* – 2019. – Vol. 7, №4. – P. 279-303.
54. Courtis, F. The control of male sexual responses / F. Courtis, S. Carrier, K. Charvier. – Text : visual // *Current Pharm Des.* – 2013. – Vol. 19. – P. 4341–56.
55. CRD-733, a Novel PDE9 (Phosphodiesterase 9) inhibitor, reverses pressure overload-induced heart failure / D.A. Richards, M.J. Aronovitz, P. Liu [et al.]. – Text : visual // *Circ Heart Fail.* – 2021. – Vol. 14, №1. – P. e:007300.
56. Cyclic nucleotide monophosphates in plants and plant signaling / C. Marondedze, A. Wong, L. Thomas [et al.]. – Text : visual // *Handb Exp Pharmacol.* – 2017. – Vol. 238. – P. 87-103.
57. Cyclic-nucleotide- and HCN-channel-mediated phototransduction in intrinsically photosensitive retinal ganglion cells / Z. Jiang, W.W.S. Yue, L. Chen [et al.]. – Text : visual // *Cell.* – 2018. – Vol. 175, №3. – P. 652-664.
58. Development of novel phosphodiesterase 5 inhibitors for the therapy of Alzheimer's disease / E. Zuccarello, E. Acquarone, E. Calcagno [et al.]. – Text : visual // *Biochem Pharmacol.* – 2020. – Vol. 176. – P. e:113818.
59. Development of novel rifampicin-derived P-glycoprotein activators/inducers, synthesis, in silico analysis and application in the RBE4 cell model, using paraquat as substrate / V. Vilas-Boas, R. Silva, A. Palmeira [et al.]. – Text : visual // *PLoS One.* – 2013. – Vol. 8, №8. – P. e:74425.
60. Drug binding sites on P-Glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis / C. Martin, G. Berridge, P. Mistry [et al.]. – Text : visual // *Biochemistry.* – 2000. – Vol. 39. – P. 11901–11906.
61. Duan, X. Improved haemocompatibility of cysteine-modified polymers via endogenous nitric oxide / X. Duan, R.S. Lewis. – Text : visual // *Biomaterials.* – 2002. – Vol. 23, №4. – P. 1197-203.

62. Effect of P-glycoprotein (p-gp) inducers on exposure of p-gp substrates: review of clinical drug-drug interaction studies / M. Elmeliegy, M. Vourvahis, C. Guo, D.D. Wang. – Text : visual // *Clin Pharmacokinet.* – 2020. – Vol. 59, №6. – P. 699-714.
63. Effectiveness and safety of fexofenadine, a new nonsedating H1-receptor antagonist in the treatment of fall allergies / E.A. Bronsky, , C.J. Falliers, H.B. Kaiser [et al.]. – Text : visual // *Allergy Asthma Proc.* – 1998. – Vol. 19. – P. 135-141.
64. Effects of cyclic GMP on smooth muscle relaxation / T.D. Warner, J.A. Mitchell, H. Sheng, F. Murad. – Text : visual // *Advances in pharmacology (San Diego, Calif.)*. – 1994. – Vol. 26. – P. 171–194.
65. Effects of nitric oxide on mucosal barrier dysfunction during early phase of intestinal ischemia/reperfusion / Y. Takizawa, H. Kishimoto, T. Kitazato [et al.]. – Text : visual // *Eur J Pharm Sci.* – 2011. – Vol. 42, №3. – P. 246-52.
66. Ellman, L.G. Tissue sulfhydryl groups / L.G. Ellman. – Text : visual // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1959. – Vol. 82. – P. 70-77.
67. Epigenetics: the third pillar of nitric oxide signaling / S. Socco, R. Bovee, M. Palczewski [et al.]. – Text : visual // *Pharmacol. Res.* – 2017. – Vol. 121. – P. 52–58.
68. Faraco, G. Hypertension: a harbinger of stroke and dementia / G. Faraco, C. Iadecola. – Text : visual // *Hypertension.* – 2013. – Vol. 62, №5. – P. 810–817.
69. Fatal gastrointestinal obstruction and hypertension in mice lacking nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase / A. Friebe, E. Mergia, O. Dangel [et al.]. – Text : visual // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104, №18. – P. 7699–7704.
70. Features of oxidative and nitrosative metabolism in lung diseases / S. Soodaeva, N. Kubysheva, I. Klimanov [et al.]. – Text : visual // *Oxid Med Cell Longev.* – 2019. – Vol. 2019. – P. 1689861.
71. Fernhoff, N.B. A nitric oxide/cysteine interaction mediates the activation of soluble guanylate cyclase / N.B. Fernhoff, E.R. Derbyshire, M.A Marletta. – Text : visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 2009. – Vol. 106, №51. – P. 21602–21607.
72. Ferreira, R.J. Molecular Docking characterizes substrate-binding sites and efflux modulation mechanisms within P-glycoprotein [Text] / R.J. Ferreira, M.J.U.

Ferreira, D.J. dos Santos // *J. Chem. Inf. Model.* – 2013. – Vol. 53. – P. 1747-1760.

73. Forstermann, U. Nitric oxide synthases regulation and function / U. Forstermann, W. Sessa. – Text : visual // *European Heart J.* – 2012. – P. 829-837.

74. Francisco, I.F. Peripheral nitric oxide signaling directly blocks inflammatory pain / I.F. Francisco Gomes, Q.C. Fernando, M.C. Thiago. – Text : visual // *Biochemical Pharmacology.* – 2020. – Vol. 176. – P. e:113862.

75. Functional induction of P-glycoprotein in the blood-brain barrier of streptozotocin-induced diabetic rats: evidence for the involvement of nuclear factor-kappa B, a nitrosative stress-sensitive transcription factor, in the regulation / H.J. Maeng, M.H. Kim, H.E. Jin [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2007. – Vol. 35. – P. 1996–2005.

76. Fundamental mechanisms of the cell death caused by nitrosative stress / F. Wang, Q. Yuan, F. Chen [et al.]. – Text : visual // *Front Cell Dev Biol.* – 2021. – Vol. 9. – P. e:742483.

77. Furchgott, R.F. The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine / R.F. Furchgott, J.V. Zawadzki. – Text : visual // *Nature.* – 1980. – Vol. 288. – P. 373-376.

78. Gaston, B. Nitric oxide and thiol groups / B. Gaston. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta.* – 1999. – Vol. 1411. – P. 323–333.

79. Gaynullina, D.K. Changes in endothelial nitric oxide production in systemic vessels during early ontogenesis - a key mechanism for the perinatal adaptation of the circulatory system / D.K. Gaynullina, R. Schubert, O.S. Tarasova. – Text : visual // *Int.J. Mol. Sci.* – 2019. – Vol. 20, №6. – P. 1421.

80. Gender differences in spatial learning, synaptic activity, and long-term potentiation in the hippocampus in rats: molecular mechanisms / P. Monfort, B. Gomez-Gimenez, M. Llansola, V. Felipe. – Text : visual // *ACS Chem. Neurosci.* – 2015. – Vol. 6. – P. 1420–1427.

81. Ghofrani, H.A. Sildenafil: from angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond / H.A. Ghofrani, I.H. Osterloh, F. Grimminger. – Text : visual // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2006. – Vol. 5. – P. 689-702.

82. Goshi, E. Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo / E. Goshi, G. Zhou, Q. He. – Text : visual // *Med Gas Res.* – 2019. – Vol. 9, №4. – P. 192-207.
83. Gruetter, C.A. Dissociation of cysteine and glutathione levels from nitroglycerin-induced relaxation / C.A. Gruetter, S.M. Lemke. – Text : visual // *Eur J Pharmacol.* – 1985. – Vol. 111, №1. – P. 85-95.
84. Gutierrez Cisneros, C. Synthetic, natural, and semisynthetic polymer carriers for controlled nitric oxide release in dermal applications: A review / C. Gutierrez Cisneros, V. Bloemen, A. Mignon. – Text : visual // *Polymers (Basel).* – 2021. – Vol. 13, №5. – P. 760.
85. Heat shock protein 90 regulates soluble guanylyl cyclase maturation by a dual mechanism / Y. Dai, S. Schlanger, M.M. Haque [et al.]. – Text : visual // *J. Biol. Chem.* – 2019. – Vol. 294, №35. – P. 12880-12891.
86. Hemodynamic, hormonal, and renal actions of phosphodiesterase-9 inhibition in experimental heart failure / N.J.A. Scott, M.T. Rademaker, C.J. Charles [et al.]. – Text : visual // *J Am Coll Cardiol.* – 2019. – Vol. 74. – P. 889–901.
87. Hennessy, M. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter / M. Hennessy, J.P. Spiers. – Text : visual // *Pharmacol Res.* – 2007. – Vol. 55, №1. – P. 1-15.
88. Hilgers, A.R. Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa / A.R. Hilgers, R.A. Conradi, P.S. Burton. – Text : visual // *Pharmac. Res.* – 1990. – Vol. 7, №9. – P. 902–910.
89. Homology modeling of the human P-glycoprotein (ABCB1) and insights into ligand binding through molecular docking studies / L. Mora Lagares, N. Minovski, A.Y. Caballero Alfonso [et al.]. – Text : visual // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, №11. – P. e:4058.
90. Hwang, T.L. Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea / T.L. Hwang, C.C. Wu, C.M. Teng. – Text : visual // *Br. J. Pharmacol.* – 1998. – Vol. 125. – P. 1158-1163.
91. Hydroxysafflor yellow a shows protection against PPAR γ inactivation in

nitrosative neurons / L. Sun, Y.W. Xu, J. Han [et al.]. – Text : visual // *Oxid Med Cell Longev.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 9101740.

92. In murine 3T3 fibroblasts, different second messenger pathways resulting in the induction of NO synthase II (iNOS) converge in the activation of transcription factor NF- κ B / H. Kleinert, C. Euchenhofer, I. Ihrig-Biedert, U. Förstermann. – Text : visual // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 6039–6044.

93. Inducible nitric oxide synthase: regulation, structure, and inhibition / M.A. Cinelli, H.T. Do, G.P. Miley, R.B. Silverman. – Text : visual // *Medicinal research reviews.* – 2020. – Vol. 40. – P. 158-189.

94. Interplay between the nuclear receptor pregnane X receptor and the uptake transporter organic anion transporter polypeptide 1A2 selectively enhances estrogen effects in breast cancer / H.E. Meyer zu Schwabedissen, R.G. Tirona, C.S. Yip [et al.]. – Text : visual // *Cancer Res.* – 2008. – Vol. 68, №22. – P. 9338-47.

95. Jehle, A. The interplay between cGMP and calcium signaling in Alzheimer's disease / A. Jehle, O. Garaschuk. – Text : visual // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, №13. – P. e:7048.

96. Jourdeuil, D. Oxidation and nitrosation of thiols at low micromolar exposure to nitric oxide. Evidence for a free radical mechanism // D. Jourdeuil, F.L. Jourdeuil, M. Feelisch. – Text : visual // *The Journal of biological chemistry.* – 2003. – Vol. 278, №18. – P. 15720–15726.

97. Juliano, R.L. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants / R.L. Juliano, V. Ling. – Text : visual // *Biochem. Biophys. Acta.* – 1976. – Vol. 455, №1. – P. 155–162.

98. Kone, B.C. Nitric oxide in renal health and disease / B.C. Kone. – Text : visual // *Am. J. Kidney Dis.* – 1997. – Vol. 30, №3. – P. 311–333.

99. L-Arginine and tetrahydrobiopterin supported nitric oxide production is crucial for the microbicidal activity of neutrophils / S. Nagarkoti, S. Sadaf, D. Awasthi [et al.]. – Text : visual // *Free Radic. Res.* – 2019. – Vol. 53, №3. – P. 281–292.

100. Lobysheva, I.I. Interaction of peroxynitrite and hydrogen peroxide with dinitrosyl iron complexes containing thiol ligands in vitro / I.I. Lobysheva, V.A.

Serezhenkov, A.F. Vanin. – Text : visual // *Biochemistry*. – 1999. – Vol. 64. – P. 194-200.

101. Loo, T.W. Determining the structure and mechanism of the human multidrug resistance P-glycoprotein using cysteine-scanning mutagenesis and thiol-modification techniques / T.W. Loo, D.M. Clarke. – Text : visual // *Biochim. Biophys. Act. (BBA)-Biomembran.* – 1999. – Vol. 1461, №2. – P. 315-325.

102. Loscalzo, J. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system / J. Loscalzo, G. Welch. – Text : visual // *Progress in cardiovascular diseases*. – 1995. – Vol. 38, №2. – P. 87–104.

103. Lv, C. Xenobiotic receptors in mediating the effect of sepsis on drug metabolism / C. Lv, L. Huang. – Text : visual // *Acta Pharm Sin B*. – 2020. – Vol. 10, №1. – P. 33-41.

104. Maratha, S. Possible involvement of NO-sGM-cGMP signaling in the antidepressant like effect of pyridoxine in mice / S. Maratha, V. Sharma, V. Walia. – Text : visual // *Metab Brain Dis*. – 2022. – Vol. 37, №1. – P. 173-183.

105. Mechanisms of regulation of the P-glycoprotein transporter protein functioning under the action of nitric oxide / A.V. Shchulkin, Y.V. Abalenikhina, E.A. Sudakova [et al.]. – Text : visual // *Biochemistry (Mosc)*. – 2022. – Vol. 87, №4. – P. 366-379.

106. Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy / R. Silva, V. Vilas-Boas, H. Carmo [et al.]. – Text : visual // *Pharmacol Ther*. – 2015. – Vol. 149. – P. 1-123.

107. Mora Lagares, L. Multiclass classifier for p-glycoprotein substrates, inhibitors, and non-active compounds / L. Mora Lagares, N. Minovski, M. Novič. – Text : visual // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, №10. – P. e:2006.

108. Multidrug resistance modulation activity of silybin derivatives and their anti-inflammatory potential / S. Dobiasova, K. Řehořova, D. Kučerova [et al.]. – Text : visual // *Antioxidants (Basel)*. – 2020. – Vol. 9, №5. – P. e:455.

109. Nanoparticulate matter exposure results in white matter damage and an inflammatory microglial response in an experimental murine model / M. Connor, K.

Lamorie-Foote, Q. Liu [et al.]. – Text : visual // PLoS One. – 2021. – Vol. 16, №7. – P. e:0253766.

110. Nawa, A. Regulatory action of nitric oxide synthase on ileal P-glycoprotein expression under streptozotocin-induced diabetic condition / A. Nawa, W. Fujita-Hamabe, S. Tokuyama. – Text : visual // Biol Pharm Bull. – 2011. – Vol. 34, №3. – P. 436-8.

111. New insights in the in vitro characterisation and molecular modelling of the P-glycoprotein inhibitory promiscuity [Text] / G. Bocci, A. Moreau, P. Vayer [et al.]. – Text : visual // Europ. J. Pharmac. Sci. – 2018. – Vol. 121. – P. 85-94.

112. N^G-hydroxy-L-arginine and nitric oxide inhibit Caco-2 tumor cell proliferation by distinct mechanisms / G.M. Buga, L.H. Wei, P.M. Bauer [et al.]. – Text : visual // Am J Physiol. – 1998. – Vol. 275, №4. – P. 1256-1264.

113. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response / D. Wink, H. Hines, R. Cheng [et al.]. – Text : visual // J. of Leukocyte Biology. – 2011. – Vol. 89. – P. 873-891.

114. Nitric oxide contributes to hypoxia-reoxygenation-induced P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells / S.J. Robertson, R. Mokgokong, K.D. Kania [et al.]. – Text : visual // Cell Mol Neurobiol. – 2011. – Vol. 31, №7. – P. 1103-11.

115. Nitric oxide differentially regulates renal ATP binding cassette transporters during endotoxemia / S. Heemskerk, A. van Koppen, L. van den Broek [et al.]. – Text : visual // Pflugers Arch. – 2007. – Vol. 454. – P. 321–34.

116. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications / P.G. Wang, M. Xian, X. Tang [et al.]. – Text : visual // Chem Rev. – 2002. – Vol. 102, №4. – P. 1091-134.

117. Nitric oxide mediates increased P-glycoprotein activity in interferon- γ -stimulated human intestinal cells / S.G. Dixit, B. Zingarelli, D.J. Buckley [et al.]. – Text : visual // Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol. – 2005. – Vol. 288, №3. – P. 533-40.

118. Nitric oxide reverses drug resistance by inhibiting ATPase activity of p-glycoprotein in human multi-drug resistant cancer cells / B.K. Sinha, C.D. Bortner, R.P.

Mason, R.E. Cannon. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta Gen Subj.* – 2018. – Vol. 62, №12. – P. 2806-2814.

119. Nitric oxide reverts the resistance to doxorubicin in human colon cancer cells by inhibiting the drug efflux / C. Riganti, E. Miraglia, D. Viarisio [et al.]. – Text : visual // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65. – P. 516–25.

120. Nitric oxide synthase-mediated alteration of intestinal P-glycoprotein under hyperglycemic stress (*Yakugaku zasshi*) / A. Nawa, W. Fujita-Hamabe, K. Nakamoto, S. Tokuyama. – Text : visual // *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan.* – 2011. – Vol. 131, №4. – P. 487–492.

121. Nitroglycerin and Iloprost improve mitochondrial function in colon homogenate without altering the barrier integrity of Caco-2 monolayers / A. Herminghaus, R. Eberhardt, R. Truse [et al.]. – Text : visual // *Front Med (Lausanne).* – 2018. – №5. – P. 291.

122. Nitrosothiols: chemistry and reactions / C. Zhang, T.D. Biggs, N.O. Devarie-Baez [et al.]. – Text : visual // *Chem Commun (Camb).* – 2017. – Vol. 53, №82. – P. 11266-11277.

123. Oral vitamin E supplementation in reducing nitrosative stress in adults treated for celiac disease / A. Piątek-Guziewicz, A. Dąbek, M. Przybylska-Feluś [et al.]. – Text : visual // *Pol Arch Intern Med.* – 2020. – Vol. 130, №7-8. – P. 711-713.

124. Oxidative stress and energy metabolism in the brain: midlife as a turning point / V.I. Lushchak, M. Duszenko, D.V. Gospodaryov, O. Garaschuk. – Text : visual // *Antioxidants.* – 2021. – Vol. 10. – P. e:1715.

125. Parasrampur, R. Divergent effects of nitric oxide donors on the biliary efflux transporters in isolated perfused rat livers: nitric oxide-independent inhibition of ABC transporters by sodium nitroprusside / R. Parasrampur, R. Mehvar. – Text : visual // *Drug Metab Lett.* – 2011. – Vol. 5, №1. – P. 64-72.

126. Parietal-eye phototransduction components and their potential evolutionary implications / C.Y. Su, D.G. Luo, A. Terakita [et al.]. – Text : visual // *Science.* – 2006. – Vol. 311. – P. 1617–1621.

127. Patel, M. Importance of hepatic transporters in clinical disposition of drugs

and their metabolites / M. Patel, K.S. Taskar, M.J. Zamek-Gliszczynski. – Text : visual // *J Clin Pharmacol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 23-39.

128. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement / M.V. Varma, Y. Ashokraj, C.S. Dey, R. Panchagnula. – Text : visual // *Pharmacological research.* – 2003. – Vol. 48, №4. – P. 347–359.

129. Phosphodiesterase 5 inhibitors and erectile dysfunction / P. Sandner, N. Svenstrup, H. Tinel [et al.]. – Text : visual // *Expert Opinion on Therapeutic Patents.* – 2008. – Vol. 18, №1. – P. 21-33.

130. Phosphodiesterase-9 (PDE9) inhibition with BAY 73-6691 increases corpus cavernosum relaxations mediated by nitric oxide–cyclic GMP pathway in mice / F.H. Da Silva, M.N. Pereira, C.F. Franco-Penteado [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Impotence Research.* – 2013. – Vol. 25, №2. – P. 69–73.

131. Polysulfides and products of H₂S/S-nitrosoglutathione in comparison to H₂S, glutathione and antioxidant Trolox are potent scavengers of superoxide anion radical and produce hydroxyl radical by decomposition of H₂O₂ / A. Misak, M. Grman, Z. Bacova [et al.]. – Text : visual // *Nitric Oxide.* – 2018. – Vol. 76. – P. 136-151.

132. Protein kinase G phosphorylates soluble guanylyl cyclase on serine 64 and inhibits its activity / Z. Zhou, N. Sayed, A. Pyriochou [et al.]. – Text : visual // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2008. – Vol. 28. – P. 1803.

133. Protein S-nitrosylation: purview and parameters / D.T. Hess, A. Matsumoto, S.O. Kim [et al.]. – Text : visual // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 150–166.

134. Recent advances in thromboresistant and antimicrobial polymers for biomedical applications: just say yes to nitric oxide (NO) / Y. Wo, E. Brisbois, R. Bartlett, M. Meyerhoff. – Text : visual // *Biomater Sci.* – 2016. – Vol. 4, №8. – P. 1161–1183.

135. Recent developments in pharmacological effect, mechanism and application prospect of diazeniumdiolates / B. Li, Y. Ming, Y. Liu [et al.]. – Text : visual // *Front Pharmacol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 923.

136. Regulation of B cell functions by S-nitrosoglutathione in the EAE model / J. Kim, S.M.T. Islam, F. Qiao [et al.]. – Text : visual // *Redox Biol.* – 2021. – Vol. 45. – P.

e:102053.

137. Regulation of STAT3 and NF- κ B activations by S-nitrosylation in multiple myeloma / J. Kim, S. Choi, N. Saxena [et al.]. – Text : visual // Free radical biology and medicine. – 2017. – Vol. 106. – P. 245–253.

138. Role of CAR and PXR in xenobiotic sensing and metabolism / Y.M. Wang, S.S. Ong, S.C. Chai, T. Chen. – Text : visual // Expert Opin Drug Metab Toxicol. – 2012. – Vol. 8, №7. – P. 803-17.

139. Role of nitric oxide in the cardiovascular and renal systems / A. Ahmad, S. Dempsey, Z. Daneva, M. Azam [et al.]. – Text : visual // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – Vol. 9, №19. – P. e:2605.

140. Sandner, P. Anti-fibrotic effects of soluble guanylate cyclase stimulators and activators: A review of the preclinical evidence / P. Sandner, J.P. Stasch. – Text : visual // Respiratory medicine. – 2017. – Vol. 122, №1. – P. 1–9.

141. Sauna, Z.E. About a switch: How P-Glycoprotein (ABCB1) harnesses the energy of ATP binding and hydrolysis to do mechanical work / Z.E. Sauna, S.V. Ambudkar. – Text : visual // Mol. Cancer Ther. – 2007. – Vol. 6. – P. 13–23.

142. Share conserved walker A cysteines 431 and 1074 in human P-glycoprotein are accessible to thiol-specific agents in the apo and ADP-vanadate trapped conformations / H.M. Sim, J. Bhatnagar, E.E. Chufan [et al.]. – Text : visual // Biochemistry. – 2013. – Vol. 52, №41. – P. 7327–7338.

143. Signaling through cGMP-dependent protein kinase I in the amygdala is critical for auditory-cued fear memory and long-term potentiation / C. Paul, F. Schöberl, P. Weinmeister [et al.]. – Text : visual // J. Neurosci. – 2008. – Vol. 28. – P. 14202–14212.

144. Sinha, B.K. Nitric oxide inhibits ATPase activity and induces resistance to topoisomerase II-poisons in human MCF-7 breast tumor cells / B.K. Sinha, A. Kumar, R.P. Mason. – Text : visual // Biochemistry and biophysics reports. – 2017. – Vol. 10. – P. 252–259.

145. Sinha, B.K. Reversal of drug resistance by JS-K and nitric oxide in ABCB1- and ABCG2-expressing multi-drug resistant human tumor cells / B.K. Sinha, L. Perera,

- R.E. Cannon. – Text : visual // *Biomed Pharmacother.* – 2019. – Vol. 120. – P. e:109468.
146. S-nitrosoglutathione inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by S-nitrosation of CCAAT/enhancer-binding protein β / M. Mussbacher, H. Stessel, T. Pirker [et al.]. – Text : visual // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9, №1. – P. e:15403.
147. S-nitrosoglutathione reductase in human lung cancer / N.V. Marozkina, C. Wei, S. Yemen [et al.]. – Text : visual // *American journal of respiratory cell and molecular biology.* – 2012. – Vol. 46, №1. – P. 63–70.
148. S-Nitrosothiols: chemistry and reactions / C. Zhang, T.D. Biggs, N.O. Devarie-Baez [et al.]. – Text : visual // *Chem Commun (Camb).* – 2017. – Vol. 53, №82. – P. 11266-11277.
149. S-nitrosylation of the Peroxiredoxin-2 promotes S-nitrosoglutathione-mediated lung cancer cells apoptosis via AMPK-SIRT1 pathway / Y. Zhang, C. Sun, G. Xiao [et al.]. – Text : visual // *Cell death and disease.* – 2019. – Vol. 10, №5. – P. 329.
150. Sodium nitroprusside in 2014: A clinical concepts review / D.G. Hottinger, D.S. Beebe, T. Kozhimannil [et al.]. – Text : visual // *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* – 2014. – Vol. 30, №4. – P. 462-71.
151. Soluble guanylate cyclase stimulators and activators / P. Sandner, D.P. Zimmer, G.T. Milne [et al.]. – Text : visual // *Handbook of experimental pharmacology.* – 2021. – Vol. 264. – P. 355–394.
152. Soluble guanylate cyclase $\alpha 1$ -deficient mice: a novel murine model for primary open angle glaucoma / E.S. Buys, Y.C. Ko, C. Alt [et al.]. – Text : visual // *PloS one.* – 2013. – Vol. 8, №3. – P. 60156.
153. STAT3 regulation by S-nitrosylation: implication in cancer / I. Singh, J. Kim, A. Singh [et al.]. – Text : visual // *Redox biology.* – 2015. – Vol. 5. – P. 416–417.
154. Steinert, J.R. Nitric oxide signaling in brain function, dysfunction, and dementia / J.R. Steinert, T. Chernova, I.D. Forsythe. – Text : visual // *Neuroscientist.* – 2010. – Vol. 16. – P. 435–452.
155. Stern, S. Clinical relevance of the constitutive androstane receptor / S. Stern, R. Kurian, H. Wang. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2022. – Vol. 50, №7. – P. 1010-1018.

156. Stress and its association with cardiometabolic disorders / I. Pérez-Torres, L. Manzano-Pech, M.E. Rubio-Ruíz [et al.]. – Text : visual // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, №11. – P. e:2555.
157. Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors / S. Mollazadeh, A. Sahebkar, F. Hadizadeh [et al.]. – Text : visual // *Life sciences*. – 2018. – Vol. 214. – P. 118-123.
158. Structure-function relationships in the human P-glycoprotein (ABCB1): insights from molecular dynamics simulations / L. Mora Lagares, Y. Pérez-Castillo, N. Minovski, M. Novič. – Text : visual // *Int J Mol Sci*. – 2021. – Vol. – 23, №1. – P. 362.
159. Targeting NO/cGMP signaling in the CNS for neurodegeneration and Alzheimer's disease / M. Ben Aissa, S.H. Lee, B.M. Bennett, G.R.J. Thatcher. – Text : visual // *Curr. Med. Chem*. – 2016. – Vol. 23. – P. 2770–2788.
160. Targeting the trafficking of kidney water channels for therapeutic benefit / P.W. Cheung, R. Bouley, D. Brown [et al.]. – Text : visual // *Annu Rev. Pharmacol. Toxicol*. – 2020. – Vol. 60. – P. 175-194.
161. The cGMP-dependent protein kinase 2 contributes to cone photoreceptor degeneration in the CNGA3-deficient mouse model of achromatopsia / M. Koch, C. Scheel, H. Ma [et al.]. – Text : visual // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 22, №1. – P. 52.
162. The fate of NO in guanosine monophosphate during enzymic transformations leading to guanosine 3',5'-monophosphate generation / T.F. Walseth, G. Graff, T.P. Krick, N.D. Goldberg. – Text : visual // *The Journal of biological chemistry*. – 1981. – Vol. 256, №5. – P. 2176–2179.
163. The immediate efficacy of inhaled nitric oxide treatment in preterm infants with acute respiratory failure during neonatal transport / F. Garrido, J.L. Gonzalez-Caballero, R. Lomax, I. Dady [et al.]. – Text : visual // *Acta Paediatr*. – 2019. – Vol. 109, №2. – P. 309–313.
164. The interface between cell signaling pathways and pregnane X receptor / R.S. Rogers, A. Parker, P.D. Vainer [et al.]. – Text : visual // *Cells*. – 2021. – Vol. 10, №11. – P. e:3262.
165. The MDR1 gene, responsible for multidrug-resistance, codes for

glycoprotein / K. Ueda, M.M. Cornwell, M.M. Gottesman [et al.]. – Text : visual // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1986. – Vol. 141. – P. 956–962.

166. The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs / J.D. Wessler, L.T. Grip, J. Mendell, R.P. Giugliano. – Text : visual // J Am Coll Cardiol. – 2013. – Vol. 61, №25. – P. 2495-502.

167. The role of P-glycoprotein in decreasing cell membranes permeability during oxidative stress / A.V. Shchulkin, Y.V. Abalenikhina, P.D. Erokhina [et al.]. – Text : visual // Biochemistry (Mosc.). – 2021. – Vol. 86, №2. – P. 197-206.

168. Therapeutic augmentation of NO-sGC-cGMP signalling: lessons learned from pulmonary arterial hypertension and heart failure / F.T. riposkiadis, A. Xanthopoulos, J. Skoularigis, R.C. Starling. – Text : visual // Heart failure reviews. – 2022. – Vol. 27, №6. – P. 1991–2003.

169. Three decades of P-gp inhibitors: skimming through several generations and scaffolds / A. Palmeira, E. Sousa, M.H. Vasconcelos, M.M. Pinto. – Text : visual // Curr Med Chem. – 2012. – Vol. 19, №13. – P. 1946-2025.

170. TM2, a novel semi-synthetic taxoid, exerts anti-MDR activity in NSCLC by inhibiting P-gp function and stabilizing microtubule polymerization / L. Jia, X. Gao, Y. Fang [et al.]. – Text : visual // Apoptosis. – 2022. – Vol. 27, №11-12. – P. 1015–1030.

171. Tolosa, L. General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay / L. Tolosa, M.T. Donato, M.J. Gómez-Lechon. – Text : visual // Methods Mol. Biol. – 2015. – Vol. 1250. – P. 333-348.

172. Transcriptional and post-transcriptional regulation of duodenal P-glycoprotein and MRP2 in healthy human subjects after chronic treatment with rifampin and carbamazepine / S. Brueck, H. Bruckmueller, D. Wegner [et al.]. – Text : visual // Mol Pharm. – 2019. – Vol. 16, №9. – P. 3823-3830.

173. Transport characteristics of fexofenadine in the Caco-2 cell model / N. Petri, C. Tannergren, D. Rungstad, Lennernäs. – Text : visual // H. Pharm. Res. – 2004. – Vol. 21. – P. 1398-1404.

174. Tryptophan nitration of immunoglobulin light chain as a new possible biomarker for atopic dermatitis / K. Iizumi, H. Kawasaki, A. Shigenaga [et al.]. – Text :

visual // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2018. – Vol. 63, №3. – P. 197-204.

175. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *In Vitro Metabolism – and Transporter-Mediated Drug-Drug Interaction Studies Guidance for Industry.* – 2017. – 45 p. – Text : visual.

176. Vaandrager, A.B. Molecular properties and biological functions of cGMP-dependent protein kinase II / A.B. Vaandrager, B.M. Hogema, H.R. de Jonge. – Text : visual // *Front Biosci.* – 2005. – Vol. 10. – P. 2150-64.

177. Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions / R. Elsby, D.D. Surry, V.N. Smith, A.J. Gray. – Text : visual // *Xenobiotica.* – 2008. – Vol. 38. – P. 1140-1164.

178. Vericiguat for heart failure with reduced ejection fraction / C.M. Lombardi, G. Cimino, M. Pagnesi [et al.]. – Text : visual // *Curr. Cardiol. Rep.* – 2021. – Vol. 23, №10. – P. 144.

179. Vladimirov, Y.A. Violation of the barrier properties of the inner and outer membranes of mitochondria, necrosis and apoptosis / Y.A. Vladimirov. – Text : visual // *Biologicheskie membrany.* – 2002. – Vol. 19, №5. – P. 356–377.

180. Waghray, D. Inhibit or Evade Multidrug Resistance P-Glycoprotein in Cancer Treatment / D. Waghray, Q. Zhang. – Text : visual // *J Med Chem.* – 2018. – Vol. 61, №12. – P. 5108-5121.

181. Walia, V. NO-sGC- cGMP signaling influence the anxiolytic like effect of lithium in mice in light and dark box and elevated plus maze / V. Walia, C. Garg, M. Garg. – Text : visual // *Brain Res.* – 2019. – Vol. 1704. – P. 114-126.

182. Wittenborn, E.C. Structural perspectives on the mechanism of soluble guanylate cyclase activation / E.C. Wittenborn, M.A. Marletta. – Text : visual // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, №11. – P. e:5439.

183. Xanthenes as P-glycoprotein modulators and their impact on drug bioavailability / V. Silva, E. Gil-Martins, B. Silva [et al.]. – Text : visual // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* – 2021. – Vol. 17, №4. – P. 441-482.

184. Yaguchi, J. Evolution of nitric oxide regulation of gut function / J. Yaguchi, S. Yaguchi. – Text : visual // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2019. – Vol. 116, №12. – P. 5607–5612.
185. Yang, T. Progress and promise of nitric oxide-releasing platforms / T. Yang, A.N. Zelikin, R. Chandrawati. – Text : visual // Adv Sci (Weinh). – 2018. – Vol. 5, №6. – P. e:1701043.
186. Yau, K.W. Phototransduction motifs and variations / K.W. Yau, R.C. Hardie. – Text : visual // Cell. – 2009. – Vol. 139, №2. – P. 246-264.
187. Yoon, S. Nitrosative stress and human disease: therapeutic potential of denitrosylation / S. Yoon, G.H. Eom, G. Kang. – Text : visual // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22, №18. – P. e:9794.
188. Zweier, J.L. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems / J.L. Zweier, A. Samouilov, P. Kuppusamy. – Text : visual // Biochim Biophys Acta. – 1999. – Vol. 1411, №2-3. – P. 250-262.