

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

На правах рукописи

Сучкова Ольга Николаевна

**Механизмы регуляции полипептида,
транспортирующего органические анионы,
1В1 под действием S-нитрозоглутатиона в эксперименте *in vitro***

1.5.4. Биохимия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Абаленихина Юлия Владимировна

Рязань – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Белки-транспортёры: общая характеристика, классификация	14
1.2. Структурно-функциональные особенности OATP1B1	16
1.2.1. Структура OATP1B1	16
1.2.2. Механизм функционирования OATP1B1	19
1.2.3. Локализация и биомедицинское значение OATP1B1	21
1.3. Механизмы регуляции OATP1B1	23
1.3.1. Транскрипционная регуляция	23
1.3.2. Посттрансляционная регуляция OATP1B1	23
1.3.3. Регуляция функционирования OATP1B1 с помощью ингибиторов	24
1.4. Клеточная линия HepG2: происхождение, использование в медико-биологических исследованиях	27
1.4.1. Происхождение клеточной линии HepG2	27
1.4.2. Использование клеточной линии HepG2 в медико-биологических исследованиях	30
1.5. S-нитрозоглутатион: химическая природа, свойства, донор оксида азота	32
1.5.1. Химическая структура и метаболизм S-нитрозоглутатиона	32
1.5.2. Оксид азота (II): сигнальная молекула и токсический агент	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	43
2.1. Объект исследования: описание клеточных линий и условий культивирования	43
2.2. Дизайн исследования	46
2.3. Тест на цитотоксичность (МТТ-тест)	50
2.4. Определение уровня оксида азота	51
2.5. Оценка функционирования митохондрий	53
2.6. Количественная оценка содержания битирозина	53
2.7. Оценка концентрации общего белка	54

2.8.	Оценка концентрации небелковых SH-групп фотометрическим методом.....	55
2.9.	Оценка уровня внутриклеточного S-нитрозоглутатиона и глутатиона методом ВЭЖХ МС/МС	56
2.10.	Оценка субстратной специфичности OATP1B1 к S-нитрозоглутатиону...57	
2.11.	Метод вестерн-блот.....	58
2.12.	Оценка экспрессии гена <i>SLCO1B1</i>	62
2.13.	Оценка активности OATP1B1	63
2.14.	Статистическая обработка данных	63
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....		64
3.1.	Оценка влияния S-нитрозоглутатиона на жизнеспособность, функционирование митохондрий и показатели апоптоза клеток линии HepG2....	64
3.1.1.	Влияние S-нитрозоглутатиона на жизнеспособность клеток и функционирование митохондрий	64
3.1.2.	Влияние S-нитрозоглутатиона на показатели апоптоза: антиапоптотический фактор Bcl2 и проапоптотический фактор Fas	67
3.2.	Влияние S-нитрозоглутатиона на уровень оксида азота и показатели нитрозативного стресса, содержание Nrf2 в клетках линии HepG2	70
3.3.	Влияние S-нитрозоглутатиона на относительное количество Nrf2 в ядре клеток линии HepG2	80
3.4.	Оценка принадлежности S-нитрозоглутатиона к субстратам OATP1B1...84	
3.5.	Влияние S-нитрозоглутатиона на относительное количество и активность OATP1B1, экспрессию гена <i>SLCO1B1</i>	85
3.5.1.	Влияние S-нитрозоглутатиона на относительное количество OATP1B1.....	85
3.5.2.	Влияние S-нитрозоглутатиона на активность OATP1B1	87
3.5.3.	Влияние S-нитрозоглутатиона на экспрессию гена <i>SLCO1B1</i>	88
3.6.	Оценка регуляции белка-транспортера OATP1B1 в условиях воздействия S-нитрозоглутатиона на клетки линии HepG2	90
3.6.1.	Оценка цитотоксичности ODQ, AEM1, TFCA на клетках линии HepG2..90	

3.6.2. Влияние АЕМ1, ODQ, TFCA на относительный уровень OATP1B1 в клеточной линии HepG2	92
3.6.3. Участие NO-pГЦ-сигнального пути, транскрипционного фактора Nrf2 и рецептора LXR α в регуляции относительного количества OATP1B1 под действием S-нитрозоглутатиона в клетках линии HepG2	94
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
ВЫВОДЫ	109
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	110
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	111
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	112
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	115

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (*англ.: organic anion transporting polypeptide 1B1*, OATP1B1) – инфлюксный транспортер, экспрессирующийся преимущественно в печени и относящийся к суперсемейству переносчиков растворенных веществ (*англ.: superfamily of solute carriers, SLC*) [45].

Среди всех печеночных транспортеров OATP1B1 (*SLCO1B1*) отличается высокой клинической значимостью, так как участвует в транспорте широкого спектра эндогенных соединений (желчные кислоты, тиреоидные гормоны, стероидные сульфаты, конъюгаты глюкуронида, пептиды [57, 107, 116]) и лекарственных препаратов (статины [59, 78, 121, 176], босентан [61], валсартан [123] и олмесартан [153]). Установлено, что изменение активности/дисфункция OATP1B1, например при генетическом дефекте, может приводить к гипербилирубинемии, а также к изменению трансмембранного транспорта лекарственных веществ-субстратов и развитию нежелательных лекарственных реакций. Данный факт подчеркивает важность проведения исследований, посвященных оценке функционирования OATP1B1 в различных условиях и необходимость поиска его ингибиторов/активаторов.

Биохимические механизмы регуляции OATP1B1 активно изучаются [90, 167]. Например, показано, что некоторые препараты, такие как гемфиброзил, циклоспорин А, рифампицин, кларитромицин, эритромицин снижают активность транспортера за счет взаимодействия с его молекулой [61, 115]. Описана также транскрипционная, посттранскрипционная и посттрансляционная регуляции OATP1B1 [172].

Оксид азота (II, NO) – это биологически активная молекула, которая регулирует многочисленные биохимические и физиологические процессы, например, сосудистый тонус, нейротрансмиссию, функционирование иммунной системы, а также проявляет антиоксидантную и противовоспалительную

активность [134, 143, 160, 178]. Основные свои эффекты оксид азота реализует через NO-pГЦ-цГМФ-сигнальный путь [132]. В то же время, в высоких концентрациях NO способен участвовать в образовывании активных форм азота, вследствие чего изменяется редокс-статус клетки. Одним из защитных механизмов в условиях изменения уровня активных форм кислорода/азота является ядерный фактор эритроидного происхождения (англ.: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, Nrf2) [136] за счет активации антиоксидантных систем.

NO обладает высокой реакционной способностью, поэтому быстро окисляется во внутриклеточной среде [100], что ограничивает его действие как модулятора сигнальных путей. По этой причине для повышения уровня оксида азота в клетке применяются различные его доноры, например S-нитрозоглутатион (SNOG) [63]. По сравнению с другими донорами NO (органическими нитратами и нитритами, металлическими нитрозильными комплексами и т.д.) [149, 211], SNOG является эндогенной молекулой, не вызывает развитие феномена толерантности и обладает низкой токсичностью [65, 145]. S-нитрозоглутатион инициирует основные сигнальные каскады NO, в частности NO-pГЦ-цГМФ-сигнальный путь [8]. Роль NO в регуляции OATP1B1 на данный момент еще не исследована. С другой стороны, S-нитрозоглутатион не может свободно проникать через клеточную мембрану. Установлено, что во внеклеточной среде S-нитрозоглутатион метаболизируется с образованием глутатиона и оксида азота (II), который, в свою очередь, способен диффундировать внутрь клетки [144]. Кроме этого, доказано, что ключевой механизм проникновения S-нитрозоглутатиона в клетку связан с переносом нитрозогруппы от S-нитрозоглутатиона к другим аминокислотам, содержащим тиольные группы. Глутатион и образовавшиеся S-нитрозотиолы поступают в клетку посредством специализированных транспортных систем [63].

В настоящее время ведется активный поиск белков, которые могли бы переносить SNOG через клеточную мембрану. Учитывая субстратную специфичность OATP1B1, можно предположить, участие транспортера в трансмембранном переносе SNOG в гепатоцитах, что также требует экспериментального подтверждения.

Степень разработанности проблемы

OATP1B1 был идентифицирован в печени тремя независимыми научными группами в 1999 г [45], поэтому механизмы его функционирования и регуляции, роль в физиологических и биохимических процессах только начинают активно изучаться. Установлено, что транспортер переносит через цитоплазматическую мембрану ряд эндогенных веществ и ксенобиотиков [45, 154].

Показано, что различные факторы транскрипции регулируют экспрессию OATP1B1/*SLCO1B1*. Промотор *SLCO1B1* трансктивировался гепатическим ядерным фактором (*англ.: hepatocyte nuclear factors, HNFs*) 1 α [70] и 4 α [174], печеночным рецептором X субъединицы альфа (*англ.: liver X receptor, LXR α*) [140], а лиганд ретиноевой кислоты подавлял экспрессию мРНК *SLCO1B1* в гепатоцитах человека [85]. Описана роль гликозилирования, фосфорилирования и убиквитинирования в регуляции OATP1B1 [172].

Так же на количество белка-транспортера оказывают влияние половые гормоны. Тестостерон увеличивал уровень белка-транспортера OATP1B1, действуя через фарнезоидный X рецептор (*англ.: farnesoid X receptor, FXR*), прегнан X рецептор (*англ.: pregnane X receptor, PXR*) и LXR α ; эстрадиол увеличивал количество белка-транспортера OATP1B1, действуя через конститутивный андростановый рецептор (*англ.: constitutive androstane receptor, CAR*); а прогестерон снижал содержание белка-транспортера OATP1B1 [200].

На клетках линии аденокарциномы ободочной кишки человека (*англ.: Cancer coli; Caco-2*) было доказано регуляторное действие NO на рецепторы CAR [7], PXR [30] и эффлюксный белок-транспортер P-гликопротеин посредством NO-pГЦ-цГМФ-сигнального механизма [8, 34]. Однако роль NO в регуляции OATP1B1 на данный момент не установлена и участие данного транспортера в трансмембранном переносе S-нитрозоглутатиона не описано, что и послужило целью настоящего исследования.

Цель исследования

Оценить участие полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 в трансмембранном переносе S-нитрозоглутатиона, проанализировать влияние донора NO на функционирование транспортера и установить биохимические механизмы его регуляции *in vitro*.

Задачи исследования

1. Оценить влияние S-нитрозоглутатиона на содержание оксида азота (II), выявить его цитотоксические концентрации и изучить воздействие на функционирование митохондрий, процессы нитрозилирования и апоптоза, активацию транскрипционного фактора Nrf2.

2. Оценить участие полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 в трансмембранном переносе S-нитрозоглутатиона.

3. Изучить влияние S-нитрозоглутатиона на функционирование (экспрессию гена *SLCO1B1*, количество и активность) полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 в клетках линии HepG2 *in vitro*.

4. Изучить участие NO-pГЦ-сигнального пути в реализации влияния S-нитрозоглутатиона на полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1.

5. Проанализировать роль транскрипционных факторов Nrf2 и LXR α в регуляции полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 под действием S-нитрозоглутатиона.

Научная новизна

В ходе выполнения работы впервые:

- оценена роль полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 в переносе S-нитрозоглутатиона через клеточную мембрану. Установлено, что донор NO не переносится изучаемым белком-транспортером;

- установлено участие полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 в транспорте глутатиона;
- доказано, что S-нитрозоглутатион в концентрациях 10-50 мкМ увеличивает относительное количество и активность полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 и способствует повышению экспрессии гена *SLCO1B1*;
- показано, что NO-pГЦ-сигнальный путь, ядерный фактор эритроидного происхождения Nrf2, печеночный X рецептор (LXR α) вносят существенный вклад в регуляцию полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 при воздействии S-нитрозоглутатиона на клетки линии HepG2.

Теоретическая и практическая значимость работы

По результатам исследования установлено, что OATP1B1 не проявляет субстратной специфичности в отношении S-нитрозоглутатиона, но донор NO оказывает модулирующее действие на количество и активность данного транспортера. Получено, что S-нитрозоглутатион вызывает повышение экспрессии гена *SLCO1B1*, количества белка OATP1B1, а также активности OATP1B1.

Установлено, что стимуляция OATP1B1 посредством S-нитрозоглутатиона осуществляется через NO-pГЦ-сигнальный механизм, транскрипционный фактор Nrf2 и рецептор LXR α . Высокие концентрации S-нитрозоглутатиона вызывают развитие нитрозативного стресса, что нивелирует индуцирующее действие низких и средних концентраций.

Полученные результаты имеют важное практическое значение. В клинической практике доноры NO – нитраты и субстраты OATP1B1 – статины (препараты, снижающие уровень холестерина) часто назначают совместно. Повышение активности OATP1B1 под действием NO может приводить к ускоренному захвату статинов гепатоцитами, где они оказывают свое фармакологическое действие.

Методология и методы исследования

Эксперимент диссертационной работы был выполнен *in vitro* на трех клеточных линиях: гепатоцеллюлярная карцинома человека (*англ.: hepatocellular carcinoma*, HepG2); клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека (*англ.: human embryonic kidney 293*; HEK293); клеточная линия, трансфицированная геном, кодирующим OATP1B1 (HEK293-SLCO1B1).

В качестве донора оксида азота (II) был использован S-нитрозоглутатион в диапазоне концентраций 1-100 мкМ при экспозиции 3, 24 и 72 ч.

Уровень NO детектировали с помощью флуоресцентных зондов DAF FM, выраженность нитрозативного стресса – по уровню 3-нитротирозина (детектировали методом вестерн-блот) и битирозина (детектировали флуориметрией). Функционирование митохондрий оценивали по реакции с флуоресцентными зондами MitoTracker Red. Цитотоксические концентрации S-нитрозоглутатиона определяли по результатам МТТ-теста (фотометрический метод анализа).

Оценка выраженности апоптоза была проведена при анализе изменения относительного количества антиапоптотического белка Bcl2 (*англ.: apoptosis regulator*, Bcl-2) и проапоптотического белка Fas, определяемых методом вестерн-блот. Оценку относительного количества полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 выполняли методом вестерн-блот.

Внутриклеточную концентрацию аторвастатина, характеризующую активность OATP1B1 определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией.

Количественную оценку ампликонов гена *SLCO1B1* анализировали с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени.

Роль NO-pГЦ-сигнального пути, транскрипционного фактора Nrf2, рецептора LXR α в регуляции OATP1B1 под действием S-нитрозоглутатиона анализировали с помощью специфических ингибиторов данных транскрипционных факторов.

Значение OATP1B1 в трансмембранном переносе S-нитрозоглутатиона оценивали с помощью сравнения проникновения донора оксида азота в клетки HEK293 и HEK293-SLCO1B1. Концентрацию S-нитрозоглутатиона анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения StatSoft Statistica 13.0, Microsoft Excel и GraphPad Prism 8.

Положения, выносимые на защиту

1. S-нитрозоглутатион в концентрациях 10-50 мкМ проявляет цитопротекторное действие за счет активации Nrf2. S-нитрозоглутатион в концентрации 100 мкМ и сроке воздействия 24 и 72 ч проявляет цитотоксичность: снижает жизнеспособность клеток, функциональную активность митохондрий и вызывает развитие апоптоза.

2. S-нитрозоглутатион не является субстратом и прямым ингибитором полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1. Глутатион транспортируется в клетки при участии OATP1B1.

3. Воздействие S-нитрозоглутатиона в течение 24 и 72 ч в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ повышает количество полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 и экспрессию гена *SLCO1B1*, кодирующего белок-переносчик, а в концентрациях 10 и 50 мкМ повышает активность транспортера.

4. Механизм регуляции полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 в условиях увеличения уровня оксида азота (II) реализуется через NO-рГЦ-сигнальный путь, транскрипционный фактор Nrf2 и рецептор LXR α .

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием адекватных и современных методов исследования (полимеразная цепная реакция в

режиме реального времени, флуоресцентные зонды, вестерн-блот, высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией) с последующей систематизацией и статистической обработкой.

Ключевые положения диссертации были изложены, обсуждены и включены в материалы конференций: Ежегодной научной конференции, посвященной Десятилетию науки и технологий и 80-летию Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова (Рязань, 2023); IX Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2023); Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина и 80-летию Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова «Достижения современной фармакологической науки» (Рязань, 2023); V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицина и фармация. Прошлое, настоящее, будущее» (Орехово-Зуево, 2024); XXX Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2024» (Санкт-Петербург, 2024); Всероссийской конференции с международным участием «Биохимия человека» (Москва, 2024); конференции с международным участием «Системный подход в медицине и образовании», посвященная Научной школе выдающегося физиолога академика П.К. Анохина (Москва, 2024).

Внедрение результатов работы в практику

Основные результаты диссертационной работы успешно внедрены в учебный процесс при обучении студентов на кафедрах биологической химии, фармакологии, деятельность центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно выполнен обзор литературы, проведена большая часть экспериментальных работ, обработка и интерпретация результатов, подготовка публикаций по диссертационной работе. Личный вклад автора в выполнение диссертационной работы составляет более 90%.

Сведения о публикациях по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ, в том числе 2 статьи в журналах перечня ВАК при Минобрнауки России, 3 публикации в журналах, входящих в цитатно-аналитическую базу данных Scopus, 1 патент РФ на изобретение, 1 рационализаторское предложение.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, глава 1 – обзор литературы, глава 2 – материалы и методы, глава 3 – результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы. Диссертация изложена на 138 страницах, иллюстрирована 56 рисунками и 9 таблицами. Список литературы представлен 212 источниками, включая 39 источников отечественной и 173 источника зарубежной литературы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Белки-транспортёры: общая характеристика, классификация

В транспорте биоактивных и лекарственных веществ участвуют белки-транспортёры, которые обеспечивают как их приток (инфлюкс), так и отток (эффлюкс) [126]. К эффлюксным белкам-транспортёрам относятся АТФ-связывающие кассетные транспортёры (*англ.: ATP-binding cassette, ABC-транспортёры*) [47,138,179], а к инфлюксным белкам – в первую очередь транспортёры растворенных веществ (*англ.: solute carrier family, SLC*) [139, 195].

ABC-транспортёры, представляют собой суперсемейство транспортных систем, которое является одним из крупнейших и старейших семейств. ABC-транспортёры относятся к классу транслоказ. Субъединицы АТФазы используют энергию связывания и гидролиза аденозинтрифосфата (АТФ) для перемещения субстратов через мембраны. Большинство систем транспорта также имеют экстрацитоплазматическую часть – белок, связывающий растворенные вещества [47, 105, 138].

Транспортёры суперсемейства ABC участвуют в формировании множественной лекарственной устойчивости, и именно так были впервые идентифицированы некоторые из них. В случае гиперэкспрессии транспортных белков ABC в раковых клетках, происходит эффлюкс противоопухолевых препаратов и, как следствие, развивается устойчивость опухоли [23, 39, 66].

Классификация ABC-транспортёров основана на структурных особенностях и порядке доменов. Основываясь на этом принципе, выделяют несколько подсемейств: ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF, ABCG, ABCH. По структуре ABC-транспортёры разделяют на полные (содержат два трансмембранных домена) и неполные (содержат один трансмембранный домен).

Транспортёры семейства SLC принято разделять на облегченные или вторично активные транспортёры. Данная классификация основана на использовании разности электрохимических потенциалов или ионного градиента,

который образуется для транспортировки субстратов через биологические мембраны [3]. Транспортёры SLC экспрессируются в почках, печени, кишечнике, мозге и играют важную роль в поддержании гомеостаза организма [139].

В семействе переносчиков SLC выделяют несколько подсемейств:

- подсемейство генов *SLC21* – полипептиды, транспортирующие органические анионы (*англ.: organic-anion-transporting polypeptides, OATPs*);
- подсемейство генов *SLC22A* – переносчики органических анионов (*англ.: organic anion carriers, OATs*); переносчики органических катионов (*англ.: organic cation transporter, OCT*); или переносчики органических катионов/карнитина (*англ.: organic zwitterion/cation transporters, OCTNs*);
- подсемейство генов *SLC15A* – переносчики пептидов (*англ.: peptide transporter, PEPTs*);
- подсемейство генов *SLC47A* – переносчики лекарственных средств и токсинов (*англ.: multi-antimicrobial extrusion protein, MATEs*). MATE играют ключевую роль в распределении лекарственных веществ и относятся к переносчикам семейства SLC, однако они действуют как эффлюксные белки [10, 31, 118, 139, 152].

Таким образом, OCT транспортируют органические катионы, OATPs – крупные гидрофобные органические анионы, OATs – более мелкие и гидрофильные органические анионы, PEPT отвечают за транспорт дипептидов, трипептидов и пептидоподобных лекарственных средств, а MATE способствуют оттоку органических катионов.

Субстратами SLC-транспортёров являются как эндогенные, так и экзогенные вещества, что указывает на то, что дисфункция SLC не только нарушает гомеостаз, но и в значительной степени влияет на распределение лекарственных веществ-субстратов. Одними из наиболее клинически значимых представителей данного суперсемейства являются OATP-транспортёры.

1.2. Структурно-функциональные особенности OATP1B1

1.2.1. Структура OATP1B1

Органические анионы, транспортирующие полипептиды (OATPs для человека и Oatps для других видов), кодируются генами *SLC21/SLCO* в соответствии с номенклатурой Комитета по номенклатуре генов [102].

На сегодняшний день идентифицировано 11 переносчиков OATP у человека. На основе филогенетических связей и хронологии идентификации OATP классифицируются на:

- семейства – обозначаются арабской цифрой, идентичность аминокислотной последовательности составляет 40% и более;
- подсемейства – обозначаются арабскими буквами, идентичность аминокислотной последовательности составляет 60% и более.

Если в пределах одного подсемейства имеется несколько отдельных генных продуктов (белков), следует использовать дополнительную непрерывную арабскую нумерацию, основанную на хронологии идентификации [102].

На этом основании OATPs человека подразделяются на шесть семейств (OATP1, OATP2, OATP3, OATP4, OATP5 и OATP6), и каждое семейство может состоять из нескольких подсемейств (таких как OATP1A, OATP1B и OATP1C). Внутри этих подсемейств отдельные OATP нумеруются в соответствии с хронологией их идентификации, и, если уже известен ортолог, им присваивается одинаковый номер. Таким образом, OATPs человека обозначаются как OATP1A2, OATP1B1, OATP1B3, OATP1C1, OATP2A1, OATP2B1, OATP3A1, OATP4A1, OATP5A1 и OATP6A1, соответственно [40, 103].

Белки семейства OATP состоят из 643-722 аминокислотных остатков. Их молекулярная масса обычно находится в пределах 65-120 кДа, однако может варьировать из-за процесса гликозилирования белковой молекулы. Полипептидная цепь данных белков содержит 12 трансмембранных доменов, которые образуют два псевдосимметричных участка: N-пучок (включающий домены 1-6) и C-пучок

(включающий домены 7-12) (Рисунок 1). N- и C-концевые участки молекулы локализованы на цитоплазматической стороне мембраны. Молекула также имеет 6 внеклеточных петель, причем наиболее протяженная из них соединяет 9-ю и 10-ю спирали. На 2-й и 5-й петлях расположены сайты гликозилирования [32].

Структура OATP1B1 имеет открытую внутрь конформацию с большой центральной полостью, обращенной в цитоплазму гепатоцитов [193]. На внешней стороне, находящейся в пространстве OATP1B1, содержится большой внеклеточный домен массой 25 кДа, распределенный по 4 внеклеточным петлям и содержащий дисульфидные мостики (Рисунок 1). Субстратсвязывающий домен имеет воронкообразную полость, которая расположена в C-пучке транспортера и образована доменами 7, 8, 9 и 10, на вершине располагается отрицательно-заряженная сульфатная группа (Рисунок 1). Боковые цепи аминокислот Tyr422, Tyr425, Gln541 и Asn544 образуют водородные связи с сульфатной группой. При этом Tyr422 участвует в катион- π -взаимодействии с гуанидиновой группой Arg633, что может способствовать косвенной стабилизации отрицательно заряженной сульфатной группы. Внутренняя часть связывающего кармана OATP1B1 состоит преимущественно из ароматических и гидрофобных аминокислотных остатков. Кроме того, исследования показывают, что аминокислота Leu545 играет важную роль в модуляции субстратной специфичности у человеческого OATP1B1 [101]. Связывающий карман содержит отрицательно-заряженный участок и гидрофобный или ароматический каркас, что обеспечивает возможность распознавания субстратов OATP1B1.

Особенностью OATP является область, расположенная между внеклеточной петлей 3 и трансмембранным доменом 6 и содержащая мотив последовательности Asp-x-ArgTrp-(Is/Val)-GlyAlaTrpTrp-x-Gly-(Phe/Leu)-Leu, где «x» обозначает любой аминокислотный остаток. Этот мотив присутствует во всех OATP и поэтому называется «сигнатурным мотивом OATP» [102, 103].

Положительный заряд молекулы OATP1B1 обеспечивается наличием нескольких консервативных аминокислотных остатков, таких как аргинин, лизин, аспарагин, глутамин и гистидин. Установлено, что у полипептидов семейства

ОАТР1 в положении 181 расположен остаток аргинина (Arg181), который отсутствует у представителей других семейств ОАТР [32, 146]. Считается, что этот аминокислотный остаток играет ключевую роль в формировании субстрат-связывающего сайта. Результаты сайт-направленного мутагенеза ОАТР1В1 показали, что замена аминокислот Arg57, Lys361 и Arg580 может изменять сродство ОАТР1В1 к субстратам, таким как эстрадиол-17 β -глюкуронид и бромсульфоталеин. Кроме того, Lys399 участвует в процессе интеграции белка в мембрану [32, 205].

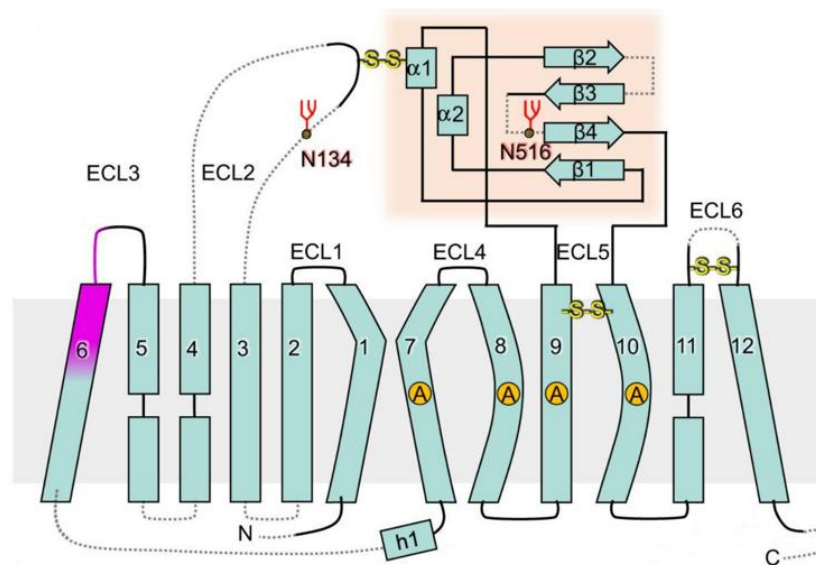


Рисунок 1 – Схематичная структура белка-транспортера ОАТР1В1 (Цит. по Ciută A.D. et al., 2023) [193]

Примечание – ECL – внеклеточные петли;

..... – гибкие области;

розовый цвет – специфичный мотив;

S-S – дисульфидные связи;

A – сайты, взаимодействующие со связанным анионным субстратом.

На границе с внешней поверхностью мембраны, между экстрацеллюлярной петлей 3 и доменом 6, расположены три высококонсервативных остатка триптофана. Их положение в полипептидной цепи ОАТР может служить маркером для идентификации белков этого семейства в различных базах данных. Однако функциональная роль этих аминокислотных остатков, а также их точная локализация в мембране до сих пор остаются не до конца изученными [105].

Также в составе петли 5 есть 10 консервативных остатков цистеина, которые образуют между собой дисульфидные связи [103] и, возможно, необходимы для экспрессии белков в плазматическую мембрану [95].

1.2.2. Механизм функционирования OATP1B1

В настоящее время известно, что транспортеры семейства SLC для переноса субстратов через цитоплазматическую мембрану не используют энергию АТФ. Это связано с тем, что SLC-транспортеры по своей структуре напоминают каналы, однако, функционально они больше похожи на ферменты, с активностью, описываемой кинетикой уравнения Михаэлиса-Ментена. Активность SLC-транспортеров, так же, как и ферментов, становится насыщенной при высоких концентрациях субстрата, и они образуют эквивалент переходного состояния, которое является промежуточным и при котором доступ к месту связывания субстрата одновременно блокируется с обеих сторон мембраны. Формирование промежуточного состояния имеет решающее значение, так как обеспечивает поддержание электрохимических градиентов, установленных клеткой [106].

За последнее десятилетие конформация структур транспортеров в нескольких функциональных состояниях вместе с биохимическим и биофизическим анализом, расчетами молекулярной динамики *in silico* позволило выявить более конкретные детали транспорта. Однако, механизм переноса веществ с помощью OATP1B1 до конца не изучен.

Считается, что транспортные белки основного семейства фасилитаторов (*англ. major facilitator superfamily*; MFS), к которым принадлежат OATP, работают по механизму чередующего (переменного) доступа [194], который можно описать тремя типами моделей: механизм «переключатель-качалка», «качающийся пучок» или «лифт» (Рисунок 2) [88, 193].

Во многих случаях структурные особенности OATP включают центральный субстрат-связывающий карман, который расположен исключительно в С-домене.

Основой механизма транспорта является то, что сайт связывания субстрата поочередно перемещается с одной стороны мембраны на другую [125].

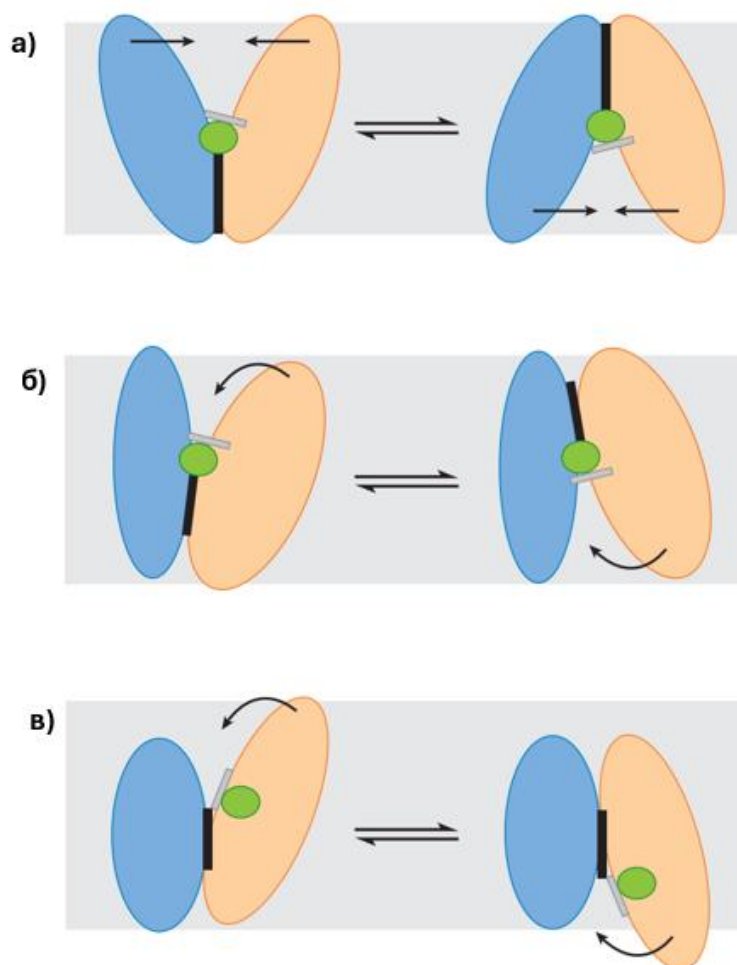


Рисунок 2 – Механизмы действия белков-транспортеров семейства SLC
(Цит. по Drew D., 2016) [88]

Примечание – а) модель «переключатель-качалка»;

б) модель «качающийся пучок»;

в) модель «лифт»;

● N-терминальный участок;

● C-терминальный участок;

● – субстрат белка-транспортера;

■ – центральный сайт связывания с субстратом, домен транспортера;

■ – лабильный домен.

Менее лабильный N-терминальный участок обычно называют «каркасом» (Рисунок 2, голубой овал), а C-терминальный участок — «транспортным» доменом (Рисунок 2, бежевый овал). Обе модели — «переключатель-качалка» и «качающийся пучок» (Рисунок 2 а,б) — можно далее назвать работающими по механизму движущегося барьера, согласно постулату Митчелла П. [150].

В механизме «лифта» два пучка сильно расходятся, и субстрат (Рисунок 2в, зеленый круг) транспортируется через мембрану только с помощью С-концевого участка, тогда как N-конец остается фиксированным, как правило, из-за олигомеризации. Связывание и высвобождение субстрата в каждом состоянии, вероятно, облегчаются локальными переходами ворот в домене транспортера.

В заключение, стоит отметить, что в настоящее время изучена структура группы белков OATP, что обеспечивает основу для понимания и изучения субстратной специфичности OATP1B1 к эндогенным веществам и лекарственным средствам.

1.2.3. Локализация и биомедицинское значение OATP1B1

Экспрессия OATP была изучена как на уровне мРНК, так и на уровне белков. В целом, OATPs были обнаружены практически в каждом органе в эпителиальных или эндотелиальных клетках. Некоторые OATPs имеют ограниченную экспрессию и поэтому считаются специфичными для конкретного органа, в то время как другие экспрессируются повсеместно [167].

Полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 кодируется геном *SLCO1B1*. Белок экспрессируется на синусоидальной (базолатеральной) мембране гепатоцитов и является одним из наиболее высоко экспрессируемых транспортеров в печени человека. OATP1B1 является тканеспецифичным белком печени [77]. Также OATP1B1 был обнаружен на базальной мембране клеток Сертоли и диффузно – в клетках Лейдига [141], а мРНК *SLCO1B1* была обнаружена в энтероцитах, клетках рака молочной железы [57], клетках карциномы яичников и клетках HepG2 [14, 167].

Впервые экспрессия белка OATP1B1 была зарегистрирована на базолатеральной мембране гепатоцитов по всей доле печени взрослого человека и плода с помощью метода нозерн-блот [41]. Позже было установлено, что OATP1B1 экспрессируется не только в физиологических условиях, но и при доброкачественных опухолях печени, что было представлено в исследованиях

Vander Borgh S. et al., 2007 [83]. Были доказаны снижение экспрессии OATP1B1 в гепатоцеллюлярных аденомах и диффузная экспрессия OATP1B1 в очаговой узловой гиперплазии.

Экспрессия OATP1B1 имеет тенденцию к снижению при гепатоцеллюлярной карциноме (ГЦК). мРНК *SLCO1B1* была снижена в клеточных линиях Hep3В и HepG2 [151, 168].

Однако, в исследованиях Vavricka S.R. et al., 2004 [197] было показано, что уровни OATP1B1 существенно не отличались в образцах гепатоцеллюлярной карциномы по сравнению с образцами нормальной печени.

В работах Tsuboyama T. et al., 2010 подтвердили общую тенденцию снижения экспрессии OATP1B1 в образцах тканей гепатоцеллюлярной карциномы [108]. В работах Wen J. et al., 2021 имеются данные о создании модели трансфицированных клеток линии HepG2 с целью гиперэкспрессии OATP1B1 [207].

Следует отметить, что снижение регуляции OATP1B1 в гепатоцеллюлярной карциноме сопровождается аналогичными изменениями в первичных культивируемых гепатоцитах, и может быть результатом дедифференциации клеток [96].

Среди печеночных OATP, OATP1B1 (*SLCO1B1*) имеет высокую клиническую значимость. Он обладает широкой субстратной специфичностью. Субстраты OATP1B1 – статины [59, 78, 121], босентан [61], валсартан [123] и олмесартан [153], а также эндогенные соединения, такие как желчные кислоты, тиреоидные гормоны, стероидные сульфаты, конъюгаты глюкуронида и пептиды [107, 116], эстрон-3-сульфат [57].

Установлено, что активность OATP1B1 может изменяться. Например, мутации в гене *SLCO1B1*, вызывающие снижение активности транспортера, ассоциированы с повышенным риском развития побочных эффектов при применении статинов. Это подчеркивает важность учета генетических особенностей пациентов при назначении и корректировке дозировок препаратов [128]. Комбинированное использование статинов с ингибиторами OATP1B1, такими как циклоспорин и рифампицин, может вызывать увеличение

концентрации статинов в плазме крови. Это, в свою очередь, повышает риск развития побочных эффектов, которые варьируют от миопатии до жизнеугрожающего состояния – рабдомиолиза [75, 109, 120].

Таким образом, изучение особенностей функционирования и регуляции OATP1B1 является не только важной фундаментальной задачей, но и клинически значимым аспектом для современной медико-биологической науки.

1.3. Механизмы регуляции OATP1B1

1.3.1. Транскрипционная регуляция

Различные факторы транскрипции регулируют экспрессию OATP1B1. Промотор *SLCO1B1* активируется гепатоцитарным ядерным фактором 1 α (англ.: *hepatocyte nuclear factor 1-alpha*; HNF) [70] и 4 α [174], печеночным рецептором X подтип α (англ.: *liver X receptor*; LXRA) [59, 140] и фарнезоидным рецептором X (англ.: *farnesoid X receptor*; FXR) [59].

Также для OATP1B1 известны эпигенетические механизмы регуляции [167]. Например, miR-206 оказывает подавляющее действие на экспрессию *SLCO1B1*. У людей с высоким уровнем miR-206 в печени наблюдается более низкий уровень *SLCO1B1* [148]. Таким образом, регуляция на транскрипционном и эпигенетическом уровнях может играть значительную роль в общей экспрессии мРНК *SLCO1B1*.

1.3.2. Посттрансляционная регуляция OATP1B1

Гликозилирование. На посттрансляционном уровне OATP1B1 является гликозилированным белком [141, 157]. Олигосахариды присоединяются к остаткам аспарагина ферментами олигосахарилтрансферазами [154]. Гликозилирование OATP1B1 важно для регуляции белка-транспортера (Рисунок 3). Так, три из терминальных остатков глюкозы и один остаток маннозы удаляются из белка, чтобы подготовить белок к перемещению на плазматическую мембрану [166, 201].

Известно, что гликозилирование OATP1B1 происходит во второй и пятой внеклеточных петлях, в то время как негликозилированная часть белка сохраняется в цитоплазме. Известно, что аспарагины в 134 и 516 положении участвуют в процессе гликозилирования в базальных условиях; однако мутация Asn 134 также приводила к дополнительному гликозилированию Asn 503. Одновременная замена этих трех остатков аспарагина (Asn 134, Asn 503 и Asn 516) на глутамин приводила к значительному снижению транспортной активности OATP1B1 и экспрессии белка на плазматической мембране, что указывает на то, что эти сайты могут быть важны для экспрессии и/или функционирования OATP1B1 [157].

Фосфорилирование. Фосфорилирование белков-переносчиков является ключевым механизмом регуляции их транспортной функции [172] (Рисунок 3). С использованием фосфопротеомного анализа ткани печени человека *in silico* было предсказано, что OATP1B1 фосфорилируется [50] по нескольким сайтам [163]. Несмотря на то, что фосфорилирование OATP1B1 не было охарактеризовано до сих пор, Hong M. et al., 2015 [170] продемонстрировали, что активация протеинкиназы С снижала транспортную функцию OATP1B1 и была связана с уменьшением поверхностной экспрессии OATP1B1 на мембране [170]. Таким образом, необходимы исследования, направленные на изучение условий фосфорилирования для оценки изменения функциональной активности белка.

1.3.3. Регуляция функционирования OATP1B1 с помощью ингибиторов

Деградация белков является фундаментальным клеточным процессом, который регулирует гиперпродукцию белка и удовлетворяет функциональные потребности клетки [55]. Система убиквитин-протеасома и лизосомальные пути являются двумя основными механизмами, посредством которых происходит деградация клеточных белков [176].

Регуляция транспортной функции OATP1B1 путем ингибирования лизосом

Хлорохин, препарат класса 4-аминохинолинов, используемый для лечения малярии [204], является широко используемым ингибитором лизосом в лабораторных условиях для изучения лизосомальной деградации белков [76, 198].

В стабильных клеточных линиях, экспрессирующих OATP1B1, обработка ингибитором лизосом хлорохином заметно увеличила уровни белка OATP1B1, что позволяет предположить, что лизосома играет важную роль в деградации OATP1B1 [87, 202]. Предварительная обработка хлорохином значительно снижает транспорт, опосредованный OATP1B1 [87].

Роль процесса убиквитинирования в регуляции OATP1B1

Убиквитинирование – это важная посттрансляционная модификация, которая регулирует многие клеточные процессы, включая передачу сигнала, контроль клеточного цикла и регуляцию транскрипции посредством протеасомной деградации белков и поддержания гомеостаза белков [79, 112, 113]. Были получены данные, что OATP1B1 может быть конъюгирован с убиквитином в клетках, гиперэкспрессирующих OATP1B1 [202], что не влияло на его транспортную функцию (Рисунок 3).

Таким образом, OATP1B1 является недавно открытым транспортером, относящимся к суперсемейству SLC-транспортеров. Его структура, механизмы функционирования и регуляции активно изучаются в настоящее время. На данный момент установлено, что OATP1B1 играет важную роль в транспорте эндогенных веществ и лекарственных веществ из системного кровотока в гепатоциты, что обуславливает его высокую клиническую значимость. Количество новых субстратов OATP1B1 постоянно увеличивается, описываются новые сигнальные пути модуляции функционирования данного транспортера. Роль NO-цГМФ сигнального пути в регуляции OATP1B1 на данный момент не изучена, а следовательно, этот аспект требует более глубокого изучения.

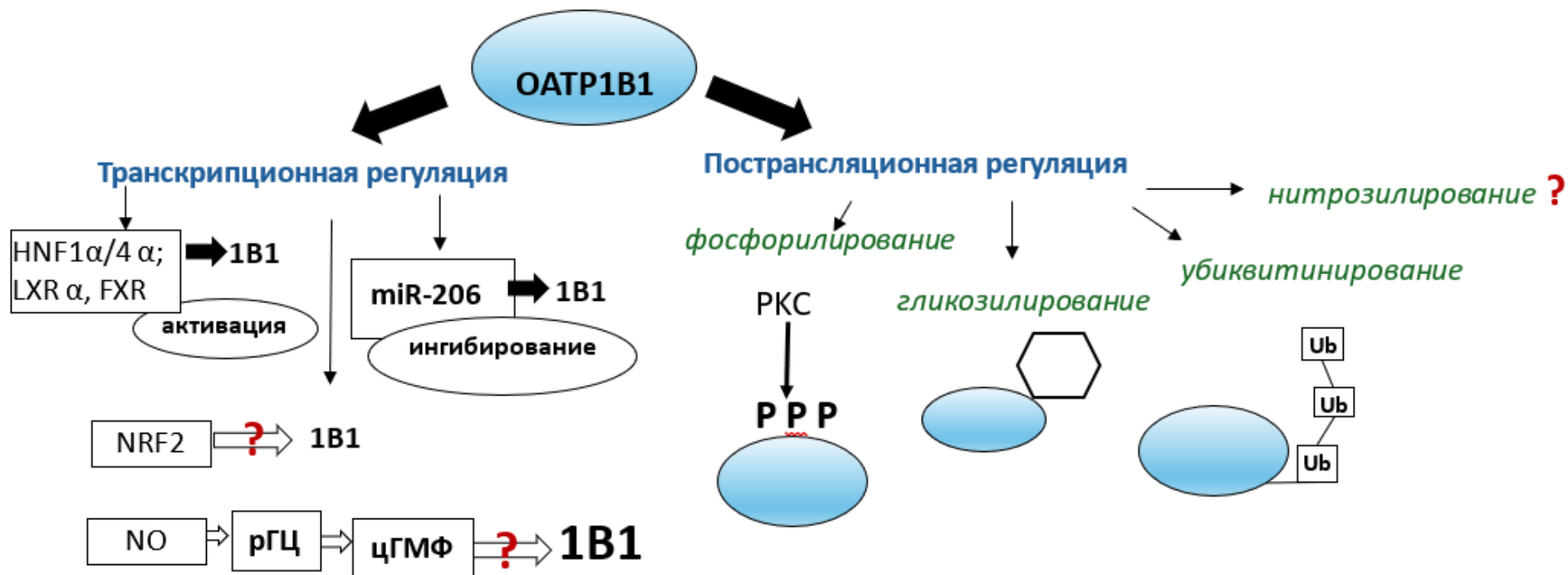


Рисунок 3 – Известные и предполагаемые механизмы регуляции OATP1B1

1.4. Клеточная линия HepG2: происхождение, использование в медико-биологических исследованиях

1.4.1. Происхождение клеточной линии HepG2

Клеточная линия HepG2 была выделена Knowles V.V. et al. из клеток опухоли печени в 1975 году [131, 190]. Позже, в 1980 году, исследователями из Института Вистар в Филадельфии был подан патент на HepG2, характеризовавший ее как «клеточную линию, полученную из ткани печени 15-летнего белого мужчины с высокодифференцированной гепатоцеллюлярной карциномой», и таким образом данная линия клеток была внесена в репозиторий Американской коллекции типовых культур [54].

Такая классификация происхождения HepG2 вызывала разногласия в научной среде и через 30 лет López-Terrada D. et al. провели расследование, в ходе которого было выявлено, что клеточная линия HepG2 была ошибочно определена как ГЦК и на самом деле происходит из эпителиальной гепатобластомы (ГБ) [137, 142]. На это указывали как визуальные различия в препаратах клеток ГЦК и ГБ, так и молекулярные особенности линии клеток HepG2, присущие ГБ. Так, были обнаружены потери в районе хромосомы 4q3, связанные с транслокацией t(1;4), трисомии 2 и 20 и другие хромосомные аномалии, характерные для ГБ. HepG2 характеризуется низким содержанием митохондрий и слабо развитой гладкой эндоплазматической сетью. Клетка HepG2 содержит около 7,5 пг ДНК, что на 15% больше, чем в нормальной соматической клетке [117].

Клеточная линия HepG2 несет мутацию в промоторе теломеразы обратной транскриптазы (англ.: *telomerase reverse transcriptase*; TERT) [68]. Мутация в промоторе TERT встречается как при ГЦК, так и при ГБ, что способствует иммортализации, защищая теломеры в раковых клетках. Кроме того, особенности сигнального пути Wnt/ β -катенин, вызванные делецией третьего экзона гена *CTNNB1*, и нарушения в регуляции путей роста и выживания клеток, характерные

для фетальной и эмбриональной ГБ, также указывали на происхождение HepG2 от ГБ [17, 54, 110, 209].

По своим цитологическим характеристикам клетки HepG2, безусловно, наиболее похожи на опухолевые клетки гепатобластомы, но в то же время они сохраняют черты, характерные для нормальных гепатоцитов (таблица 1).

Средний диаметр клетки HepG2 составляет около 10-20 мкм, гепатоцита - 15 мкм, а опухолевых клеток с ГБ – 10-20 мкм, ГЦК >10 мкм. Около 20% гепатоцитов человека двуядерные или полиплоидные [69, 199]; часто их ядра анизокариотичны. Клетки HepG2 содержат от трех до семи ядер [99], на долю которых приходится до 25% общего клеточного белка, хотя их размер несколько больше, чем у нормальных гепатоцитов, содержащих до 10% общего белка в клетке. В опухолевых клетках, которые также характеризуются аномальным количеством хромосом, наблюдается увеличение количества ядер – до семи на клетку.

Клетка HepG2 содержит в среднем 170 мкг общего белка, что почти в три раза меньше, чем в гепатоцитах (600 мкг) [117]. Так, было показано, что уровень СУР3А4, который является одним из ключевых ферментов клеточного метаболизма лекарственных препаратов [97], в клетках HepG2 и у пациентов с ГЦК, гепатитом В в 100-400 раз меньше, чем в нормальных гепатоцитах [74, 80, 84].

Измененными сигнальными путями в ГБ являются сигнальный преобразователь и активатор транскрипции 3 (STAT3) [191] и сигнальные пути PI3K/Akt, ERK и p38 [22, 122]. В случае ГЦК основными путями, участвующими в онкогенном процессе, помимо Wnt/ β -катенина [155], являются фактор роста гепатоцитов/c-MET, фактор роста эндотелия сосудов, митоген-активируемая протеинкиназа (MAPK)/ERK (или Ras-Raf-MEK-ERK) и PI3K/AKT/Mtor [46]. Изменения в клеточной линии HepG2 наблюдаются в сигнальном пути трансформирующего фактора роста-бета (*англ.: transforming growth factor beta*, TGF- β), на долю которого приходится 38% генных мутаций при ГЦК [51]. Нарушение регуляции передачи сигналов по пути TGF- β играет центральную роль в воспалении, фиброгенезе и иммуномодуляции в микроокружении ГЦК [71].

Таблица 1 – Сравнительный анализ организации клеток гепатоцитов, HepG2, эпителиальной гепатобластомы, гепатоцеллюлярной карциномы

	Гепатоциты	HepG2	Эпителиальная гепатобластома	Гепатоцеллюлярная карцинома
Размер клеток	15 мкм	12-19 мкм	10-20 мкм	>10 мкм
Количество ядер	Двухядерные или полиплоидные	3-7	7	7
Количество хромосом	46	50-60	80-100	88-124
Количество ДНК	6 пг	7,5 пг	Количество не стабильно	Количество не стабильно
Компартменты клетки	-	Снижено содержание митохондрий	-	-
Протеом	600 мкг белка/клетка	170 мкг белка/клетка	150-200 мкг белка/клетка	150-200 мкг белка/клетка
Сигналинг		Wnt/ β -катенин	- Wnt/ β -катенин; - STAT3; - PI3K/Akt; - ERK; - p38	Wnt/ β -катенин; VEGF; (MAPK)/ERK; PI3K/AKT/Mtor; TGF- β

1.4.2. Использование клеточной линии HepG2 в медико-биологических исследованиях

Во многих исследованиях вместо первичной культуры печени используются иммортализованные клеточные линии печени, так как биопсия имеет высокую стоимость и является инвазивным методом, а также отмечается снижение активности органоспецифичных ферментов в выделенных клетках. Кроме того, не существует методики, позволяющей культивировать биоптаты печени для проведения длительных исследований [53]. В настоящее время существует около 40 различных линий опухолевых клеток печени, но наиболее часто используемыми являются HepaRG, Huh7, SK-Hep-1, Hep3B и HepG2, полученные из различных опухолей [159]. Среди упомянутых клеточных культур клеточная линия HepG2 приобрела популярность благодаря широкому спектру ее применения в научных исследованиях, а также HepG2 были первыми клетками, которые продемонстрировали основные характеристики гепатоцитов. Одна из возможных причин популярности использования клеточной линии HepG2 связана с тем фактом, что в большинстве случаев первичным раком печени является гепатоцеллюлярная карцинома.

В силу своего происхождения линия HepG2 отличается от нормальных гепатоцитов. Самым главным различием является слабая экспрессия цитохромов суперсемейства P450 (*англ.: cytochrome P450, CYP*), таких как CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2A6, CYP2D6 и т. д., которые участвуют в фазе I ксенобиотического окисления в печени [54, 93, 104]. Это связано с измененным паттерном так называемых печеночно-обогащенных транскрипционных факторов, а именно, группы белков, регулирующих транскрипцию, и вследствие этого контролирующей печеночную экспрессию различных генов, включая CYP [86]. Кроме того, было обнаружено, что некоторые общие признаки для клеточной линии HepG2 и нормальных гепатоцитов транспортные белки, такие как котранспортирующий полипептид таурохолат натрия, транспортер для экспорта

желчных солей (АВСВ11) и полипептид, транспортирующий органические анионы, 1В1 также слабо экспрессируются, в клетках HepG2 [86].

Клеточная линия HepG2 используется в различных научных исследованиях, в частности по изучению токсического действия тяжелых металлов, наночастиц и лекарственных веществ на клетки печени *in vitro* [54]. Данное использование объективно и объясняется тем, что метаболические функции клеток HepG2 соответствуют нормальным гепатоцитам: синтез и секреция белков плазмы, метаболизм холестерина и триглицеридов, метаболизм и транспорт липопротеинов, синтез желчных кислот, синтез гликогена или передача сигналов инсулина [86]. Использование клеток HepG2 в исследованиях, посвященных метаболизму противоопухолевых препаратов также возможно, так как имеются сходства с ГЦК и ГБ в отношении экспрессии белков I, II и III фазы метаболизма/транспорта лекарственных средств [93].

При изучении опухолевых процессов особое внимание уделяется сигнальным путям, которые отвечают за аберрантный рост клеток, выживание, поддержание генома, клеточного ответа. Исследование сигнальных путей регуляции обеспечивает новый уровень интерпретации патологических процессов и использует его для разработки новых методов лечения онкологии.

В случае рака печени основное внимание уделяется следующим путям: TGF- β [29, 196], протоонкогену Wnt/ β -катенину [17, 209], фосфоинозитол-3-киназе (англ.: *phosphoinositide 3-kinases*, PI3K)/протеинкиназе В (англ. *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*, Akt) [189, 210], c-Jun-N-терминальной киназе (англ.: *c-Jun N-terminal kinases*, JNK)/преобразователь сигналов и активатор транскрипции (англ. *signal transducer and activator of transcription*, 3STAT) [192], пути трансдукции опухолевого белка p53 [4, 177].

В настоящее время уделяется особое внимание редокс-чувствительному транскрипционному фактору Nrf2, который участвует в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза, в том числе и при нитрозативном стрессе [21, 38, 136]. Nrf2 играет важную роль в онкогенных и цитопротекторных процессах в раковых клетках, выполняя как супрессорную, так и онкогенную роль

[48, 147]. Во многих злокачественных новообразованиях его экспрессия повышена, и связана с агрессивностью опухоли, прогрессированием и терапевтической устойчивостью [39, 133]. Было показано, что повышенная экспрессия Nrf2 наблюдается при гепатоцеллюлярной карциноме – наиболее распространенной первичной злокачественной опухоли печени [44].

Клетки HepG2 являются наиболее часто изучаемыми линиями клеток печени, на долю которых приходится более 70% всех исследований гепатоцеллюлярного ответа [203]. Клетки линии HepG2 легко культивируются в стандартных условиях, что делает их удобными для экспериментальных исследований. Клеточная линия HepG2 активно используется для изучения биохимических механизмов регуляции, транспорта веществ и развития онкологических заболеваний печени у человека.

Таким образом, цитологические характеристики клеток HepG2 свидетельствуют о том, что изучаемая клеточная линия имеет признаки присущие как нормальным гепатоцитам, так и опухолевым клеткам, а именно изменения в эпигенетической регуляции ядерных и митохондриальных генов [119, 206]. Всё вышеперечисленное следует учитывать при планировании экспериментальных работ с использованием клеток линии HepG2. Для медико-биологических исследований принципиально важно наличие биохимических механизмов регуляции, свойственных нормальным гепатоцитам, в клетках HepG2, что позволяет выполнять на них работы в области молекулярной биологии.

1.5. S-нитрозоглутатион: химическая природа, свойства, донор оксида азота

1.5.1. Химическая структура и метаболизм S-нитрозоглутатиона

S-нитрозоглутатион (SNOG) является эндогенным низкомолекулярным S-нитрозотиолом (SNO) и представляет собой продукт S-нитрозилирования глутатиона (GSH), наиболее распространенного клеточного тиол-содержащего трипептида [63, 64] – γ -глутамилцистеинилглицин (Рисунок 4). В физиологических

условиях S-нитрозоглутатион представляет собой стабильный пул биодоступного оксида азота II (NO) *in vivo*.

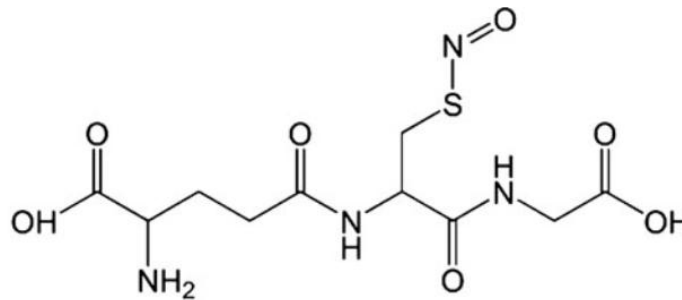


Рисунок 4 – Химическая структура S-нитрозоглутатиона

Известно, что формирование SNOG в биологических системах происходит в результате реакции между GSN и NO, однако точный механизм данного процесса мало изучен. На сегодняшний день предложено несколько возможных путей синтеза SNOG: реакция тиольной группы цистеина GSH с нитрозирующим агентом (например, триоксид диазота N_2O_3); реакция NO с тиольным радикалом GSH ($GS\cdot$); S-нитрозилирование GSH, катализируемый переходными металлами; и транснаитрозилирование (Рисунок 6) [63, 180].

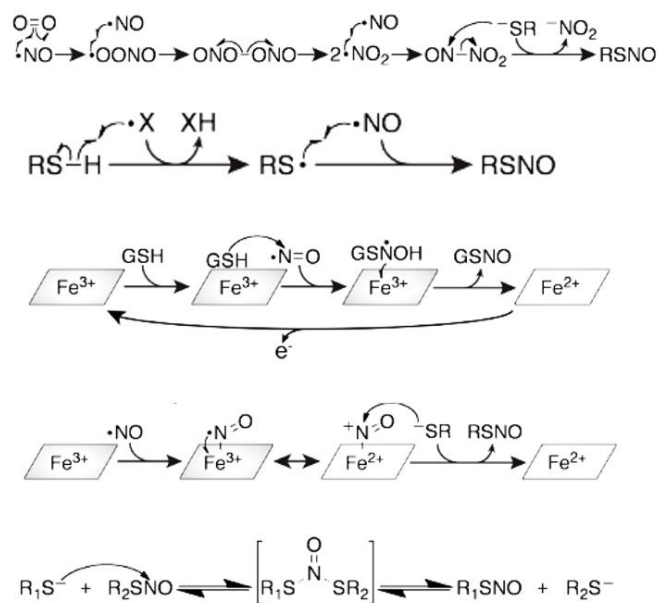


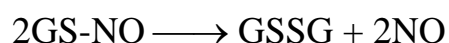
Рисунок 6 – Возможные варианты синтеза S-нитрозоглутатиона в биологических системах (Цит. по Smith B.C., 2012) [180]

Описано образование SNOG в митохондриях в процессе переноса NO-группы с гема цитохрома *c* на GSH. После этого SNOG транслоцируется в различные субклеточные структуры и транснаитрозилирует маркерные белки (т. е. передает им NO-группу), в том числе Nf-κB, STAT3, АКТ, рецептор эпидермального фактора роста (*англ.: epidermal growth factor receptor, EGFR*) и рецептор инсулинзависимого фактора роста (*англ.: insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R*), подавляя их активацию и таким образом оказывая специфические эффекты [188].

SNOG, в сравнении с остальными S-нитрозотиолами, обладает высокой стабильностью, что объясняется его низкой восприимчивостью к ион-зависимому разложению металлами. Так, при воздействии ионов меди (II) SNOG разлагается значительно медленнее, чем S-нитрозоцистеин, что может быть связано со способностью γ-глутамильных групп одного из конечных продуктов распада SNOG, дисульфида глутатиона (GSSG), действовать как слабый хелатор меди (II) и тем самым тормозить реакцию [63].

S-нитрозоглутатион обладает длительным периодом полураспада (от нескольких лет до часов при 100°C), поэтому он не способен к спонтанному разложению с высвобождением NO-группы, присутствие серосодержащих аминокислот в питательной среде может инициировать данный процесс [63].

При распаде нитрозотиолов образуется оксид азота и тиольные радикалы, в результате рекомбинации которых образуется дисульфид. Суммарная реакция для S-нитрозоглутатиона выглядит следующим образом [24]:



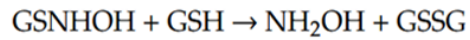
Расщепление SNOG происходит под действием фермента, называемого алкогольдегидрогеназой 5, также известной как SNOG-редуктаза (SNOGR).

Метаболизм SNOG происходит в две стадии [94]:

1. SNOGR катализирует реакцию NADH-сопряженного восстановления S-нитрозоглутатиона до N-гидроксисульфенамидоглутатиона (GSNHOH)



2. GSNHOH затем в присутствии глутатиона (GSH) превращается в дисульфид глутатиона (GSSG) и гидроксиламин (NH₂OH) из которого образуется оксид азота II.



На клеточном уровне SNOG находится в гомеостатическом равновесии с S-нитрозилированными белками, вследствие чего SNOGR посредством катаболизма SNOG изменяет количество S-нитрозилированных белков в клетке и связанных с ними сигналов [72]. У млекопитающих ген S-нитрозоглутатионредуктазы кодирует полипептид из 385 аминокислот с молекулярной массой около 40 кДа. Многочисленные исследования показали, что SNOGR регулирует S-нитрозилирование белка, действуя как денитрозилаза [162].

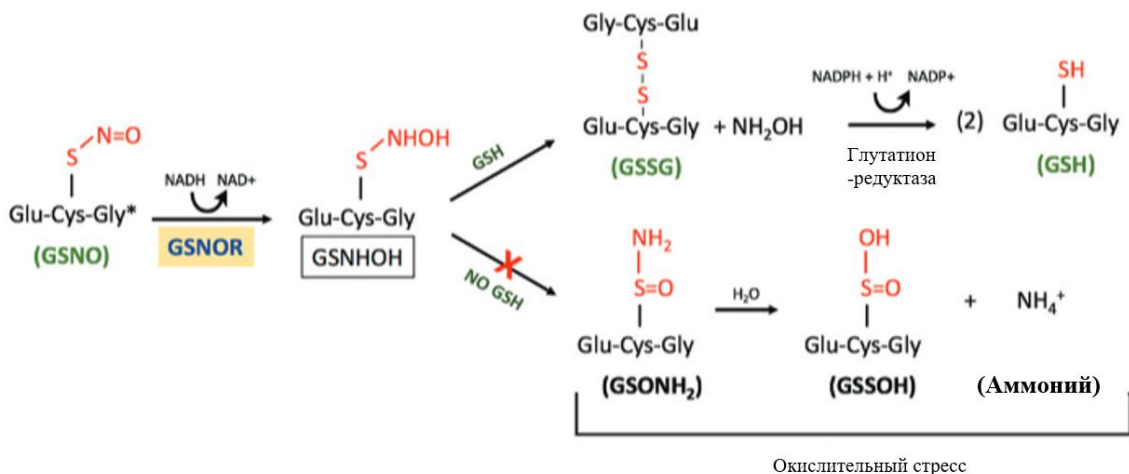


Рисунок 5 – Метаболизм GSNO под действием GSNOR
(Цит. по Barnett S.D., 2015) [58]

Примечание – GSNO – S-нитрозоглутатион; GSNOR – S-нитрозоглутатионредуктаза; GSNHOH – N-гидроксисульфенамидоглутатиона; GSSG – окисленный глутатион; GSH – восстановленный глутатион; GSONH₂ – сульфенамид; GSSOH – гидроксипроизводное глутатиона

Механизм поглощения SNOG клетками требует переноса нитрозогруппы от SNOG к другой тиолсодержащей аминокислоте – L-цистеину, перед поглощением. В ходе этой реакции транснаитрозилирования образуется глутатион и новый низкомолекулярный S-нитрозотиол – S-нитрозо-L-цистеин (L-CysNO), который является субстратом для поглощения через систему переносчика L-аминокислот.

L-CysNO легко транспортируется в клетки и может либо S-нитрозировать клеточный глутатион для преобразования SNOG внутри клетки, либо напрямую S-нитрозировать тиолы белков, вызывая клеточные реакции. Было замечено, что присутствие цистеина в средах для культивирования клеток необходимо для клеточного метаболизма SNOG. Механизм включает клеточное поглощение цистеина через систему Xc^- (цистеин/глутамат антипортер) с последующим внутриклеточным восстановлением и экспортом цистеина. Затем S-нитрозоглутатион транснаитрозирует новообразованный цистеин, и последним этапом является поглощение L-CysNO системой переносчиков L-аминокислот [63].

SNOG осуществляет свою функцию модулятора биохимических и физиологических процессов в клетках посредством транснаитрозилирования – переноса своей NO-группы на тиол цистеина другого белка [6, 16, 186].

S-нитрозилирование – это реакция ковалентного присоединения NO-группы к тиоловой группе цистеина белка с образованием S-нитрозотиола [15, 188]. Данный процесс, подобно другим посттрансляционным модификациям (фосфорилированию, метилированию и т. д.), регулирует экспрессию и функции ключевых белков, контролирующих дифференцировку клеток млекопитающих и активность клеточного цикла. Кроме того, посредством S-нитрозилирования происходит модуляция сигнальных путей, важных для нормального функционирования клеток и всего организма в целом [184].

Было показано, что SNOG обладает различными фармакологическими свойствами. Среди них можно выделить ингибирование агрегации тромбоцитов и активацию растворимой гуанилилциклазы (pГЦ), защитное действие при реперфузионном повреждении сердца и при воздействии на клетки оксидантов [132]. Также было продемонстрировано, что SNOG играет как положительную, так и отрицательную роль в апоптозе в зависимости от концентрации и типа клеток [212].

Эффекты SNOG были изучены *in vivo* на крысах для лечения когнитивных нарушений, вызванных хронической гипоперфузией головного мозга, что

позволяет предположить способность SNOG вызывать замедление нейродегенеративных процессов [175].

Данные, представленные в исследовании Sousa-Lima I. et al., 2020 [185], показывают, что введение SNOG вызывает положительную модуляцию сигнального пути инсулина. Описанный механизм способствует преодолению инсулинорезистентности у крыс, вызванной высоким содержанием сахарозы. Также было обнаружено, что оксид азота и глутатион играют важную роль в поддержании нормального действия инсулина, поскольку их уровень нарушается на ранних стадиях инсулинорезистентности. Однако введение обеих молекул не смогло восстановить действие инсулина в модели крыс с высоким содержанием сахарозы, но введение конечного продукта комбинации глутатиона и оксида азота, SNOG, оказалось эффективным для восстановления чувствительности к инсулину. Хроническая прооксидантная среда, вызванная сахарозой, приводит к дефекту в производстве SNOG, что влияет на его роль как молекулы, сенсibiliзирующей к инсулину. Наконец, исследование *in vitro* с использованием миотубов L6 подчеркивает важность SNOG как модулятора метаболизма глюкозы. Было получено, что стимуляция клеток L6 S-нитрозоглутатионом увеличивает поглощение глюкозы, инсулиновый сигнал на уровне инсулинового рецептора и протеин киназы B (англ.: *RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, protein kinase B alpha, Akt*) [185]. В биохимических исследованиях было доказано, что SNOG защищает центральную нервную систему от эксайтотоксичности, воспаления и активных форм кислорода (АФК) в различных условиях повреждения. S-нитрозоглутатион оказывает противовоспалительное действие в посттравматических ситуациях, главным образом, за счет снижения экспрессии ядерного фактора kB (англ.: *nuclear factor kB, Nf-kB*), молекул адгезии, цитокинов и индуцибельной NO-синтазы (iNOS) [1]. Он оказывает нейропротекторное действие через снижение апоптотической гибели нейронов и ингибирование активности каспазы-3. S-нитрозоглутатион проявляет свое антиоксидантное действие через модуляцию окислительно-восстановительных процессов, например, повышает уровень глутатиона и снижает уровень пероксинитрита [1,

160W]. В животных моделях острого повреждения центральной нервной системы SNOG защищает гематоэнцефалический барьер, уменьшает отек, снижает экспрессию молекул клеточной адгезии (англ.: *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*, ICAM-1), эктодисплазина 1 (англ. *ectodysplasin 1*, ED1) и матриксных металлопротеиназ 9 (ММП-9). Кроме того, SNOG подавляет активацию тромбоцитов и воспалительные явления в эндотелиальных и Т-клетках. Защитный эффект нитрозилирования был также отмечен при сердечно-сосудистых заболеваниях. Дефицит нитрозилирования, по-видимому, является общим механизмом патогенеза заболеваний [183]. Было доказано влияние SNOG на количество и активность орфанных рецепторов [37] и белка-транспортера Р-гликопротеина [8].

Имеются литературные данные о влиянии SNOG на гемоглобин. Известно, что в высоких концентрациях S-нитрозоглутатион ингибирует кислородсвязывающую функцию оксигемоглобина человека [25].

Основным регуляторным путем S-нитрозилирования белков является метаболизм SNOG S-нитрозоглутатион-редуктазой. SNOG существует в равновесном состоянии с S-нитрозилированным белком, а кардиомиоциты используют SNOG в качестве физиологического пула для NO-группы – основного участника реакций транснаитрозилирования [184]. Можно предположить, что нитрозоглутатионы эффективны при онкологических заболеваниях. Показано, что S-нитрозоглутатион в высоких концентрациях вызывает гибель клеток гепатоцеллюлярной карциномы, запуская процесс апоптоза [19]. Кроме этого, можно предположить регуляторное действие SNOG за счет нитрозилирования белков. Так, путем активации MAP-киназ Ras-ERK1/2 сверхфизиологическими концентрациями SNOG наблюдался апоптоз клеток острой моноцитарной лейкемии. Обработка клеток НЕК293 супрафизиологическими концентрациями SNOG привела к S-нитрозилированию X-связанного ингибитора апоптоза и ингибированию его антикаспазной-3 и антиапоптотической функций. Кроме того, S-нитрозилирование остатков цистеина рецепторов клеточной смерти фактора некроза опухоли (ФНО), CD95, фактора некроза опухоли, индуцирующего лиганд

апоптоза (англ.: *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand 1*, TRAIL-R1) и Fas стимулирует апоптотическую гибель клеток HepG2 [173].

Таким образом, S-нитрозоглутатион можно рассматривать как донор оксида азота, обладающий в зависимости от концентрации бимодальным действием - регуляторным или повреждающим, и возможным перспективным модулятором полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1. С другой стороны, поскольку S-нитрозоглутатион практически не проникает через билипидные мембраны клеток, актуален поиск транспортных систем, участвующих в его переносе, например, оценка роли OATP1B1 в данном процессе.

1.5.2. Оксид азота (II): сигнальная молекула и токсический агент

Оксид азота II (NO) является молекулой с коротким периодом полураспада, однако имеющей важную роль в сигнальных путях. Оксид азота принимает участие в вазодилатации, нейротрансмиссии, воспалении, апоптозе и росте опухоли. NO способен свободно проходить через клеточные мембраны. Он имеет свободно-радикальную природу, обладает дополнительным электроном, который позволяет ему быть очень реакционноспособным, а в высоких концентрациях проявлять токсическое действие [9, 161].

Функция NO в первую очередь опосредована S-нитрозилированием, ковалентной модификацией тиоловых групп цистеина на белках с помощью NO или его производных с образованием S-нитрозотиолов (SNO) [186]. Наиболее известное действие NO осуществляется через циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) в качестве вторичного мессенджера. Однако цГМФ-независимые действия NO, такие как нитрозилирование тирозина в белках и S-нитрозилирование, также участвуют при различных физиологических и патологических состояниях. Например, протеомный анализ печени показал важность S-нитрозилированных белков в регуляции функции печени. При патологических состояниях формирование модифицированных белков активируется за счет увеличения уровня NO на фоне повышения количества свободных радикалов [124].

Передача сигналов NO осуществляется посредством диффузии от места его продукции к мишени в клетке. Паракринная передача сигналов возможна, поскольку NO является маленькой, незаряженной, липофильной молекулой, что позволяет ей свободно проникать через биологические мембраны. В клетке-мишени NO активирует растворимую гуанилатциклазу (pГЦ) путем нитрозилирования железа в его гемовой части, что, в свою очередь, увеличивает синтез цГМФ из клеточного ГТФ [156]. Это активирует нижестоящие киназы, включая протеинкиназы, регулируемые цГМФ, и ионные каналы, чтобы регулировать различные физиологические процессы. Механистически NO связывается с некаталитическим гемом в N-концевой части pГЦ, что приводит к конформационным изменениям фермента и увеличению активности в C-концевой части циклазного домена. Фермент представляет собой гетеродимер, состоящий из одной α -субъединицы и одной β -субъединицы [132]. В целом, эти ферменты выполняют сходные функции в сердечно-сосудистой системе и большинстве других тканей, за исключением центральной нервной системы, где NO-ГЦ1 экспрессируется пресинаптически, а NO-ГЦ2 обнаруживается постсинаптически. Основным механизмом общего контроля этого пути является распад образующегося цГМФ, реакция, катализируемая различными фосфодиэстеразами (ФДЭ), из которых ФДЭ 5, 6 и 9 проявляют наибольшую специфичность по отношению к цГМФ [143].

В целом белки и пептиды, которые были модифицированы до образования S-нитрозотиоловых связей, участвуют в независимой от гуанилатциклазы передаче сигналов оксидом азота, хотя S-нитрозилирование также влияет на ГЦ-зависимые процессы [181]. В физиологических условиях низкий уровень активных форм азота можно обнаружить практически во всех клетках *in vivo*, включая кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, фибробласты, мезенхимальные стволовые клетки и клетки гладких мышц сосудов [98].

Снижение и нарушение высвобождения NO может привести к возникновению атеросклероза, коронарному вазоспазму и рестенозу после ангиопатии. С другой стороны, увеличение синтеза NO может вызывать гипотонию

у больных циррозом и недостаточностью печени, а также вызывать геморрагический и анафилактический шок. Эндогенное высвобождение NO на базальном уровне регулирует тонус легочной сосудистой сети [28, 36, 100].

Нитрозативный стресс тесно связан с окислительным стрессом. Активные формы кислорода, такие как супероксид-анион ($O_2^{\cdot-}$), синглетный кислород (O_2), гидроксильный радикал ($\cdot OH$), перекись водорода (H_2O_2) и азота - пероксинитрит-анион ($ONOO^-$) и оксид азота (NO), которые участвуют в механизме развития окислительного стресса, перекрываются с путями образования и удаления активных форм азота и взаимно регулируют друг друга [98]. Полученный $ONOO^-$ может нитрировать несколько биомолекул, включая белки, липиды и ДНК, с образованием 3-нитротирозина. Важнейшей характеристикой нитрозативного стресса является нитрозилирование тирозина. Модификация нитрозилированных белков представляет собой посттрансляционную модификацию белков, вызванную их взаимодействием с активными формами кислорода и азота. Образование 3-нитротирозина является специфическим биомаркером нитрозативного стресса, который можно использовать для мониторинга внутриклеточного образования и локализации $ONOO^-$, а также тяжести гибели клеток [98]. Считается, что гиперпродукция NO может оказывать токсическое действие, выраженность и проявление которого зависит от источника и места его воздействия. Известно, что оксид азота (II) быстро реагирует с супероксидными анионами, образующимися из митохондриальных и/или немитохондриальных источников, с образованием высокотоксичного пероксинитрита ($ONOO^-$) [1]. Более того, было показано, что чрезмерный окислительный/нитрозативный стресс вызывает гибель клеток посредством S-нитрозилирования белковых мишеней, таких как паркин, динамин-связанный белок 1 (англ.: *dynammin-related protein*, Drp1), протеиндисульфидизомераза, X-связанный ингибитор апоптоза (англ.: *X-linked inhibitor of apoptosis protein*; XIAP), ММП-9, циклооксигеназа-2 (ЦОГ-2), чувствительный к N-этилмалеимиду фактор (англ.: *N-ethylmaleimide-sensitive factor*, NSF) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (GAPDH) [72]. В настоящее время активно изучается сигнальная роль ядерного фактора эритроидного

происхождения (англ.: *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, Nrf2) при дисбалансе редокс-статуса клетки. Рассмотрена его роль в регуляции эффлюксного белка-транспортера [89], в том числе при развитии окислительного [2, 27] и нитрозативного стресса [8, 34]. Все это позволяет предположить, участие Nrf2 и в регуляции инфлюксных белков-транспортеров, а именно OATP1B1 [35].

NO способен проявлять как канцерогенные, так и антиканцерогенные свойства. Такой двойственный характер напрямую связан с концентрацией NO: при 200 нМ и выше, NO проявляет себя как антиканцерогенный агент, тогда как при концентрациях ниже этого порога NO способствует выживаемости раковых клеток и активирует проканцерогенные сигнальные пути. Они могут способствовать пролиферации раковых клеток, ингибируя апоптоз, стимулируя ангиогенез и способствуя нестабильности генома [173]. NO из-за высокой реакционной способности быстро окисляется во внутриклеточной среде и в свободном состоянии существует недолго – период его полураспада составляет всего 3-5 секунд [100]. Это ограничивает действие NO как модулятора сигнальных путей внутри клетки, однако существует особый класс доноров – нитрозотиолов, которые защищают NO-группу от окисления и одновременно с этим расширяют его временное и пространственное действие [5, 173]. Так, при добавлении SNOG в суспензию тромбоцитов было обнаружено, что содержание NO по сравнению с контрольной группой (без SNOG) резко возрастало, а затем снижалось после достижения пика на 3-й день, тогда как в пробах контрольной группы (без SNOG) концентрация NO нарастала медленно и на всем протяжении эксперимента была значительно ниже, чем в образцах с SNOG [91].

Таким образом, NO является важным регулятором биохимических и физиологических процессов. Несмотря на большое количество литературных данных в области сигналинга оксида азота, в настоящее время отсутствуют данные о его действии на OATP1B1, а также об участии данного белка в возможном транспорте S-нитрозоглутатиона. Все вышеперечисленное дает предпосылки для проведения новых исследований, направленных на устранение этих пробелов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Объект исследования: описание клеточных линий и условий культивирования

Описание клеточных линий. Эксперименты *in vitro* выполнены на культуре клеток HepG2 (англ.: *human hepatocellular carcinoma cell line*), HEK293 (англ.: *human embryonic kidney*), HEK293-SLCO1B1 (Рисунок 7).

Клетки гепатоцеллюлярной карциномы (HepG2) и клетки почки человеческого эмбриона (HEK293) были приобретены в ФГБУН ИНЦ РАН, Санкт-Петербург. Трансфицированная клеточная линия HEK293-SLCO1B1, стабильно экспрессирующая OATP1B1, была получена в лаборатории биоинженерии клеток ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России [3, 33].

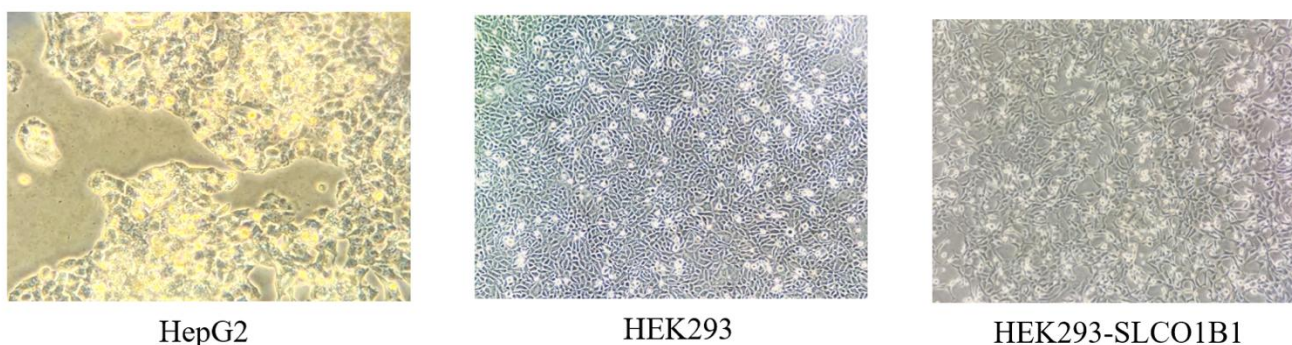


Рисунок 7 – Изображения монослоя клеточных культур HepG2, HEK293, HEK293-SLCO1B1, ув. $\times 400$

Условия культивирования клеток. Для культивирования клеточных линий HepG2, HEK293, HEK293-SLCO1B1 использовали питательную среду Игла в модификации Дульбекко с высоким содержанием глюкозы 4500 мг/л (англ.: *Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM*) (ПанЭко, Россия).

Состав питательной среды: DMEM; 4 мМ L-глутамин; пенициллин, 100 ЕД/мл; стрептомицин, 100 мкг/мл (все компоненты производства Панэко, Россия); 10 % эмбриональная бычья сыворотка (Biowest, France).

Условия культивирования: содержание CO₂ 5%, температура 37°C в инкубаторе WS- 189C (World Science, Корея).

Лабораторная посуда для культивирования клеток:

Планшеты пластиковые 96 лунок (Corning, США) для проведения МТТ-теста; 6 лунок и 24 лунки (Corning, США) для выполнения биохимических анализов; флaskи 25 см² и 75 см² (Corning, США) для культивирования клеток.

Клеточная линия HEK293-SLCO1B1

В работе использовали клеточную линию HEK293-SLCO1B1, разработанную и полученную в лаборатории биоинженерии клеток ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России [33].

Используемые химические вещества. В работе были использованы следующие вещества:

- S-нитрозоглутатион;
- 1H-[1,2,4]оксадиазоло-[4,3-a]хиноксалин-1-ОН (ODQ);
- N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин (АЕМ1);
- N-(4-трифторметилфенил) 3,4-диметоксициннамамид (TFCA).

Характеристика тестируемых веществ представлена в Таблице 2.

Действие S-нитрозоглутатиона ранее было изучено в исследованиях, проведенных на базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. Было показано, что S-нитрозоглутатион в концентрациях 1-500 мкМ и длительности инкубации 3, 24 и 72 ч участвует в регуляции активности эффлюксного белка-транспортера Р-гликопротеина [8, 18, 34], конститутивного андростанового рецептора и прегнан Х рецептора [7, 30], что позволяет рассматривать используемый диапазон концентраций эффективной экспериментальной моделью *in vitro*. Представленное исследование является продолжением цикла работ, посвященных изучению регуляции белков-транспортеров и биохимических механизмов действия S-нитрозоглутатиона.

Таблица 2 – Физико-химические свойства тестируемых веществ

	SNOG	ODQ	AEM1	TFCA
Полное наименование	S-нитрозоглутатион	1H-[1,2,4]оксадиазоло-[4,3-а]хиноксалин-1-ОН	N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин	N-(4-трифторметилфенил) 3,4-диметоксициннамамид
Химическая формула	C10H16N4O7S	C9H5N3O2	C20H14FN3O2S	C18H16F3NO3
Страна-производитель	«Sigma-Aldrich», Германия			
Свойства	Твердое вещество розового цвета без запаха	Твердое вещество без цвета и запаха	Твердое вещество белого цвета и без запаха	Твердое вещество белого/бежевого цвета, без запаха
Молекулярная масса, г/моль	336,32	187,15	379,41	351,32
Растворитель	Вода	Диметилсульфоксид		
Условия хранения	-20°C	-20°C	-20°C	-20°C
Использование в эксперименте	Донор оксида азота (II)	Ингибитор растворимой гуанилатциклазы	Ингибитор Nrf2	Ингибитор LXRα

2.2. Дизайн исследования

Нитрозоглутатион растворяли в питательной среде до концентраций 1, 5, 10, 50, 100 мкМ и инкубировали с клетками в течение 3, 24 и 72 часов во всех группах экспериментов.

В ходе работы выполнены следующие группы экспериментов:

I группа. Изучение влияния S-нитрозоглутатиона на функционирование митохондрий и жизнеспособность клеток линии HepG2 – выявление цитотоксических концентраций

Клетки линии HepG2 культивировали в стандартных условиях.

Используемый пластик для культивирования клеток – 96-луночные планшеты, в которых проводили анализ – МТТ-тест; 6-луночные планшеты для окрашивания флуоресцентными зондами MitoTracker Red.

Каждый эксперимент был выполнен трижды.

Серия 1 – *контрольная группа* – клетки, культивируемые в питательной среде, содержащей воду для инъекций.

Серия 2 – клетки, культивируемые с S-нитрозоглутатионом [14, 34] (Рисунок 8).

II группа. Оценка уровня оксида азота, показателей нитрозативного стресса и апоптоза под действием S-нитрозоглутатиона в клетках линии HepG2

Клетки линии HepG2 культивировали в планшетах:

- 6-луночные – клеточные лизаты использовались для оценки показателей нитрозативного стресса – 3-нитротирозина и битирозина, апоптоза – Bcl2 и Fas;

- 24-луночные – для оценки уровня оксида азота (II) и определения концентрации небелковых SH-групп (косвенный показатель содержания глутатиона).

На каждый эксперимент было выполнено 3 повтора.

Серия 1 – *контрольная группа* – клетки, культивируемые в питательной среде, содержащей воду для инъекций.

Серия 2 – клетки, культивируемые с S-нитрозоглутатионом [14, 34] (Рисунок 8).

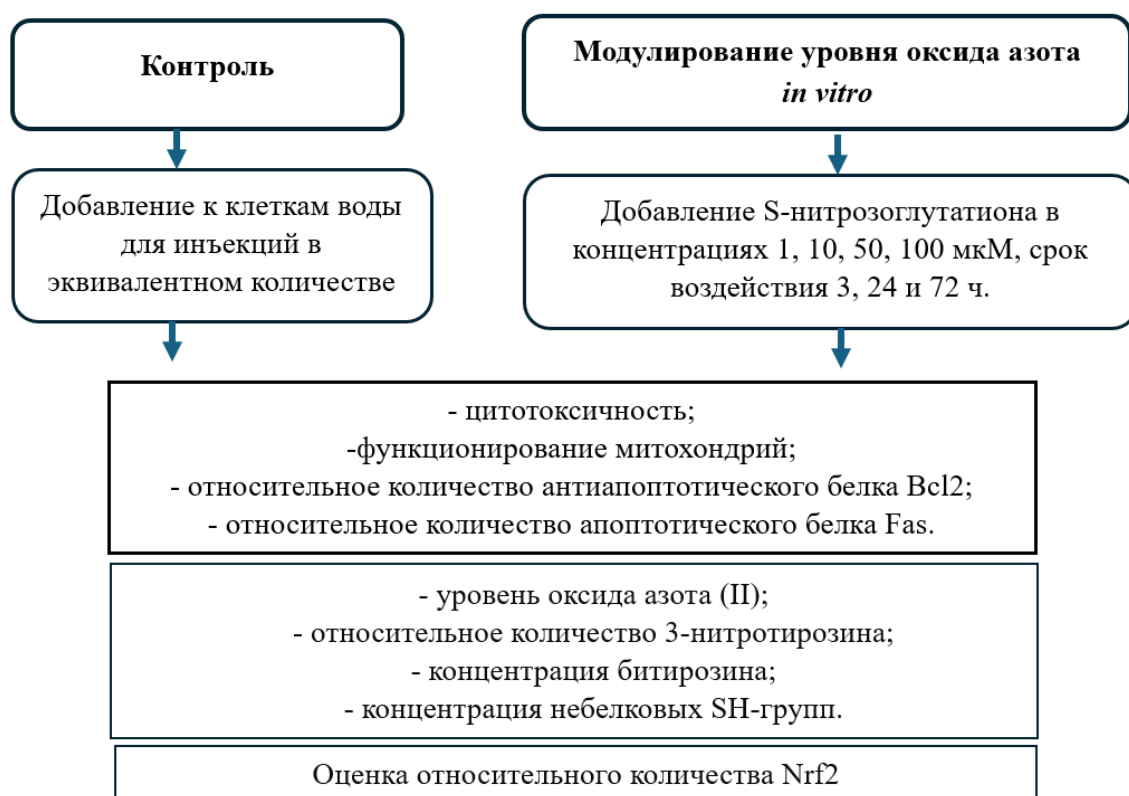


Рисунок 8 – Схема оценки воздействия S-нитрозоглутатиона на жизнеспособность клеток и внутриклеточный редокс баланс

III группа. Оценка влияния S-нитрозоглутатиона на относительное количество транскрипционного фактора Nrf2 и выявление участия растворимой гуанилатциклазы в его регуляции

Клетки линии HepG2 культивировали в 6-луночных планшетах, далее оценивали относительное количество Nrf2 в лизате клеток линии HepG2.

Серия 1 – контрольная группа – клетки, культивируемые в питательной среде, содержащей воду для инъекций.

Серия 2 – клетки, культивируемые с S-нитрозоглутатионом [14, 34].

Серия 3 – клетки, культивируемые в питательной среде с ODQ в концентрации 10 мкМ [114]. Через 30 мин после инкубации добавляли в питательную среду S-нитрозоглутатион [34, 35].

IV группа. Оценка субстратной специфичности OATP1B1 к S-нитрозоглутатиону

Клетки линии HEK293 и HEK293-SLCO1B1 культивировали в 24-луночных планшетах до достижения монослоя.

Серия 1 – клетки HEK293, к которым добавляли S-нитрозоглутатион в концентрациях 1 и 10 мкМ и инкубировали в течение 5, 15 и 30 мин.

Серия 2 – клетки HEK293-SLCO1B1, к которым добавляли S-нитрозоглутатион в концентрациях 1 и 10 мкМ и инкубировали в течение 5, 15 и 30 мин.

V группа. Оценка влияния S-нитрозоглутатиона на относительное количество, активность OATP1B1 и экспрессию гена *SLCO1B1*

Клетки линии HepG2 культивировали в 6-луночных планшетах. После проведения эксперимента клетки лизировали и оценивали относительное количество и активность белка OATP1B1, также из клеток выделяли мРНК и оценивали уровень *SLCO1B1*. Каждый эксперимент выполнен в трех повторах.

Серия 1 – *контрольная группа* – клетки, культивируемые в питательной среде, содержащей воду для инъекций.

Серия 2 – клетки, культивируемые с S-нитрозоглутатионом [14, 34] (Рисунок 9).

VI группа. Оценка цитотоксичности ODQ, AEM1, TFCA на клетки HepG2 и их влияния на количество OATP1B1

Клетки линии HepG2 культивировали в 96-луночных планшетах для оценки жизнеспособности клеток и в 6-луночных планшетах для оценки относительного количества OATP1B1.

Серия 1 – *контрольная группа 1* – клетки, культивируемые в питательной среде, содержащей воду для инъекций.

Серия 2 – *контрольная группа 2* – клетки, культивируемые в питательной среде с добавлением ДМСО в количестве 0,01% (растворитель ODQ, AEM1, TFCA).

Серия 3 – культивирование клеток в питательной среде с добавлением ODQ в концентрации 10 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч [114].

Серия 4 – культивирование клеток в питательной среде с добавлением АЕМ1 в концентрации 5 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч [43].

Серия 5 – культивирование клеток в питательной среде с добавлением TFCA в концентрации 30 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч [73].

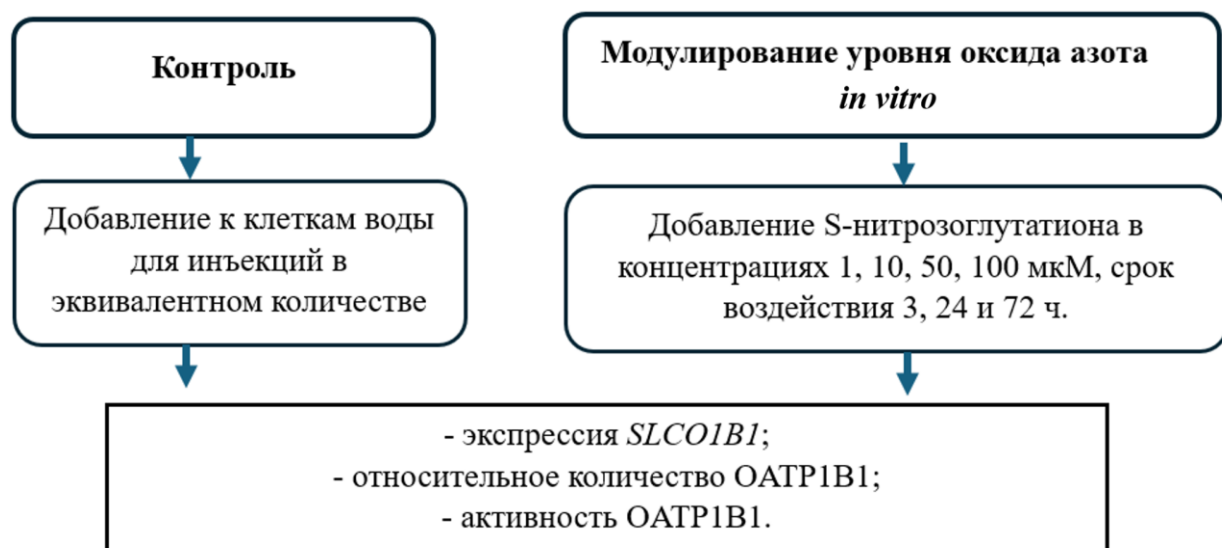


Рисунок 9 – Схема экспериментального исследования оценки влияния S-нитроглютамина на экспрессию *SLCO1B1*, количество и активность OATP1B1

VII группа. Выявление механизмов регуляции S-нитроглютамина на функционирование белка-транспортера OATP1B1

Клетки линии HepG2 культивировали в 6-луночных планшетах. После инкубации с тестируемыми веществами проводили оценку относительного количества OATP1B1.

Серия 1 – контрольная группа 1 - клетки, культивируемые в питательной среде, содержащей воду для инъекций.

Серия 2 – контрольная группа 2 – интактные клетки, которые инкубировали в питательной среде с добавлением ДМСО в количестве 0,01% (растворитель ODQ, АЕМ1, TFCA).

Серия 3 – культивирование клеток в питательной среде с добавлением ODQ в концентрации 10 мкМ [114]. Через 30 мин после преинкубации добавляли в питательную среду S-нитрозоглутатион в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ и инкубировали в течение 24 и 72 ч.

Серия 4 – культивирование клеток в питательной среде с добавлением AEM1 в концентрации 5 мкМ [43]. Через 30 мин после преинкубации добавляли в питательную среду S-нитрозоглутатион в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ и инкубировали в течение 24 и 72 ч.

Серия 5 – культивирование клеток в питательной среде с добавлением TFCA в концентрации 30 мкМ [73]. Через 30 мин после преинкубации добавляли в питательную среду S-нитрозоглутатион в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ и инкубировали в течение 24 и 72 ч (Рисунок 10).

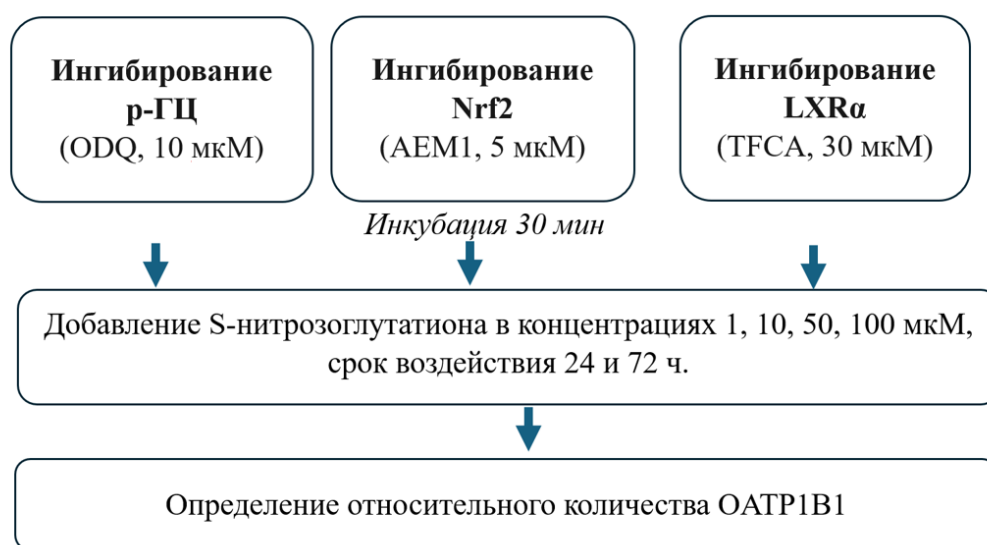


Рисунок 10 – Дизайн эксперимента по оценке механизма регуляции белка-транспортера OATP1B1 при воздействии S-нитрозоглутатиона

2.3. Тест на цитотоксичность (МТТ-тест)

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста [135].

Принцип метода. В клетках, посаженных в 96-луночный планшет анализируется активность НАДФН-зависимых оксидоредуктаз. Эти ферменты восстанавливают тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-

дифенилтетразолиум бромид (МТТ) до нерастворимого формазана, имеющего пурпурное окрашивание [2].

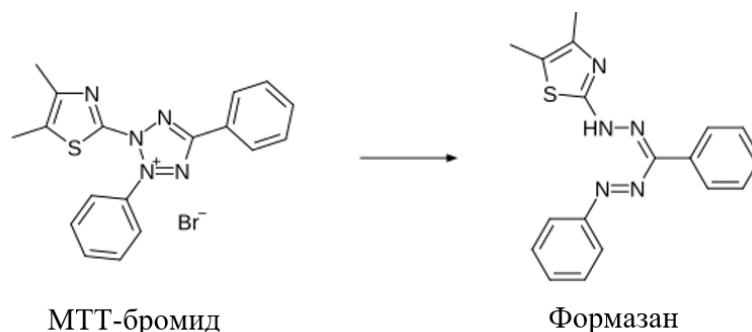


Рисунок 11 – Схема реакции, лежащей в основе МТТ-теста

Ход определения. Клетки в количестве 10^6 клеток/лунка инкубировали с тестируемыми веществами в течение 3, 24 и 72 ч в CO_2 -инкубаторе при температуре 37°C . Затем в лунки добавляли 20 мкл 0,5% раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия и выдерживали 2 часа. После этого раствор удаляли и добавляли 200 мкл 1% раствора диметилсульфоксида (ПанЭко, Россия). Планшет размещали на шейкере на 5 мин (BioSan, Латвия) для полного растворения кристаллов формазана. Детекцию проводили на планшетном фотометре Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США) при длине волны 530 нм. Значения оптической плотности, полученные для опытных и контрольных лунок, математически обрабатывали путем вычитания оптической плотности среды соответственно. Полученные данные нормировали относительно контрольных значений, которые принимали за 100%, и выражали также в процентах [19].

2.4. Определение уровня оксида азота

Для выявления уровня оксида азота (II) использовали флуоресцентные зонды DAF FM (Invitrogen, США) [56].

Принцип метода. Дериваты оксида азота в клетке взаимодействуют с 4-амино-5-метиламино-2,7-дифлуоресциндацетатом (DAF FM) и образуют флуоресцирующий бензотриазол (DAF T), таким образом, по интенсивности

флуоресценции можно судить об уровне NO в клетке (Рисунок 12). Эта реакция используется для качественной оценки клеточной продукции NO [130].

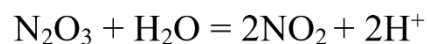
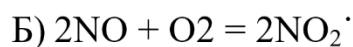
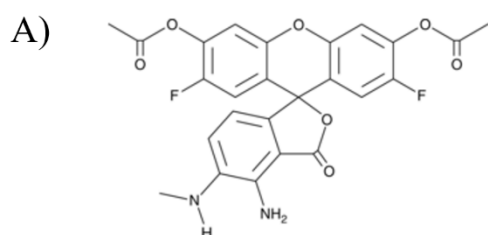


Рисунок 12 – Формула DAF FM диацетата (А) и схема взаимодействия дериватов оксида азота (II) с DAF FM (Б)

Ход проведения анализа:

1. К монослою жизнеспособных клеток на 6-луночном планшете добавляли раствор DAF FM в концентрации 10 мкМ и инкубировали клетки в CO₂-инкубаторе в течение 30 минут при температуре 37°C и содержании CO₂ - 5%.

2. После инкубации клетки промывали фосфатным буфером (ПанЭко, Россия) для удаления излишек зонда.

3. Раствор DAF FM заменяли фосфатным буфером, а затем инкубировали 15 минут для обеспечения полной дезэтерификации внутриклеточных диацетатов.

Ядра клеток прокрашивали красителем DAPI (1:50000), срок экспозиции 3 мин в темноте.

Микроскопирование клеток и ядер осуществлялось на инвертированном микроскопе Olympus CKX-53 («Olympus», Япония).

Лизис клеток. Клетки удаляли скребком с поверхности лунок планшета, суспензию клеток промывали фосфатным буфером (Панэко, Россия), далее добавляли лизирующий буфер в объеме 450 мкл.

Состав лизирующего буфера: 50 мМ pH 7,4 Tris-HCl, 150 мМ KCl, 0,5% тритон X-100 (Sigma-Aldrich, Германия).

Уровень оксида азота в клетках анализировали на спектрофлуориметре RF-6000 (Shimadzu, Япония) по интенсивности флуоресценции $\lambda_{\text{ext}}=495$ нм, $\lambda_{\text{em}}=515$ нм.

Полученные значения пересчитывали на количество клеток, которое определяли на счетчике «Countess 3 Automated Cell Counter», США. Полученные значения выражали в ед.фл./10⁶ клеток.

2.5. Оценка функционирования митохондрий

Принцип метода. Краситель MitoTracker Red представляет собой проникаемые для клеток зонды, которые содержат хлорметиловый фрагмент, реагирующий с тиолом, для реакции с активными митохондриями.

Ход определения. К клеткам линии HepG2 добавляли 100 нМ раствор MitoTracker Red и инкубировали в течение 30 мин согласно протоколу [2]. Зонды MitoTracker накапливаются в активных митохондриях. Следовательно, по интенсивности флуоресценции оценивали функциональное состояние митохондрий. Аналогичным образом ядра клеток прокрашивали красителем DAPI (1:50000), срок экспозиции 3 мин в темноте. Визуализацию клеток и ядер выполняли с помощью инвертированного микроскопа Olympus CKX-53 (Olympus, Япония). Затем клетки снимали с лунок, лизировали с помощью 0,2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Германия). Количественную оценку степени флуоресценции проводили с помощью спектрофлуориметра (Shimadzu RF-6000, Япония) при $\lambda_{\text{exc}}=579$ нм, $\lambda_{\text{em}}=599$ нм и пересчитывали на количество клеток (счетчик и анализатор жизнеспособности клеток «Countess 3 Automated Cell Counter», США). Результаты выражали в ед. фл./10⁶ клеток.

2.6. Количественная оценка содержания битирозина

Для оценки степени нитрозилирования белков при воздействии S-нитрозоглутатиона в клетках линии HepG2 проводили количественную оценку битирозиновых сшивок.

Принцип метода. Метод основан на оценке аутофлуоресценции битирозина. Флуоресценция регистрируется при следующих параметрах: $\lambda_{\text{exc}}=325$ нм и $\lambda_{\text{em}}=415$ нм [49].

Приготовление лизатов для анализа. Клетки снимали с поверхности 6-луночного планшета, далее промывали изотоническим раствором NaCl (Медпро, Россия), добавляли 450 мкл лизирующего буфера (50 mM pH 7,4 Tris-HCl, 150 mM KCl, 0,5% тритон X-100), встряхивали на шейкере и инкубировали в течение 10 минут.

Ход проведения анализа. Контрольная проба содержала 450 мкл фосфатного буфера (pH 7,4) и 50 мкл дистиллированной воды. Опытная проба содержала 450 мкл фосфатного буфера и 50 мкл пробы. Обе пробы инкубировали при 37°C в термостате «Гном» (ДНК-технологии, Россия) в течение 1 часа. По истечении инкубации интенсивность окислительной модификации тирозина оценивали по степени флуоресценции битирозина.

Количественную оценку битирозина проводили на спектрофлуориметре RF-6000 (Shimadzu, Япония) при длине возбуждения $\lambda_{\text{exc}}=325$ нм и длине волны испускания $\lambda_{\text{em}}=415$ нм. Полученные результаты выражали в единицах флуоресценции, отнесенных на мг белка (ед.фл./мг белка).

2.7. Оценка концентрации общего белка

Определение уровня белка в полученных лизатах проводили по методу Бредфорда с помощью Coomassie Plus (Bradford) AssayKit (Thermo Fisher Scientific, США).

Принцип метода. Метод основан на реакции красителя кумасси бриллиантового синего с аргинином и гидрофобными аминокислотными остатками в белке. Связанная форма имеет голубую окраску с максимумом поглощения при 595 нм [62].

Ход проведения анализа. Контрольная проба – 10 мкл дистиллированной воды соединяли с 290 мкл раствора кумасси бриллиантового синего,

экспериментальная проба – к 10 мкл образца добавляли 290 мкл раствора кумасси бриллиантового синего. Каждую пробирку встряхивали на вортексе.

Светопоглощение измеряли при длине волны 595 нм на спектрофотометре Smart Spec 3000 (Bio Rad, США).

2.8. Оценка концентрации небелковых SH-групп фотометрическим методом

Для оценки уровня небелковых SH-групп предварительно осаждали белковые компоненты лизата клеток HepG2 и проводили фотометрический анализ с помощью реактива Элмана.

Принцип метода. Метод основан на реакции взаимодействия сульфгидрильных (тиоловых) групп с 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойной кислотой) (ДТНБ, реактив Элмана).

В ходе реакции происходит разрыв дисульфидной связи в реактиве, и образуется 2-нитро-5-тиобензойная кислота, которая переходит в хиноидную форму в воде при нейтральных и щелочных pH и имеет ярко-жёлтую окраску.

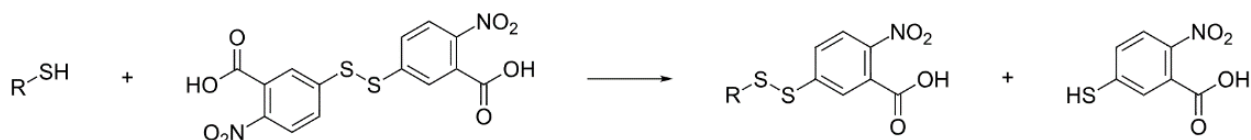


Рисунок 13 – Схема реакции, лежащей в основе метода детекции небелковых SH-групп

Ход проведения анализа. Для осаждения белков к клеткам добавляли охлажденную 5% трихлоруксусную кислоту (Химмед, Россия) и после 15 минут инкубации центрифугировали при 11000 g (СМ-50, Eppendorf, Германия) 5 минут при $t=4^{\circ}\text{C}$.

Для удаления остатков трихлоруксусной кислоты проводили реакцию нейтрализации с NaOH (1%). Далее к полученному образцу прибавляли 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойную кислоту) (Serva, Германия) в 1 М трис-HCl буфере (pH 8,0) и инкубировали 30 минут.

По окончании эксперимента фотометрический анализ был выполнен на спектрофотометре Smart Spec 3000 («Bio Rad», США) при длине волны 412 нм.

Для расчета количественной оценки использовали коэффициент молярной экстинкции $\lambda_{412}=13,6 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [92].

Результаты выражали в мкмоль/мг белка.

2.9. Оценка уровня внутриклеточного S-нитрозоглутатиона и глутатиона методом ВЭЖХ МС/МС

Принцип метода. Концентрации S-нитрозоглутатиона и глутатиона в клеточном лизате определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 и тройном квадрупольном масс-спектрометре TSQ Fortis, оснащенный источником ионизации электрораспылением (ESI) (Thermo Fisher Scientific, США).

Ход проведения анализа. Культивирование клеток с тестируемыми веществами осуществляли в 24-луночных планшетах. После выполнения экспериментов, клетки лизировали трехкратным циклом заморозки-разморозки.

Осаждение белков в биологическом образце осуществляли реакцией с метанолом (v1:v1). Хроматографическое разделение проводили на колонке C18 UCT Selectra (C18 4,6 мм × 100 мм, 3 мкм, 100 А) с защитными картриджами Selectra C18 перед колонкой SLC-18GDC46-5UM. Параметры программы градиента подвижной фазы представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Параметры программы градиента подвижной фазы

0,1%-ный раствор муравьиной кислоты А, %	Метанол В, %	Время, мин
60	40	0-0,01
40	60	0,01-2,5
1	99	2,5-6,0
60	40	6,0-10,0

Скорость потока - составила 400 мкл/мин.

Температура колонки - 35°C.

Объем аликвоты экстрагированных образцов 10 мкл.

Режим мониторинга селективных реакций для количественного анализа: для SNOG - масса/заряд 337.1→307.1; для глутатиона - масса/заряд 308.1→179.1

Результаты выражали в пмоль/мг.

2.10. Оценка субстратной специфичности OATP1B1 к S-нитрозоглутатиону

Принцип метода: метод основан на определении концентрации S-нитрозоглутатиона в клетках линии HEK293 и HEK293-SLCO1B1 с помощью ВЭЖХ-МС/МС [13].

Ход проведения анализа. Клеточные культуры HEK293 и HEK293-SLCO1B1 культивировали на 24-луночном планшете. До начала эксперимента клетки в лунках планшета промывали транспортным буфером (37°C).

Состав транспортного буфера: сбалансированный солевой раствор Хэнкса (без фенолового красного) с добавлением 12,5 мМ HEPES (pH 7,4) и 1% ДМСО.

SNOG растворяли в транспортном буфере до конечной концентрации 1 и 10 мкМ. Клетки (HEK293-SLCO1B1 и HEK293) инкубировали с тестируемым раствором при комнатной температуре в течение 5, 15 и 30 минут. Реакцию останавливали путем удаления буфера, содержащего SNOG, и добавления в лунку

0,5 мл охлажденного льдом транспортного буфера. Затем клетки немедленно трижды промывали 0,5 мл охлажденного физиологического раствора с фосфатным буфером Dulbecco (ПанЭко, Россия). Клетки подвергали лизису с помощью трех циклов «замораживание-оттаивание» (клетки замораживали при температуре -80°C и оттаивали при комнатной температуре). В конце эксперимента сравнивали концентрацию SNOG в клетках HEK293 и HEK293-SLCO1B1. В качестве положительного контроля оценивали транспорт 1 мкМ аторвастатина – классического субстрата OATP1B1. Концентрацию аторвастатина определяли методом ВЭЖХ-МС/МС и выражали в пмоль/мг белка.

2.11. Метод вестерн-блот

Метод вестерн-блот (вестерн-блоттинг, белковый иммуноблот, англ. *western blot*) – аналитический метод, используемый для определения в образце специфических белков.

Принцип метода. Метод включает разделение белков с помощью гелевого электрофореза, их перенос на мембрану и селективную иммунодетекцию иммобилизованного антигена. Метод основан на специфичности взаимодействия антитело-антиген и используется для качественной или полуколичественной идентификации специфических белков и их молекулярной массы в сложной смеси.

Приготовление клеточных лизатов. Культивирование клеток осуществляли в 6-луночных планшетах. По окончании эксперимента клетки удаляли с лунок планшета раствором трипсин-ЭДТА (0,25%:0,2%). После трипсинизации проводили трехкратную промывку раствором фосфатного буфера (ПанЭко, Россия). Лизис клеток осуществляли коммерческим буфером RIPA 100 мкл на количество клеток 10^7 (Servicebio, Китай), содержащим смесь ингибиторов протеиназ (Sigma-Aldrich, Германия). Условия лизиса были следующие: 30 мин при $t=+4^{\circ}\text{C}$, перемешивание на вортексе каждые 10 мин. На следующем этапе клеточный лизат подвергали центрифугированию при 5000 g (CM-50, Eppendorf, Германия), 15 мин. Супернатант отделяли от преципитата и использовали для

определения относительного количества 3-нитротирозина, OATP1B1, Bcl2 и Fas методом вестерн-блот.

Получение ядерной фракции гомогената для вестерн-блот анализа. Для оценки Nrf2 разделяли ядерную и цитоплазматическую фракцию клеточного лизата с помощью набора Protein Extraction Kit (Cytoplasmic Nuclear), (Bio-Rad, США). Полученный лизат центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 минут (AvantiJXN-3, BeckmanCoulter, США).

Подготовка гелей для проведения электрофореза

Полиакриламидный гель для вертикального электрофореза готовили с использованием натрия додецилсульфата (*англ.: sodium dodecyl sulfate, SDS*). Для проведения электрофореза использовали акриламидные гели 8%. В стеклянную пластинку для заливки гелей сначала готовили и заливали разделяющий гель, а затем сверху наслаивали концентрирующий гель. Схема приготовления гелей представлена в Таблице 4 [20].

Таблица 4 – Приготовление разделяющего и концентрирующего гелей: объем компонента (мл) на ячейку заданного объема

Компоненты Гели	ddH₂O	AA	Трис-НСl	SDS	APS	TEMED
Разделяющий гель, 5 мл	2,3	1,3	1,3	0,005	0,005	0,003
Концентрирующий гель, 1 мл	0,68	0,17	0,13	0,002	0,002	0,001

Примечание – раствор акриламида (AA): 30% раствор акриламида/бисакриламида (29:1);
 Для разделяющего геля: 1,5М Трис (pH 8,8): 1,5 М буферный раствор трис-гидрохлорида, pH 8,8;
 Для концентрирующего геля: 1,0М Трис (pH 6,8): 1 М буферный раствор трис-гидрохлорида, pH 6,8;
 100 г/л SDS: раствор натрия додецилсульфата 100 г/л;
 100 г/л APS: раствор аммония персульфата 100 г/л;
 TEMED: тетраметилэтилендиамин.

После добавления соответствующих количеств раствора аммония персульфата и тетраметилэтилендиамина (*англ.: tetramethylethylenediamine,*

TEMED), как указано в Таблице 4, раствор разделяющего геля перемешивали и немедленно заливали в промежуток между двумя стеклянными пластинами, оставляя достаточное место для концентрирующего геля. С помощью пипеточного дозатора сверху на гель наслаивали этанол (96%) и оставляли гель в вертикальном положении при комнатной температуре до завершения полимеризации [20]. Далее этанол сливали и промывали верхнюю часть геля несколько раз водой, чтобы удалить остатки неполимеризованного акриламида и этанола, остатки жидкости удаляли с помощью фильтровальной бумаги. Непосредственно на поверхность полимеризованного разделяющего геля добавляли соответствующее количество концентрирующего геля, содержащего раствор аммония персульфата и TEMED, как указано в Таблице 4, в промежуток между двумя стеклянными пластинами. Немедленно, но с осторожностью, вставляли чистую тетрафторполиэтиленовую гребенку на 10 ячеек в раствор концентрирующего геля так, чтобы избежать попадания в гель воздушных пузырей. Гель со вставленной гребенкой оставляли в вертикальном положении при комнатной температуре до окончания полимеризации.

Пробоподготовка для электрофореза. Образцы смешивали с буфером Laemmli, содержащем 50 мМ β-меркаптоэтанола (BioRad, США) в соотношении 1:2, инкубировали 10 мин при температуре 70°C. Объем вносимого образца в гель составлял 20 мкл, содержание общего белка составляло 20 мкг/ячейка.

Условия проведения электрофореза. Для проведения электрофореза использовали источник тока BioRad (США). Электрофорез проводили при напряжении 100 В, силе тока 25 А в течение 90 мин.

Перенос белков с геля на мембрану. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0,45 мкм) полусухим способом с помощью автоматической системы Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, США), используя буфер для переноса Transfer Buffer и режим работы для белков с молекулярной массой 5-150 кДа. Время переноса составило 7 мин при напряжении 25 В и силе тока 1,3 А.

Блокировка белков на мембране осуществлялась 1% раствором EveryBlot Blocking Buffer (Bio-Rad, США), содержащим 0,1% Tween-20 (Sigma, Германия), при инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре.

Детекция белков. Детекцию белков проводили с помощью следующих первичных и вторичных антител, указанных в Таблице 5.

Таблица 5 – Перечень первичных и вторичных антител, используемых в работе

Детектируемый белок	Первичные антитела	Вторичные антитела
3-нитротирозин	3-Nitrotyrosine, «Affinity», Китай, Cat#PAB863Ge01	Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, Invitrogen, США Cat#PA3-023
Bcl2	Bcl2, «Affinity», Китай, Cat#AF6139	
Fas	Fas, «Affinity», Китай, Cat#AF5342	
Nrf2 ядерная фракция	Nrf2, «Affinity», Китай, Cat#AF0639	
OATP1B1	OATP2, Polyclonal Antibody, «Invitrogen», США, Cat# PA5-113548	
Глицеральдегид-3-фосфат	GAPDH «Affinity», Китай, Cat#AF7021	
Ламинин	Laminin B1, «Affinity», Китай, Cat#AF5161	

Инкубация с первичными антителами (разведение 1:200) составила 2 ч при температуре 37°C, со вторичными антителами (разведение 1:4000) 1 ч при комнатной температуре. Молекулярная масса белков была подтверждена путем сравнения с маркерами молекулярной массы. Детекцию белков осуществляли хемилюминесцентным методом на приборе ChemiDocXRS+ (Bio-Rad, США). Интенсивность полученных полос анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab [12]. Содержание 3-нитротирозина, OATP1B1, Bcl2, Fas оценивали относительно GAPDH (*англ.: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*), Nrf2 в ядре относительно Laminin B1.

2.12. Оценка экспрессии гена *SLCO1B1*

Экспрессия гена *SLCO1B1*, кодирующего OATP1B1, анализировалась методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (RT).

Ход проведения анализа. После завершения экспериментов клетки снимали с лунок с помощью скребка. Общую РНК выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия). Концентрацию РНК анализировали с помощью NanoPhotometr NP80-Touch (Германия). Обратная транскрипция и ЦПР выполнялась с использованием набора «БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue» (Биолабмикс, Россия). Условия анализов представлены в Таблице 6.

Использовались следующие праймеры («Евроген», Россия):

✓ *SLCO1B1* - прямой 5'-GGTGAATGCCCAAGAGATGAG-3'
обратный 5'- GGAAACCCAGTGCAAGTGATT-3'.

✓ *GAPDH* - прямой 5'-GTCCCTCTGACTTCAACAGCG-3';
обратный 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'.

Таблица 6 – Температурные условия циклов

Этап	Температура, °С
Денатурация	95
Охлаждение	53
Элонгация	72

Анализ проводился на амплификаторе нуклеиновых кислот Applied Biosystems Quant Studio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР-RT (Life Technologies Holdings Pte. Ltd., Сингапур) с программным обеспечением QuantStudio Design and Analysis. Расчет уровня экспрессии *SLCO1B1* относительно референсного гена был осуществлен с помощью программного обеспечения LinRegPCR v.11.0 (Heart failure research center, Нидерланды) [26].

2.13. Оценка активности OATP1B1

Принцип метода. Активность OATP1B1 оценивали по нарастанию концентрации его субстрата – аторвастатина в клетках HepG2 [11].

Ход проведения анализа. Клетки культивировали в 24-луночных планшетах. После формирования монослоя к клеткам добавляли тестируемые вещества в концентрациях 1, 10, 50, 100 и 500 мкМ в транспортной среде (раствор Хэнкса, 25 мМ HEPES, pH 7,4 и 1% диметилсульфоксида, все реактивы производства ПанЭко, Россия) и инкубировали в течение 3, 24 и 72 ч. Для подтверждения адекватности используемой методики использовали положительный контроль – известный ингибитор OATP1B1 рифампицин (с ним преинкубацию прободили 15 мин). К клеткам группы негативного контроля добавляли транспортную среду. После инкубации транспортную среду заменяли на среду, содержащую тестируемые вещества + субстрат OATP1B1 – аторвастатин в концентрации 1 мкМ и выполняли инкубацию 5 минут. Эксперимент останавливали заменой транспортной среды на ледяной фосфатный буфер (ПанЭко, Россия).

Приготовление лизатов клеток. Клетки лизировали тройной «заморозкой-разморозкой» при -80°C . В лизатах клеток анализировали концентрацию аторвастатина методом ВЭЖХ МС/МС, которую пересчитывали на уровень белка и выражали в пмоль/мг/мин. Методикам ВЭЖХ-МС/МС подробно описана в [11, 19].

2.14. Статистическая обработка данных

Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения StatSoft Statistica 13.0, Microsoft Excel и GraphPad Prism 8. Полученные результаты оценивали тестом ANOVA (дисперсионным анализом). Для сравнения с контролем применяли post-hoc Даннетта, для попарного сравнения всех серий – post-hoc Тьюки. Результаты представлены в таблицах и на графиках в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Оценка влияния S-нитрозоглутатиона на жизнеспособность, функционирование митохондрий и показатели апоптоза клеток линии НерG2

3.1.1. Влияние S-нитрозоглутатиона на жизнеспособность клеток и функционирование митохондрий

Воздействие S-нитрозоглутатиона на клетки линии НерG2 не приводило к снижению жизнеспособности клеток ($F=1,43$; $p=0,29$) при сроке инкубации 3 часа (Рисунок 14).

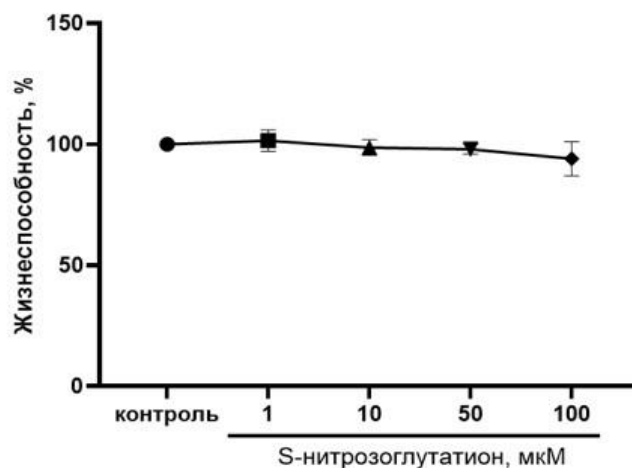


Рисунок 14 – Цитотоксичность S-нитрозоглутатиона на клетки линии НерG2, время воздействия 3 ч

Инкубация с S-нитрозоглутатионом в течение 24 ч приводила к снижению жизнеспособности клеток ($F=6,44$; $p=0,008$). Концентрация SNOG 100 мкМ оказала токсическое воздействие – жизнеспособность клеток снизилась на 8,9% ($p=0,005$) по сравнению с контролем 100% (Рисунок 15).

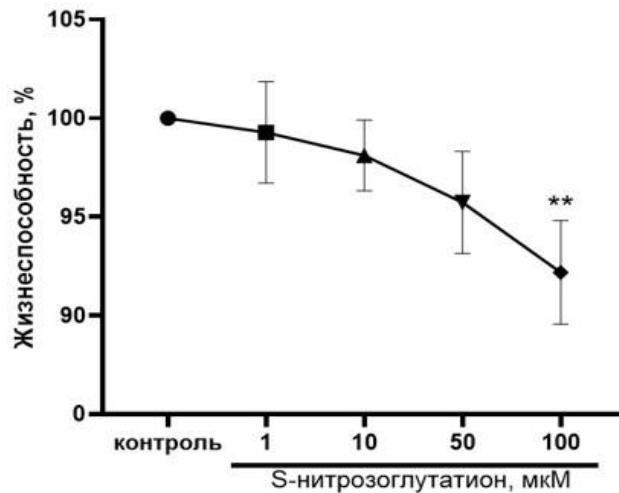


Рисунок 15 – Цитотоксичность S-нитрозоглутатиона на клетки линии HepG2, время инкубации 24 ч

Примечание – здесь и далее показаны только статистически значимые различия; ** $p < 0,01$ – статистика относительно контроля

При сроке воздействия 72 ч жизнеспособность клеток снижалась: $F=10,7$; $p=0,001$. Аналогично сроку воздействия 24 ч, при инкубации с SNOG в концентрации 100 мкМ жизнеспособность снизилась на 16,2% ($p=0,0004$) по сравнению со значениями контрольной группы, принятой за 100% (Рисунок 16).

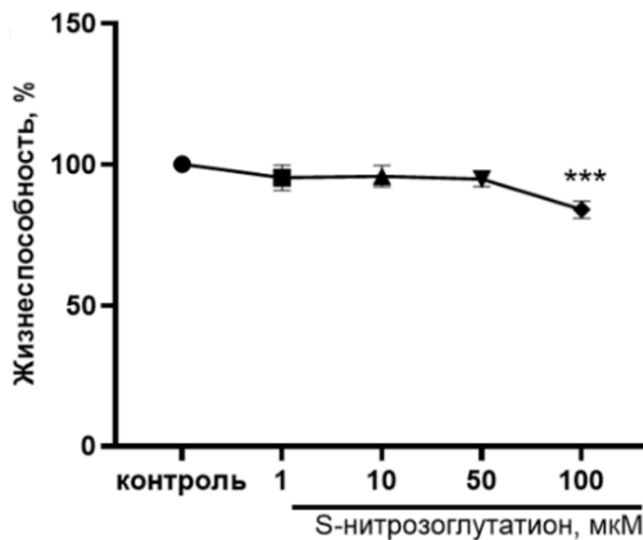


Рисунок 16 – Цитотоксичность S-нитрозоглутатиона на клетки линии HepG2, время инкубации 72 ч

Примечание – *** $p < 0,001$ – статистика относительно контроля

Таким образом, концентрация S-нитрозоглутатиона 100 мкМ при сроке воздействия 24 и 72 ч является токсичной для клеток линии НерG2.

При воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ в течение 3 ч не было зафиксировано статистически значимых изменений в функционировании митохондрий по сравнению с контрольными значениями ($F=1,2$; $p=0,36$). При увеличении срока экспозиции с S-нитрозоглутатионом до 24 ч и 72 ч при цитохимической реакции с флуоресцентным красителем MitoTracker Red были получены статистически значимые изменения: $F=21,7$; $p<0,0001$ и $F=32,5$; $p<0,0001$ соответственно. Так при воздействии SNOG в концентрации 100 мкМ, сроке инкубации 24 ч флуоресценция снижалась на 30,5% ($p<0,0001$), а при 72 ч инкубации – на 52,4% ($p<0,0001$) (Рисунок 17).

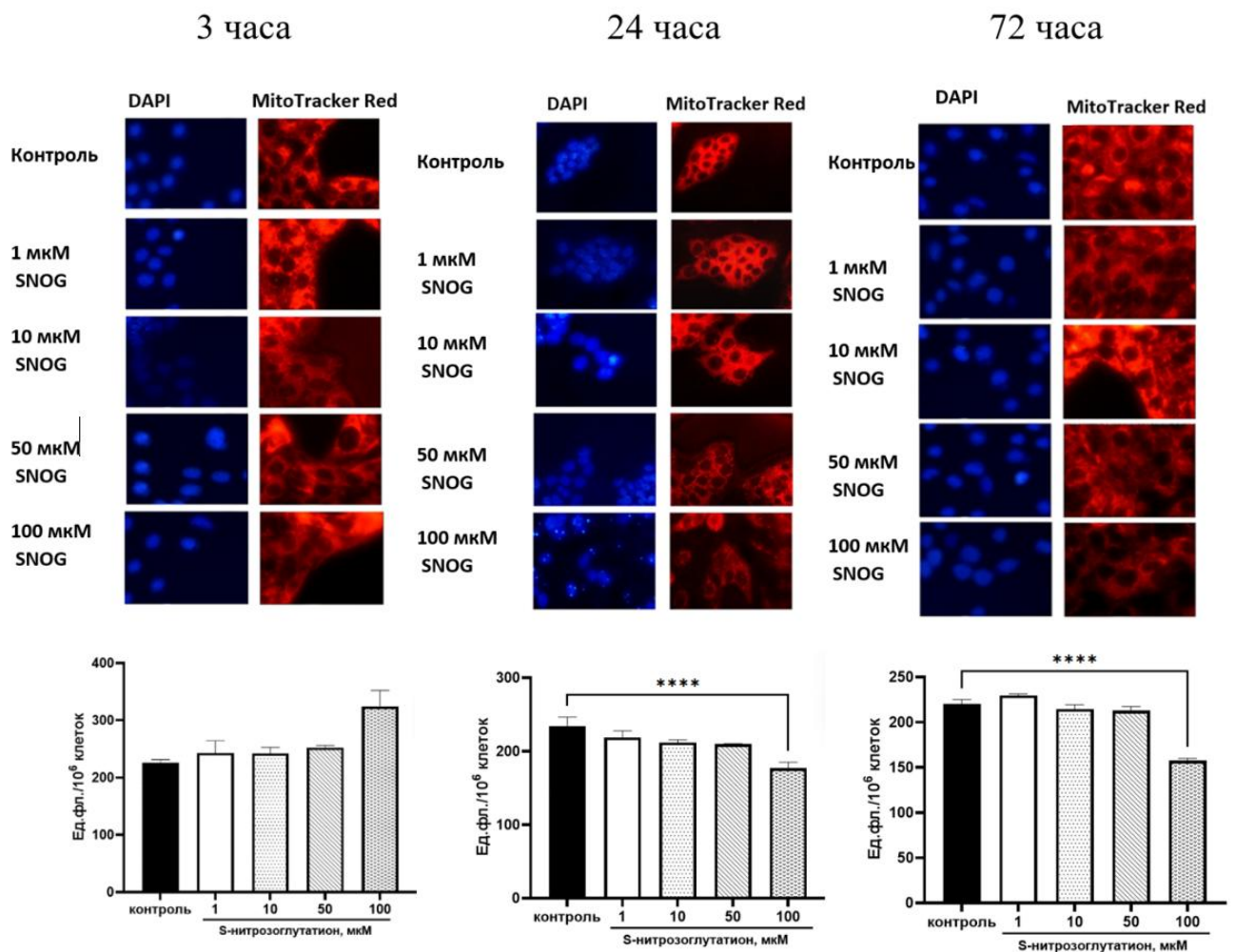


Рисунок 17 – Оценка функционирования митохондрий клеток линии НерG2 при воздействии S-нитрозоглутатиона
Примечание – **** $p<0,0001$ – статистика относительно контроля

Таким образом, S-нитрозоглутатион в концентрации 100 мкМ и длительности воздействия 24 и 72 ч снижает функционирование митохондрий и оказывает цитотоксическое действие.

3.1.2. Влияние S-нитрозоглутатиона на показатели апоптоза: антиапоптотический фактор Bcl2 и проапоптотический фактор Fas

Инкубация клеток НерG2 с S-нитрозоглутатионом в концентрациях 1, 10, 50, 100 мкМ в течение 3 ч приводила к статистически значимому изменению содержанию белка Bcl2: $F=74,8$; $p<0,0001$. Так, при воздействии SNOG в концентрациях 1, 10, 50 мкМ и инкубации 3 ч уровень Bcl2 возрастал на 66,7% ($p<0,0001$), 38,7% ($p<0,0001$) и 21,0% ($p=0,015$) соответственно, а при концентрации 100 мкМ – не отличался от значений контроля ($p>0,05$) (Рисунок 18).

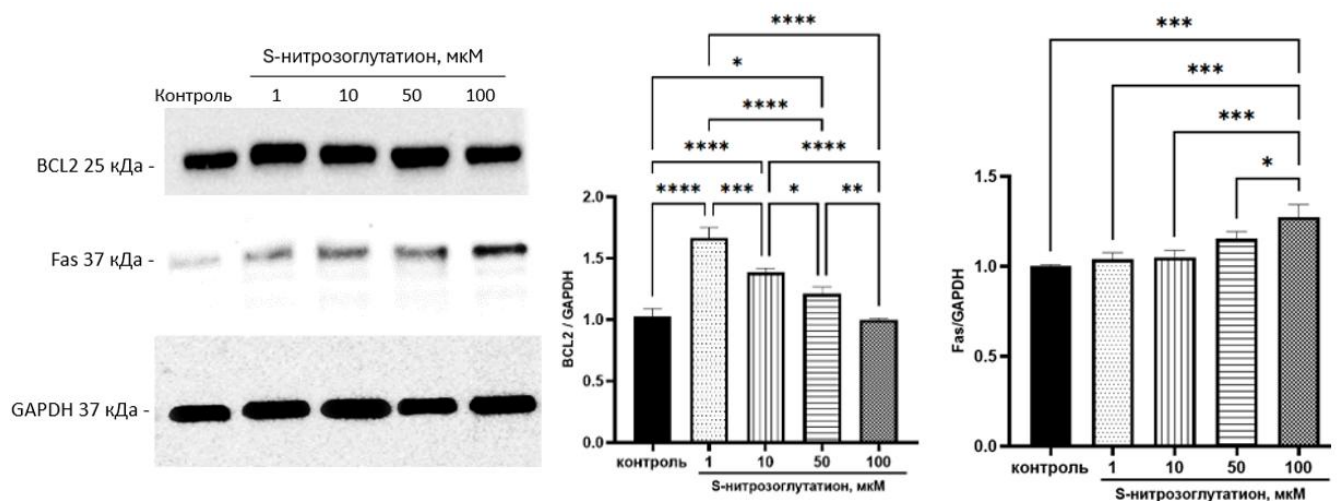


Рисунок 18 – Результаты вестерн-блот анализа содержания белков Bcl2 и Fas в клеточной линии НерG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 3 часов

Примечание – * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ – статистика относительно контроля

Полученные результаты уровня Bcl2 зависели от концентрации S-нитрозоглутатиона: при воздействии SNOG в концентрации 50 мкМ было отмечено снижение уровня Bcl2 на 12,2% ($p=0,019$) по сравнению с концентрацией 10 мкМ,

а при 100 мкМ – на 28,1% ($p < 0,0001$) по сравнению с концентрацией 10 мкМ и на 17,3% при сопоставлении с 50 мкМ (Рисунок 18).

S-нитрозоглутатион при сроке инкубации 3 ч влиял на уровень проапоптотического белка Fas в клетках линии HepG2 ($F=19,0$; $p=0,0001$) – он повышался при концентрации 100 мкМ на 27,0% ($p=0,0001$) по сравнению с контролем. Изменения носили дозозависимый характер – отмечалось увеличение относительного количества Fas на 22,1% ($p=0,0005$), 21,2% ($p=0,0007$) и 11,5% ($p=0,04$) по сравнению с концентрациями 1, 10, 50 мкМ соответственно (Рисунок 18).

Воздействие S-нитрозоглутатиона на клетки линии HepG2 в течении 24 ч приводило к снижению уровня Bcl2 ($F=38,9$; $p < 0,0001$) и повышению Fas ($F=35,0$; $p < 0,0001$). S-нитрозоглутатион способствовал снижению уровня Bcl2: при концентрации SNOG 10 мкМ на 17,8% ($p=0,0013$), 50 мкМ – на 25,0% ($p < 0,0001$), 100 мкМ – на 34,7% ($p < 0,0001$) по отношению к контрольным значениям. SNOG в концентрации 1 мкМ не оказывал эффекта на изучаемый показатель ($p > 0,05$) (Рисунок 18). Изменения, также как при сроке инкубации 3 ч, зависели от дозы S-нитрозоглутатиона. При сравнении с концентрацией 1 мкМ – снижение уровня Bcl2 отмечалось на 12,7% ($p=0,016$), 19,0% ($p=0,001$) и 28,7% ($p < 0,0001$) при концентрациях SNOG 10, 50 и 100 мкМ соответственно (Рисунок 19).

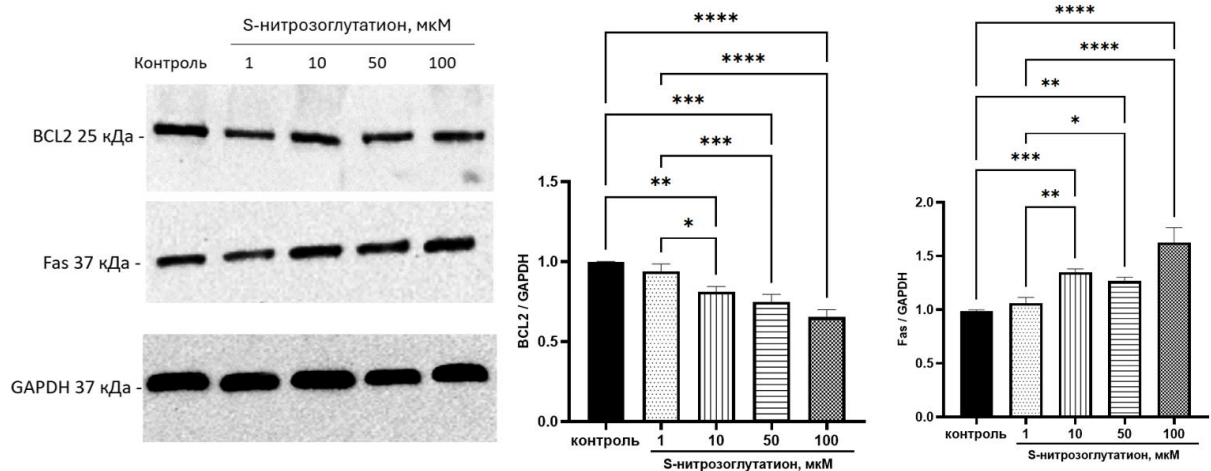


Рисунок 19 – Результаты вестерн-блот анализа содержания белков Bcl2 и Fas в клеточной линии HepG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 24 часов

Примечание – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ – статистика относительно контроля

При сроке инкубации 24 ч относительное количество Fas в клетках линии НерG2 возрастало на 35,1% ($p=0,0002$), 26,7% ($p=0,002$) и 62,7% ($p<0,0001$) по сравнению с контролем при обработке клеток S-нитрозоглутатионом в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ соответственно (Рисунок 19). Изменения также имели дозозависимый характер: в сравнении с концентрацией 1 мкМ – отмечалось повышение уровня Fas на 28,7% ($p=0,003$), 20,4% ($p=0,029$) и 56,4% ($p<0,0001$) при концентрациях SNOG 10, 50 и 100 мкМ соответственно.

Воздействие S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1, 10, 50, 100 мкМ и сроке инкубации 72 ч приводило к изменению уровня Bcl2 ($F=28,9$; $p<0,0001$) и Fas ($F=57,8$; $p<0,0001$). Так, относительное количество Bcl2 снижалось при инкубации клеток с S-нитрозоглутатионом в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ на 44,7% ($p=0,0001$), 46,0% ($p<0,0001$), 56,3% ($p<0,0001$) по сравнению со значениями контрольной группы. Кроме этого, отмечались статистически значимые различия между концентрациями 1 и 100 мкМ – снижение на 23,3% ($p=0,015$) (Рисунок 20).

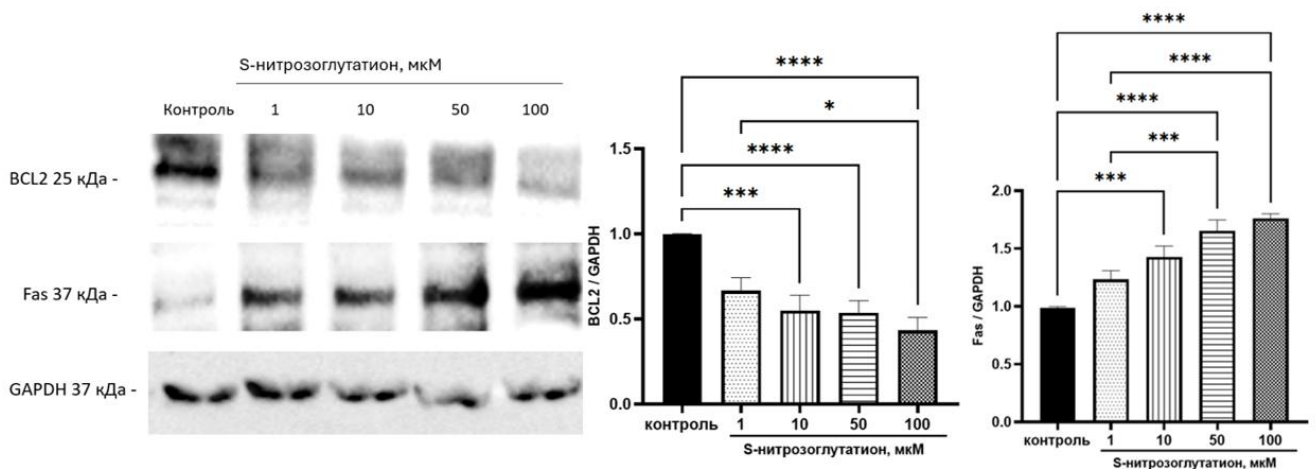


Рисунок 20 – Результаты вестерн-блот анализа содержания белков Bcl2 и Fas в клеточной линии НерG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 72 часов

Примечание – * $p<0,05$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ – статистика относительно контроля

Относительное количество Fas повышалось при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрации 10 мкМ – на 44,3% ($p=0,0001$), 50 мкМ – на 67,0% ($p<0,0001$), 100 мкМ – на 77,8% ($p<0,0001$) по сравнению с контрольными значениями. Также отмечались различия между концентрациями 1 и 50 мкМ –

повышение уровня Fas на 42,0% ($p=0,0002$), 1 и 100 мкМ – на 52,7% ($p<0,0001$), 10 и 50 мкМ – на 22,7%, 10 и 100 мкМ – на 33,3% ($p=0,0014$) (Рисунок 19).

Таким образом, S-нитрозоглутатион в концентрациях 1-50 мкМ и сроке инкубации 3 ч повышал уровень антиапоптотического белка Bcl2, а количество Fas не изменялось, что указывает на защитное действие донора NO. Увеличение длительности воздействия до 24 ч и 72 ч приводило к снижению уровня антиапоптотического белка Bcl2 и увеличению уровня проапоптотического белка Fas [19].

3.2. Влияние S-нитрозоглутатиона на уровень оксида азота и показатели нитрозативного стресса, содержание Nrf2 в клетках линии HepG2

Воздействие S-нитрозоглутатиона в течение 3 часов на клеточную линию HepG2 приводило к статистически значимому увеличению уровня оксида азота в клетках по сравнению с контролем ($F=23,5$; $p<0,0001$): на 42,2% ($p=0,008$) при концентрации 10 мкМ, на 50,4% ($p=0,002$) при концентрации 50 мкМ и на 79,7% ($p<0,0001$) при концентрации 100 мкМ. Изменения носили дозозависимый характер только при межгрупповых сравнениях концентраций 1 и 10 мкМ выше на 30,5% ($p=0,03$), 1 и 50 мкМ выше на 37,9% ($p=0,009$), 1-100 мкМ выше на 64,7% ($p=0,0002$), а также при 10-100 мкМ выше на 26,4% ($p=0,017$), между концентрациями 10 и 50 мкМ, 50 и 100 мкМ различий не было (Рисунок 21).

Содержание NO при инкубации клеток линии HepG2 с SNOG в течение 24 ч при концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ возрастало на 46%, 124,3%, 117,6% и 170,3% соответственно относительно контрольных значений ($F=109,4$; $p<0,0001$).

Изменения носили дозозависимый характер при сравнении SNOG в концентрациях 1 и 10 мкМ на 20,4% ($p=0,009$), 1 и 50 мкМ на 16,7% ($p=0,03$), 1 и 100 мкМ на 45,0% ($p<0,0001$). Также отмечались различия между концентрациями 10 и 100 мкМ на 20,4% ($p=0,002$), 50 и 100 мкМ на 24,2% ($p=0,0008$). Между концентрациями 10 и 50 мкМ статистически значимых различий не наблюдалось (Рисунок 22). При сроке воздействия 24 ч и концентрации SNOG 100 мкМ

наблюдалось увеличение уровня NO на 28,3% ($p < 0,05$) по сравнению со сроком воздействия 3 ч.

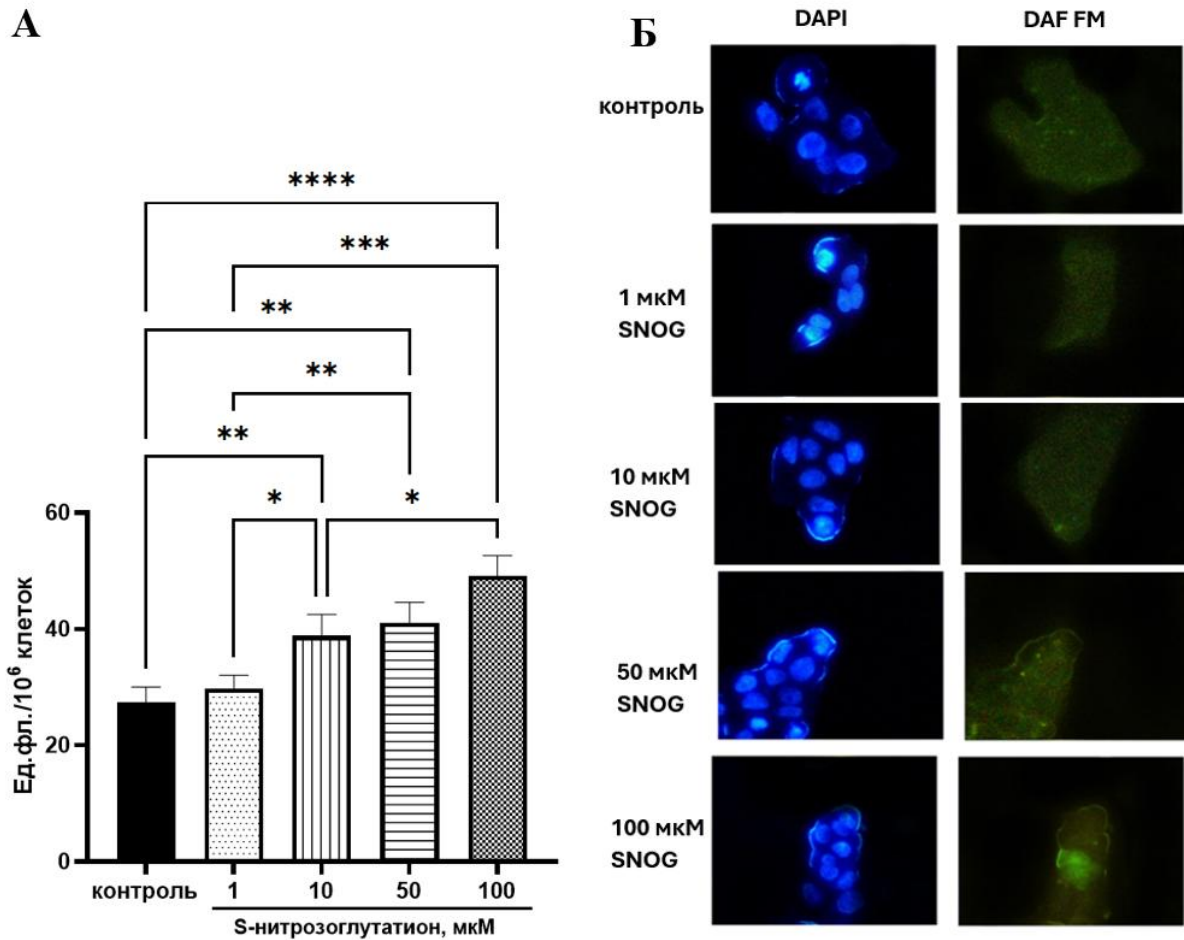


Рисунок 21 – Результаты анализа уровня оксида азота в клетках линии HepG2 с использованием флуоресцентных зондов DAF-FM после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 3 часов

Примечание – ув. $\times 400$, окрашивание ядер флуоресцентным красителем DAPI; окрашивание NO флуоресцентными зондами DAF FM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ - статистика относительно контроля

А) Количественный анализ изменения уровня NO в клетках HepG2

Б) Интенсивность флуоресценции в лизате клеток HepG2

При воздействии SNOG в течение 72 ч при концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ уровень NO в клетках линии HepG2 возрастал на 70,4% ($p = 0,017$), 104,6% (0,0011), 143,3% ($p < 0,0001$) и 211,5% ($p < 0,0001$) соответственно по сравнению с контрольной группой ($F = 40,05$; $p < 0,0001$). Изменения носили дозозависимый характер между концентрациями 1 и 50 мкМ на 42,8% ($p = 0,01$); 1 и 100 мкМ на 82,8% ($p = 0,0009$); 10 и 100 мкМ на 52,2% ($p = 0,0009$), 50 и 100 мкМ на 28,0% ($p = 0,02$). Между концентрациями 1 и 10 мкМ достоверных различий выявлено не

было (Рисунок 23). При сроке воздействия 72 ч и концентрации SNOG 100 мкМ наблюдалось увеличение уровня NO на 20,8% ($p < 0,05$) по сравнению со сроком воздействия 24 ч.

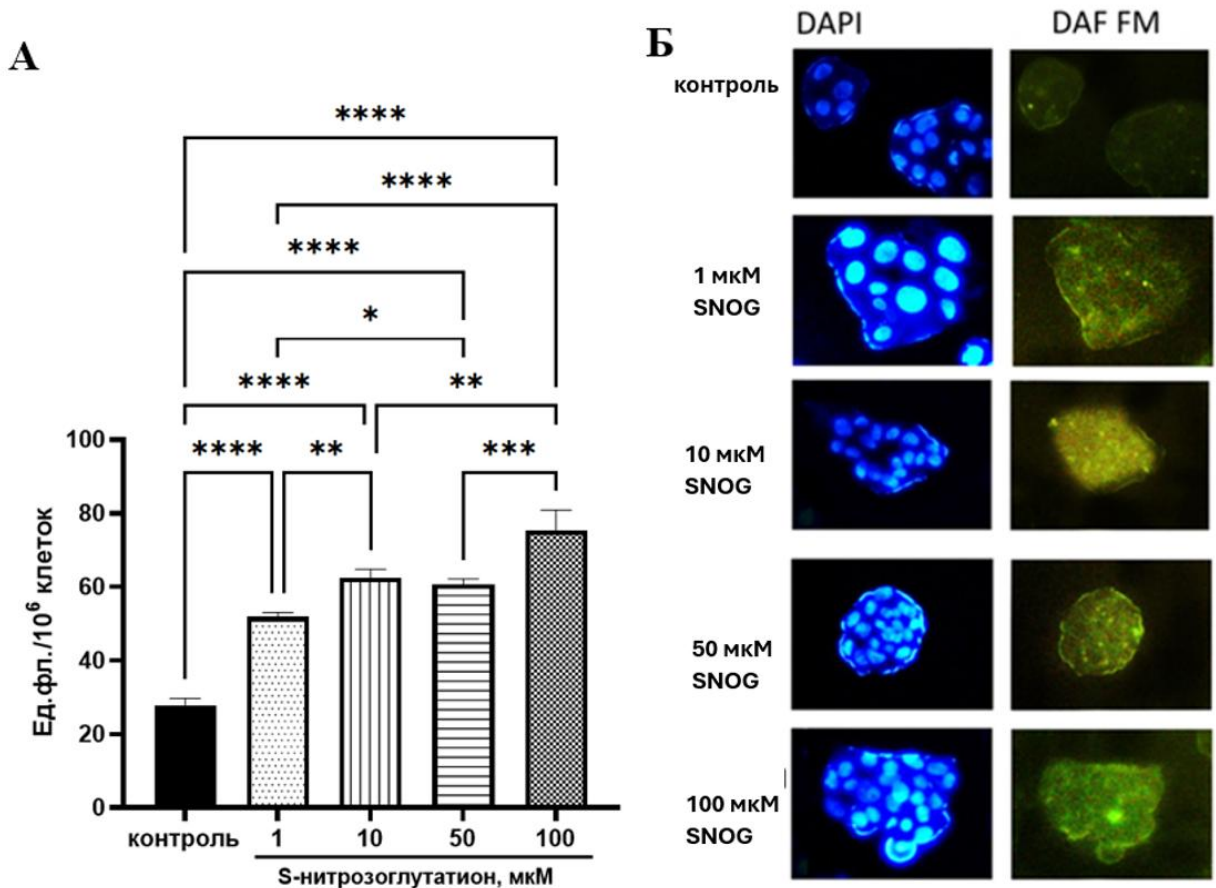


Рисунок 22 – Результаты анализа уровня оксида азота в клетках линии HepG2 с использованием флуоресцентных зондов DAF-FM после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 24 часов

Примечание – ув. $\times 400$, окрашивание ядер с флуоресцентным красителем DAPI; окрашивание NO флуоресцентными зондами DAF FM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ - статистика относительно контроля

А) Количественный анализ изменения уровня NO в клетках HepG2

Б) Интенсивность флуоресценции в лизате клеток HepG2

Таким образом, S-нитрозоглутатион подвергается метаболизму с образованием оксида азота и его дериватов, что подтверждено в эксперименте *in vitro* на клеточной линии HepG2 с использованием флуоресцентных зондов DAF FM. Важно отметить, что по результатам эксперимента получены дозозависимые изменения, также концентрация оксида азота в клетках возрастала с увеличением времени воздействия.

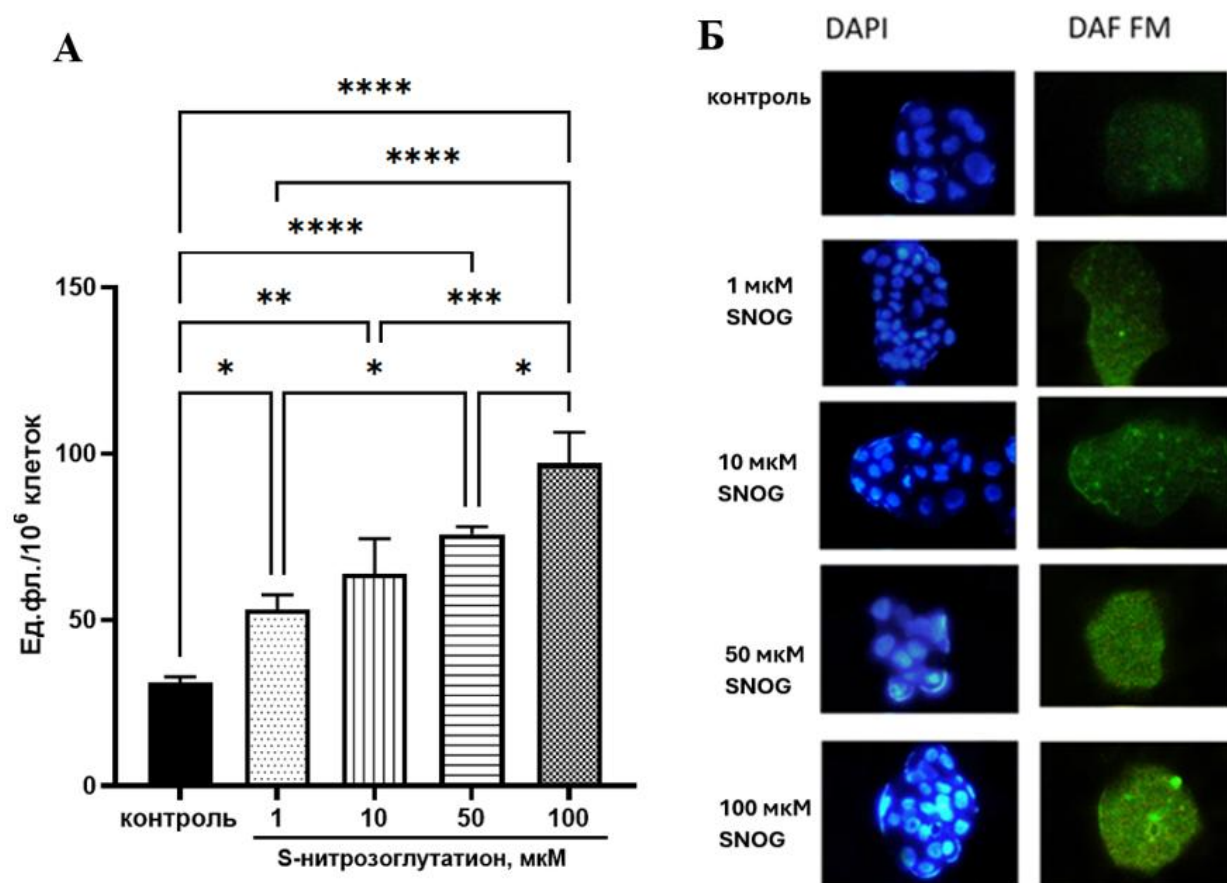


Рисунок 23 – Результаты анализа уровня оксида азота в клеточной линии HepG2 с использованием флуоресцентных зондов DAF-FM после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 72 часов

Примечание – ув. $\times 400$, окрашивание ядер флуоресцентным красителем DAPI; окрашивание NO флуоресцентными зондами DAF FM; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ – статистика относительно контроля

А) Количественный анализ изменения уровня NO в клетках HepG2

Б) Интенсивность флуоресценции в лизате клеток HepG2

Увеличение внутриклеточного уровня оксида азота инициировало процесс нитрозилирования, что подтверждалось изменением концентрации нитропроизводных. При воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ и сроке инкубации 3 ч относительное количество нитрозилированных белков увеличивалось ($F=7,91$; $p=0,004$), так уровень 3-нитротирозина возрастал на 10,5% ($p=0,004$), 12,2% ($p=0,001$), 9,2% ($p=0,02$) и 9,8% ($p=0,02$) соответственно. Дозозависимых различий зафиксировано не было (Рисунок 24).

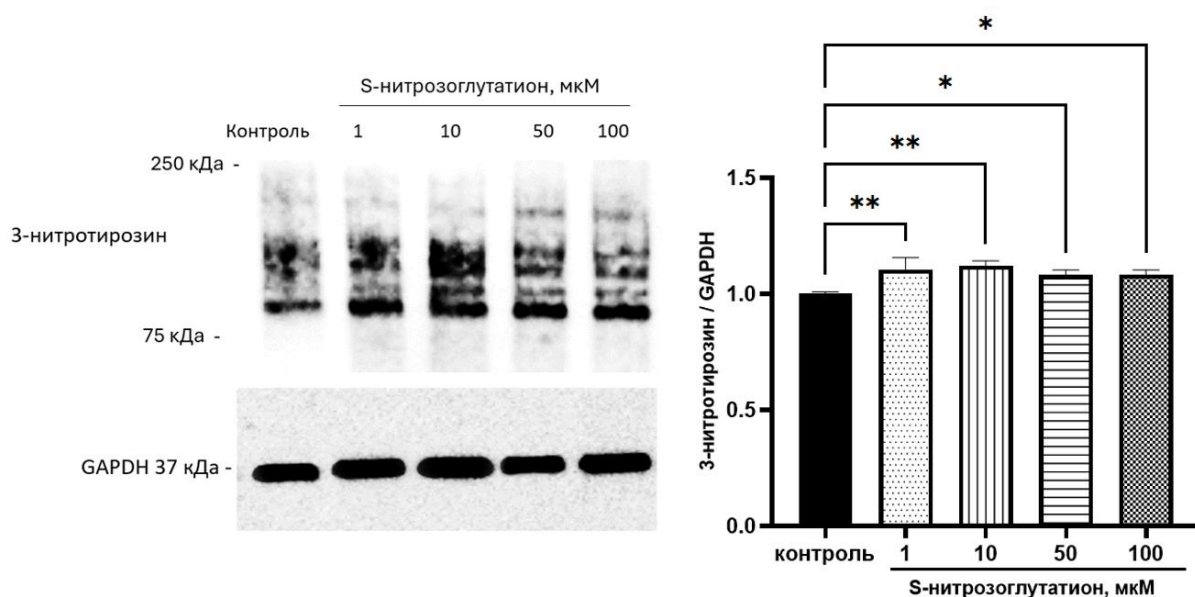


Рисунок 24 – Результаты вестерн-блот анализа количества 3-нитротирозина в белковых молекулах клеток линии HepG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 3 часов

Примечание – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – статистика относительно контроля

При увеличении срока экспозиции до 24 ч уровень 3-нитротирозина возрастал при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ ($F=36,5$; $p < 0,0001$) на 11,5% ($p=0,03$), 25,1% ($p=0,0001$), 21,3% ($p=0,0005$) и 39,3% ($p < 0,0001$) соответственно (Рисунок 25). Между концентрациями имелись дозозависимые изменения – увеличение относительного количества 3-нитротирозина: 1 и 10 мкМ – на 11,6% ($p=0,02$); 1 и 100 мкМ – на 24,1% ($p=0,0001$); 10 и 100 мкМ – на 11,2% ($p=0,02$), 50 и 100 мкМ – на 14,8% ($p=0,003$); между концентрациями 10 и 50 мкМ изменений зафиксировано не было (Рисунок 25).

При инкубации клеток в течение 72 ч при концентрациях SNOG 1, 10, 50 мкМ наблюдалось снижение уровня 3-нитротирозина ($F=384$; $p < 0,0001$) на 41,9%, 29,5% и 36,2% соответственно ($p < 0,0001$ для всех) (Рисунок 26). При концентрации GSNO 100 мкМ уровень 3-нитротирозина возрастал на 22,6% ($p=0,0008$). Изменения носили дозозависимый характер, относительное количество 3-нитротирозина возрастало между концентрациями 1 и 10 мкМ – на 21,5% ($p=0,008$), 1 и 100 мкМ – на 114,7% ($p < 0,0001$); 10 и 100 мкМ – на 76,4% ($p < 0,0001$), 50 и 100 мкМ – на 95,2% ($p < 0,0001$). Между концентрациями 1 и 50 мкМ, 10 и 50 мкМ не было достоверных различий (Рисунок 26).

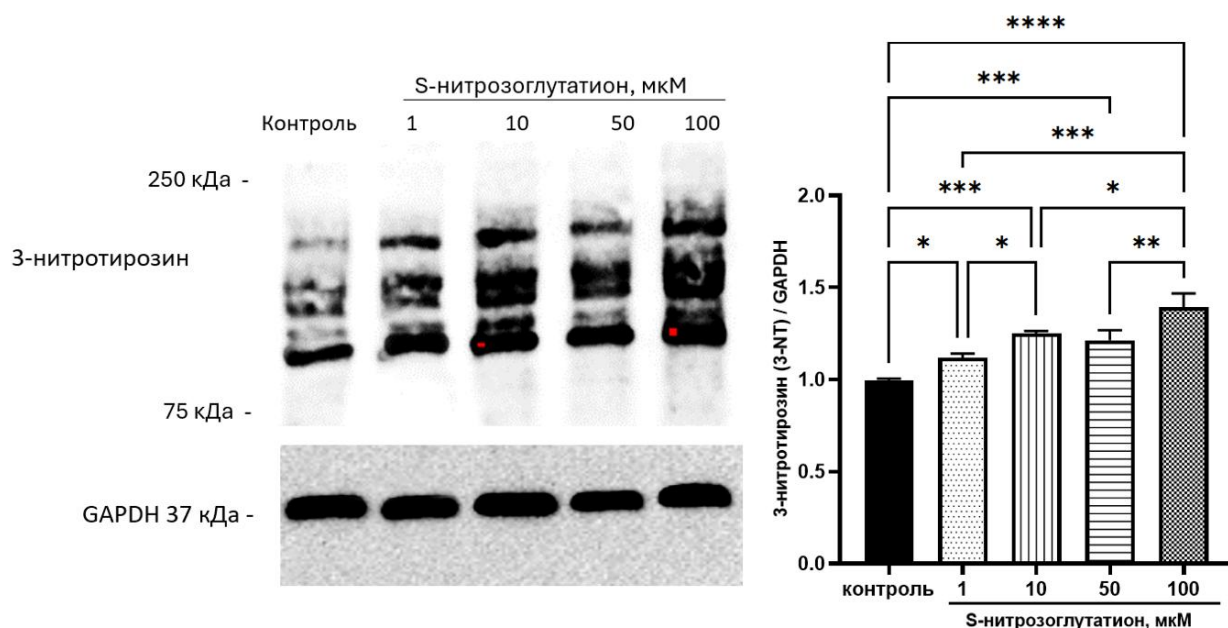


Рисунок 25 – Результаты вестерн-блот анализа содержания 3-нитротирозина в белковых молекулах клеток линии НерG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 24 часов

Примечание – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – статистика относительно контроля

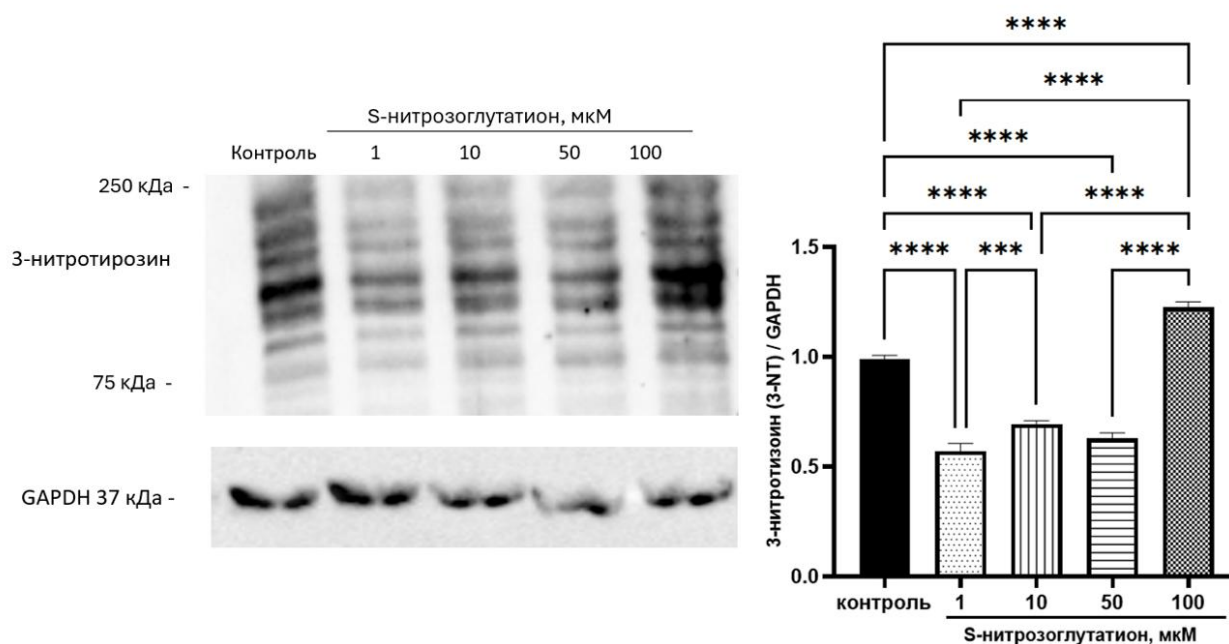


Рисунок 26 – Результаты вестерн-блот анализа содержания 3-нитротирозина в белковых молекулах клеток линии НерG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 72 часов

Примечание – ** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ – статистика относительно контроля

Таким образом, оксид азота, образующийся из S-нитрозоглутатиона нитрозилирует белки, вероятно, по ОН-группам тирозина. Судя по результатам вестерн-блот анализа, в основном нитрозилированию подвергаются белки с молекулярной массой от 75 до 250 кДа.

Содержание нитрозилированных белков возрастает при увеличении концентрации SNOG и повышении уровня NO. Однако, уровень 3-нитротирозина снижается при увеличении срока воздействия донора NO, что может быть связано с конденсацией тирозиновых радикалов в битирозин.

При сроке воздействия SNOG 3 ч уровень битирозина в клетках линии HepG2 не изменялся: $F=0,74$; $p=0,58$ (Рисунок 27).

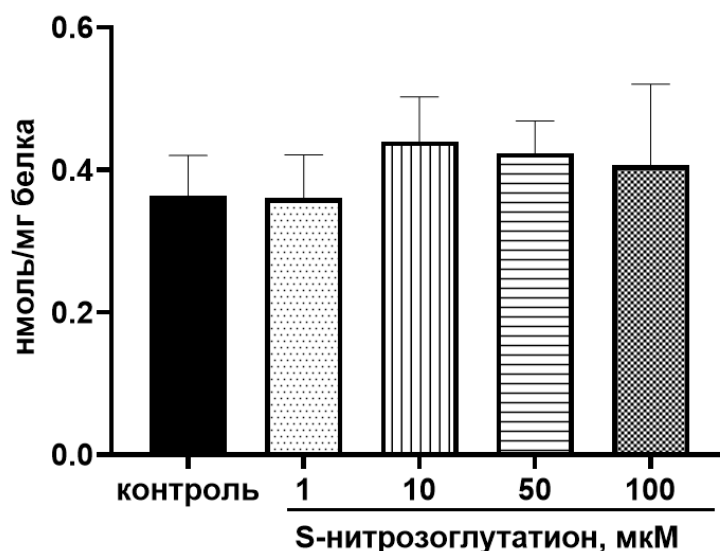


Рисунок 27 – Изменение концентрации битирозина клеток линии HepG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 3 часов

Содержание битирозина изменялось после обработки клеток линии HepG2 S-нитрозоглутатионом в течение 24 ч ($F=8,25$; $p=0,003$). При воздействии SNOG в концентрациях 1-50 мкМ уровень битирозина оставался неизменным, а при 100 мкМ увеличивался на 25,5% ($p=0,002$) по сравнению со значениями контроля (Рисунок 28).

Были зафиксированы статистически значимые различия между концентрациями 1 и 100 мкМ на 34,2% ($p=0,004$).

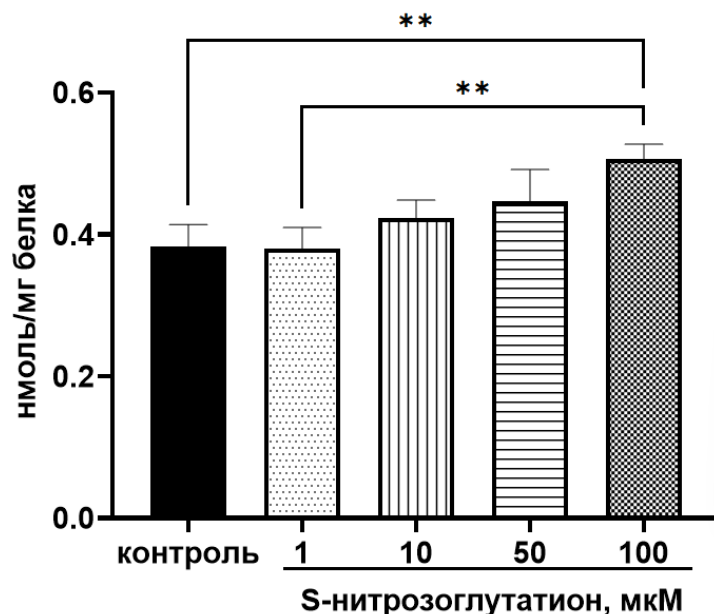


Рисунок 28 – Изменение концентрации битирозина клеток линии HepG2 после обработки S-нитроглютационом в течение 24 часов

Примечание – ** $p < 0,01$ – статистика относительно контроля

При воздействии в течение 72 ч SNOG в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ уровень битирозина возрастал ($F=23,3$; $p < 0,0001$) на 37,1% ($p=0,006$), 31,4% ($p=0,0013$), 38,6% ($p < 0,0001$) и 77,1% ($p < 0,0001$) относительно значений контроля (Рисунок 29).

Дозозависимые изменения отмечались между концентрациями 1 и 100 мкМ – на 29,2% ($p=0,006$), 10 и 100 мкМ – на 21,5% ($p=0,03$). Между концентрациями 10 и 50 мкМ; 1 и 50 мкМ не было зафиксировано статистически значимых различий (Рисунок 29) [19].

Таким образом, при воздействии S-нитроглютациона на клетки линии HepG2 усиливается образование 3-нитротирозина и битирозина. Количественное содержание нитрозилированных производных зависит от срока воздействия: при 3 и 24 ч экспозиции нарастает преимущественно 3-нитротирозин, при сроке инкубации 72 ч отмечалось максимальное образование битирозина. Изменения уровня битирозина соотносилось с изменением содержания 3-нитротирозина. Накопление 3-нитротирозина приводило к его конденсации и увеличению концентрации битирозина.

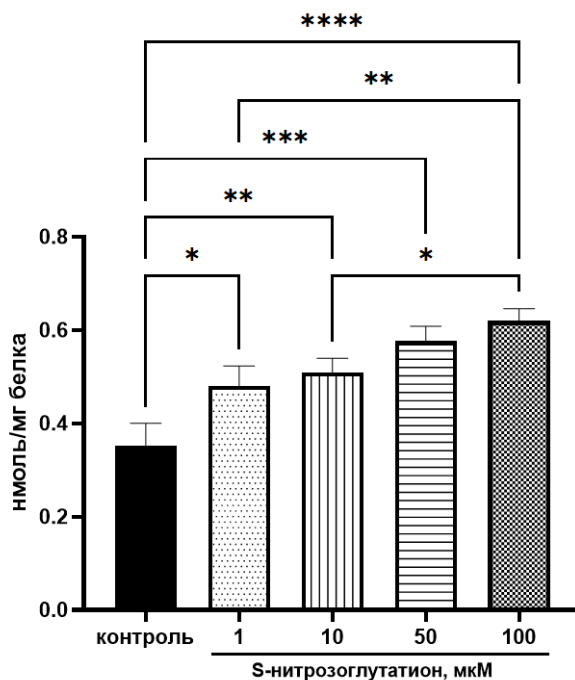


Рисунок 29 – Изменение концентрации билирубина клеток линии HepG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 72 часов

Примечание – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ – статистика относительно контроля

Для косвенной оценки уровня глутатиона в клетках определяли количество небелковых SH-групп.

Уровень небелковых SH-групп не изменялся при воздействии SNOG в течение 3 ч ($F=1,2$; $p=0,37$) (Рисунок 30).

Уровень небелковых SH-групп статистически значимо изменялся ($F=11,5$; $p=0,009$), демонстрируя снижение на 56,5% ($p=0,012$) при обработке SNOG в концентрации 100 мкМ и времени экспозиции 24 часа (Рисунок 31). Однако воздействие S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1-50 мкМ в течение 24 часов не оказывало значимого влияния на уровень небелковых SH-групп в клетках HepG2 (Рисунок 31).

При инкубации в течение 72 часов также наблюдались статистически значимые изменения ($F=20,3$; $p < 0,0001$), в частности снижение уровня небелковых SH-групп на 52,0% ($p=0,0001$) по сравнению с контролем при воздействии SNOG в концентрации 100 мкМ. Обработка S-нитрозоглутатионом в концентрациях 1-50

мкМ в течение 72 часов не оказывала значимого влияния на уровень небелковых SH-групп в клетках НерG2 (Рисунок 32).

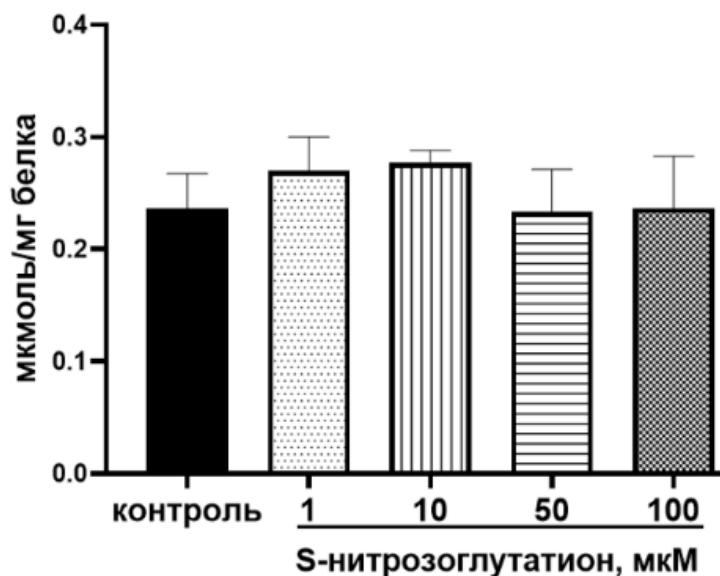


Рисунок 30 – Изменение уровня небелковых SH-групп в клетках линии НерG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 3 часов

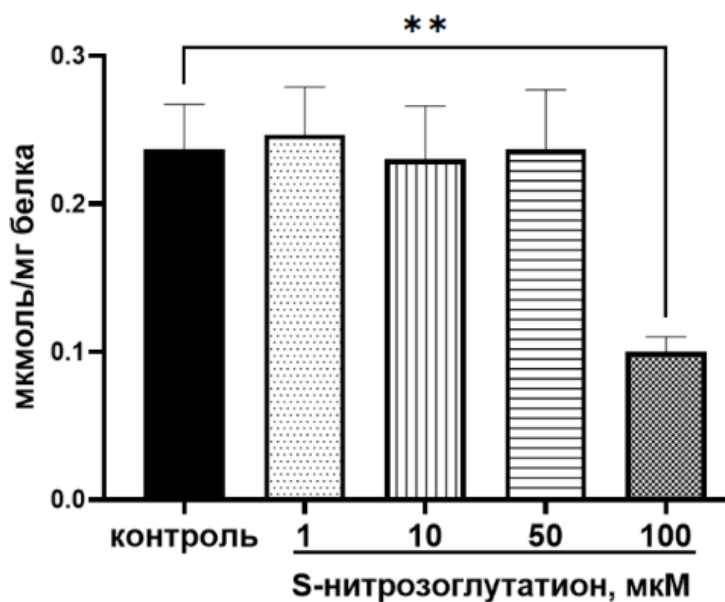


Рисунок 31 – Концентрация небелковых SH-групп в клетках линии НерG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 24 часов

Примечание – ** $p < 0,01$ – статистика относительно контроля

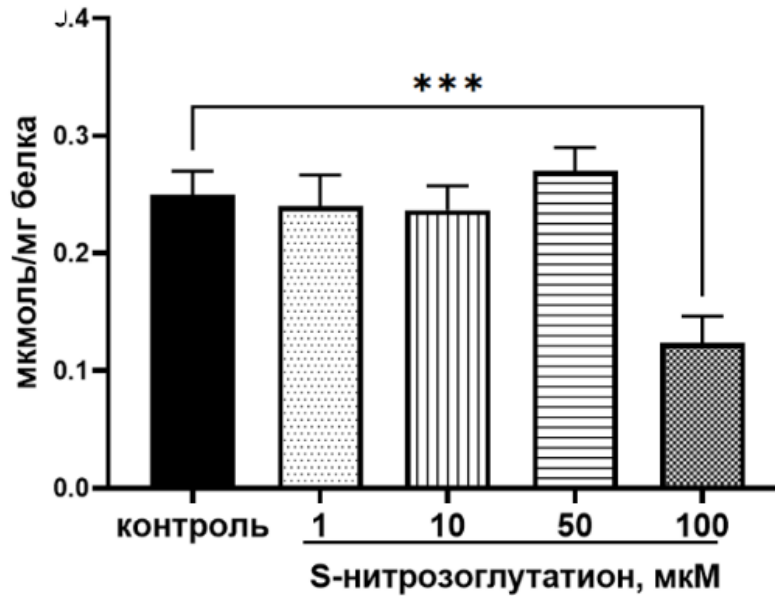


Рисунок 32 – Концентрация небелковых SH-групп в клетках HepG2 после обработки S-нитроглютационом в течение 72 часов

Примечание – *** $p < 0,001$ – статистика относительно контроля

Полученные данные указывают на то, что S-нитроглютацион в концентрациях 1-50 мкМ и сроке воздействия 3, 24 и 72 ч не влияет на уровень небелковых SH-групп.

Таким образом, S-нитроглютацион в концентрациях 1-100 мкМ и длительностью экспозиции 3, 24 и 72 ч повышает уровень NO в клетках HepG2, вызывает развитие нитрозилирования белков, а в высокой концентрации (100 мкМ) снижает количество небелковых SH-групп в концентрации.

3.3. Влияние S-нитроглютациона на относительное количество Nrf2 в ядре клеток линии HepG2

При воздействии S-нитроглютациона в течение 3 часов уровень Nrf2 возрастал в ядре клеток ($F=20,5$; $p < 0,0001$), так при концентрации 1 мкМ – на 124% ($p=0,001$), 10 мкМ – на 105% ($p=0,01$), 50 мкМ – на 73,6% ($p=0,03$), 100 мкМ – на 68,4% ($p=0,04$) относительно значений контрольной группы (Рисунок 33).

Изменения не зависели от концентрации S-нитроглютациона.

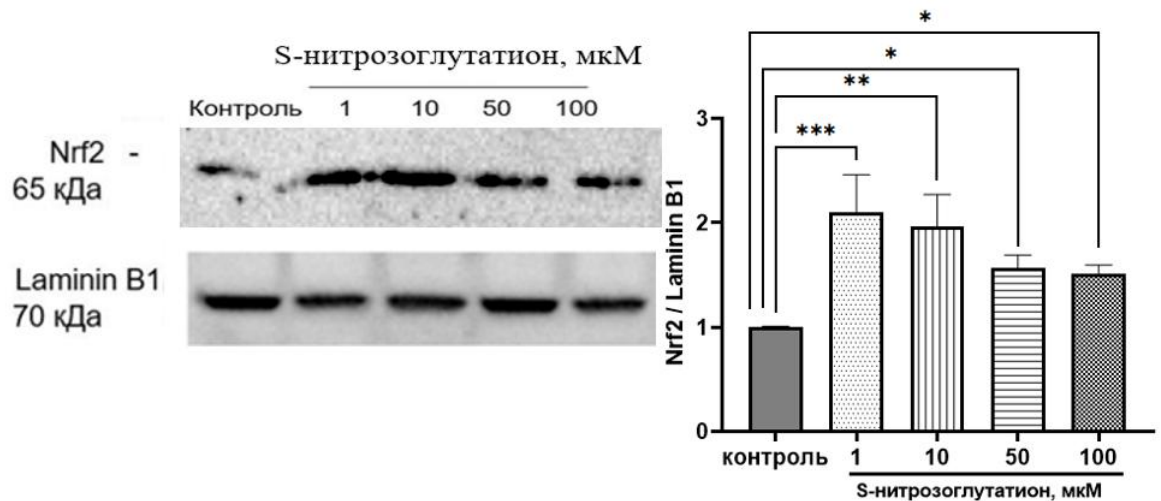


Рисунок 33 – Результаты вестерн-блот анализа содержания Nrf2 в ядре клеток линии HepG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 3 часов
Примечание – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – статистика относительно контроля

Воздействие S-нитрозоглутатиона в течение 24 часов при концентрациях 1, 10 и 50 мкМ приводило к увеличению относительного количества Nrf2 ($F=36,2$; $p < 0,0001$) на 209% ($p < 0,0001$), на 211% ($p < 0,0001$) и на 126% ($p = 0,001$) в ядерной фракции клеточного лизата соответственно (Рисунок 34).

Изменения носили также дозозависимый характер. Снижение уровня Nrf2 при концентрации S-нитрозоглутатиона 50 мкМ на 25,8% ($p = 0,04$), при 100 мкМ на 64,5% ($p < 0,0001$) по сравнению с концентрацией 1 мкМ. При концентрации S-нитрозоглутатиона 100 мкМ также наблюдалось снижение уровня Nrf2 на 63,2% ($p < 0,0001$) и 52,2% ($p = 0,0038$) по сравнению с концентрациями 10 и 50 мкМ соответственно (Рисунок 34).

При воздействии SNOG в концентрациях 1, 10, 50 мкМ на клетки линии HepG2 в течение 72 ч уровень Nrf2 в ядерной фракции клеточного лизата возрастал ($F=26,5$; $p < 0,0001$) на 43% ($p = 0,042$), 60% ($p = 0,0004$) и 79% ($p < 0,0001$) (Рисунок 35).

При обработке клеток линии HepG2 S-нитрозоглутатионом в концентрации 50 мкМ содержание Nrf2 возрастало на 35% ($p = 0,01$) по отношению к концентрации 1 мкМ.

Однако, при концентрации 100 мкМ наблюдалось снижение количества Nrf2 на 31,2% ($p = 0,03$), 40,5% ($p = 0,0021$) и 48,2% ($p < 0,0001$) по сравнению с дозами тестируемого вещества 1, 10 и 50 мкМ соответственно (Рисунок 35).

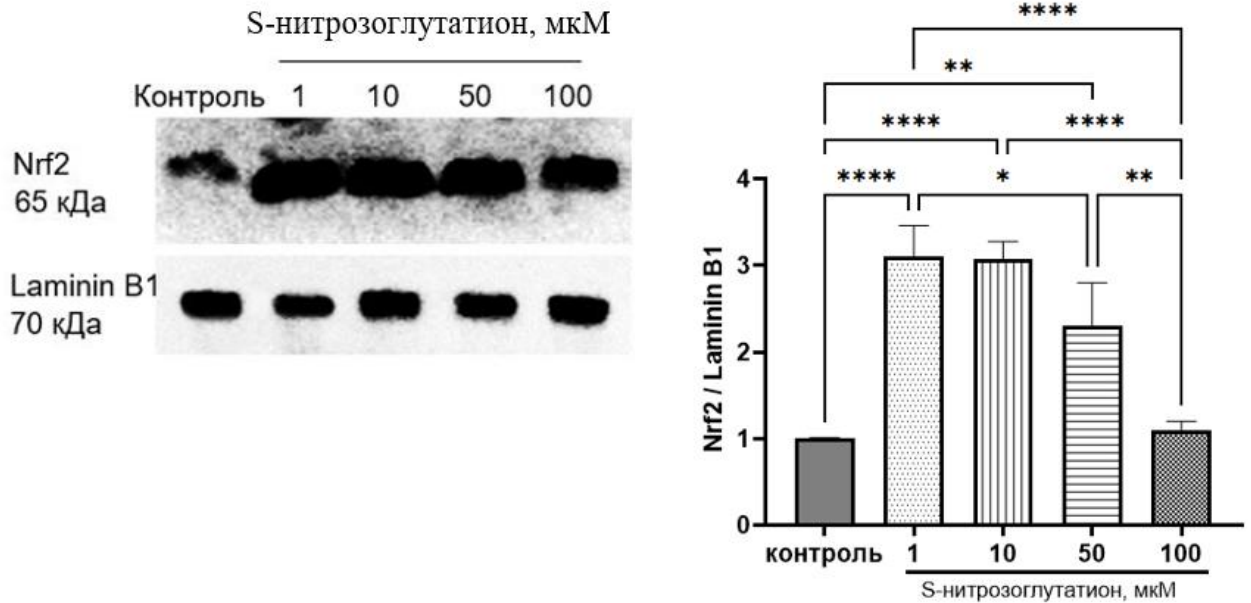


Рисунок 34 – Результаты вестерн-блот анализа содержания Nrf2 в ядре клеток линии HepG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 24 часов
Примечание – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ – статистика относительно контроля

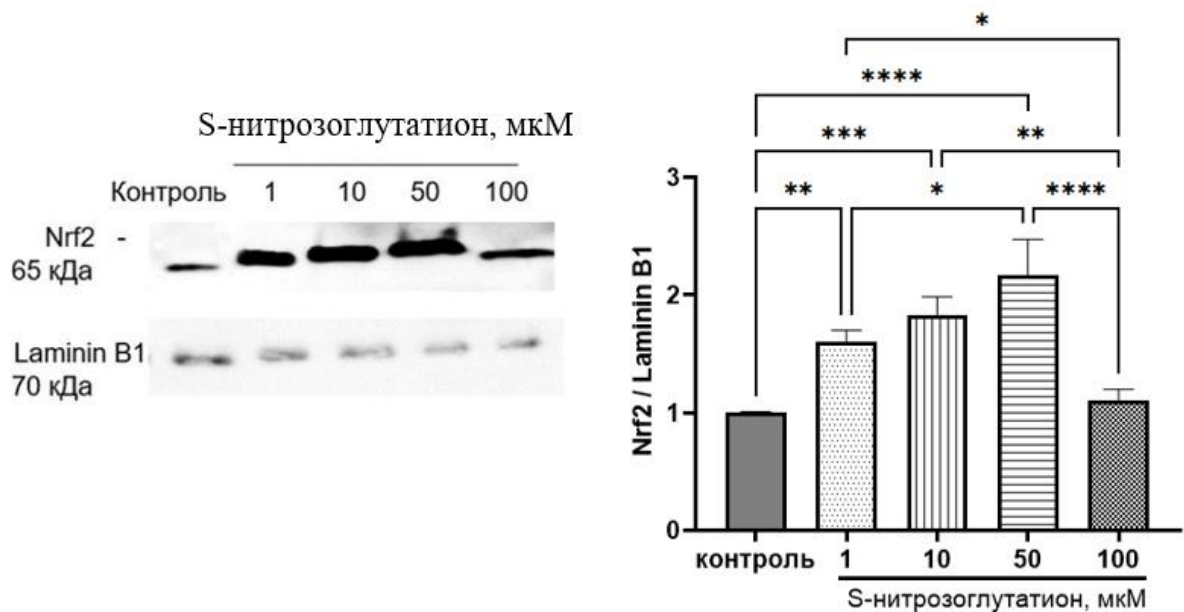


Рисунок 35 – Результаты вестерн-блот анализа содержания Nrf2 в ядре клеток линии HepG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 72 часов
Примечание – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ – статистика относительно контроля

Следует отметить, что при воздействии высоких концентраций S-нитрозоглутатиона (100 μM) уровень Nrf2 достоверно не изменялся при всех

сроках эксперимента, что скорее всего связано с повреждением клеток и подтверждается снижением их жизнеспособности, зафиксированным в данном исследовании.

Для выявления механизма активации Nrf2 использовали ингибитор pГЦ – ODQ. При блокировке сигнального пути NO-pГЦ активация Nrf2 S-нитрозоглутатионом в концентрациях 1-100 мкМ и экспозиции 24 и 72 часов не наблюдалась. Относительный уровень Nrf2 в ядерной фракции не показал значимых отличий от контрольных значений, то есть индуцирующий эффект S-нитрозоглутатиона на Nrf2 подавляется при ингибировании сигнального пути NO-pГЦ.

Таким образом, активация Nrf2 происходит через NO-зависимый гуанилатциклазный (NO-pГЦ) сигнальный каскад под воздействием S-нитрозоглутатиона (Рисунок 36).

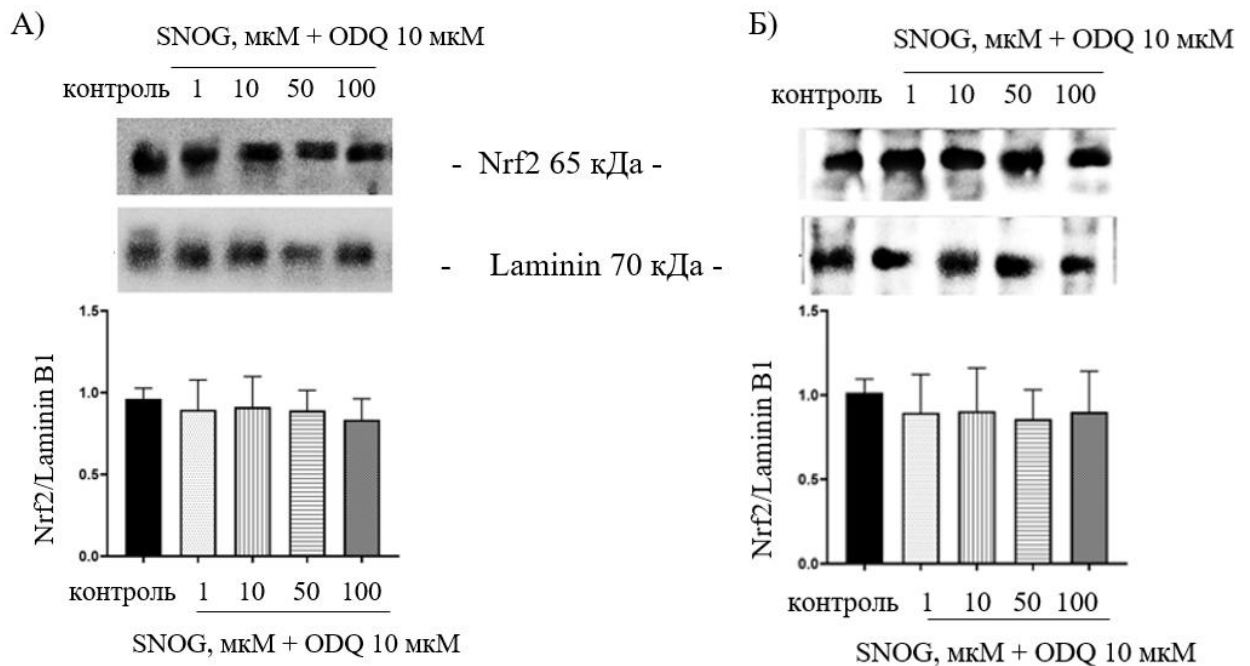


Рисунок 36 - Результаты вестерн-блот-анализа содержания Nrf2 в ядре клеток линии HepG2 после обработки S-нитрозоглутатином в концентрациях 1-100 мкМ и инкубации в течении 24ч (А) и 72 ч (Б) в присутствии ингибитора NO-pГЦ-сигнального пути ODQ

3.4. Оценка принадлежности S-нитрозоглутатиона к субстратам OATP1B1

Для того, чтобы проверить участие OATP1B1 в переносе S-нитрозоглутатиона, оценивали поглощение SNOG в клетках HEK293-SLCO1B1 и HEK293. S-нитрозоглутатион не был обнаружен в лизатах HEK293-SLCO1B1 и HEK293 при добавлении в концентрациях 1 мкМ или 10 мкМ.

В то же время концентрация аторвастатина в лизате HEK293-SLCO1B1 была выше, чем в лизате HEK293 через 5, 15 и 30 минут (аторвастатин добавляли в концентрации 1 мкМ). Эти данные указывают на то, что модельная система HEK293-SLCO1B1 работает должным образом и что S-нитрозоглутатион не является субстратом OATP1B1. Интересно, что после применения S-нитрозоглутатиона в концентрации 10 мкМ концентрация глутатиона в HEK293-SLCO1B1 через 5 и 15 минут была выше, чем в HEK293. Через 30 минут, напротив, концентрация глутатиона в HEK293 была выше, чем в HEK293-SLCO1B1 (Рисунок 37).

Следовательно, полученные результаты указывают на то, что OATP1B1 может участвовать в переносе глутатиона через клеточную мембрану.

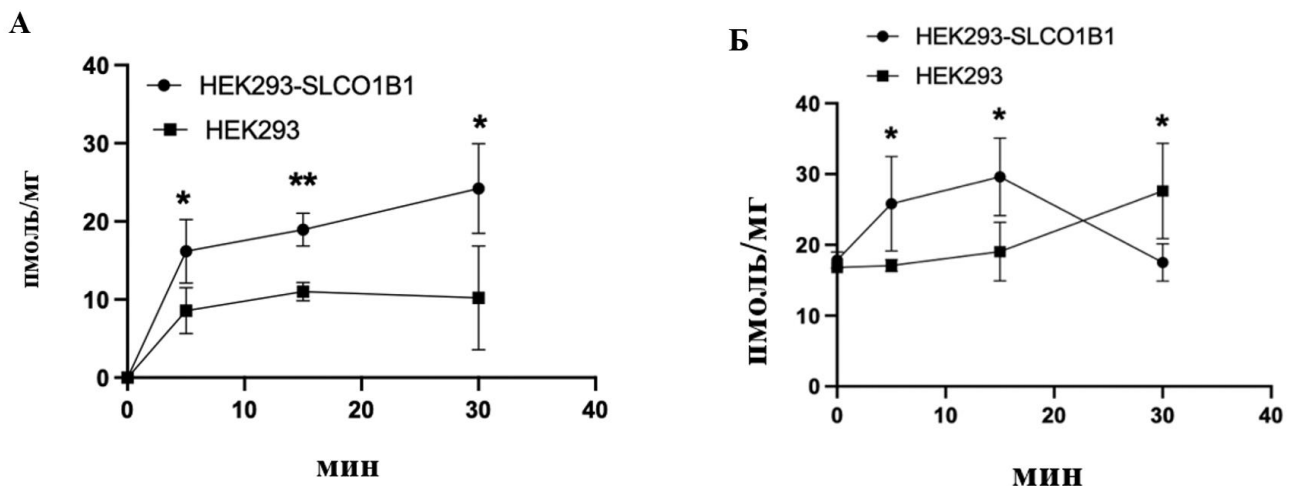


Рисунок 37 – Внутриклеточное содержание аторвастатина (А) и глутатиона (Б) в клетках линии HEK293 и HEK293-SLCO1B1

Примечание – * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – статистика относительно контроля

3.5. Влияние S-нитрозоглутатиона на относительное количество и активность OATP1B1, экспрессию гена *SLCO1B1*

3.5.1. Влияние S-нитрозоглутатиона на относительное количество OATP1B1

S-нитрозоглутатион в изучаемых дозах 1-100 мкМ при 3-часовом воздействии не оказывал статистически значимого действия на количественное содержание полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 ($F=3,18$; $p=0,09$) в клетках линии HepG2 (Рисунок 38).

После 24 ч инкубации с S-нитрозоглутатионом были зафиксированы следующие результаты ($F=19,0$; $p<0,0001$): концентрация 1 мкМ не вызывала значимых изменений, концентрации 10, 50 и 100 мкМ увеличивали содержание OATP1B1 на 136,7% ($p=0,0003$), 154,1% ($p<0,0001$), 124,5% ($p=0,0006$) соответственно относительно значений контрольной группы (Рисунок 39).

Дозозависимое повышение относительного количества отмечалось только по сравнению с концентрацией 1 мкМ: на 27% ($p=0,001$) относительно 10 мкМ, на 44% ($p=0,0004$) относительно 50 мкМ, на 15% ($p=0,002$) относительно 100 мкМ. Между концентрациями 10, 50 и 100 мкМ не было получено статистически значимых различий (Рисунок 39).

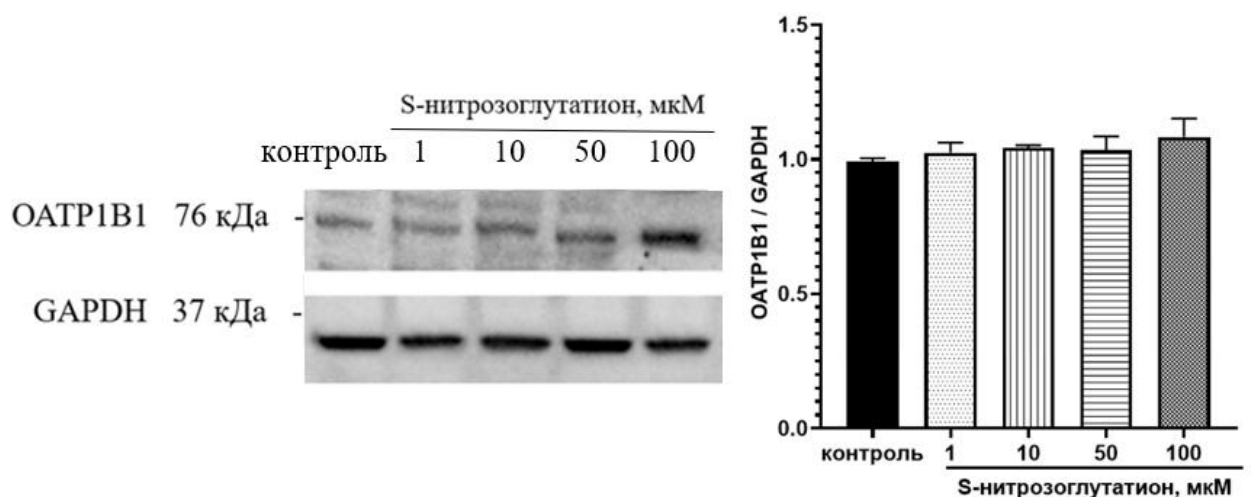


Рисунок 38 – Результаты вестерн-блот анализа содержания OATP1B1 в клетках линии HepG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 3 часов

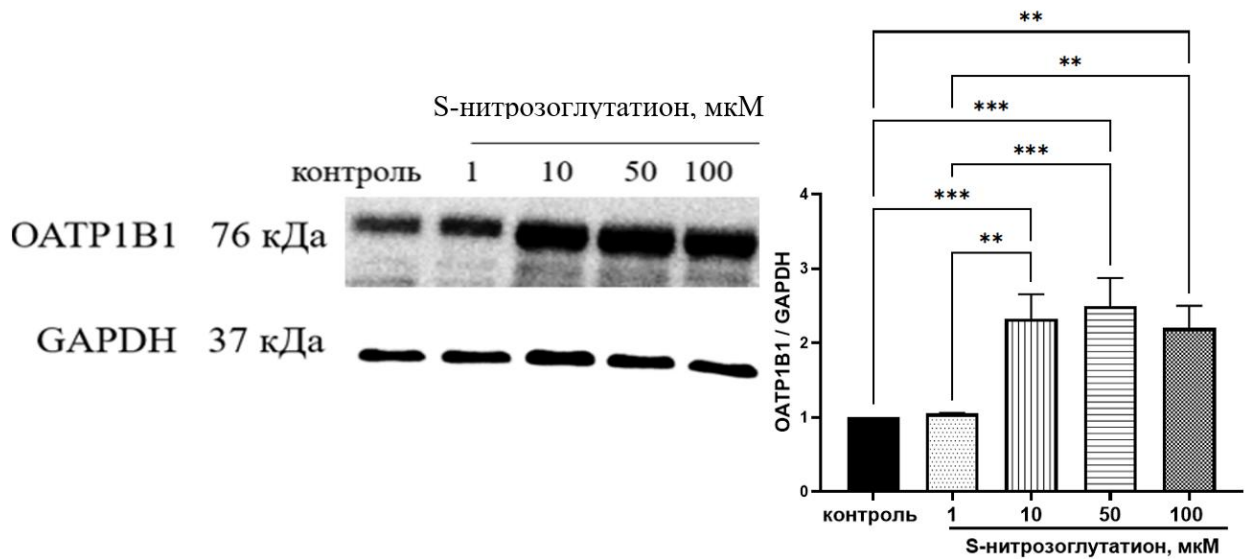


Рисунок 39 – Результаты вестерн-блот анализа содержания ОАТР1В1 в клетках линии HepG2 после обработки S-нитроглютационом в течение 24 часов
Примечание – ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – статистика относительно контроля

После 72-часовой обработки S-нитроглютационом клеток линии HepG2 также было зафиксировано увеличение относительного уровня белка-транспортера ОАТР1В1: $F=229,6$; $p < 0,0001$. Так, при обработке SNOG в концентрации 10 мкМ относительный уровень ОАТР1В1 увеличивался на 134,1% ($p < 0,0001$), 50 мкМ – на 42,5% ($p < 0,0001$), 100 мкМ – на 23,3% ($p = 0,006$) по сравнению со значениями контрольной группы (Рисунок 40).

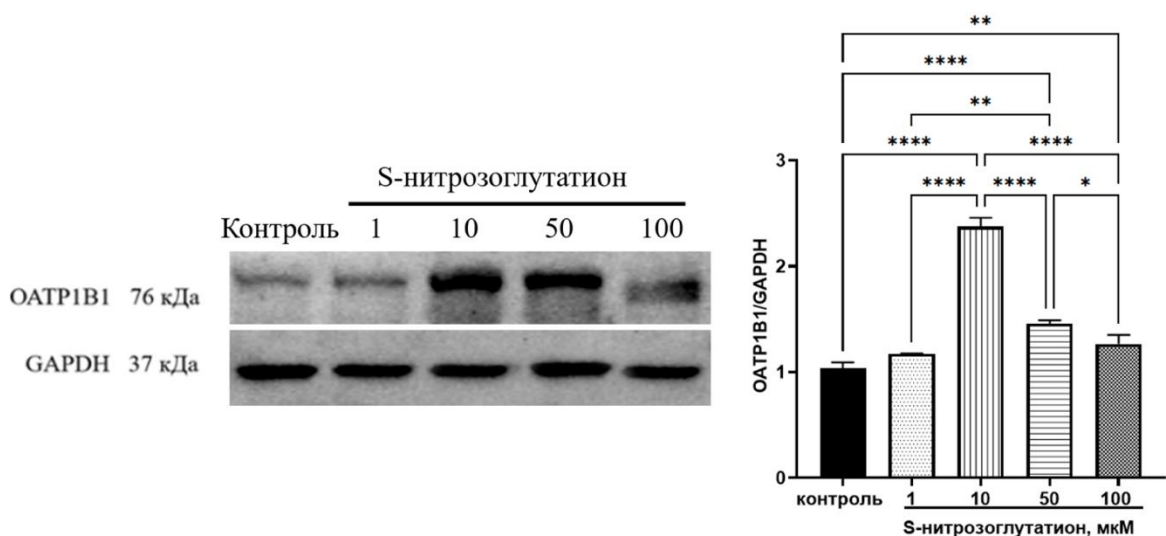


Рисунок 40 – Результаты вестерн-блот анализа содержания ОАТР1В1 в клетках линии HepG2 после обработки S-нитроглютационом в течение 72 часов
Примечание – ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – статистика относительно контроля

Дозозависимое повышение уровня OATP1B1 было получено при сравнении с концентраций 1 и 10 мкМ на 120,4% ($p < 0,0001$), 1 и 50 мкМ на 28,7% ($p = 0,001$) и снижение относительного количества OATP1B1 при сравнении с концентрациями 10 и 50 мкМ на 91,6% ($p < 0,0001$); 10 и 100 мкМ – на 110,8% ($p < 0,0001$); 50 и 100 – на 19,2% ($p = 0,02$) (Рисунок 40).

Из полученных результатов следует, что S-нитрозоглутатион оказывает стимулирующее влияние на количество инфлюксного белка-транспортера OATP1B1 в клетках линии HepG2. Изменения зависят от времени воздействия и концентрации использованного донора оксида азота.

3.5.2. Влияние S-нитрозоглутатиона на активность OATP1B1

Воздействие SNOG в течение 3 ч не влияло на активность OATP1B1 ($F = 1,8$, $p > 0,05$). Повышение относительного количества OATP1B1 сопровождалось увеличением активности белка-транспортера. S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50, 100 мкМ вызывал повышение проникновения аторвастатина в клетках HepG2 ($F = 10,4$, $p < 0,0005$) на 27,8% ($p = 0,02$), 41,8% ($p = 0,001$), 21,8% ($p = 0,06$) соответственно при сроке инкубации 24 ч относительно контроля.

Увеличение срока инкубации до 72 ч приводило к повышению проникновения аторвастатина в клетки HepG2 под действием SNOG в концентрации 50 мкМ на 54,8% ($p = 0,047$) по сравнению с показателями контроля (Таблица 7), что свидетельствует о повышении активности белка-транспортера.

В то же время классический ингибитор OATP1B1 рифампицин дозозависимо снижал проникновение аторвастатина внутрь клеток ($F = 27,1$, $p < 0,0001$): в концентрации 10 мкМ на 24,3% ($p = 0,004$), 50 мкМ – 29,1% ($p = 0,001$), 100 мкМ – 38,7% ($p < 0,0001$), 100 мкМ – 55,6% ($p < 0,0001$) (Таблица 7).

Полученные результаты свидетельствуют о повышении активности OATP1B1 под действием S-нитрозоглутатиона при экспозиции в течение 24 и 72 ч.

Таблица 7 – Изменение внутриклеточной концентрации (пмоль/мг/мин, $M \pm SD$, $n=3$) аторвастатина при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1, 10, 50, 100 мкМ, срок инкубации 3, 24 и 72 ч

Срок воздействия	S-нитрозоглутатион			Рифампицин
	3 ч	24 ч	72 ч	
Контроль	4,95 ± 0,52	4,85 ± 0,29	4,65 ± 0,41	4,78 ± 0,49
1 мкМ	5,07±1,67	4,62±0,36	4,79±0,52	4,52±0,13
10 мкМ	4,69±0,69	6,11±0,13*	6,95±0,99	3,63±0,32*
50 мкМ	5,12±1,17	6,76±0,77*	7,20±1,55*	3,39±0,35*
100 мкМ	3,95±0,39	5,82±0,41	5,88±1,28	2,93±0,34*

Примечание – * достоверные отличия по сравнению с контрольной группой

3.5.3. Влияние S-нитрозоглутатиона на экспрессию гена *SLCO1B1*

Была проведена оценка экспрессии гена *SLCO1B1* в клетках линии HepG2. Обработка клеток линии HepG2 S-нитрозоглутатионом в тестируемых концентрациях 1-100 мкМ в течение 3 ч статистически значимо не изменяла изучаемый показатель ($F=2,85$, $p=0,08$) (Рисунок 41) [14, 26].

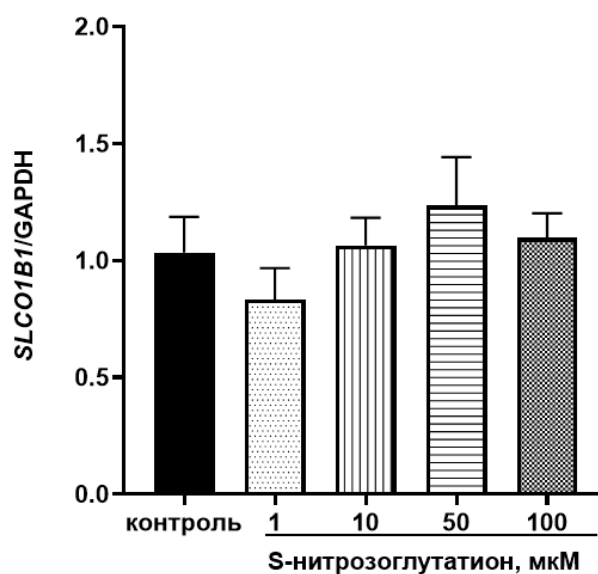


Рисунок 41 – Экспрессия гена *SLCO1B1* в клетках линии HepG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 3 часов

24-часовая обработка клеток линии HepG2 S-нитрозоглутатионом приводила к достоверному повышению экспрессии гена *SLCO1B1* ($F=225$; $p<0,0001$): 10 и 50 мкМ увеличивали экспрессию в 40 раз ($p<0,0001$), 100 мкМ – в 10 раз ($p=0,0003$) при сопоставлении результатов с контрольными значениями (Рисунок 42, А). Похожие изменения наблюдались при сравнении экспрессии в концентрации 1 мкМ с концентрациями 10, 50 и 100 мкМ (Рисунок 42, А).

При сравнении экспрессии гена *SLCO1B1* после обработки S-нитрозоглутатионом в концентрациях 10 и 50 мкМ с концентрацией 100 мкМ уровень экспрессии снижался на 68% ($p=0,0001$) и 67% ($p=0,0001$) соответственно (Рисунок 42, А).

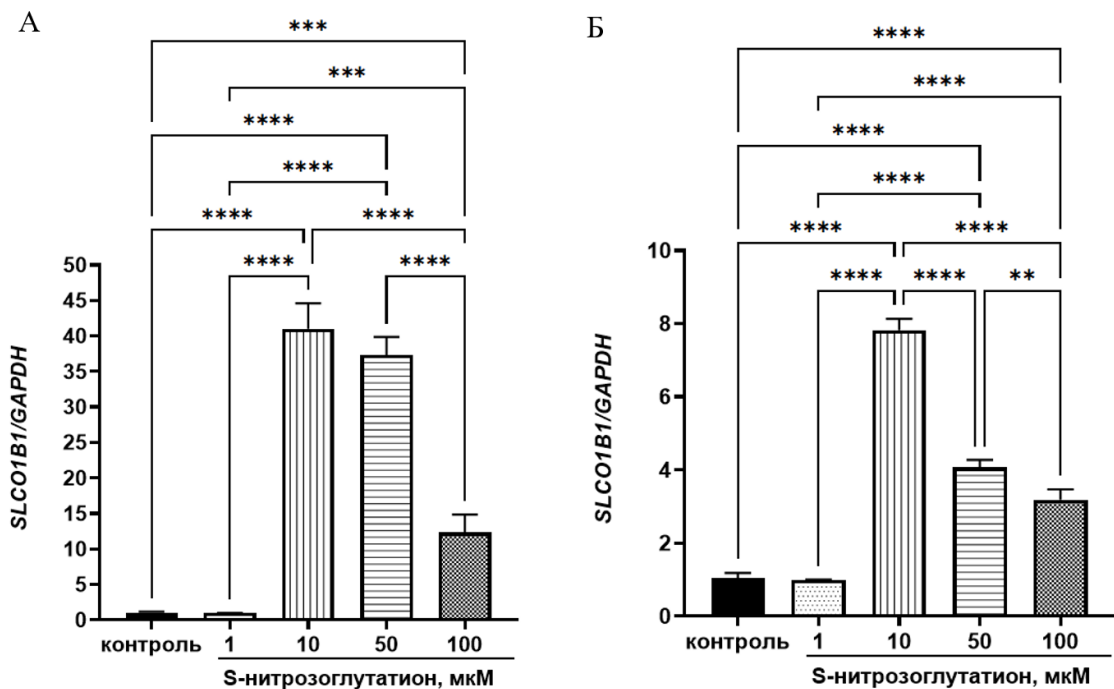


Рисунок 42 – Экспрессия гена *SLCO1B1* в клетках линии HepG2 после обработки S-нитрозоглутатионом в течение 24 часов (А) и 72 (Б) часов

Примечание – ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$ – статистика относительно контроля

После 72 часов обработки S-нитрозоглутатионом уровень экспрессии гена *SLCO1B1* увеличивался в 6 раз при концентрации 10 мкМ, в 3 раза при 50 мкМ и в 2 раза при 100 мкМ ($p<0,0001$ для всех групп) (Рисунок 42, Б).

Аналогичные изменения наблюдались при сравнении с концентрацией 1 мкМ. По сравнению с концентрацией 10 мкМ, уровень экспрессии гена *SLCO1B1* снижался на 47,4% ($p < 0,0001$) при 50 мкМ и на 58,9% ($p < 0,0001$) при 100 мкМ, а между концентрациями 50 мкМ и 100 мкМ снижение составило 20% ($p = 0,004$). (Рисунок 42, Б).

Таким образом, S-нитрозоглутатион при воздействии в течение 24 и 72 часов оказывал регуляторное действие на функционирование белка-транспортера OATP1B1, а именно повышал его относительное количество и активность, что объясняется увеличением экспрессии гена *SLCO1B1* в клетках линии HepG2.

При кратковременном воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 часов изменений в функционировании OATP1B1 зафиксировано не было.

3.6. Оценка регуляции белка-транспортера OATP1B1 в условиях воздействия S-нитрозоглутатиона на клетки линии HepG2

3.6.1. Оценка цитотоксичности ODQ, AEM1, TFCA на клетках линии HepG2

В работе был использован ингибитор растворимой гуанилатциклазы (pГЦ) – ODQ, ингибитор Nrf2 – AEM1, ингибитор LXR α – TFCA.

Первоначально была проведена оценка цитотоксичности используемых ингибиторов на клетках линии HepG2 – изменений зафиксировано не было (Таблица 8). Концентрации ингибиторов были выбраны на основании литературных данных и протестированы в имеющихся лабораторных условиях.

Таблица 8 – Результаты статистического анализа при сравнении жизнеспособности клеток линии HepG2 в экспериментальных и контрольных группах (тест ANOVA)

	ODQ	AEM1	TFCA
F	1,59	1,36	0,17
p	0,25	0,31	0,94

При тестировании влияния ODQ в концентрации 10 мкМ (Рисунок 43), АЕМ1 в концентрации 5 мкМ (Рисунок 44), ТФСА – 30 мкМ (Рисунок 45) и сроках инкубации 3, 24 и 72 ч не было зафиксировано статистически значимых различий.

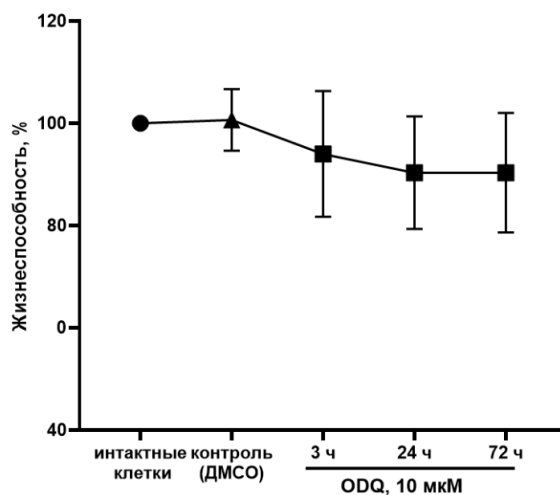


Рисунок 43 – Цитотоксичность ODQ при воздействии на клетки линии НерG2 в течение 3, 24 и 72 часов

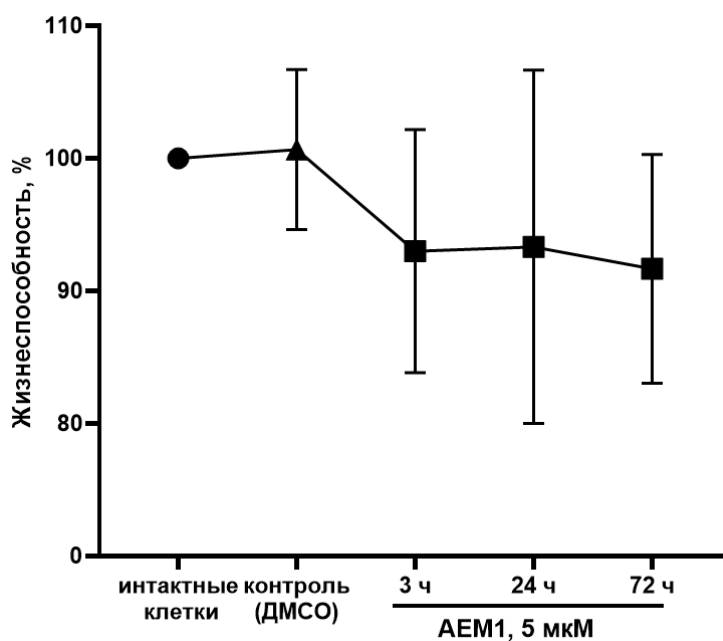


Рисунок 44 – Цитотоксичность АЕМ1 при воздействии на клетки линии НерG2 в течение 3, 24 и 72 часов

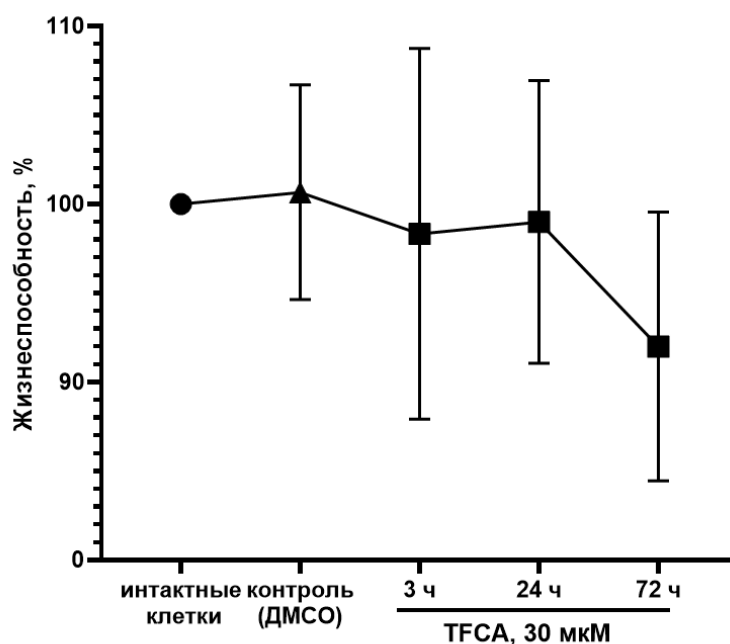


Рисунок 45 – Цитотоксичность TFCA при воздействии на клетки линии HepG2 в течение 3, 24 и 72 часов

Таким образом, ODQ, AEM1 и TFCA на жизнеспособность клеток линии HepG2 влияния не оказывали.

3.6.2. Влияние AEM1, ODQ, TFCA на относительный уровень OATP1B1 в клеточной линии HepG2

В ходе эксперимента было получено, что ингибиторы ODQ (Рисунок 46), AEM1 (Рисунок 47), TFCA (Рисунок 48) при воздействии в течение 3, 24 и 72 ч не оказывали самостоятельного воздействия на относительное количество OATP1B1, статистически значимых различий зафиксировано не было (Таблица 9). ДМСО при сроках воздействия 3, 24 и 72 ч не оказывал влияния на относительное количество OATP1B1.

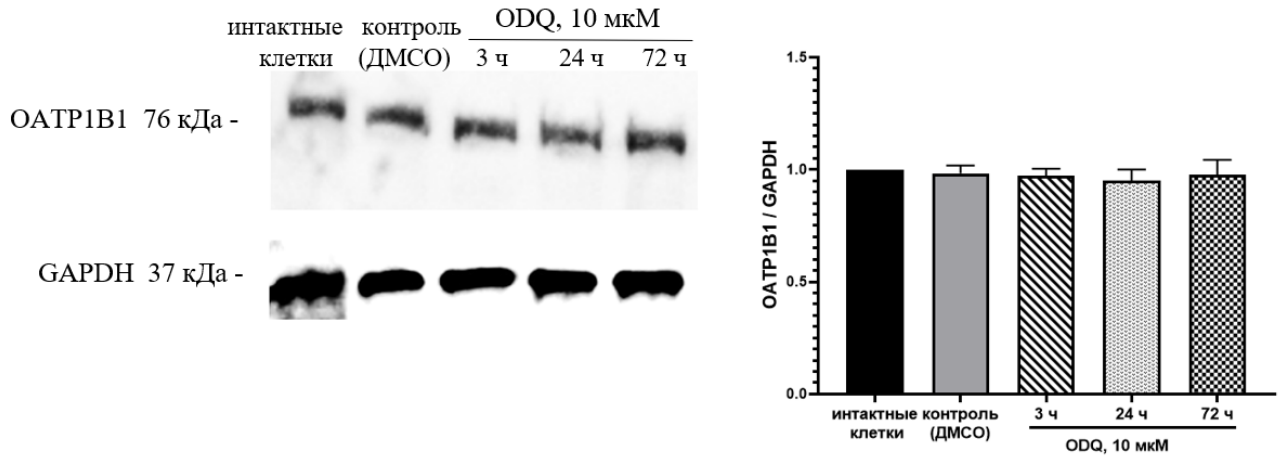


Рисунок 46 – Результаты вестерн-блот анализа содержания OATP1B1 в клетках линии НерG2 после обработки ODQ в течение 3, 24 и 72 часов

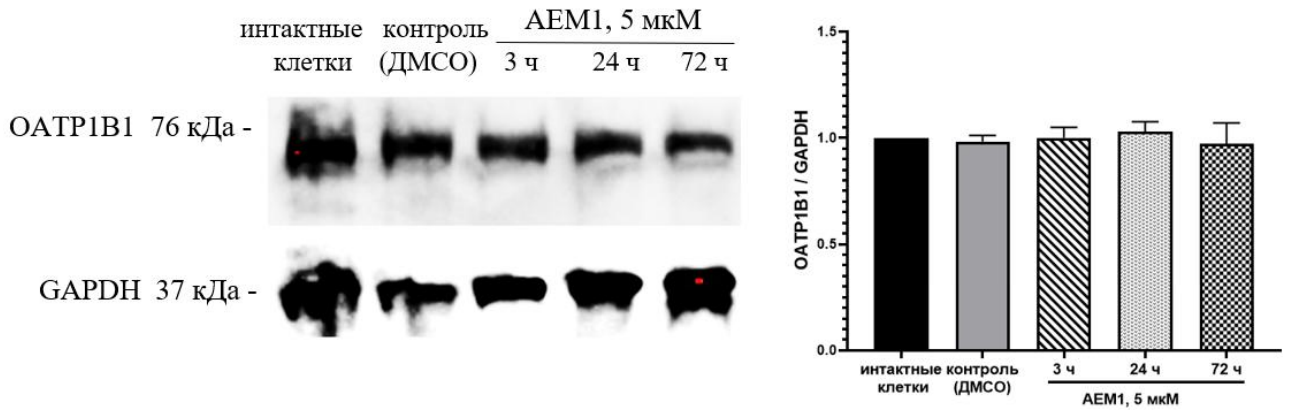


Рисунок 47 – Результаты вестерн-блот анализа содержания OATP1B1 в клетках линии НерG2 после обработки AEM1 в течение 3, 24 и 72 ч

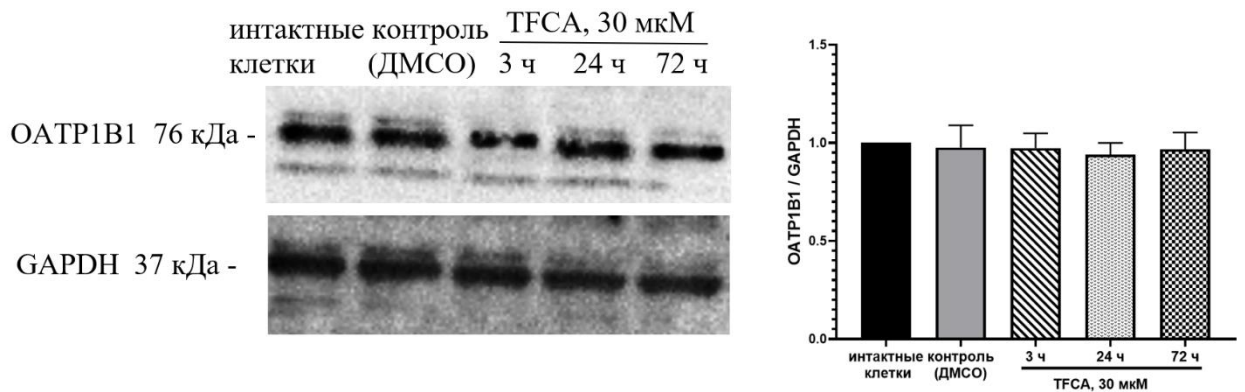


Рисунок 48 – Результаты вестерн-блот анализа содержания OATP1B1 в клетках линии НерG2 после обработки TFCA в течение 3, 24 и 72 ч

Таблица 9 – Результаты статистического анализа относительного количества OATP1B1 в экспериментальных и контрольных группах (тест ANOVA)

	ODQ	AEM1	TFCA
F	1,59	1,36	0,77
p	0,25	0,31	0,56

Таким образом, растворитель ингибиторов ДМСО, а также тестируемые вещества ODQ (10 мкМ), AEM1 (5 мкМ), TFCA (30 мкМ) не оказывали самостоятельного воздействия на относительное количество OATP1B1 в клетках линии HepG2.

Следовательно, тестируемые вещества – ингибитор сигнального пути NO-рГЦ (ODQ), ингибитор транскрипционного фактора Nrf2 (AEM1), ингибитор печеночного X рецептора подтип α (TFCA) могут использоваться как адекватные агенты в экспериментальных моделях для оценки механизмов воздействия S-нитрозоглутатиона на белок-транспортер OATP1B1.

3.6.3. Участие NO-рГЦ-сигнального пути, транскрипционного фактора Nrf2 и рецептора LXR α в регуляции относительного количества OATP1B1 под действием S-нитрозоглутатиона в клетках линии HepG2

После 24 ч воздействия S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибитором NRF2 – AEM1 в концентрации 5 мкМ отличия от контроля были только при концентрации SNOG 100 мкМ. Воздействие в дозах 1, 10 и 50 мкМ не оказывало эффекта на содержание OATP1B1 (F=9,34; p=0,0021). Уровень OATP1B1 увеличивался на 39,0% (p=0,0059) по сравнению с контрольными значениями при совместном применении S-нитрозоглутатиона (100 мкМ) и AEM1 (5 мкМ) (Рисунок 49).

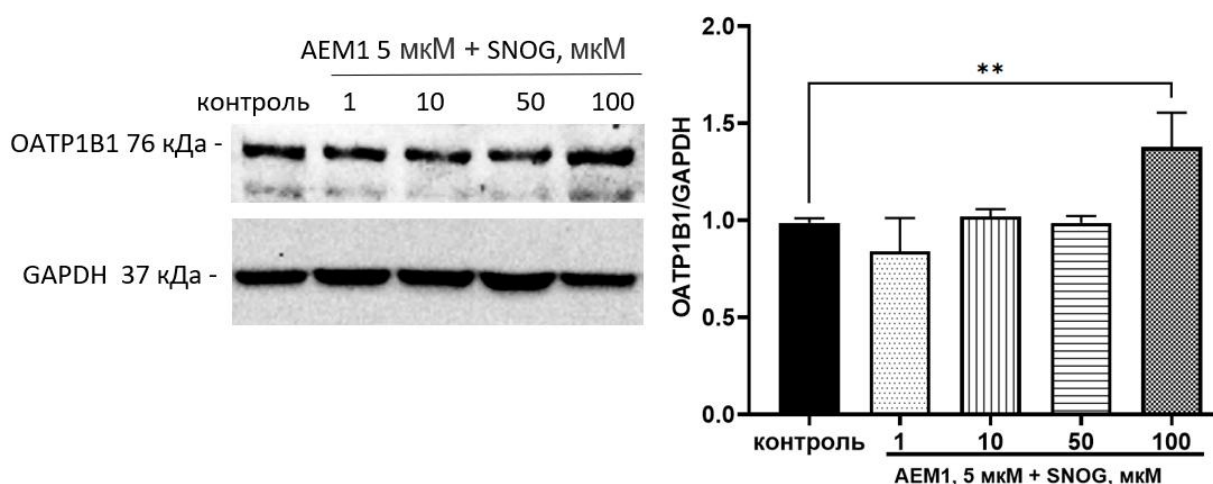


Рисунок 49 – Результаты вестерн-блот анализа содержания ОАТР1В1 в клетках линии HepG2 после обработки АЕМ1 в концентрации 5 мкМ совместно с S-нитрозоглутатионом в течение 24 часов

Примечание – ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$ – статистика относительно контроля

Анализ данных показал, что относительный уровень ОАТР1В1 изменяется при 72 ч воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с АЕМ1 ($F=8,28$; $p=0,0032$). В частности, уровень ОАТР1В1 увеличивался на 23,4% ($p=0,0059$) по сравнению с контрольными значениями при совместном применении АЕМ1 (5 мкМ) и S-нитрозоглутатиона (100 мкМ). При концентрациях SNOG 1, 10 и 50 мкМ уровень ОАТР1В1 оставался неизменным относительно контроля (Рисунок 50).

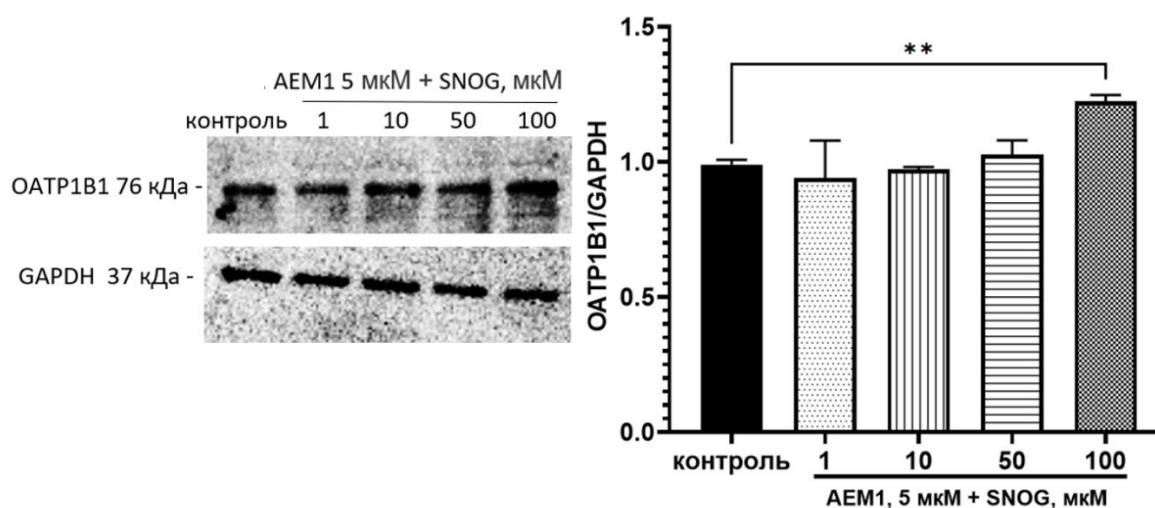


Рисунок 50 – Результаты вестерн-блот анализа содержания ОАТР1В1 в клетках линии HepG2 после обработки АЕМ1 в концентрации 5 мкМ совместно с S-нитрозоглутатионом в течение 72 ч

Примечание – ** $p < 0,01$ – статистика относительно контроля

При обработке клеток линии НерG2 S-нитрозоглутатионом в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ в сочетании с ингибитором NO-зависимой гуанилатциклазы (NO-pГЦ) – ODQ в течение 24 и 72 часов статистически значимых различий по сравнению с контролем выявлено не было ($F=2,16$; $p=0,14$ и $F=0,33$; $p=0,84$ соответственно) (Рисунок 51 и Рисунок 52).

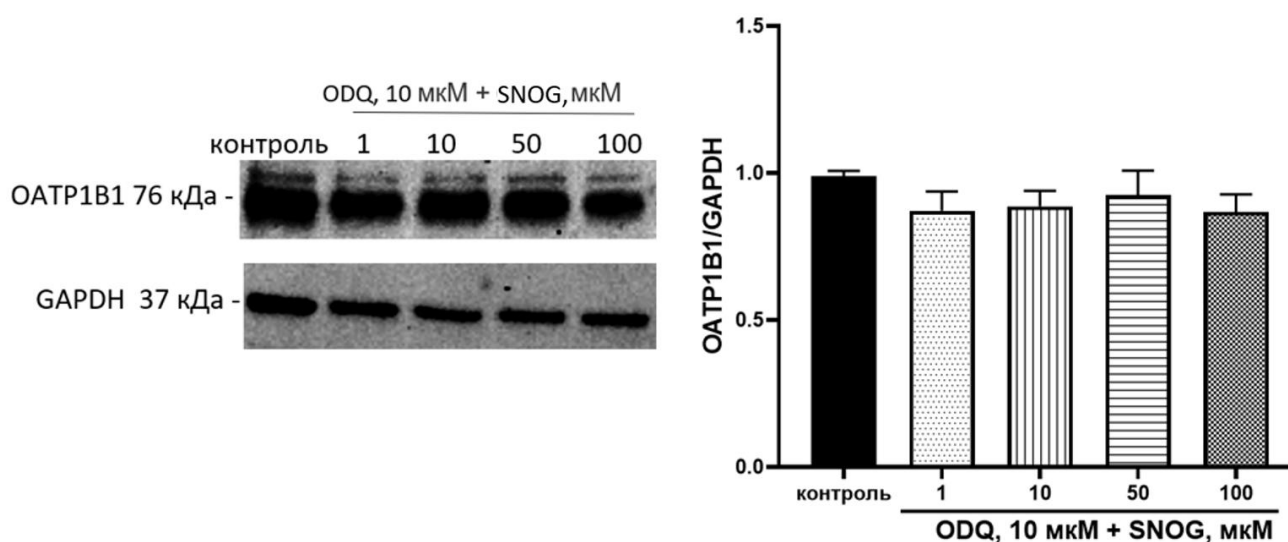


Рисунок 51 – Результаты вестерн-блот анализа содержания OATP1B1 в клетках линии НерG2 после обработки ODQ в концентрации 10 мкМ совместно с S-нитрозоглутатионом в течение 24 часов

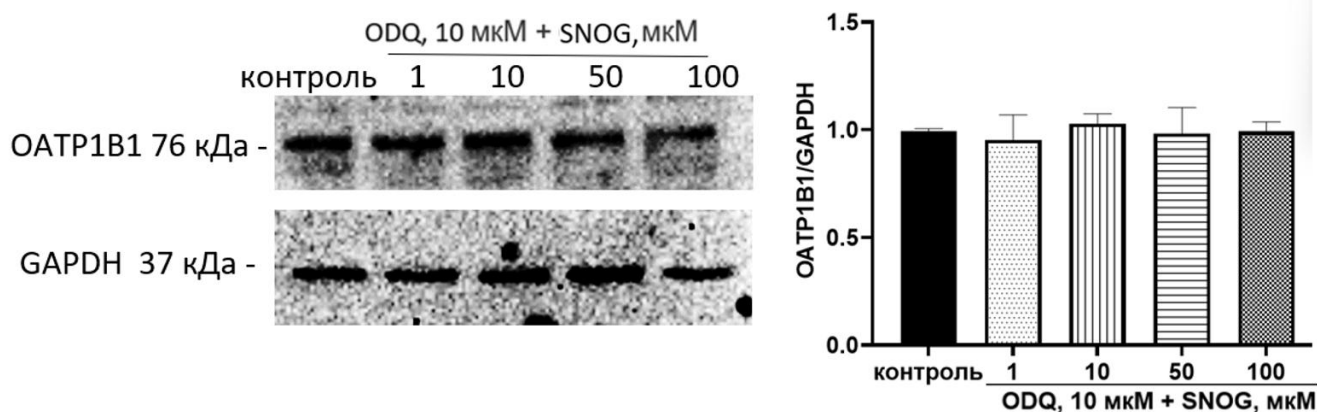


Рисунок 52 – Результаты вестерн-блот анализа содержания OATP1B1 в клетках линии НерG2 после обработки ODQ в концентрации 10 мкМ совместно с S-нитрозоглутатионом в течение 72 часов

После 24 часов инкубации клеток линии НерG2 с TFCA в сочетании с S-нитрозоглутатионом уровень белка OATP1B1 изменялся: $F=12,2$; $p=0,0007$. В

частности, при совместной обработке TFCA и S-нитрозоглутатионом в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ относительный уровень OATP1B1 увеличивался на 35,7% ($p=0,0017$), 33,3% ($p=0,026$) и 32,7% ($p=0,029$) соответственно, тогда как при концентрации 1 мкМ изменений не наблюдалось (Рисунок 53).

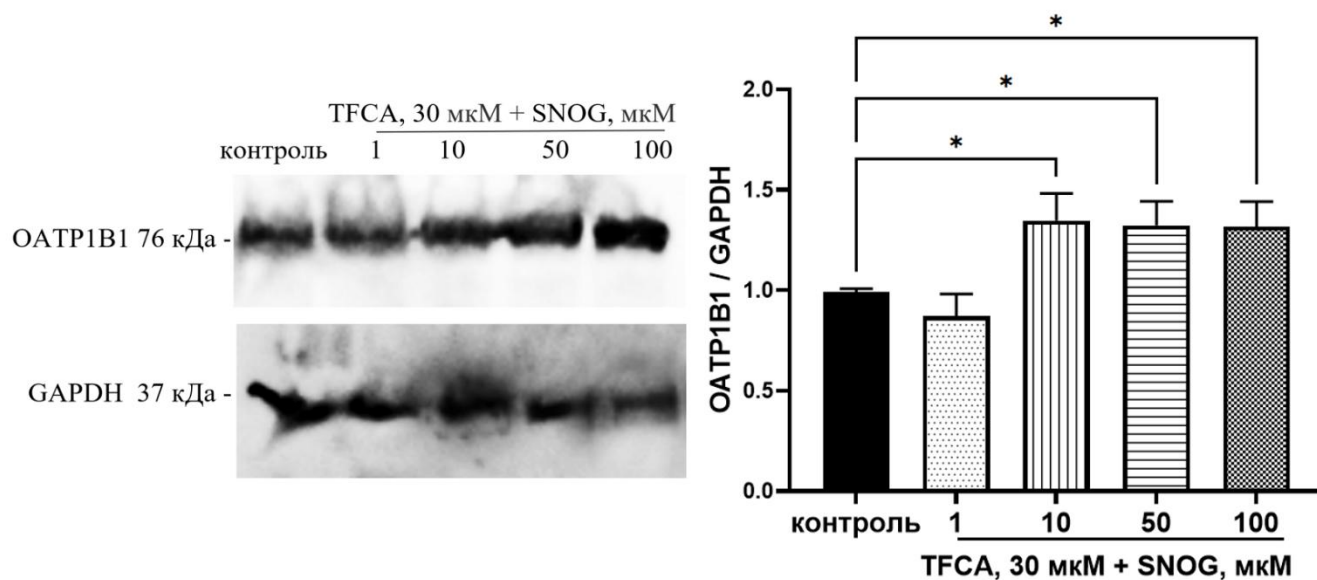


Рисунок 53 – Результаты вестерн-блот анализа содержания OATP1B1 в клетках линии HepG2 после обработки TFCA в концентрации 30 мкМ совместно с S-нитрозоглутатионом в течение 24 часов

Примечание –* $p < 0,05$ – статистика относительно контроля

72-часовая обработка клеток TFCA и S-нитрозоглутатионом вызывала изменение уровня белка-транспортера OATP1B1: $F=10,2$; $p=0,0015$. Так, S-нитрозоглутатион в концентрациях 10 и 50 мкМ в сочетании с TFCA увеличивал относительный уровень OATP1B1 на 41,3% ($p=0,018$) и 35,3% ($p=0,044$) соответственно. Однако концентрации 1 и 100 мкМ значимого эффекта на уровень OATP1B1 не оказывали (Рисунок 54).

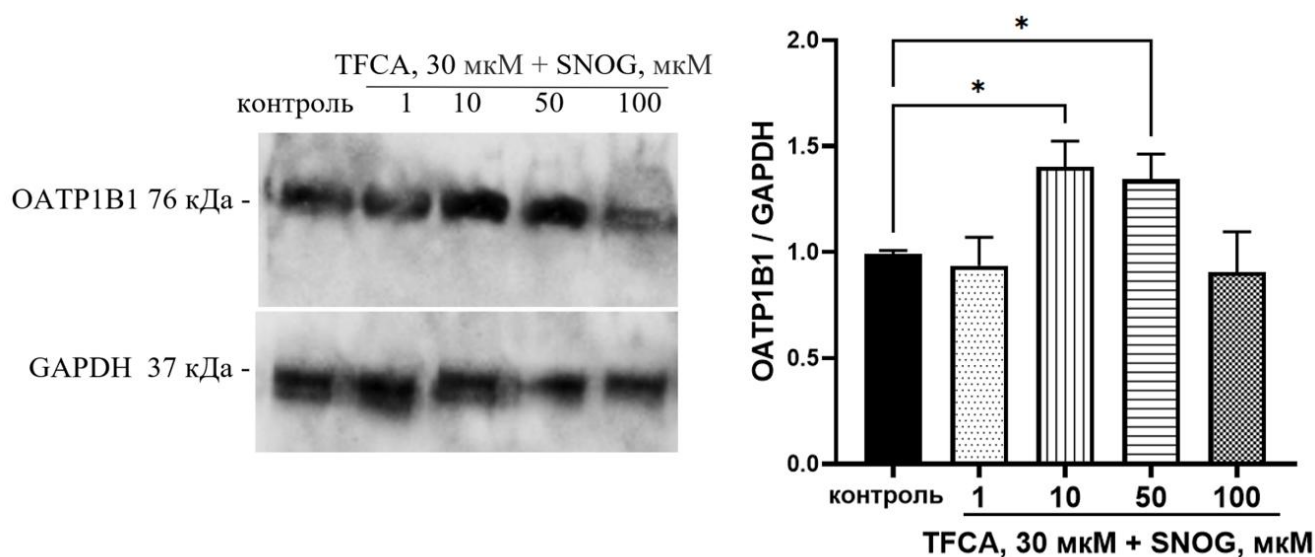


Рисунок 54 – Результаты вестерн-блот анализа содержания OATP1B1 в клетках линии HepG2 после обработки TFCA в концентрации 30 μ M совместно с S-нитрозоглутатионом в течение 72 часов

Примечание – * $p < 0,05$ – статистика относительно контроля

Полученные результаты свидетельствуют о том, что S-нитрозоглутатион реализует регуляторное действие на OATP1B1 преимущественно посредством NO-рГЦ, Nrf2 и в меньшей степени посредством LXR α .

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

OATP1B1 – инфлюксный белок-транспортёр, играющий важную роль в проникновении его субстратов внутрь гепатоцитов и ряда других клеток. Субстратами данного переносчика являются эндогенные вещества (желчные кислоты, билирубин и др.), а так же лекарственные препараты, например, статины, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента [158], сартаны и ряд других веществ [153, 172]. OATP1B1 принимает участие в транспорте билирубина, поэтому снижение его активности может приводить к развитию «желтухи» [164].

В опухолевых клетках OATP1B1 может транспортировать субстраты внутрь клеток и таким образом повысить эффективность терапии цитостатиками-субстратами [111, 208].

Поэтому изучение механизмов регуляции OATP1B1 является не только важной фундаментальной, но и проблемой, нацеленной на повышение эффективности и безопасности терапии субстратами изучаемого белка-транспортёра.

На данный момент описано несколько механизмов регуляции для OATP1B1 [167]: прямое ингибирование OATP1B1; транскрипционная регуляция; посттранскрипционная регуляция; посттрансляционная регуляция (гликозилирование, убиквитирование, регуляция протеинкиназами); полиморфизм гена *SLCO1B1*.

Для таргетной регуляции экспрессии и активности OATP1B1 тестируются все новые и новые сигнальные пути.

Представленное исследование было посвящено оценке влияния S-нитрозоглутатиона на экспрессию гена *SLCO1B1*, количество и активность белка OATP1B1 в клетках линии HepG2, а также выявления возможного механизма регуляции в условиях данной экспериментальной модели посредством NO-pГЦ-сигнального пути, транскрипционного фактора Nrf2, рецептора LXR α .

Дополнительно в рамках работы оценивалась принадлежность S-нитрозоглутатиона к субстратам OATP1B1.

S-нитрозоглутатион – производное глутатиона [63], которое является одновременно и эндогенным депо NO. Принято считать, S-нитрозоглутатион активирует растворимую гуанилатциклазу и запускает сигнальный каскад через повышение уровня цГМФ. При высоких концентрациях (выше 100 мкМ) S-нитрозоглутатион, как и другие доноры NO, может вызывать развитие нитрозативного стресса, активацию транскрипционного фактора Nrf2 и/или нитрозилирование определенных белков [187].

В качестве объекта исследования для изучения механизмов регуляции OATP1B1 была выбрана клеточная линия HepG2. HepG2 – гепатоцеллюлярная карцинома, выделенная из печени мужчины европеоидного происхождения [110]. Линия клеток HepG2 является одной из наиболее широко используемых линий раковых клеток во многих биомедицинских исследованиях благодаря своей универсальности. Представляя человеческую энтодермальную линию клеток, HepG2 широко используются в качестве моделей для исследований в области токсикологии, включая токсикогеномные скрининги с использованием CRISPR-Cas9, онкологии, заболеваний печени, механизмов регуляции генов, открытия биомаркеров и метаболизма лекарств, в том числе при участии белка-транспортера OATP1B1 [109, 116]. Поэтому клеточная линия HepG2 является хорошей тест-системой для оценки молекулярных механизмов регуляции OATP1B1 при действии S-нитрозоглутатиона – донора NO [19].

На начальном этапе исследования изучалось влияние экзогенного S-нитрозоглутатиона на клеточную линию HepG2.

Для подтверждения повышения уровня оксида азота (NO) в клетках линии HepG2 под действием S-нитрозоглутатиона использовали флуоресцентные зонды DAF-FM. Результаты показали, что S-нитрозоглутатион в концентрациях 1–100 мкМ и при времени экспозиции 3, 24 и 72 часа вызывал увеличение уровня NO.

NO оказывает не только регуляторное воздействие. При повышении его концентрации может развиваться нитрозативный стресс и повреждение клеток. Например, происходит образование пероксинитрита (ONOO-), который как раз и оказывает токсическое (повреждающее) действие на клетки за счет окисления

белков, жиров и углеводов. Нитрозилирование тирозина является наиболее специфичной модификацией при развитии нитрозативного стресса [98]. Поэтому в настоящем исследовании в клеточном лизате HepG2 дополнительно анализировали содержание 3-нитротирозина и битирозина, которые являются идентификаторами нитрозативного стресса.

Тирозин может быть окислен несколькими одноэлектронными окислителями ($X\bullet$) до тирозильного радикала (Рисунок 55, 1). Восстановители, такие как глутатион, аскорбат и мочевая кислота, могут восстанавливать тирозильные радикалы обратно до тирозина (Рисунок 55, 2). В дополнение, $\bullet\text{OH}$ может присоединяться к фенольному кольцу тирозина (Рисунок 55, 3), образуя гидрокситирозильный радикал, который может дегидратироваться до радикала тирозина (Рисунок 54, 4). Нитрозилирование тирозина также может происходить альтернативным путем, который подразумевает взаимодействие тирозильных радикалов с $\bullet\text{NO}$ с формированием 3-нитротирозина (Рисунок 55, 5). Нитротирозин в дальнейшем конденсируется до 3,3-битирозина (битирозина) [60, 82].

В ходе исследования было выявлено, что уровень 3-нитротирозина статистически значимо увеличивался под действием S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1–100 мкМ при времени инкубации 3 и 24 часа. Однако при 72-часовой инкубации и концентрациях SNOG 1, 10 и 50 мкМ наблюдалось снижение уровня 3-нитротирозина, что связано с активацией перехода 3-нитротирозина в битирозин (Рисунок 55). При концентрации SNOG 100 мкМ возрастал уровень 3-нитротирозина и битирозина, что указывает на развитие нитрозативного стресса.

Важно отметить, что при воздействии S-нитрозоглутатиона активировались процессы апоптоза, о чем свидетельствует изменение уровня Bcl2 и Fas. При сроке инкубации 3 ч уровень антиапоптотического белка Bcl2 возрастал при концентрациях донора оксида азота 1-50 мкМ, а количество Fas не изменялось, что указывает на защитное действие NO. Увеличение длительности воздействия до 24 ч и 72 ч приводило к снижению уровня антиапоптотического белка Bcl2 и увеличению уровня проапоптотического белка Fas.

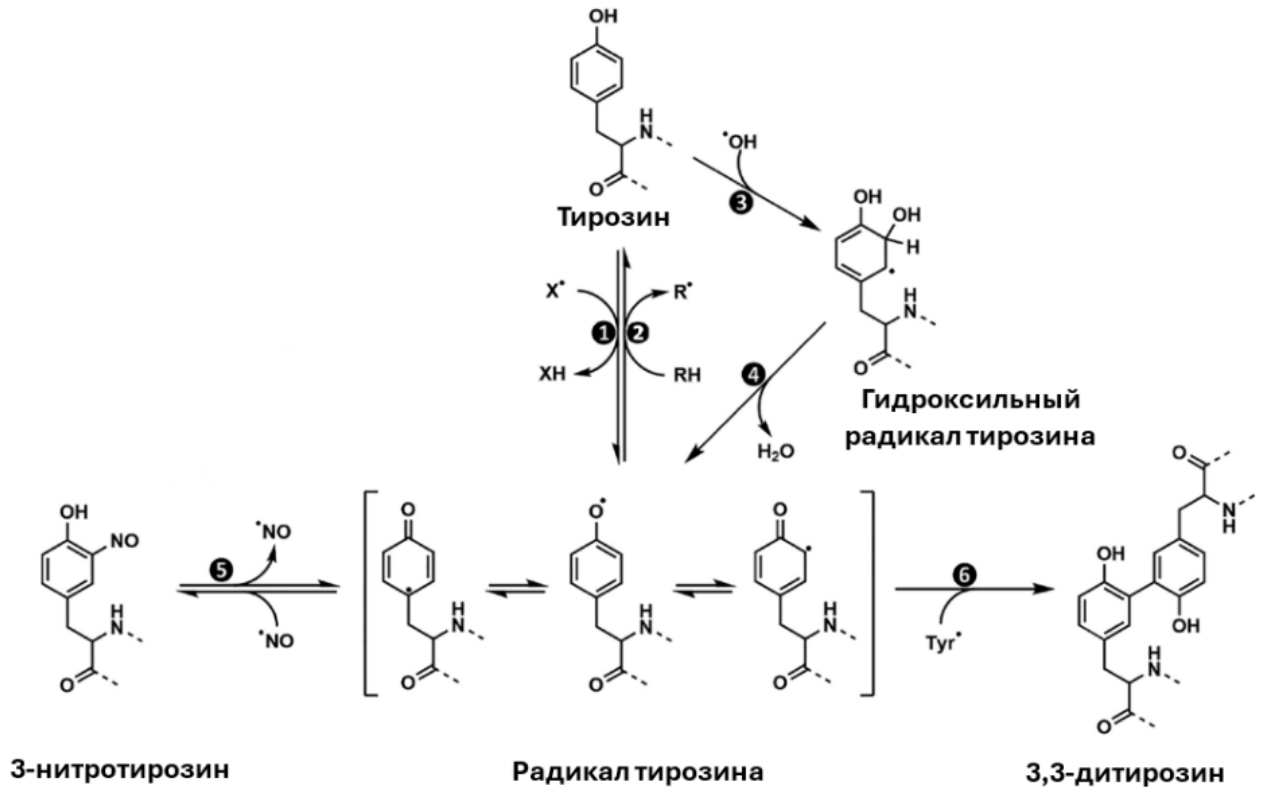


Рисунок 55 – Формирование 3-нитротирозина и битирозина при воздействии активных форм азота

При сроке инкубации клеток линии HepG2 с S-нитрозоглутатионом 3 ч жизнеспособность клеток оставалась на уровне контрольных значений. S-нитрозоглутатион в концентрациях 1-50 мкМ сроком воздействия 24 и 72 ч не проявлял цитотоксического действия. Однако при концентрации 100 мкМ наблюдалось снижение жизнеспособности клеток и функционирования митохондрий по сравнению с контролем. Аналогичные изменения были получены для уровня глутатиона, по его косвенной оценке – концентрации небелковых SH-групп. Уровень небелковых SH-групп снижался только при концентрации 100 мкМ и сроках экспозиции 24 и 72 часа.

S-нитрозоглутатион в концентрациях 1-50 мкМ и сроке воздействия 3 ч оказывает сигнальное действие в клетках линии HepG2, что проявляется в повышении уровня антиапоптотического белка Bcl2, и видимо, способствует сохранению жизнеспособности клеток [19]. S-нитрозоглутатион в концентрации

100 мкМ при инкубации в течение 3, 24 и 72 часов вызывает развитие нитрозативного стресса, что приводит к активации апоптоза и снижению жизнеспособности клеток.

Таким образом, максимальное увеличение уровня NO при концентрации 100 мкМ приводило к снижению уровня небелковых SH-групп, максимальному возрастанию уровней 3-нитротирозина и битирозина, смещению равновесия в содержании антиапоптотического белка Bcl2 (снижение) и проапоптотического белка Fas (повышение), что в свою очередь приводило к снижению жизнеспособности клеток.

Известно, что при добавлении SNOG к иммортализованной клеточной линии преадипоцитов 3 (T3-L1) в концентрациях 500 мкМ и выше наблюдается токсическое действие, проявляющееся снижением жизнеспособности клеток, уменьшением концентрации белка и триацилглицеридов. В то же время концентрации ниже 500 мкМ инициируют процесс нитрозилирования, который играет важную роль в регуляции созревания адипоцитов [182].

На клетках Caco-2 было показано, что SNOG в концентрации 500 мкМ оказывает токсическое действие, а в более низких концентрациях оказывает регуляторное действие, в частности на белок-транспортер Р-гликопротеин [18, 34]. В селезеночных В-клетках 50 мкМ SNOG увеличивал продукцию интерлейкинов. Концентрация SNOG 50 мкМ проявляла регуляторное действие: при обработке селезеночных В-клеток наблюдалось увеличение продукции интерлейкинов [171].

Таким образом, 1-50 мкМ концентрации SNOG являются безопасными и оказывают физиологическое действие, а выше 100 мкМ – токсичными [34, 182, 187]. Аналогичная тенденция была получена и для клеток линии HepG2 в наших исследованиях [19].

S-нитрозоглутатион является основным эндогенным депо NO в клетках и рассматривается как перспективный препарат с NO-донорной активностью [1]. Поэтому изучение его биохимических и фармакологических эффектов активно продолжается [127]. Также существуют некоторые вопросы о механизме его транспорта в клетки. В данной работе была проведена оценка принадлежности

SNOG к субстратам и модуляторам активности OATP1B1. OATP1B1 является инфлюксным печеночным транспортером, обеспечивающим проникновение субстратов в гепатоциты. Субстратами этого транспортера является широкий спектр эндогенных веществ, таких как эстрон-3-сульфат, билирубин и др. Поэтому была выдвинута гипотеза, что S-нитрозоглутатион также может транспортироваться в гепатоциты с помощью OATP1B1 [90].

С другой стороны, OATP1B1 является транспортером, играющим важную роль в транспорте лекарственных средств. Его субстратами являются широко используемые препараты, такие как статины, сартаны, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента [129]. Поэтому, если рассматривать SNOG как терапевтический агент, необходимо знать, как он может влиять на OATP1B1, чтобы предсказать развитие взаимодействий с другими препаратами на уровне этого транспортера. Механизмы регуляции OATP1B1 активно изучаются в настоящее время [167], а роль NO и SNOG как его эндогенного депо в этом процессе к настоящему моменту еще не доказана.

Было показано, что транспорт/проникновение SNOG не различается в клетках HEK293 и HEK293-SLCO1B1. S-нитрозоглутатион не был обнаружен ни в одной из них, несмотря на то, что классический субстрат OATP1B1 имел более высокую проницаемость в HEK293-SLCO1B1. Полученные данные свидетельствуют о том, что SNOG не является субстратом для OATP1B1. Примечательно, что при добавлении SNOG к клеткам HEK293-SLCO1B1 содержание глутатиона увеличивалось быстрее, чем в клетках HEK293, что может указывать на то, что глутатион является субстратом для OATP1B1. Глутатион не способен проникать через клеточную мембрану, и для его трансмембранного транспорта требуются специфические транспортеры [165]. Выявленная в нашем исследовании способность глутатиона транспортироваться OATP1B1 может быть еще одним типом его транспорта в гепатоциты. Полученные результаты также подтверждают ранее высказанное предположение о том, что SNOG транспортируется через клеточную мембрану опосредованно, путем

предварительного переноса нитрозогруппы с S-нитрозоглутатиона на другую тиолсодержащую аминокислоту [63].

В ходе настоящего исследования было установлено, что под действием S-нитрозоглутатиона повышается экспрессия мРНК гена *SLCO1B1*, кодирующего OATP1B1, относительное количества белка-транспортера, а также проникновение его субстрата аторвастатина внутрь клеток HepG2, что свидетельствует о повышении и его активности.

Обращает на себя внимание, совпадение повышения уровня мРНК *SLCO1B1* и количества белка OATP1B1 при концентрациях S-нитрозоглутатиона 10-100 мкМ, следовательно, увеличение количества белка OATP1B1 регулируется экспрессией гена *SLCO1B1* в клетках линии HepG2 [26].

Примечательно, что повышение транспорта аторвастатина в клетки HepG2 наблюдается не при всех концентрациях SNOG, вызвавших повышение экспрессии белка. Можно предположить, что при высоких концентрациях оксид азота вызывает нитрозилирование OATP1B1, что приводит к снижению его активности. Это предположение подтверждается повышением уровня продуктов нитрозилирования [9, 26].

На заключительном этапе исследования были изучены механизмы повышающей регуляции OATP1B1 при воздействии S-нитрозоглутатиона.

Основной механизм сигналинга NO реализуется через цГМФ. Было показано, что ингибирование сигнального пути NO-pГЦ подавляло индуцирующий эффект SNOG при всех концентрациях и всех сроках воздействия. Полученные результаты свидетельствуют о том, что стимулирующее влияние S-нитрозоглутатиона на OATP1B1 реализуется через сигнальный путь NO-pГЦ.

В качестве регуляторного фактора в условиях воздействия S-нитрозоглутатиона был рассмотрен транскрипционный фактор Nrf2, являющийся сенсором окислительно-восстановительного гомеостаза [52]. В норме Nrf2 локализуется в цитоплазме и связан с белком Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), который способствует разрушению Nrf2 и препятствует его проникновению в ядро [38, 169]. При развитии окислительного/нитрозативного

стресса происходит диссоциация комплекса Nrf2-keap, Nrf2 транслоцируется в ядро, где запускает экспрессию генов, участвующих в антиоксидантной защите клеток [42]. Установлено, что оксид азота (NO) активирует сигнальный путь Nrf2–Keap1. NO вызывает быстрое накопление Nrf2 в ядре, активацию транскрипции и повышение экспрессии антиоксидантных ферментов [6, 35]. По нашим данным, S-нитрозоглутатион в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ и сроке воздействия 3, 24 и 72 ч повышал уровень Nrf2 в ядерной фракции лизата клеток линии HepG2, что свидетельствует о реализации регуляторной функции.

В представленном исследовании ингибирование Nrf2 также частично нейтрализовало действие S-нитрозоглутатиона на OATP1B1. Результаты показали, что SNOG активирует Nrf2 (его уровень в ядре клетки увеличивается), а ингибирование сигнального пути NO-pГЦ подавляет индуцирующий эффект SNOG на Nrf2. Полученные результаты указывают на то, что SNOG активирует сигнальный путь NO-цГМФ, который активирует Nrf2, что, в свою очередь, может увеличить экспрессию гена *SLCO1B1* и количество белка OATP1B1.

Печеночный X рецептор печени подтип α (LXR α) является ядерным рецептором, который активируется оксистеролами. Все больше доказательств указывают на то, что этот ядерный рецептор играет важную роль не только в регуляции метаболизма холестерина, но и в интеграции метаболизма стеролов, жирных кислот и глюкозы [67].

LXR α является одним из основных транскрипционных регуляторов OATP1B1 [140]. В нашем исследовании LXR α принимал участие в действии 100 мкМ SNOG и экспозиции в течение 72 часов. Можно предположить, что высвобождаемые продукты нитрозативного стресса активировали LXR α (Рисунок 56).

Полученные результаты имеют важное практическое значение. В клинической практике доноры NO нитраты и субстраты OATP1B1 статины (препараты, снижающие уровень холестерина) часто назначают вместе [81]. Повышение регуляции OATP1B1 под действием NO может привести к

ускоренному захвату статинов в гепатоцитах, где они оказывают свое фармакологическое действие.

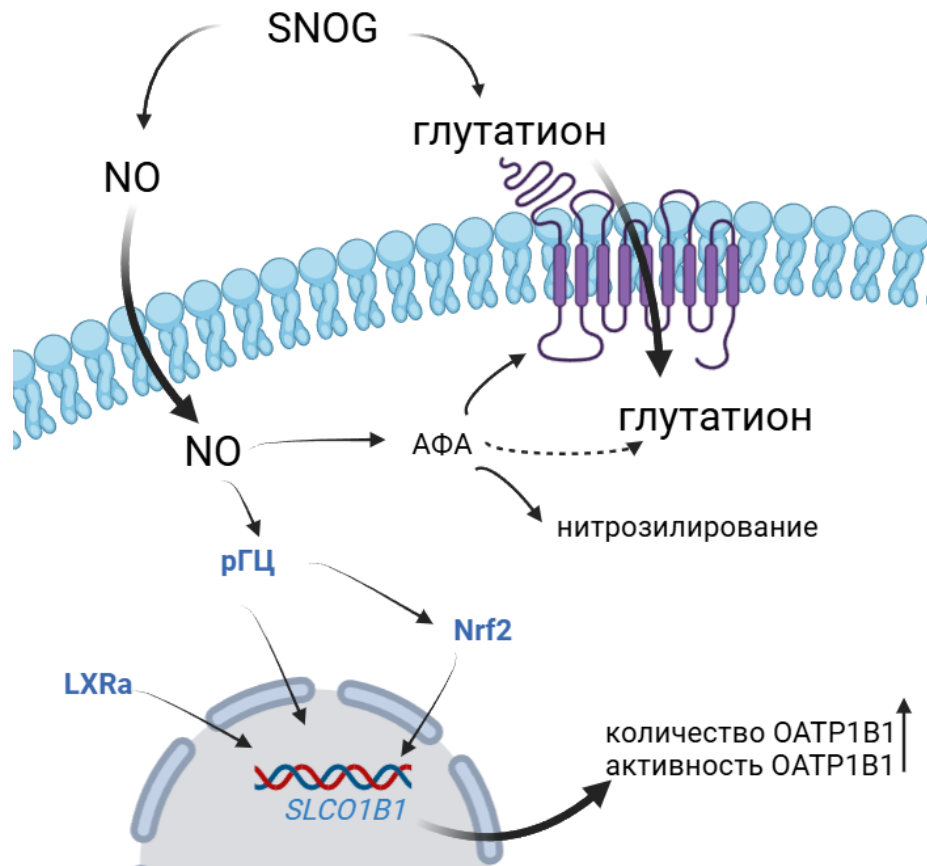


Рисунок 56 – Механизм воздействия S-нитрозоглутатиона на функционирование OATP1B1

Таким образом, исследование показало, что S-нитрозоглутатион не является субстратом OATP1B1, но стимулирует его экспрессию и активность. Стимулирующая регуляция OATP1B1 S-нитрозоглутатионом осуществляется через сигнальный путь NO-pGC, транскрипционный фактор Nrf2 и рецептор LXRα.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенного исследования на клетках линии HepG2 указывают на то, что S-нитрозоглутатион вне клеток подвергается метаболизму до оксида азота и глутатиона. Образующийся глутатион далее транспортируется в клетку при участии OATP1B1, где быстро расходуется, вероятно, на нейтрализацию активных форм азота/кислорода, тем самым при концентрациях S-нитрозоглутатиона 10-50 мкМ сдерживает развитие нитрозативного стресса. Концентрация S-нитрозоглутатиона 100 мкМ оказывала токсическое действие, что выражалось в нарушении гомеостаза между Bcl2 и Fas в сторону проапоптотического фактора, накоплении продуктов нитрозилирования и сопровождалось снижением жизнеспособности клеток.

В свою очередь NO проявляет регуляторное действие – активирует NO-pГЦ-сигнальный механизм и транскрипционный фактор Nrf2, которые способствуют экспрессии гена *SLCO1B1* и дальнейшей активации функционирования OATP1B1. Кроме этого, в условиях воздействия донора NO – S-нитрозоглутатиона регуляция OATP1B1 осуществлялась с помощью LXR α .

С другой стороны, NO может образовывать активные формы азота, что способствует нитрозилированию белковых молекул. Возможно, что нитрозилированию подвергался OATP1B1. Данный механизм может лежать в основе снижения активности OATP1B1 при сохранившейся экспрессии *SLCO1B1*.

Таким образом, оксид азота (II) участвует в регуляции функционирования OATP1B1 в клетках линии HepG2, что следует учитывать при назначении препаратов с NO-продуцирующим действием в сочетании с субстратами белка-транспортера OATP1B1.

ВЫВОДЫ

1. В клетках линии HepG2 S-нитрозоглутатион при экспозиции 3 ч (10-100 мкМ), 24 и 72 ч (1-100 мкМ) повышает содержание оксида азота (II). В высокой концентрации (100 мкМ) и воздействии в течение 24 и 72 ч донор NO оказывает цитотоксическое действие за счет снижения функциональной активности митохондрий, индукции нитрозативного стресса (повышение концентрации 3-нитротирозина и битирозина) и активации апоптоза (снижение уровней антиапоптотического белка Bcl2 и увеличение проапоптотического белка Fas). При всех сроках наблюдения (3, 24 и 72 ч) и концентрациях 1-50 мкМ донор NO активирует Nrf2, повышая его уровень в ядерной фракции клеток.

2. Полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 не участвует в переносе S-нитрозоглутатиона через мембраны клеток HEK293-SLCO1B1. Глутатион является субстратом OATP1B1.

3. S-нитрозоглутатион (10-100 мкМ) при экспозиции 24 и 72 ч увеличивает экспрессию гена *SLCO1B1* и уровень белка полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1. При кратковременном воздействии (3 ч) S-нитрозоглутатион (1-100 мкМ) не влияет на активность полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1, а при экспозиции 24 и 72 ч (10 и 50 мкМ) вызывает ее повышение.

4. В клетках линии HepG2 донор оксида азота (II) – S-нитрозоглутатион (10-100 мкМ) при сроке инкубации 24 и 72 ч повышает количество полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1, действуя через растворимую гуанилатциклазу.

5. Функционирование полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 10 и 50 мкМ и экспозиции 24 и 72 ч регулируется посредством Nrf2, а в концентрации 100 мкМ и длительности воздействия 72 ч через печеночный X рецептор подтип α в клетках линии HepG2.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Патологии, сопровождающиеся развитием нитрозативного стресса, могут вызывать снижение активности полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1, что необходимо учитывать при проведении терапии с применением субстратов полипептида.

2. Длительное воздействие S-нитрозоглутатиона (24 и 72 ч) в концентрациях 10-50 мкМ можно использовать в экспериментах *in vitro* как модель для индукции активности и количества полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1.

3. Растворимая гуанилатциклаза, Nrf2 и LXR α могут рассматриваться как мишени для модулирования активности полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. С целью подтверждения полученных результатов о влиянии S-нитрозоглутатиона на активность полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 необходимо выполнение клинических исследований с лекарственными препаратами – донорами NO или анализ активности полипептида при заболеваниях, сопровождающихся развитием нитрозативного стресса.

2. Для подтверждения влияния NO на функционирование полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 необходимо выполнение экспериментов с другими донорами NO на других линиях клеток печени (например, первичной культуре).

3. Учитывая выявленную возможную роль полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 в транспорте глутатиона при анализе проникновения S-нитрозоглутатиона через клеточные мембраны целесообразно выполнение отдельных экспериментов по оценке участия полипептида в транспорте глутатиона.

4. Целесообразна дальнейшая оценка роли других транспортеров суперсемейства SLC в трансмембранном переносе S-нитрозоглутатиона и глутатиона.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АА – акриламид

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

ГБ – гепатобластома

ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома

ДМСО – диметилсульфоксид

ДТНБ – 5,5'-дитиобис-(2-нитробензойная) кислота

ММП-9 – матриксные металлопротеиназы 9

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид

рГЦ – растворимая гуанилатциклаза

ФДЭ – фосфодиэстераза

ФНО – фактор некроза опухоли

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЦОГ-2 – циклооксигеназа-2

АВС-транспортеры – АТФ-связывающие кассетные транспортеры (*англ.: ATP-binding cassette*)

АЕМ1 – N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин

Akt – протеинкиназа В (*англ.: RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*)

APS – персульфат аммония (*англ.: ammonium persulfate*)

Bcl-2 – антиапоптотический белок Bcl2 (*англ.: apoptosis regulator*)

CYP – цитохром P450 (*англ.: cytochrome P450*)

Caco-2 – клетки линии аденокарциномы ободочной кишки человека (*англ.: Cancer coli*)

Drp1 – динамин-связанный белок 1 (*англ.: dynamin-related protein*)

ED1 – эктодисплазин 1 (*англ. ectodysplasin 1*)

EGFR – рецептор эпидермального фактора роста (*англ.: epidermal growth factor receptor*)

Fas – проапоптотический белок

FXR – фарнезоидный X рецептор (*англ.: farnesoid X receptor*)

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

GSH – восстановленный глутатион

GSNHOH – N-гидроксисульфенамидоглутатион

GSSG – дисульфид глутатиона

HEK293 – клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека (*англ.: human embryonic kidney 293*)

HepG2 – клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека (*англ.: hepatocellular carcinoma*)

HNFs – гепатический ядерный фактор (*англ.: hepatocyte nuclear factors*)

ICAM-1 – молекула клеточной адгезии (*англ.: Inter-Cellular Adhesion Molecule 1*)

IGF-1R – рецептор инсулинзависимого фактора роста (*англ.: insulin-like growth factor 1 receptor*)

iNOS – индуцибельная NO-синтаза

JNK – c-Jun-N-терминальная киназа (*англ.: c-Jun N-terminal kinases*)

L-CysNO – S-нитрозо-L-цистеин

LXR α – печеночный рецептор X подтип альфа (*англ.: liver X receptor*)

MATEs – транспорт лекарственных средств и токсинов (*англ.: multi-antimicrobial extrusion protein*)

MFS – основное семейство фасилитаторов (*англ. major facilitator superfamily*)

Nf-kb – ядерный фактор kB (*англ.: nuclear factor kB*)

NO – оксид азота (II)

NOS – синтаза оксида азота (*англ.: NO- synthase*)

Nrf2 – ядерный фактор эритроидного происхождения (*англ.: nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

NSF – чувствительный к N-этилмалеимиду фактор (*англ.: N-ethylmaleimide-sensitive factor*)

- OATPs – органические анионотранспортирующие полипептиды (*англ.: organic-anion-transporting polypeptides*)
- OATs – переносчики органических анионов (*англ.: organic anion carriers*)
- OCT – переносчики органических катионов (*англ.: organic cation transporter*)
- OCTNs – переносчики органических катионов/карнитина (*англ.: organic zwitterion/cation transporters*)
- ODQ – 1H-[1,2,4]оксадиазоло-[4,3-а]хиноксалин-1-ОН
- ONOO⁻ – пероксинитрит
- OATP1B1 – полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (*англ.: organic anion transporting polypeptide 1B1*)
- PEPTs – переносчики пептидов (*англ.: peptide transporter*)
- PI3K – фосфоинозитол-3-киназа (*англ.: phosphoinositide 3-kinases*)
- PXR – прегнан X рецептор (*англ.: pregnane X receptor*)
- SDS – натрия додецилсульфат (*англ.: sodium dodecyl sulfate*)
- SLC – суперсемейство переносчиков растворенных веществ (*англ.: superfamily of solute carriers,*)
- SNO – S-нитрозотиол
- SNOG – S-нитрозоглутатион
- SNOGR – S-нитрозоглутатион-редуктаза
- STAT – преобразователь сигналов и активатор транскрипции (*англ.: signal transducer and activator of transcription, 3*)
- TEMED – тетраметилэтилендиамин (*англ.: tetramethylethylenediamine*)
- TERT – теломераза обратной транскриптазы (*англ.: telomerase reverse transcriptase*)
- TFCA – N-(4-трифторметилфенил) 3,4-диметоксициннамамид
- TGF-β – трансформирующий фактор роста-бета (*англ.: transforming growth factor beta*)
- TMB – трансмембранный домен (*англ.: transmembrane domain*)
- TRAIL-R1 – фактор некроза опухоли, индуцирующий лиганд апоптоза (*англ.: tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand 1*)
- XIAP – протеиндисульфидизомераза, X-связанный ингибитор апоптоза (*англ.: X-linked inhibitor of apoptosis protein*)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.

2. Абаленихина, Ю.В. Регуляция функционирования Р-гликопротеина в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*: специальность 1.5.4. «Биохимия»: диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Абаленихина Юлия Владимировна; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. - Рязань, 2022. - 249 с. – Текст : непосредственный.

3. Ананьева, П.Д. Оценка принадлежности этилметилгидроксипиридина сукцината к субстратам и модуляторам активности OATP1B1 3.3.6. «Фармакология. Клиническая фармакология (медицинские науки)»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Ананьева Пелагея Дмитриевна: ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. - Рязань, 2024. - 119 с. – Текст: непосредственный.

4. Белки семейства p53 в ответе опухолевых клеток на ионизирующее излучение: развитие проблемы / О.А. Кучур, Д.О. Кузьмина, М.С. Духинова [и др.]. – Текст : непосредственный // Acta Naturae. – 2021. – Т. 13, № 3 (50). – С. 65-76.

5. Ванин, А.Ф. Влияние экзогенного и эндогенного оксида азота на организм человека и животных / А.Ф. Ванин. – Текст : непосредственный // Пульмонология. – 2024. – Т. 34, № 3. – С. 311-325.

6. Влияние донора NO нитрозотиола глутатиона на уровень окислов азота и малонового диальдегида в крови крыс / Л.Ю. Каминская, А.А. Жлоба, Л.А. Александрова [и др.]. – Текст : непосредственный // Артериальная гипертензия. – 2005. – Т. 11, № 1. – С. 5-9.

7. 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.

8. Влияние оксида азота на функционирование белка-транспортера гликопротеина-P / Ю.В. Абаленихина, Е.А. Судакова, А.А. Слепнев [и др.]. – Текст : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 173. № 1. – С. 38-42.

9. 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

10. Евтеев, В.А. МАТЕ-транспортеры: участие в фармакокинетике лекарственных средств и межлекарственных взаимодействиях / В.А. Евтеев, А.Б. Прокофьев, Н.Д. Бунятян, В.Г. Кукес. – Текст : непосредственный // Фармация. – 2019. – Т. 68, № 7. – С. 44-47.

11. Ерохина, П.Д. Разработка и валидация методики количественного определения аторвастатина в клетках линии HepG2 методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / П.Д. Ерохина, П.Ю. Мыльников, С.О. Ганина [и др.] – Текст : непосредственный // Российский медикобиологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2022. – Т.30. №2. – С. 149-158.

12. Изменение относительного количества белка-транспортера OATP1B1 при воздействии S-нитрозоглутатиона *in vitro*. / О.Н. Сучкова, Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин [и др.]. – Текст: непосредственный // Прикладные информационные аспекты медицины. – 2024. – Т. 27. № 3. – С. 44-50.

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

14. Индуцирующее влияние S-нитрозоглутатиона на экспрессию и активность полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 (OATP1B1) в клетках линии HepG2 / О.Н. Сучкова, Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин [и др.]. – Текст : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2025. –

Т. 70. № 1. – С. 1-8.

15. Калинина, Е.В. S-глутатионирование и S-нитрозилирование как модуляторы редокс-зависимых процессов в опухолевой клетке / Е.В. Калинина, М.Д. Новичкова. – Текст : непосредственный // Биохимия. – 2023. – Т. 88, № 7. – С. 1137-1161.

16. Калинина, Е.В. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов / Е. В. Калинина, Н.Н. Чернов, М.Д. Новичкова. – Текст : непосредственный // Успехи биологической химии. – 2014. – Т. 54. – С. 299-348.

17. Катенин-β: структура, функции и роль в опухолевой трансформации эпителиальных клеток / А.В. Исаева, А.П. Зима, И.П. Шабалова [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. – 2015. – Т. 70, № 4. – С. 475-483.

18. Механизмы регуляции функционирования белка-транспортера Р-гликопротеина под действием оксида азота / А.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина, Е.А. Судакова [и др.]. – Текст: непосредственный // Биохимия. – 2022. – Т. 87. № 4. – С. 523-538.

19. Нитрозоглутатион как индуктор нитрозативного стресса и апоптоза / О.Н. Сучкова, Ю.В. Абаленихина, Е.В. Костюкова [и др.]. – Текст: непосредственный // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2024. – Т. 27. № 9. – С. 50-56.

20. Общая фармакопейная статья. Электрофорез в полиакриламидном геле (утв. и введена в действие Приказом Минздрава России от 31.10.2018 N 749) ОФС.1.2.1.0023.15. ("Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV издание. Том I")

21. Повышение экспрессии генов аутофагии и Nrf2-зависимого сигнального пути новыми монофенольными антиоксидантами зависит от их структуры / С.Е. Храпов, П.М. Кожин, М.В. Храпова [и др.]. – Текст : непосредственный // Сибирский научный медицинский журнал. – 2021. – Т. 41, № 3. – С. 25-31.

22. Подавление антиоксидантной системы и сигнального пути

PI3K/AKT/MTOR в резистентных к цисплатину опухолевых клетках при действии кверцетина / А.А.Ш. Хасан, Е.В. Калинина, В.В. Татарский [и др.]. – Текст : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 173, № 6. – С. 748-753.

23. Противоопухолевая активность динитрозильного комплекса железа на клетках множественной миеломы / Н.П. Акентьева, Н.А. Санина, Т.Р. Приходченко [и др.]. – Текст : непосредственный // Доклады Академии наук. – 2019. – Т. 486, №6. – С. 742-747.

24. Пугаченко, И.С. Влияние метаболитов оксида азота на окислительную модификацию белков и липидов : специальность 1.5.4. «Биохимия»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / И.С. Пугаченко – Текст : непосредственный // ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН». – 2023. – С. 186.

25. Путинцева, О.В. S-нитрозоглутатион в высоких концентрациях ингибирует кислородсвязывающую функцию оксигемоглобина человека / О.В. Путинцева, Е.А. Калаева, В.Г. Артюхов, Е.В. Гостева. – Текст : непосредственный // Вестник ВГУ, серия: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – № 4. – С. 66-72.

26. Регуляция печеночных транспортеров OATP1A2 И OATP1B1 под действием оксида азота (II) / Ю.В. Абаленихина, О.Н. Сучкова, Е.В. Костюкова [и др.]. – Текст: непосредственный // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2024. – № 7 (227). – С. 114-121.

27. Роль Р-гликопротеина в ограничении проницаемости клеточных мембран при окислительном стрессе / А.В. Шулькин, Ю.В. Абаленихина, И.В. Черных [и др.]. – Текст: непосредственный // Биохимия. – 2021. – Т. 86. №2. – С. 236-237.

28. Роль оксида азота в процессах свободнорадикального окисления / А.Г. Соловьева, В.Л. Кузнецова, С.П. Перетягин [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2016. – Т. 1 (53). – С. 228-233.

29. Роль трансформирующего фактора роста бета в опухолевом процессе / В.Г. Кулес, А.Б. Прокофьев, О.К. Парфенова [и др.]. – Текст : непосредственный //

Человек и его здоровье. – 2021. – Т. 24, № 3. – С. 61-69.

30. Сеидкулиева А.А. Влияние пероксида водорода и S-нитрозоглутатиона на функционирование прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора 1.5.4. «Биохимия»: диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Сеидкулиева Адамиана Аманмамедовна: ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. - Рязань, 2023. - 142 с. – Текст: непосредственный.

31. Смирнов, Л.П. Белки-транспортёры органических катионов семейства SLC22 (OCT-OCTN). Молекулярное разнообразие, структура, функция, участие в функционировании в системе межорганной коммуникации у животных (обзор) / Л.П. Смирнов. – Текст : непосредственный // Труды Карельского научного центра РАН. – 2018. – № 12. – С. 3-19.

32. Смирнов, Л.П. Транспортёры органических анионов (OATP). Свойства, структура, участие в процессах биотрансформации (Обзор) / Л. П. Смирнов, И. В. Суховская, Е.В. Борвинская. – Текст : непосредственный // Труды Карельского научного центра РАН. – 2017. – № 12. – С. 43-56.

33. Создание клеточной линии, селективно продуцирующей функционально активный транспортёр OATP1B1 / М. С. Котлярова, А. В. Щулькин, П. Д. Ерохина [и др.]. – Текст : непосредственный // Биохимия. – 2023. – Т. 88, № 9. – С. 1536-1544.

34. Судакова, Е.А. Влияние донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона на функционирование Р-гликопротеина *in vitro* : специальность 1.5.4. «Биохимия» : диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук / Судакова Елена Александровна; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России. - Рязань, 2022. - 113 с. – Текст : непосредственный.

35. Сучкова, О.Н. Участие NO-ГЦ-сигнального пути и Nrf2 в индукции количества белка-транспортёра OATP1B1 при кратковременном воздействии S-нитрозоглутатиона / О.Н. Сучкова, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин – Текст : непосредственный // Альманах молодой науки. – 2024. – Т.52, № 1. – С. 83-84.

36. Тимошин, А.А. Соединения на основе природных стабилизированных форм оксида азота как перспективные лекарственные средства / А.А. Тимошин,

В.Л. Лакомкин, А.А. Абрамов, Э.К. Рууге – Текст : непосредственный // Кариологический вестник. – 2023. – Т.18, №2-2. – С. 26

37. Функционирование преганн X рецептора в условиях окислительного стресса / Ю.В. Абаленихина, Е.А. Судакова, А.А. Слепнев [и др.]. – Текст : непосредственный // Биологические мембраны. – 2022. – Т. 39. № 2. – С. 107-115.

38. Шиловский, Г.А. Лабильность защитной системы клетки Nrf2/Keap/ARE в различных моделях клеточного старения и возрастных патологиях / Г.А. Шиловский. – Текст : непосредственный // Биохимия. – 2022. – Т. 87, вып. 1. – С. 86-103.

39. Штиль, А.А. Эпигенетическая регуляция множественной лекарственной устойчивости в опухолевых клетках: передача сигналов, транскрипционная активация и возможности профилактики / А.А. Штиль. – Текст : непосредственный // Успехи современной биологии. – 2001. – Т. 121, № 6. – С. 563-575.

40. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2) / B. Hsiang, Y. Zhu, Z. Wang [et al.]. – Text : visual // Journal of Biological Chemistry. – 1999. – Vol. 274. – P. 37161-37168.

41. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane / J. König, Y. Cui, A. T. Nies [et al.]. – Text : visual // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. – 2000. – Vol. 278, № 1. – P. 156-164.

42. A Protective Role of the NRF2-Keap1 Pathway in Maintaining Intestinal Barrier Function / Z. Wen, W. Liu, X. Li [et al.]. – Text : visual // Oxidative Medicine and Cellular Longevity. – 2019. – Vol. 2019. – P. 1759149.

43. A Small Molecule Inhibits Deregulated NRF2 Transcriptional Activity in Cancer / M.J. Bollong, H. Yun, L. Sherwood [et al.]. – Text : visual // ACS Chemical Biology. – 2015. – Vol. 10, № 10. – P. 2193-2198.

44. A state-of-the-art review on the NRF2 in Hepatitis virus-associated liver cancer / L. Kalantari, Z. R. Ghotbabadi, A. Gholipour [et al.]. – Text : visual // Cell Communication and Signaling. – 2023. – Vol. 21, № 1. – P. 318.

45. Abe, T. Organic anion transporting polypeptides: roles in drug disposition and

toxicity / T. Abe, B. Hsiang, J. Konig. – Text: visual // Drug Metabolism Reviews. – 1999–2000. – Vol. 31. – P. 1-15.

46. Activation of MTOR Signaling Pathway in Hepatocellular Carcinoma / G. Ferrín, M. Guerrero, V. Amado [et al.]. – Text : visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21, № 4. – P. 1266.

47. Alam, A. Structure and Mechanism of Human ABC Transporters / A. Alam, K.P. Locher. – Text : visual // Annu Rev Biophys. – 2023. – Vol. 52. – P. 275-300.

48. Alkaloids as Natural NRF2 Inhibitors: Chemoprevention and Cytotoxic Action in Cancer / D. Gjorgieva Ackova, V. Maksimova, K. Smilkov [et al.]. – Text : visual // Pharmaceuticals. – 2023. – Vol. 16, № 6. – P. 850.

49. Amadò, R. Dityrosine: in vitro production and characterization / R. Amadò, R. Aeschbach, H. Neukom. – Text : visual // Methods in Enzymology. – 1984. – Vol. 107. – P. 377-388.

50. An enzyme assisted RP-RPLC approach for in-depth analysis of human liver phosphoproteome / Y. Bian, C. Song, K. Cheng [et al.]. – Text : visual // Journal of Proteomics. – 2014. – Vol. 96. – P. 253-262.

51. Analysis of Genomes and Transcriptomes of Hepatocellular Carcinomas Identifies Mutations and Gene Expression Changes in the Transforming Growth Factor- β Pathway / J. Chen, S. Zaidi, S. Rao [et al.]. – Text : visual // Gastroenterology. – 2018. – Vol. 154. – P. 195-210.

52. Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications / A. Raghunath, K. Sundarraj, R. Nagarajan [et al.]. – Text : visual // Redox Biology. – 2018. – Vol. 17. – P. 297-314.

53. Application of Evolving Computational and Biological Platforms for Chemical Safety Assessment / R.S. Settivari, J.C. Rowlands, D.M. Wilson [et al.]. – Text : visual // In: A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development / A. S. Faqi, Ed. – 2nd ed. – Boston, MA: Academic Press, 2017. – P. 843-873.

54. Arzumanian, V.A. The Curious Case of the HepG2 Cell Line: 40 Years of Expertise / V.A. Arzumanian, O.I. Kiseleva, E.V. Poverennaya. – Text : visual // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22, № 23. – P. 13135.

55. Avci, D. Clipping or extracting: Two ways to membrane protein degradation / D. Avci, M.K. Lemberg. – Text : visual // *Trends Cell Biol.* – 2015. – Vol. 25. – P. 611-622.

56. Balcerzyk, A. On the specificity of 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein as a probe for nitric oxide / A. Balcerzyk, M. Soszynski, G. Bartosz. – Text : visual // *Free Radical Biology and Medicine.* – 2005. – Vol. 39, № 3. – P. 327-335.

57. Banerjee, N. Differential role of organic anion-transporting polypeptides in estrone-3-sulphate uptake by breast epithelial cells and breast cancer cells / N. Banerjee, C. Allen, R. Bendayan. – Text : visual // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* – 2012. – Vol. 342, № 2. – P. 510-519.

58. Barnett, S.D. The role of S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) in human disease and therapy / S.D. Barnett, I.L.O. Buxton. – Text : visual // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* – 2017. – Vol. 52, № 3. – P. 340-354.

59. Berberine Promotes OATP1B1 Expression and Rosuvastatin Uptake by Inducing Nuclear Translocation of FXR and LXR α / M. Liu, D. Zhu, J. Wen [et al.]. – Text : visual // *Frontiers in Pharmacology.* – 2020. – Vol. 11. – P. 375.

60. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration / G. Ferrer-Sueta, N. Campolo, M. Trujillo [et al.]. – Text : visual // *Chemical Reviews.* – 2018. – Vol. 118, № 3. – P. 1338-1408.

61. Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: Inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil / A. Treiber, R. Schneider, S. Hausler, [et al.]. – Text : visual // *Drug Metabolism and Disposition.* – 2007. – Vol. 35. – P. 1400-1407.

62. 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 // *Analytical Biochemistry.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.

63. 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.

64. Broniowska, K.A. The chemical biology of S-nitrosothiols / K.A. Broniowska, N. Hogg. – Text : visual // *Antioxid Redox Signal*. – 2012. – Vol. 17, № 7. – P. 969-980.
65. Buffer concentration dramatically affects the stability of S-nitrosothiols in aqueous solutions / W. Li, D. Wang, K.U. Lao, [et al.]. – Text : visual // *Nitric Oxide*. – 2022. – Vol. 118. – P. 59-65.
66. Bukowski, K. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy / K. Bukowski, M. Kciuk, R. Kontek. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21, № 9. – P. 3233.
67. Calkin, A. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR / A. Calkin, P. Tontonoz. – Text : visual // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2012. – Vol. 13. – P. 213-224.
68. Cevik, D. Common telomerase reverse transcriptase promoter mutations in hepatocellular carcinomas from different geographical locations / D. Cevik, G. Yildiz, M. Ozturk. – Text : visual // *World Journal of Gastroenterology*. – 2015. – Vol. 21. – P. 311-317.
69. Changes to Hepatocyte Ploidy and Binuclearity Profiles during Human Chronic Viral Hepatitis / H. Toyoda, O. Bregerie, A. Vallet [et al.]. – Text : visual // *Gut*. – 2005. – Vol. 54. – P. 297-302.
70. Characterization of the human OATP-C (SLC21A6) gene promoter and regulation of liver-specific OATP genes by hepatocyte nuclear factor 1alpha / D. Jung, B. Hagenbuch, L. Gresh [et al.]. – Text : visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276. – P. 37206-37214.
71. Chen, J. Immunomodulatory TGF- β Signaling in Hepatocellular Carcinoma / J. Chen, J. A. Gingold, X. Su. – Text: visual // *Trends in Molecular Medicine*. – 2019. – Vol. 25, № 11. – P. 1010-1023.
72. Choi, M.S. Pathophysiological Role of S-Nitrosylation and Transnitrosylation Depending on S-Nitrosoglutathione Levels Regulated by S-Nitrosoglutathione Reductase / M.S. Choi. – Text : visual // *Biomolecules & Therapeutics*. – 2018. – Vol. 26, № 6. – P. 533--538.
73. Cinnamamides, novel liver X receptor antagonists that inhibit ligand-induced

lipogenesis and fatty liver / W.C. Sim, D.G. Kim, K.J. Lee [et al.]. – Text : visual // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2015. – Vol. 355, № 3. – P. 362-369.

74. Comparative Proteomic Analysis of Human Liver Tissue and Isolated Hepatocytes with a Focus on Proteins Determining Drug Exposure / A. Vildhede, J. R. Wiśniewski, A. Norén [et al.]. – Text : visual // Journal of Proteome Research. – 2015. – Vol. 14. – P. 3305-3314.

75. Comparing Various In Vitro Prediction Criteria to Assess the Potential of a New Molecular Entity to Inhibit Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 / J. Vaidyanathan, K. Yoshida, V. Arya, [et al.]. – Text : visual // Journal of Clinical Pharmacology. – 2016. – Vol. 56, Suppl. 7. – P. S59-S72.

76. Comparison of chloroquine-like molecules for lysosomal inhibition and measurement of autophagic flux in the brain / C. Fourrier, V. Bryksin, K. Hattersley [et al.]. – Text : visual // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2021. – Vol. 534. – P. 107-113.

77. Complete OATP1B1 and OATP1B3 deficiency causes human Rotor syndrome by interrupting conjugated bilirubin reuptake into the liver / E. van de Steeg, V. Stránecký, H. Hartmannová [et al.]. – Text : visual // Journal of Clinical Investigation. – 2012. – Vol. 122, № 2. – P. 519-528.

78. Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans / M. Hirano, K. Maeda, Y. Shitara [et al.]. – Text : visual // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2004. – Vol. 311. – P. 139-146.

79. Cvek, B. The ubiquitin-proteasome system (UPS) and the mechanism of action of bortezomib / B. Cvek, Z. Dvorak. – Text : visual // Current Pharmaceutical Design. – 2011. – Vol. 17. – P. 1483-1499.

80. CYP3A5 Functions as a Tumor Suppressor in Hepatocellular Carcinoma by Regulating MTORC2/Akt Signaling / F. Jiang, L. Chen, Y.C. Yang [et al.]. – Text : visual // Cancer Research. – 2015. – Vol. 75. – P. 1470-1481.

81. Danish register-based study on the association between specific cardiovascular

drugs and fragility fractures / M. Torstensson, A.H. Hansen, K. Leth-Møller [et al.]. – Text : visual // *BMJ Open*. – 2015. – Vol. 5. – P. e009522.

82. deBoer, T.R. Peroxynitrite-Mediated Dimerization of 3-Nitrotyrosine: Unique Chemistry along the Spectrum of Peroxynitrite-Mediated Nitration of Tyrosine / T.R. deBoer, R.I. Palomino, P.K. Mascharak. – Text : visual // *Medical One*. – 2019. – Vol. 4. – P. e190003.

83. Diagnostic and pathogenetic implications of the expression of hepatic transporters in focal lesions occurring in normal liver / S. Vander Borgh, L. Libbrecht, H. Blokzijl [et al.]. – Text : visual // *Journal of Pathology*. – 2005. – Vol. 207. – P. 471-482.

84. Differential expression of glutamine synthetase and cytochrome P450 isoforms in human hepatoblastoma / A. Schmidt, A. Braeuning, P. Ruck [et al.]. – Text : visual // *Toxicology*. – 2011. – Vol. 281. – P. 7-14.

85. Differential regulation of drug transporter expression by all-trans retinoic acid in hepatoma HepaRG cells and human hepatocytes / M. Le Vee, E. Jouan, B. Stieger [et al.]. – Text : visual // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2013. – Vol. 48. – P. 767-774.

86. Donato, M.T. Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells / M.T. Donato, L. Tolosa, M.J. Gómez-Lechón. – Text : visual // *Methods in Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 1250. – P. 77-93.

87. Downregulation of organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1 transport function by lysosomotropic drug chloroquine: Implication in OATP-mediated drug-drug interactions / K. Alam, S. Pahwa, X. Wang [et al.]. – Text : visual // *Molecular Pharmaceutics*. – 2016. – Vol. 13. – P. 839-851.

88. Drew, D. Shared molecular mechanisms of membrane transporters / D. Drew, O. Boudker. – Text : visual // *Annual Review of Biochemistry*. – 2016. – Vol. 85. – P. 543-572.

89. Drug Transporter Expression and Activity in Human Hepatoma HuH-7 Cells / E. Jouan, M. Le Vée, C. Denizot [et al.]. – Text : visual // *Pharmaceutics*. – 2016. – Vol. 9, № 1. – P. 3.

90. Effect of OATP1B1 genotypes on plasma concentrations of endogenous OATP1B1 substrates and drugs, and their association in healthy volunteers / D. Mori, Y. Kashihara, T. Yoshikado [et al.]. – Text : visual // Drug Metabolism and Pharmacokinetics. – 2019. – Vol. 34. – P. 78-86.

91. Effects of nitric oxide donor S-nitrosoglutathione on apoptosis of apheresis platelets / X. Zhang, S. Yu, G. Deng [et al.]. – Text : visual // Hematology. – 2018. – Vol. 23, № 8. – P. 574-580.

92. Ellman, G. L. Tissue sulfhydryl groups / G. L. Ellman. – Text : visual // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 1959. – Vol. 82, № 1. – P. 70–77.

93. Evaluation of Parent- and Metabolite-Induced Mitochondrial Toxicities Using CYP-Introduced HepG2 Cells / A. Takemura, S. Gong, T. Sato [et al.]. – Text : visual // Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2021. – Vol. 110. – P. 3306-3312.

94. Evidence for an Allosteric S-Nitrosoglutathione Binding Site in S-Nitrosoglutathione Reductase (GSNOR) / K. Fontana, N. Onukwue, B. L. Sun [et al.]. – Text : visual // Antioxidants. – 2019. – Vol. 8, № 11. – P. 545.

95. Functional analysis of the extracellular cysteine residues in the human organic anion transporting polypeptide, OATP2B1 / E. Hänggi, A. F. Grundschober, S. Leuthold [et al.]. – Text : visual // Molecular Pharmacology. – 2006. – Vol. 70, № 3. – P. 806-817.

96. Functional expression of sinusoidal drug transporters in primary human and rat hepatocytes / E. Jigorel, M. Le Vee, C. Boursier-Neyret [et al.]. – Text : visual // Drug Metabolism and Disposition. – 2005. – Vol. 33. – P. 1418-1422.

97. Functional Pharmacogenetics / Genomics of Human Cytochromes P450 Involved in Drug Biotransformation / U.M. Zanger, M. Turpeinen, K. Klein [et al.]. – Text : visual // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2008. – Vol. 392. – P. 1093-1108.

98. Fundamental Mechanisms of the Cell Death Caused by Nitrosative Stress / F. Wang, Q. Yuan, F. Chen [et al.]. – Text : visual // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2021. – Vol. 9. – P. 742483.

99. Fusion of HepG2 Cells with Mesenchymal Stem Cells Increases Cancer-Associated and Malignant Properties: An in Vivo Metastasis Model / H. Li, Z. Feng, T.

- C. Tsang [et al.]. – Text : visual // *Oncology Reports*. – 2014. – Vol. 32. – P. 539-547.
100. Goshi, E. Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo / E. Goshi, G. Zhou, Q. He. – Text : visual // *Medical Gas Research*. – 2019. – Vol. 9, № 4. – P. 192-207.
101. Gui, C. Role of transmembrane domain 10 for the function of organic anion transporting polypeptide 1B1 / C. Gui, B. Hagenbuch. – Text : visual // *Protein Science*. – 2009. – Vol. 18. – P. 2298-2306.
102. Hagenbuch, B. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: Phylogenetic classification as OATP/SLCO super-family, new nomenclature and molecular/functional properties / B. Hagenbuch, P.J. Meier. – Text : visual // *Pflügers Archiv*. – 2004. – Vol. 447. – P. 653-665.
103. Hagenbuch, B. The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters / B. Hagenbuch, B. Stieger. – Text : visual // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2013. – Vol. 34, № 2–3. – P. 396-412.
104. Hagenbuch, B. The superfamily of organic anion transporting polypeptides / B. Hagenbuch, P.J. Meier. – Text : visual // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2003. – Vol. 1609, № 1. – P. 1-18.
105. Hagenbuch, B. Xenobiotic transporters of the human organic anion transporting polypeptides (OATP) family / B. Hagenbuch, C. Gui. – Text : visual // *Xenobiotica*. – 2008. – Vol. 38, № 7–8. – P. 778-801.
106. Henderson, R. K. Coupling efficiency of secondary active transporters / R. K. Henderson, K. Fendler, B. Poolman. – Text : visual // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2019. – Vol. 58. – P. 62-71.
107. Hepatic uptake of bilirubin and its conjugates by the human organic anion transporter SLC21A6 / Y. Cui, J. König, I. Leier [et al.]. – Text : visual // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – Vol. 276. – P. 9626-9630.
108. Hepatocellular carcinoma: hepatocyte-selective enhancement at gadoxetic acid-enhanced MR imaging – correlation with expression of sinusoidal and canalicular transporters and bile accumulation / T. Tsuboyama, H. Onishi, T. Kim [et al.]. – Text : visual // *Radiology*. – 2010. – Vol. 255. – P. 824-833.

109. HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics / J.M. Choi, S.J. Oh, S.Y. Lee [et al.]. – Text : visual // Archives of Pharmacal Research. – 2015. – Vol. 38, № 5. – P. 691-704.

110. HepG2 is a hepatoblastoma-derived cell line / D. López-Terrada, S.W. Cheung, M.J. Finegold [et al.]. – Text : visual // Human Pathology. – 2009. – Vol. 40, № 10. – P. 1512-1515.

111. Hep-tamethine carbocyanine dye-mediated near-infrared imaging of canine and human cancers through the HIF-1 α /OATPs signaling axis / C. Shi, J.B. Wu, G.C. Chu [et al.]. – Text : visual // Oncotarget. – 2014. – Vol. 5, № 20. – P. 10114-10126.

112. Hershko, A. The ubiquitin system / A. Hershko, A. Ciechanover. – Text : visual // Annual Review of Biochemistry. – 1998. – Vol. 67. – P. 425-479.

113. Hershko, A. The ubiquitin system for protein degradation / A. Hershko, A. Ciechanover. – Text : visual // Annual Review of Biochemistry. – 1992. – Vol. 61. – P. 761-807.

114. 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 // British Journal of Pharmacology. – 1998. – Vol. 125. – P. 1158-1163.

115. Identifying novel inhibitors for hepatic organic anion transporting polypeptides by machine learning-based virtual screening / A. Tuerkova, B.J. Bongers, U. Norinder [et al.]. – Text : visual // Journal of Chemical Information and Modeling. – 2022. – Vol. 62. – P. 6323-6335.

116. Impact of Pineapple Juice on Expression of CYP3A4, NAT2, SULT1A1 and OATP1B1 mRNA in HepG2 Cells / W. Chatuphonprasert, W. Tukum-Mee, J. Wattanathorn [et al.]. – Text : visual // Pakistan Journal of Biological Sciences. – 2022. – Vol. 25, № 1. – P. 15-22.

117. In-Depth Quantitative Analysis and Comparison of the Human Hepatocyte and Hepatoma Cell Line HepG2 Proteomes / J.R. Wiśniewski, A. Vildhede, A. Norén [et al.]. – Text : visual // Journal of Proteomics. – 2016. – Vol. 136. – P. 234-247.

118. Influence of Cation Transporters (OCTs and MATEs) on the Renal and

Hepatobiliary Disposition of [¹¹C] Metoclopramide in Mice / I. Hernández-Lozano, S. Mairinger, M. Sauberer [et al.]. – Text : visual // *Pharmaceutical Research*. – 2021. – Vol. 38, № 1. – P. 127-140.

119. Interaction of Mitochondrial and Epigenetic Regulation in Hepatocellular Carcinoma / V.C. De Sánchez, E. Chávez, G. Velasco-Loyden [et al.]. – Text : visual // *Liver Cancer*. – London, UK: IntechOpen, 2016. – P. 13.

120. Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver / S.R. Vavricka, J. Van Montfoort, H.R. Ha [et al.]. – Text : visual // *Hepatology*. – 2002. – Vol. 36. – P. 164-172.

121. Involvement of multiple transporters in the hepatobiliary transport of rosuvastatin / S. Kitamura, K. Maeda, Y. Wang, [et al.]. – Text : visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2008. – Vol. 36. – P. 2014-2023.

122. Involvement of PI3K/Akt, ERK and P38 Signaling Pathways in Emodin-Mediated Extrinsic and Intrinsic Human Hepatoblastoma Cell Apoptosis / Y. Cui, P. Lu, G. Song [et al.]. – Text : visual // *Food and Chemical Toxicology*. – 2016. – Vol. 92. – P. 26-37.

123. Involvement of transporters in the hepatic uptake and biliary excretion of valsartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor, in humans / W. Yamashiro, K. Maeda, M. Hirouchi [et al.]. – Text : visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2006. – Vol. 34. – P. 1247-1254.

124. Iwakiri, Y. Nitric oxide in liver diseases / Y. Iwakiri, M. Y. Kim. – Text : visual // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2015. – Vol. 36, № 8. – P. 524-536.

125. Jardetzky, O. Simple allosteric model for membrane pumps / O. Jardetzky. – Text : visual // *Nature*. – 1966. – Vol. 211. – P. 969-970.

126. Jetter, A. Drugs and hepatic transporters: A review / A. Jetter, G. A. Kullak-Ublick. – Text : visual // *Pharmacological Research*. – 2020. – Vol. 154. – P. 104234.

127. Kalliokoski, A. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics / A. Kalliokoski, M. Niemi. – Text : visual // *British Journal of Pharmacology*. – 2009. – Vol. 158. – P. 693-705.

128. Kane, M. Simvastatin Therapy and SLCO1B1 Genotype / M. Kane. – Text :

visual // Medical Genetics Summaries. – 2024. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK385569/>.

129. Kimoto, E. Mechanistic Evaluation of the Complex Drug-Drug Interactions of Maraviroc: Contribution of Cytochrome P450 3A, P-Glycoprotein and Organic Anion Transporting Polypeptide 1B1 / E. Kimoto, M. Vourvahis, R.J. Scialis. – Text : visual // Drug Metabolism and Disposition. – 2019. – Vol. 47. – P. 493-503.

130. Kinetic analysis of DAF-FM activation by NO: toward calibration of a NO-sensitive fluorescent dye / S. M. Namin, S. Nofallah, M. S. Joshi [et al.]. – Text : visual // Nitric Oxide. – 2013. – Vol. 28. – P. 39-46.

131. Knowles, B. B. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen / B.B. Knowles, C.C. Howe, D.P. Aden. – Text : visual // Science. – 1980. – Vol. 209, № 4455. – P. 497-499.

132. Koesling, D. Physiological Functions of NO-Sensitive Guanylyl Cyclase Isoforms / D. Koesling, E. Mergia, M. Russwurm. – Text : visual // Current Medicinal Chemistry. – 2016. – Vol. 23, № 24. – P. 2653-2665.

133. Kryszczuk, M. Significance of NRF2 in physiological and pathological conditions: A comprehensive review / M. Kryszczuk, O. Kowalczyk. – Text : visual // Archives of Biochemistry and Biophysics. – 2022. – Vol. 730. – P. 109417.

134. Kumar, G. Functional implications of vascular endothelium in regulation of endothelial nitric oxide synthesis to control blood pressure and cardiac functions / G. Kumar, S. K. Dey, S. Kundu. – Text : visual // Life Sciences. – 2020. – Vol. 259. – P. 118377.

135. Kumar, P. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay / P. Kumar, A. Nagarajan, P. D. Uchil. – Text : visual // Cold Spring Harbor Protocols. – 2018. – Vol. 2018, № 6. – P. prot095505.

136. Lee, D.S. P2X7 Receptor Augments LPS-Induced Nitrosative Stress by Regulating Nrf2 and GSH Levels in the Mouse Hippocampus / D.S. Lee, J.E. Kim. – Text : visual // Antioxidants. – 2022. – Vol. 11, № 4. – P. 778.

137. Li, T.T. Overview of organic anion transporters and organic anion transporter polypeptides and their roles in the liver / T.T. Li, J.X. An, J.Y. Xu. – Text : visual // World

Journal of Clinical Cases. – 2019. – Vol. 7, № 23. – P. 3915-3933.

138. Liu, X. ABC Family Transporters / X. Liu. – Text : visual // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2019. – Vol. 1141. – P. 13-100.

139. Liu, X. SLC Family Transporters / X. Liu, G. Pan. – Text : visual // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2019. – Vol. 1141. – P. 101-202.

140. Liver X receptor alpha and farnesoid X receptor are major transcriptional regulators of OATP1B1 / H. E. Meyer zu Schwabedissen, K. Bottcher, A. Chaudhry [et al.]. – Text : visual // Hepatology. – 2010. – Vol. 52. – P. 1797-1807.

141. Localization and genomic organization of a new hepatocellular organic anion transporting polypeptide / J. König, Y. Cui, A. T. Nies [et al.]. – Text : visual // Journal of Biological Chemistry. – 2000. – Vol. 275, № 30. – P. 23161-23168.

142. López-Terrada, D. HepG2 is a hepatoblastoma-derived cell line / D. López-Terrada, S. W. Cheung, M.J. Finegold, B. B. Knowles. – Text : visual // Human Pathology. – 2009. – Vol. 40, № 10. – P. 1512-1515.

143. Lundberg, J.O. Nitric oxide signaling in health and disease / J.O. Lundberg, E. Weitzberg. – Text : visual // Cell. – 2022. – Vol. 185, № 16. – P. 2853-2878.

144. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase / N. Ramachandran, P. Root, X.-M. Jiang [et al.]. – Text : visual // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2001. – Vol. 98. – P. 9539-9544.

145. Mechanisms of nitric oxide generation in living systems / O.N. Burov, M.E. Kletskii, S.V. Kurbatov [et al.]. – Text : visual // Nitric Oxide. – 2022. – Vol. 118. – P. 1-16.

146. Meier-Abt, F. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLCO superfamily: identification of new members in nonmammalian species, comparative modeling and a potential transport mode / F. Meier-Abt, Y. Mokrab, K. Mizuguchi. – Text : visual // Journal of Membrane Biology. – 2005. – Vol. 208, № 3. – P. 213-227.

147. Menegon, S. The Dual Roles of NRF2 in Cancer / S. Menegon, A. Columbano, S. Giordano. – Text : visual // Trends in Molecular Medicine. – 2016. – Vol. 22, № 7. – P. 578-593.

148. microRNA-206 modulates the hepatic expression of the organic anion-transporting polypeptide 1B1 / T. El Saadany, B. van Rosmalen, Z. Gai [et al.]. – Text : visual // *Liver International*. – 2019. – Vol. 39, № 12. – P. 2350-2359.

149. Miller, M. Recent developments in nitric oxide donor drugs / M. Miller, I. Megson. – Text : visual // *British Journal of Pharmacology*. – 2007. – Vol. 151. – P. 305-321.

150. Mitchell, P.A general theory of membrane transport from studies of bacteria / P. Mitchell. – Text : visual // *Nature*. – 1957. – Vol. 180. – P. 134-136.

151. Molecular determinants in the transport of a bile acid-derived diagnostic agent in tumoral and nontumoral cell lines of human liver / A. Libra, C. Ferneti, V. Lorusso [et al.]. – Text : visual // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2006. – Vol. 319. – P. 809-817.

152. Molecular Insights to the Structure-Interaction Relationships of Human Proton-Coupled Oligopeptide Transporters (PepTs) / Y. Luo, J. Gao, X. Jiang [et al.]. – Text : visual // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15, № 10. – P. 2517.

153. Multiple human isoforms of drug transporters contribute to the hepatic and renal transport of olmesartan, a selective antagonist of the angiotensin II AT1-receptor / A. Yamada, K. Maeda, E. Kamiyama [et al.]. – Text : visual // *Drug Metabolism and Disposition*. – 2007. – Vol. 35. – P. 2166-2176.

154. Murray, M. Trafficking and other regulatory mechanisms for organic anion transporting polypeptides and organic anion transporters that modulate cellular drug and xenobiotic influx and that are dysregulated in disease / M. Murray, F. Zhou. – Text : visual // *British Journal of Pharmacology*. – 2017. – Vol. 174. – P. 1908-1924.

155. Mutations in TP53, CTNNB1 and PIK3CA Genes in Hepatocellular Carcinoma Associated with Hepatitis B and Hepatitis C Virus Infections / M. L. Tornesello, L. Buonaguro, F. Tatangelo [et al.]. – Text : visual // *Genomics*. – 2013. – Vol. 102. – P. 74-83.

156. Nephrogenic diabetes insipidus in mice lacking all nitric oxide synthase isoforms / T. Morishita, M. Tsutsui, H. Shimokawa [et al.]. – Text : visual // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – Vol. 102,

№ 30. – P. 10616-10621.

157. N-Glycosylation dictates proper processing of organic anion transporting polypeptide 1B1 / J. Yao, W. Hong, J. Huang [et al.]. – Text : visual // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7. – P. e52563.

158. Niemi, M. Role of OATP transporters in the disposition of drugs / M. Niemi. – Text : visual // Pharmacogenomics. – 2007. – Vol. 8. – P. 787-802.

159. Nikolic, M. In Vitro Models and On-Chip Systems: Biomaterial Interaction Studies With Tissues Generated Using Lung Epithelial and Liver Metabolic Cell Lines / M. Nikolic, T. Sustersic, N. Filipovic. – Text : visual // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2018. – Vol. 6. – P. 120.

160. Nitric oxide as a cellular antioxidant: A little goes a long way / S.G. Hummel, A.J. Fischer, S.M. Martin [et al.]. – Text : visual // Free Radical Biology and Medicine. – 2006. – Vol. 40. – P. 501-506.

161. Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications / S.M. Andrabi, N.S. Sharma, A. Karan [et al.]. – Text : visual // Advanced Science. – 2023. – Vol. 10, № 30. – P. e2303259.

162. Niu, Y.J. S-nitrosoglutathione reductase maintains mitochondrial homeostasis by promoting clearance of damaged mitochondria in porcine preimplantation embryos / Y.J. Niu, D. Zhou, X.S. Cui. – Text : visual // Cell Proliferation. – 2021. – Vol. 54, № 3. – P. e12990.

163. Novel mechanism of impaired function of organic anion-transporting polypeptide 1B3 in human hepatocytes: Post-translational regulation of OATP1B3 by protein kinase C activation / J. Powell, T. Farasyn, K. Kock [et al.]. – Text : visual // Drug Metabolism and Disposition. – 2014. – Vol. 42. – P. 1964-1970.

164. OATP1B1 polymorphism is a major determinant of serum bilirubin level but not associated with rifampicin-mediated bilirubin elevation / W. Zhang, Y.J. He, Z. Gan [et al.]. – Text : visual // Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. – 2007. – Vol. 34, № 12. – P. 1240-1244.

165. Oestreicher, J. Glutathione: subcellular distribution and membrane transport / J. Oestreicher, B. Morgan. – Text : visual // Biochemistry and Cell Biology. – 2019. –

Vol. 97. – P. 270-289.

166. Opat, A. S. Steady-state localization of a medial-Golgi glycosyltransferase involves transit through the trans-Golgi network / A. S. Opat, F. Houghton, P. A. Gleeson. – Text : visual // *Biochemical Journal*. – 2001. – Vol. 358. – P. 33-40.

167. Organic anion transporting polypeptides (OATPs): regulation of expression and function / M. Svoboda, J. Riha, K. Wlcek [et al.]. – Text : visual // *Current Drug Metabolism*. – 2011. – Vol. 12, № 2. – P. 139-153.

168. Potent cytotoxicity of the phosphatase inhibitor microcystin LR and microcystin analogues in OATP1B1- and OATP1B3-expressing HeLa cells / N.R. Monks, S. Liu, Y. Xu [et al.]. – Text : visual // *Molecular Cancer Therapeutics*. – 2007. – Vol. 6. – P. 587-598.

169. Protective Role of the NRF2-Keap1 Pathway in Maintaining Intestinal Barrier Function / Z. Wen, W. Liu, X. Li [et al.]. – Text : visual // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2019. – Vol. 2019. – P. 1759149.

170. Protein kinase C affects the internalization and recycling of organic anion transporting polypeptide 1B1 / M. Hong, W. Hong, C. Ni [et al.]. – Text : visual // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2015. – Vol. 1848. – P. 2022-2030.

171. 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 Biology*. – 2021. – Vol. 45. – P. 102053.

172. Regulation of Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-Mediated Transport: An Updated Review in the Context of OATP-Mediated Drug-Drug Interactions / K. Alam, A. Crowe, X. Wang [et al.]. – Text : visual // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19, № 3. – P. 855-874.

173. Reis, A.K.C.A. S-nitrosothiols and H₂S donors: Potential chemo-therapeutic agents in cancer / A.K.C.A. Reis, A. Stern, H. P. Monteiro. – Text : visual // *Redox Biology*. – 2019. – Vol. 27. – P. 101190.

174. Role of human hepatocyte nuclear factor 4alpha in the expression of drug-metabolizing enzymes and transporters in human hepatocytes assessed by use of small interfering RNA / Y. Kamiyama, T. Matsubara, K. Yoshinari [et al.]. – Text : visual //

Drug Metabolism and Pharmacokinetics. – 2007. – Vol. 22. – P. 287-298.

175. S-Denitrosylation: A Crosstalk between Glutathione and Redoxin Systems / S. Chakraborty, E. Sircar, C. Bhattacharyya [et al.]. – Text : visual // Antioxidants. – 2022. – Vol. 11, № 10. – P. 1921.

176. SEARCH Collaborative Group. SLCO1B1 variants and statin-induced myopathy—A genomewide study / SEARCH Collaborative Group. – Text : visual // New England Journal of Medicine. – 2008. – Vol. 359. – P. 789-799.

177. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas / W. Xue, L. Zender, C. Miething [et al.]. – Text : visual // Nature. – 2007. – Vol. 445, № 7128. – P. 656-660.

178. Sharma, J. Role of nitric oxide in inflammatory diseases / J. Sharma, A. Al-Omran, S. Parvathy. – Text : visual // Inflammopharmacology. – 2007. – Vol. 15. – P. 252-259.

179. Shen, S. ABC transporters and drug efflux at the blood-brain barrier / S. Shen, W. Zhang. – Text : visual // Reviews in the Neurosciences. – 2010. – Vol. 21, № 1. – P. 29-53.

180. Smith, B.C. Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling / B.C. Smith, M.A. Marletta. – Text : visual // Current Opinion in Chemical Biology. – 2012. – Vol. 16, № 5–6. – P. 498-506.

181. S-Nitrosoglutathione formation at gastric pH is augmented by ascorbic acid and by the antioxidant vitamin complex, Resiston / V. I. Stsiapura, I. Bederman, I. I. Stepuro [et al.]. – Text : visual // Pharmaceutical Biology. – 2018. – Vol. 56, № 1. – P. 86-93.

182. 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 // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – P. 15403.

183. S-nitrosoglutathione reduces oxidative injury and promotes mechanisms of neurorepair following traumatic brain injury in rats / M. Khan, H. Sakakima, T. S. Dhammu [et al.]. – Text : visual // Journal of Neuroinflammation. – 2011. – Vol. 8. – P. 78.

184. S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR) deficiency accelerates cardiomyocyte differentiation of induced pluripotent stem cells / A.G. Salerno, A.C.B.A.

Wanschel, R.A. Dulce [et al.]. – Text : visual // *Journal of Cardiovascular Aging*. – 2021. – Vol. 1. – P. 13.

185. S-Nitrosoglutathione Reverts Dietary Sucrose-Induced Insulin Resistance / I. Sousa-Lima, A.B. Fernandes, R.S. Patarrão [et al.]. – Text : visual // *Antioxidants*. – 2020. – Vol. 9, № 9. – P. 870.

186. S-nitrosothiol homeostasis maintained by ADH5 facilitates STING-dependent host defense against pathogens / M. Jia, L. Chai, J. Wang [et al.]. – Text : visual // *Nature Communications*. – 2024. – Vol. 15, № 1. – P. 1750.

187. 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 & Disease*. – 2019. – Vol. 10. – P. 329.

188.S-Nitrosylation: An Emerging Paradigm of Redox Signaling / V. Fernando, X. Zheng, Y. Walia [et al.]. – Text : visual // *Antioxidants*. – 2019. – Vol. 8, № 9. – P. 404.

189. S-palmitoylation of PCSK9 induces sorafenib resistance in liver cancer by activating the PI3K/AKT pathway / Y. Sun, H. Zhang, J. Meng [et al.]. – Text : visual // *Cell Reports*. – 2022. – Vol. 40, № 7. – P. 111194.

190. Stanley, L.A. Through a glass, darkly? HepaRG and HepG2 cells as models of human phase I drug metabolism / L.A. Stanley, C.R. Wolf. – Text : visual // *Drug Metabolism Reviews*. – 2022. – Vol. 54, № 1. – P. 46-62.

191. STAT3-Activated Long Non-Coding RNA Lung Cancer Associated Transcript 1 Drives Cell Proliferation, Migration, and Invasion in Hepatoblastoma Through Regulation of the MiR-301b/STAT3 Axis / X. Wang, S. Guo, R. Zhao [et al.]. – Text : visual // *Human Gene Therapy*. – 2019. – Vol. 30. – P. 702-713.

192. STAT5 deficiency in hepatocytes reduces diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in mice / D. Kaltenecker, M. Themanns, K. M. Mueller [et al.]. – Text : visual // *Cytokine*. – 2019. – Vol. 124. – P. 154573.

193. Structure of human drug transporters OATP1B1 and OATP1B3 / A. D. Ciută, K. Nosol, J. Kowal [et al.]. – Text : visual // *Nature Communications*. – 2023. – Vol. 14, № 1. – P. 5774.

194. Structures and general transport mechanisms by the major facilitator

superfamily (MFS) / D. Drew, R.A. North, K. Nagarathinam [et al.]. – Text : visual // *Chemical Reviews*. – 2021. – Vol. 121. – P. 5289-5335.

195. Targeting SLC transporters: small molecules as modulators and therapeutic opportunities / A. Schlessinger, N. Zatorski, K. Hutchinson [et al.]. – Text : visual // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2023. – Vol. 48, № 9. – P. 801-814.

196. Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy / D. Peng, M. Fu, M. Wang [et al.]. – Text : visual // *Molecular Cancer*. – 2022. – Vol. 21, № 1. – P. 104.

197. The human organic anion transporting polypeptide 8 (SLCO1B3) gene is transcriptionally repressed by hepatocyte nuclear factor 3 β in hepatocellular carcinoma / S.R. Vavricka, D. Jung, M. Fried [et al.]. – Text : visual // *Journal of Hepatology*. – 2004. – Vol. 40. – P. 212-218.

198. The lysosomal inhibitor, chloroquine, increases cell surface BMPR-II levels and restores BMP9 signalling in endothelial cells harbouring BMPR-II mutations / B.J. Dunmore, K.M. Drake, P.D. Upton [et al.]. – Text : visual // *Human Molecular Genetics*. – 2013. – Vol. 22, № 18. – P. 3667-3679.

199. The ploidy conveyor of mature hepatocytes as a source of genetic variation. / A. W. Duncan, M. H. Taylor, R. D. Hickey [et al.]. – Text : visual // *Nature*. – 2010. – Vol. 467. – P. 707-710.

200. The role of adopted orphan nuclear receptor in the regulation of an organic anion transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1) under the action of sex hormones / A.V. Shchulkin, Yu.V. Abalenikhina [et al.]. – Text : visual // *Current Issues in Molecular Biology*. – 2023. – Vol. 45. № 12. – P. 9593-9605.

201. Traub, L.M. The trans-Golgi network: A late secretory sorting station / L.M. Traub, S. Kornfeld. – Text : visual // *Current Opinion in Cell Biology*. – 1997. – Vol. 9. – P. 527-533.

202. Treatment with proteasome inhibitor bortezomib decreases organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B3-mediated transport in a substrate-dependent manner / K. Alam, T. Farasyn, A. Crowe [et al.]. – Text : visual // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12. – P. e0186924.

203. Validation and utility of HepG2 xenograft model for hepatocellular carcinoma

/ Y. Song, Q. Lu, D. Jiang [et al.]. – Text : visual // European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging. – 2023. – Vol. 50, № 3. – P. 639-641.

204. Varisli, L. Dissecting pharmacological effects of chloroquine in cancer treatment: interference with inflammatory signaling pathways / L. Varisli, O. Cen, S. Vlahopoulos. – Text : visual // Immunology. – 2020. – Vol. 159, № 3. – P. 257-278.

205. Weaver, Y.M. Several conserved positively charged amino acids in OATP1B1 are involved in binding or translocation of different substrates / Y.M. Weaver, B. Hagenbuch. – Text : visual // Journal of Membrane Biology. – 2010. – Vol. 236, № 3. – P. 279-290.

206. Wei, J. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling and the Pathogenesis of Hepatocarcinoma / J. Wei, D. Fang. – Text : visual // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – P. 1799.

207. Wen, J. OATP1B1 Plays an Important Role in the Transport and Treatment Efficacy of Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma / J. Wen, M. Zhao. – Text : visual // Disease Markers. – 2021. – Vol. 2021. – P. 9711179.

208. Whisenant, T.C. Organic Anion Transporters (OAT) and Other SLC22 Transporters in Progression of Renal Cell Carcinoma / T.C. Whisenant, S.K. Nigam. – Text : visual // Cancers. – 2022. – Vol. 14, № 19. – P. 4772.

209. Wnt/ β -catenin signaling in cancers and targeted therapies / F. Yu, C. Yu, F. Li [et al.]. – Text : visual // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2021. – Vol. 6, № 1. – P. 307.

210. Yang, J. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells / J. Yang, C. Pi, G. Wang. – Text : visual // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2018. – Vol. 103. – P. 699-707.

211. Yang, Y. Advanced nitric oxide donors: Chemical structure of NO drugs, NO nanomedicines and biomedical applications / Y. Yang, Z. Huang, L. L. Li. – Text : visual // Nanoscale. – 2021. – Vol. 13. – P. 444-459.

212. Zeng, H. Metabolism of S-nitrosoglutathione by endothelial cells / H. Zeng, N.Y. Spencer, N. Hogg. – Text : visual // American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2001. – Vol. 281, № 1. – P. 432-439.