

На правах рукописи

Судакова Елена Александровна

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

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Рязань – 2022

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

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент **Щулькин Алексей Владимирович**

Официальные оппоненты:

Шумаев Константин Борисович, доктор биологических наук, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», старший научный сотрудник лаборатории биохимии азотфиксации и метаболизма азота Института биохимии имени А.Н. Баха

Покровская Татьяна Григорьевна, доктор медицинских наук, доцент, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России (390026, г. Рязань, ул. Шевченко, д. 34, корп. 2) и на сайте www.rzgmu.ru

Автореферат разослан «_____» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат медицинских наук, доцент

Короткова Н.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и новизна исследования

P-гликопротеин (P-gp, *MDR1*) – АТФ-зависимый белок-транспортер, относящийся к суперсемейству ABC-транспортеров и обеспечивающий выведение субстратов из клеток во внеклеточное пространство и биологические жидкости. P-gp экспрессируется в энтероцитах кишечника, гепатоцитах, эпителии почечных канальцев, эндотелии гистогематических барьеров, а также в опухолевых клетках (Waghray D. et al., 2018; Mora Lagares L. et al., 2019; Bukowski K. et al., 2020; Jia L. et al., 2022). Благодаря такой локализации основными функциями данного белка-транспортера являются участие в фармакокинетике лекарственных веществ и резистентности опухолей к химиотерапии (Mollazadeh S. et al., 2018).

Активность P-gp может изменяться под воздействием различных факторов и веществ. При этом индукторы (рифампицин, карбамазепин) повышают активность белка-транспортера (Brueck S. et al., 2019), а ингибиторы (кетоконазол, верапамил) ее снижают (Shchulkin A.V. et al., 2021).

Механизмы регуляции P-gp продолжают активно изучаться, в частности, постоянно ведется поиск эндогенных и экзогенных веществ, модулирующих активность белка-транспортера (Socco S. et al., 2017; Shchulkin A.V. et al., 2021). Согласно современным представлениям ключевую роль в регуляции активности P-gp играет уровень экспрессии гена *MDR1* (multidrug resistance gene), кодирующего данный белок-транспортер, и изменение активности уже синтезированного белка. Экспрессия гена *MDR1* инициируется сигналами от большого количества стимулов, которые сходятся на общей области промотора, называемого «*MDR1* enhanceosome» (Dixit S.G. et al., 2005). Транскрипционные факторы, такие как, прегнан X рецептор (PXR), конститутивный андростановый рецептор (CAR), транскрипционный фактор эритроидного происхождения 2 (Nrf2), могут активировать синтез P-gp (Wang Y.M. et al., 2012; Lv C. et al., 2020; Connor M. et al. 2021; Shchulkin A.V. et al., 2021).

Оксид азота II (NO) – сигнальная молекула, обладающая широким

спектром физиологических эффектов. Показано, что NO участвует в синаптической передаче сигнала, нейрогенезе, вазодилатации, развитии воспаления, повреждении клеток и т.д. (Socco S. et al., 2017).

Основные физиологические функции NO реализуются через NO-pГЦ-цГМФ-сигнальный каскад. В то же время гиперпродукция данной молекулы может привести к развитию нитрозативного стресса (НС). НС представляет собой совокупность биохимических реакций, в ходе которых NO и активные формы азота вызывают повреждение биомакромолекул белков, жиров, углеводов и нуклеиновых кислот и, как следствие, формирование патологии (Pérez-Torres I. et al., 2020; Wang F. et al., 2021; Gutierrez Cisneros C. et al., 2021; Yoon S. et al., 2021).

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

Степень разработанности проблемы

В ряде исследований оценивалось влияние доноров NO на количество и активность P-gr. Однако в данных работах были получены противоречивые результаты (Dixit S.G. et al., 2005; Robertson S.J. et al., 2011; Sinha B.K. et al., 2018; Parasrampuria R. et al., 2011). Кроме того, не было изучено дозозависимое действие NO и, что самое главное, механизмы его реализации.

На кафедре фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России более 10 лет изучаются особенности функционирования P-gr. В частности установлены механизмы влияния половых и тиреоидных гормонов на функционирование P-gr, оценена принадлежность этилметилгидроксипиридина, фабомотизола, этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина к субстратам, индукторам, ингибиторам белка-транспортера (Щулькин А.В. и др., 2015; Черных И.В. и др., 2017; Ерохина П.Д. и др., 2020). На кафедре биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО ФГБОУ ВО

РязГМУ Минздрава России в течение многих лет изучается роль оксида азота (NO), его дефицита и гиперпродукции в патогенезе развития ряда заболеваний (Арапова А.И. и др., 2016; Теплов С.А. и др., 2016; Фомина М.А. и др., 2018).

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

Цель исследования

Изучить влияние донора оксида азота (NO) S-нитрозоглутатиона на количество и активность белка-транспортера P-гликопротеина и оценить роль цГМФ-сигнального пути, ядерного фактора эритроидного происхождения 2, прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора в данном процессе.

Задачи исследования

1. Изучить влияние донора оксида азота (NO) S-нитрозоглутатиона на относительное количество белка-транспортера P-гликопротеина на клетках линии Caco-2 *in vitro*.

2. Изучить влияние донора оксида азота (NO) S-нитрозоглутатиона на активность белка-транспортера P-гликопротеина на клетках линии Caco-2 *in vitro*.

3. Установить роль нитрозативного стресса в механизме влияния донора оксида азота (NO) S-нитрозоглутатиона на количество и активность белка-транспортера P-гликопротеина.

4. Оценить роль цГМФ-сигнального пути в механизме влияния донора оксида азота (NO) S-нитрозоглутатиона на количество белка-транспортера P-гликопротеина.

5. Оценить роль ядерного фактора эритроидного происхождения 2 в механизме влияния донора оксида азота (NO) S-нитрозоглутатиона на количество белка-транспортера P-гликопротеина.

6. Оценить роль прегнан X рецептора в механизме влияния донора оксида азота (NO) S-нитрозоглутатиона на количество белка-транспортера P-

гликопротеина.

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

Научная новизна

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

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

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

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе исследования на клетках линии Caco-2 установлены механизмы разнонаправленного влияния донора NO S-нитрозоглутатиона (GSNO) на количество и активность белка-транспортера Р-гр. В частности, показано, что снижение количества и активности Р-гр связано с повреждением его молекулы вследствие развития НС.

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

Результаты работы имеют важное практическое значение. Проникновение веществ через монослой клеток линии Caco-2 является классической модельной

системой абсорбции веществ в тонком кишечнике. Изменение активности P-гр под действием донора NO расширяет представление об абсорбции веществ-субстратов белка-транспортера в тонком кишечнике при развитии заболеваний, сопровождающихся НС (Piatek-Guziewicz A. et al., 2020), а также при их совместном назначении с лекарственными препаратами – донорами NO, например, нитратами, что, в свою очередь, повысит эффективность и безопасность проводимой фармакотерапии.

Методология и методы исследования

Работа выполнена *in vitro* с использованием клеточной линии аденокарциномы ободочной кишки человека (линии Caco-2). В качестве донора NO использовали GSNO. Цитотоксическое действие GSNO оценивали по результатам МТТ-теста. Уровень метаболитов NO, концентрацию пероксинитрита, белковых и безбелковых SH-групп в лизате клеток определяли спектрофотометрически, содержание битирозина – спектрофлуориметрическим методом. Относительное количество P-гр анализировали методом вестерн-блот. Активность белка-транспортера оценивали по транспорту его субстрата – фексофенадина через монослой клеток. Концентрацию фексофенадина в транспортной среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ детектированием. Роль цГМФ-сигнального пути, Nrf2, PXR, CAR в регуляции функционирования P-гр была изучена с помощью применения специфических ингибиторов данных факторов. Полученные результаты анализировались с помощью программ «Statsoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и GraphPad Prism 8.

Положения, выносимые на защиту

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

оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона сопровождается аналогичным по направленности изменением его активности.

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

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

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

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

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием адекватных и современных методов исследования с последующей систематизацией и статистической обработкой.

Основные положения диссертации представлены, обсуждены и опубликованы в материалах: XXIV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2021); XXIV Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2021); III Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Естественнонаучные основы медико-биологических знаний» (Рязань, 2021); «XXIX Международной конференции и дискуссионном научном клубе. Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Весенняя сессия NT + ME`2020» (Республика Крым, Ялта-Гурзуф, 2021); Научно-практического круглого стола с

международным участием «Актуальные проблемы фундаментальных и прикладных исследований», посвященного 80-летнему юбилею доктора медицинских наук, профессора, академика российской академии естествознания, члена европейской академии естествознания, заслуженного деятеля науки и образования, заслуженного профессора НАО «Медицинский университет Семей» С.О. Тапбергенова (Семей, 2021); VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2021); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2022); XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2022); XXVIII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2022» (Санкт-Петербург, 2022); «XXX Международной конференции и дискуссионного научного клуба. Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. New Information Technology in Medicine, Pharmacology, Biology and Ecology. NT + ME`2022» (Республика Крым, Ялта-Гурзуф, 2022); VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2022).

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

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

Внедрение результатов исследования в практику

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

Личный вклад автора

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

Сведения о публикациях по теме диссертации

По результатам диссертационной работы опубликовано 13 работ: 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и входящих в базы Web of Science и Scopus, 10 тезисов докладов в материалах Российских и международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 113 страницах и включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты исследования, обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы. Диссертация иллюстрирована 25 рисунками и 8 таблицами. Список литературы представлен 188 источниками, из них 27 отечественных и 161 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Работа выполнена на клеточной линии аденокарциномы ободочной кишки человека (линии Сасо-2). Клетки культивировали в 96-луночных, 6-луночных

планшетах и трансвеллах («Corning», США) при 37°C и 5% уровне CO₂ в Дульбекко модифицированной среде Игла с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) («Sigma-Aldrich», США), с добавлением L-глутамин (4 мМ) («Sigma-Aldrich», США), 15% эмбриональной бычьей сыворотки («Sigma-Aldrich», США), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина («Sigma-Aldrich», США) соответственно в течение 21 суток. При данном сроке Caco-2 спонтанно дифференцируются в клетки, сходные с тонкокишечными энтероцитами и гиперэкспрессирующие P-gp (Elsby R. et al., 2008).

В качестве донора NO использовали S-нитрозоглутатион (GSNO, «Sigma-Aldrich», США), который добавляли к клеткам в концентрациях 1, 10, 50, 100 и 500 мкМ и инкубировали в течение 3, 24 и 72 ч. К контрольным клеткам в эквивалентном объеме прибавляли воду для инъекций (растворитель GSNO). На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения (n=3).

В исследовании были сформированы следующие экспериментальные серии: первая серия – изучение цитотоксического действия GSNO на клетки линии Caco-2; вторая серия – изучение влияния GSNO на биохимические показатели, характеризующие выраженность НС в клетках линии Caco-2; третья серия – изучение влияния GSNO на относительное количество P-gp; четвертая серия – изучение влияния GSNO на трансэпителиальное сопротивление (TEER) монослоя клеток линии Caco-2 и активность P-gp; пятая серия – изучение роли NO-цГМФ сигнального пути и транскрипционных факторов Nrf2, PXR, CAR в механизме влияния GSNO на P-gp.

В пятой серии при оценке механизмов индукции P-gp под действием донора NO в питательную среду за 30 мин до добавления GSNO вносили: ингибитор рГЦ – ODQ («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 10 мкМ (Hwang T.L. et al., 1998), ингибитор Nrf2 – АЕМ1 («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 5 мкМ (Bollong M.J. et al., 2015), ингибитор PXR – кетоконазол («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 10 мкМ (Kota B.P. et al., 2010), ингибитор CAR – CINPA 1 («TOCRIS», Великобритания) в концентрации 10 мкМ (Cherian M.T. et al., 2015). GSNO использовался в концентрациях, которые

вызывали повышение относительного количества Р-гр.

Цитотоксическое действие GSNO оценивали по результатам МТТ-теста (Tolosa L. et al., 2015). Для этого клетки культивировали в 96-луночном планшете.

Для оценки биохимических показателей клетки культивировали в 6-луночных планшетах. После окончания экспозиции, клетки снимали с лунок раствором трипсин–ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», США). Клетки из расчета 1×10^6 промывали изотоническим раствором натрия хлорида («Медпро», Россия) и ресуспендировали в 150 мкл ледяного буфера для лизиса (50 мМ трис-НСl, рН 7,4, 150 мМ КСl, 0,5% тритон Х-100, смесь ингибиторов протеиназ (аминоэтилбензолсульфонилфторид гидрохлорид (АЕBSF) 2 мМ; апротинин 0,3 мкМ; бестатин 130 мкМ; ЭДТА 1 мМ; эпоксисукциниллейцинуанидинобутиламид (Е-64) 14 мкМ; лейпептин 1 мкМ («Sigma-Aldrich», США)), встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g (СМ-50, «Eppendorf», Германия). Супернатант переносили в отдельные пробирки. Далее оценивали выраженность НС. Для этого фотометрическими методами анализировали уровень метаболитов оксида азота (Метельская В.А. и др., 2005), концентрацию битирозина (Amado R. et al., 1984), уровень пероксинитрита Lobysheva I.I. et al., 1999) и тиоловых (SH-) групп (Путинцева О.В. и др., 2018; Ellman L.G., 1959).

Для оценки относительного количества Р-гр клетки культивировали в 6-луночных планшетах. После окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА («Sigma-Aldrich», США), трижды промывали раствором фосфатного буфера («Bio-Rad», США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo («Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ («Sigma-Aldrich», США) в течение 30 мин при 4°C и постоянном перемешивании (из расчёта 10^7 клеток на 100 мкл буфера). Полученный лизат центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 10 мин (центрифуга Avanti JXN-3; Beckman Coulter). В супернатанте определяли

количество белка по методу Брэдфорда с помощью Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit («Thermo Fisher Scientific», США).

Относительное количество P-*gp* оценивали методом вестерн-блот с использованием первичных мышинных моноклональных антител (P-Glycoprotein Antibody MA5-13854; «Invitrogen», США) в концентрации 1:200. Визуализацию первичных антител проводили с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP; «Invitrogen», США) в разведении 1:4000. Хемилюминесценцию фиксировали с помощью ChemiDocXRS+ («Bio-Rad», США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad», США). Количество P-*gp* оценивали относительно содержания белка GAPDH (первичные мышинные моноклональные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 («Invitrogen», США), разведение 1:1000; вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH — Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP («Invitrogen», США), разведение 1:4000).

Для исследования активности P-*gp* использовали трансвеллы, состоящие из двух камер: апикальной и базолатеральной. Дном апикальной камеры является полупроницаемая мембрана, на которую высевали клетки Caco-2. Целостность клеточного монослоя оценивали по величине TEER, которое определяли с помощью вольтметра Millicell ERS-2 (Millipore). При его значении выше 500 мОм×см² выполняли транспортные эксперименты. Для этого в лунки трансвеллов добавляли питательную среду с GSNO в тестируемых концентрациях. После окончания инкубации вновь оценивали TEER и заменяли питательную среду на транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich», США) с 25 mM Хепес («Sigma-Aldrich», США) и 1% диметилсульфоксида. Затем в апикальную камеру добавляли субстрат P-*gp* – фексофенадин («Sigma-Aldrich», США) в конечной концентрации 150 мкМ. Через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из базолатеральной камеры для определения концентрации субстрата (*a-b* транспорт, обусловленный пассивной диффузией против функционирования P-

gr). В аналогичных трансвеллах оценивали транспорт фексофенадина из базолатеральной камеры в апикальную (*b-a* транспорт, обусловленный пассивной диффузией и функционированием P-gr).

Транспорт субстрата рассчитывали по формуле (Elsby R. et al., 2008): $P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{(A \times C_0)}$, где P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient, см/с), dQ/dt – изменение количества субстрата в камере-реципиенте за время инкубации (мкМ×мл/с), A – площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелле (см²), C_0 – начальная концентрация субстрата в камере-доноре (мкМ). Дополнительно рассчитывали отношение коэффициентов кажущейся проницаемости: *b-a* к *a-b*: Отношение коэффициентов = $\frac{P_{app} \text{ } b-a}{P_{app} \text{ } a-b}$.

Концентрации фексофенадина в транспортной среде определяли методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при длине волны 220 нм. Исследование выполнялось на ВЭЖХ-хроматографе «Стайер» (АО «Аквилон») по оригинальной методике (Щулькин А.В. и др., 2020).

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

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследования для подтверждения повышения уровня NO в клетках Caco-2 под действием GSNO оценивался уровень метаболитов оксида азота в лизате клеток после завершения экспериментальных воздействий. Выявлено, что данный показатель дозозависимо увеличивался во всех сериях экспериментов и при всех концентрациях GSNO (Таблица 1).

Для оценки выраженности НС в лизате клеток анализировали концентрацию пероксинитрита и битирозина. Уровень пероксинитрита увеличивался по сравнению с контролем при длительности эксперимента 3 и 24 ч и концентрациях GSNO 100, 500 мкМ. При 72 ч инкубации его содержание возрастало при всех концентрациях донора оксида азота. Количество битирозина статистически значимо повышалось по сравнению с контролем при действии GSNO в концентрациях 10-500 мкМ и сроках инкубации 24 и 72 ч (Таблица 1).

Таблица 1 – Концентрация метаболитов оксида азота, пероксинитрита и битирозина в лизате клеток Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Время инкубации	Группы	Концентрации метаболитов NO (нмоль/мг белка)	Концентрации битирозина (нмоль/мг белка)	Концентрации пероксинитрита (нмоль/мг белка)
3 ч	Контроль	11,4 ± 0,4	0,304 ± 0,005	9,4 ± 0,8
	GSNO 1 мкМ	12,6 ± 0,1*	0,314 ± 0,004	11,1 ± 2,0
	GSNO 10 мкМ	14,5 ± 0,1*	0,316 ± 0,011	11,8 ± 1,4
	GSNO 50 мкМ	14,9 ± 0,9*	0,333 ± 0,007	12,3 ± 1,9
	GSNO 100 мкМ	15,4 ± 0,5*	0,299 ± 0,005	15,8 ± 1,2*
	GSNO 500 мкМ	17,3 ± 0,4*	0,318 ± 0,003	18,1 ± 0,5*
24 ч	Контроль	10,7 ± 0,3	0,31 ± 0,002	9,7 ± 0,7
	GSNO 1 мкМ	12,7 ± 1,1*	0,33 ± 0,01	11,2 ± 1,1
	GSNO 10 мкМ	14,7 ± 0,6*	0,367 ± 0,02*	11,8 ± 1,6
	GSNO 50 мкМ	15,6 ± 0,9*	0,379 ± 0,002*	12,1 ± 1,2
	GSNO 100 мкМ	16,1 ± 0,7*	0,401 ± 0,019*	13,0 ± 1,0*
	GSNO 500 мкМ	17,0 ± 0,2*	0,418 ± 0,019*	14,9 ± 0,8*
72 ч	Контроль	10,8 ± 0,5	0,304 ± 0,005	12,2 ± 1,9
	GSNO 1 мкМ	13,6 ± 0,5*	0,338 ± 0,007	18,4 ± 1,6*
	GSNO 10 мкМ	14,3 ± 0,7*	0,394 ± 0,022*	20,4 ± 1,3*
	GSNO 50 мкМ	16,9 ± 0,7*	0,378 ± 0,003*	20,4 ± 0,7*
	GSNO 100 мкМ	17,9 ± 0,9*	0,385 ± 0,003*	22,4 ± 2,3*
	GSNO 500 мкМ	18,2 ± 0,8*	0,415 ± 0,003*	22,5 ± 1,2*

Содержание белковых и безбелковых SH-групп в клетках Caco-2 достоверно снижалось относительно контроля при воздействии GSNO в течение 3 ч и концентрациях 50-500 мкМ, при экспозиции 24 ч и концентрациях 100 и 500 мкМ и при инкубации 72 ч и концентрациях 10-500 мкМ (Таблица 2).

При исследовании цитотоксического действия GSNO было установлено снижение жизнеспособности клеток при действии донора NO в концентрациях 100 и 500 мкМ и 24 ч инкубации и в концентрациях 50-500 мкМ и 72 ч воздействии.

Таблица 2 – Концентрация белковых и безбелковых SH-групп в лизате клеток Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Время инкубации	Группы	Концентрация белковых SH-групп (мкмоль/мг белка)	Концентрация безбелковых SH-групп (мкмоль/мг белка)
3 ч	Контроль	0,144±0,025	0,244±0,042
	GSNO 1 мкМ	0,14±0,009	0,297±0,022
	GSNO 10 мкМ	0,126±0,0053	0,249±0,014
	GSNO 50 мкМ	0,085±0,007*	0,176±0,009*
	GSNO 100 мкМ	0,075±0,005*	0,163±0,014*
	GSNO 500 мкМ	0,06±0,012 *	0,112±0,017 *
24 ч	Контроль	0,111±0,021	0,207±0,009
	GSNO 1 мкМ	0,101±0,006	0,192±0,018
	GSNO 10 мкМ	0,086±0,004	0,187±0,023
	GSNO 50 мкМ	0,091±0,014	0,189±0,028
	GSNO 100 мкМ	0,065±0,004*	0,139±0,001*
	GSNO 500 мкМ	0,034±0,004*	0,081±0,009*
72 ч	Контроль	0,111±0,021	0,201±0,012
	GSNO 1 мкМ	0,091±0,01	0,182±0,019
	GSNO 10 мкМ	0,06±0,008*	0,175±0,014*
	GSNO 50 мкМ	0,074±0,007*	0,167±0,009*
	GSNO 100 мкМ	0,07±0,015*	0,128±0,004*
	GSNO 500 мкМ	0,047±0,021*	0,065±0,002 *

Таким образом, GSNO в концентрациях 1-500 мкМ и сроках экспозиции 3, 24, 72 ч является донором NO. При этом в концентрациях 100 и 500 мкМ при экспозиции 24 ч и в концентрациях 50-500 мкМ и экспозиции 72 ч данное вещество инициирует развитие НС и вызывает снижение жизнеспособности клеток.

На следующем этапе работы оценивалось влияние GSNO на относительное количество Р-гр в клетках линии Сасо-2. При воздействии донора оксида азота (II) на клетки в течение 3 ч количество Р-гр достоверно не изменялось по сравнению со значениями контроля. При увеличении длительности эксперимента до 24 ч относительное количество Р-гр повышалось при концентрациях GSNO 10, 50 и 100 мкМ, а при концентрации 500 мкМ отмечалось снижение уровня белка-транспортера. При длительности воздействия 72 ч донор оксида азота (II) в концентрации 10 мкМ повышал относительное количество Р-гр, а в концентрации донора NO 100 мкМ и 500 мкМ вызывал его уменьшение по сравнению с контрольными значениями (Рисунок 1).

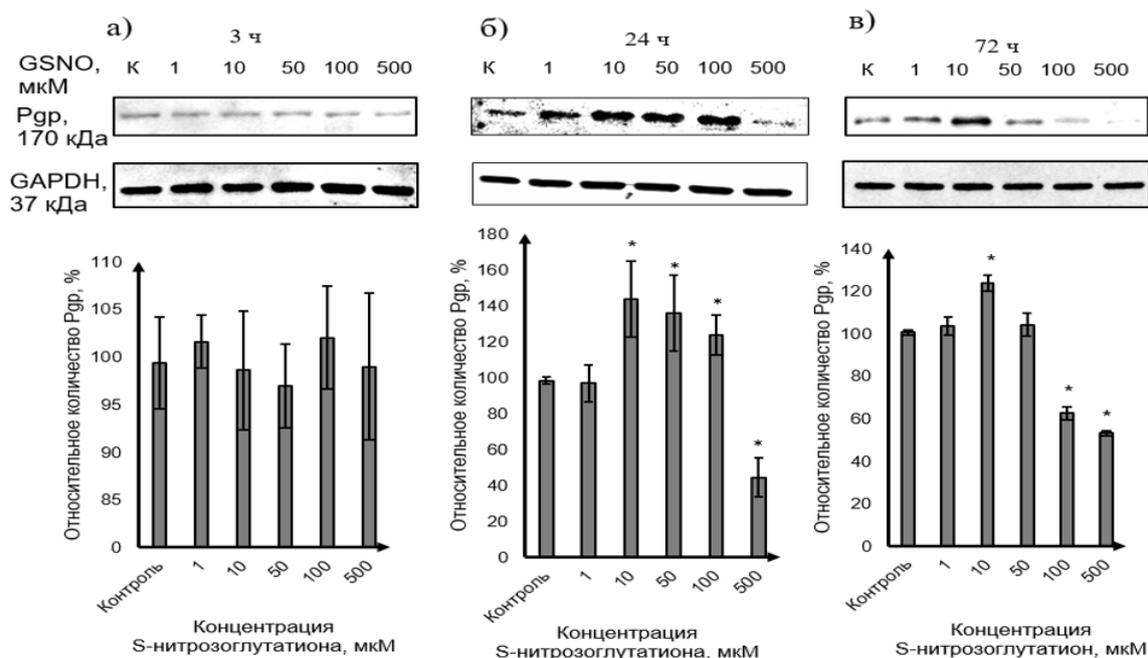


Рисунок 1 – Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 (а), 24 (б) и 72 (в) ч ($M \pm SD$, $n=3$). К – контроль

Активность Р-рр оценивали по транспорту его маркерного субстрата – фексофенадина через монослой клеток линии Сасо-2. Перед выполнением транспортных экспериментов до и после воздействия донора оксида азота (II) анализировали целостность клеточного монослоя по величине TEER. Воздействие GSNO во всех тестируемых концентрациях в течение 3 ч не оказало достоверного эффекта на величину TEER. Увеличение длительности экспозиции до 24 ч сопровождалось снижением TEER при воздействии 500 мкМ GSNO, а при 72 ч инкубации вызывало уменьшение TEER при концентрациях GSNO 100 и 500 мкМ по сравнению со значениями до начала эксперимента, что свидетельствует о снижении плотности межклеточных контактов (Таблица 3).

GSNO при воздействии на клетки Сасо-2 в течение 3 ч в концентрациях 1-100 мкМ достоверно не влиял на значения коэффициентов Ррр $b-a$, Ррр $a-b$ фексофенадина и их отношение, а в концентрации 500 мкМ вызывал уменьшение Ррр $b-a$, повышение Ррр $a-b$ и снижение отношения коэффициентов Ррр $b-a$ / Ррр $a-b$ по сравнению с контролем, что характеризует снижение активности Р-рр (Таблица 4).

Таблица 3 – Трансэпителиальное сопротивление монослоя клеток линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=6$)

Время инкубации	Группы	Трансэпителиальное сопротивление	
		До эксперимента	После эксперимента
3 ч	Контроль	640,0±60,99	657,5±36,84
	GSNO 1 мкМ	700,0±35,78	697,0±112,88
	GSNO 10 мкМ	738,33±60,14	736,67±39,83
	GSNO 50 мкМ	693,33±46,76	686,67±43,67
	GSNO 100 мкМ	595,0±50,49	602,83±115,62
	GSNO 500 мкМ	664,83±55,10	655,00±164,77
24 ч	Контроль	646,67±76,59	707,5±64,87
	GSNO 1 мкМ	696,67±99,13	728,17±102,25
	GSNO 10 мкМ	720,0±90,77	698,33±65,55
	GSNO 50 мкМ	636,67±68,02	603,33±45,02
	GSNO 100 мкМ	663,33±87,10	605,5±137,69
	GSNO 500 мкМ	700,33±91,07	506,67±91,14 *
72 ч	Контроль	723,33±42,27	716,67±56,45
	GSNO 1 мкМ	711,67±96,42	761,5±78,15
	GSNO 10 мкМ	665,00±95,24	656,67±69,19
	GSNO 50 мкМ	646,67±65,93	620,00±36,33
	GSNO 100 мкМ	673,33±68,61	493,33±73,67 *
	GSNO 500 мкМ	665,33±105	441,67±119,57 *

При длительности эксперимента 24 ч 10 и 50 мкМ GSNO повышали коэффициент $R_{app} b-a$ по сравнению с контролем, при этом $R_{app} a-b$ не изменялся. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении активности P-гр. Увеличение концентрации GSNO до 500 мкМ приводило к нормализации $R_{app} b-a$ (он достоверно не отличался от контроля), но повышало $R_{app} a-b$, что является следствием снижения активности белка-транспортера. Отношение $R_{app} b-a / R_{app} a-b$ при 24 ч эксперименте достоверно не изменялось по сравнению с контролем при влиянии донора NO во всех концентрациях (Таблица 4).

Инкубация клеток линии Сасо-2 с GSNO в течение 72 ч приводила к увеличению $R_{app} b-a$ при концентрации донора NO 10 мкМ по сравнению со значением контроля (что характеризует повышение активности P-гр), а в остальных концентрациях достоверного эффекта не оказывала. $R_{app} a-b$ увеличивался при воздействии GSNO в концентрациях 50, 100 и 500 мкМ по сравнению с контролем. При этом отношение $R_{app} b-a / R_{app} a-b$ увеличивалось при воздействии GSNO в концентрации 10 мкМ (повышение активности P-гр) и уменьшалось в концентрации донора NO 500 мкМ (снижение активности белка-

транспортера) (Таблица 4).

Таблица 4 – Транспорт субстрата Р-гликопротеина фексофенадина через монослой клеток линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Время инкубации	Группы	$P_{app} b-a, \times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} a-b, \times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} b-a / P_{app} a-b$
3 ч	Контроль	1,25±0,12	0,42±0,13	3,25±1,3
	GSNO 1 мкМ	0,98±0,27	0,47±0,217	2,27±0,64
	GSNO 10 мкМ	1,19±2,24	0,93±0,94	3,20±3,71
	GSNO 50 мкМ	1,27±0,23	0,42±0,29	3,79±1,86
	GSNO 100 мкМ	0,98±0,15	0,65±0,73	3,56±3,10
	GSNO 500 мкМ	0,87±0,22*	1,97±0,82*	0,51±0,25*
24 ч	Контроль	1,09±0,084	0,51±0,07	2,16±0,47
	GSNO 1 мкМ	1,77±0,38	0,92±0,64	2,49±1,24
	GSNO 10 мкМ	5,77±0,69*	1,38±0,82	5,35±2,93
	GSNO 50 мкМ	4,00±0,21*	1,53±0,08	3,14±1,52
	GSNO 100 мкМ	2,43±1,64	1,06±0,08	4,74±4,87
	GSNO 500 мкМ	2,55±1,53	2,60±0,42*	1,06±0,82
72 ч	Контроль	1,18±0,66	0,455±0,144	2,46±0,89
	GSNO 1 мкМ	1,07±0,13	0,469±0,16	2,44±0,68
	GSNO 10 мкМ	2,82±0,91*	0,65±0,24	5,22±3,89*
	GSNO 50 мкМ	2,24±0,48	1,49±0,29*	1,53±0,38
	GSNO 100 мкМ	1,50±0,20	1,9±0,59*	0,81±0,21
	GSNO 500 мкМ	1,30±0,19	2,42±0,76*	0,58±0,16*

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что повышение активности Р-гр под влиянием донора NO GSNO связано с увеличением количества белка-транспортера, а уменьшение активности и количества белка-транспортера и нарушение целостности клеточного монослоя, видимо, обусловлено развитием НС под влиянием высоких концентраций GSNO.

На заключительном этапе исследования были изучены механизмы повышения относительного количества Р-гр под действием GSNO. Для этого были выполнены эксперименты с ингибиторами факторов, стимулирующих экспрессию гена *MDR1*, кодирующего Р-гр.

Вначале было проверено самостоятельное влияние ингибиторов на уровень белка-транспортера при их изолированной экспозиции с клетками Сасо-2 в течение 72 ч. Было показано, что ингибитор рГЦ – ODQ (10 мкМ), ингибитор Nrf2 – АЕМ1 (5 мкМ), ингибитор PXR – кетоконазол (10 мкМ) достоверного эффекта на количество Р-гр не оказывали ($p > 0,05$). Однако ингибитор CAR – CINPA1 (10 мкМ) приводил к снижению уровня Р-гр.

Ингибитор рГЦ – ODQ при совместном инкубировании с 10 и 50 мкМ GSNO в течение 24 ч предотвращал повышение количества P-гр и не оказывал влияния при концентрации GSNO 100 мкМ, количество P-гр превышало показатели контроля. При длительности эксперимента 72 ч ODQ также предотвращал увеличение уровня P-гр при концентрации GSNO 10 мкМ, данный показатель не отличался от значений контроля (Рисунок 2).

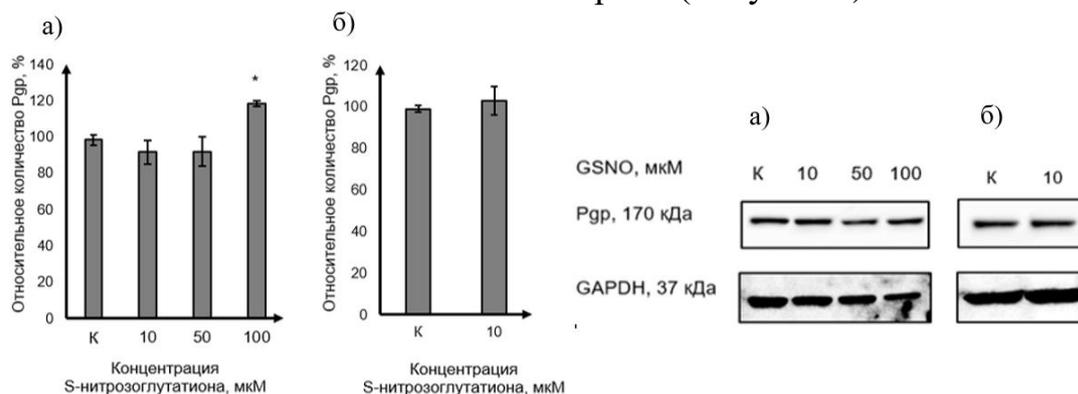


Рисунок 2 – Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием циклической гуанилатциклазы (ODQ) в течение 24 (а) и 72 (б) ч (M±SD, n=3). К – контроль

Ингибитор Nrf2 – АЕМ1 не оказывал влияния на содержание P-гр при воздействии GSNO в концентрации 10 мкМ и экспозиции 24 и 72 ч, количество P-гр превышало показатели контроля (Рисунок 3). В то же время АЕМ1 предотвращал повышение количества P-гр при воздействии GSNO в концентрациях 50 и 100 мкМ и длительности инкубации 24 ч (Рисунок 3).

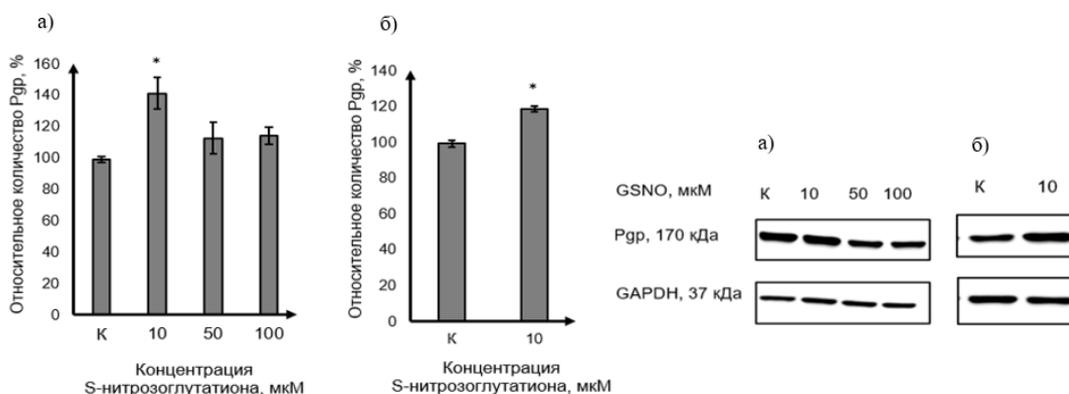


Рисунок 3 – Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием фактора эритроидного происхождения 2 (АЕМ1) в течение 24 (а) и 72 (б) ч (M±SD, n=3). К – контроль

Кетоконазол – ингибитор PXR не предотвращал повышения содержания P-*gr* в клетках Caco-2 под действием GSNO во всех сериях экспериментов.

CINPA1 – ингибитор CAR не влиял на изменение количества P-*gr* при воздействии GSNO в концентрациях 50 и 100 мкМ в течение 24 ч, которое превышало значения контроля. При концентрации GSNO 10 мкМ и экспозиции 24 ч и 72 ч CINPA1 предотвращал повышение уровня P-*gr* (Рисунок 4).

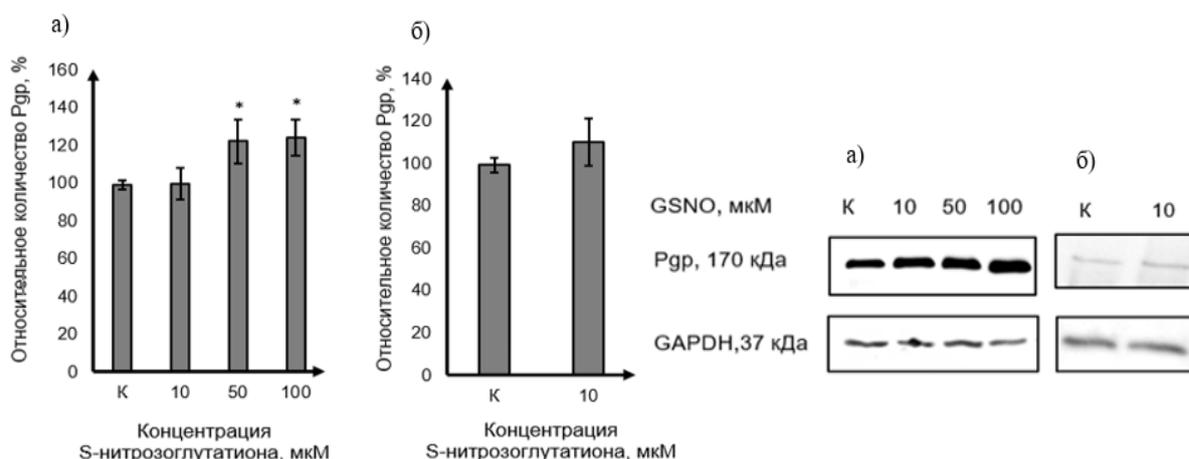


Рисунок 4 – Относительное количество P-гликопротеина в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием конститутивного андростанового рецептора (CINPA1) в течение 24 (а) и 72 (б) ч ($M \pm SD$, $n=3$). К – контроль

Таким образом, увеличение относительного количества P-*gr* в клетках Caco-2 при влиянии низких концентраций GSNO реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь (10-50 мкМ) и CAR (10 мкМ), а при повышении концентрации GSNO до 50-100 мкМ, развитию и прогрессированию НС – через Nrf2.

ВЫВОДЫ

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

2. Донор оксида азота (II) S-нитрозоглутатион при длительности воздействия 3 ч в концентрации 500 мкМ снижает активность P-гликопротеина. При длительности воздействия 24 ч S-нитрозоглутатион в концентрациях 10 и 50

мкМ повышает активность белка-транспортера, а в концентрации 500 мкМ ее снижает и нарушает целостность клеточного монослоя. При длительности воздействия 72 ч донор NO в концентрации 10 мкМ увеличивает активность белка-транспортера, а в концентрациях 100-500 мкМ ее снижает и также нарушает целостность монослоя клеток линии Сасо-2.

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

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

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

6. Прегнан Х рецептор не участвует в регуляции Р-гликопротеина при действии донора оксида азота (II) S-нитрозоглутатиона в диапазоне концентраций 1-500 мкМ и длительности воздействия 3 ч, 24 ч и 72 ч.

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Совместное назначение лекарственных препаратов, которые являются донорами NO (например, нитроглицерин, изосорбида динитрат, нитропруссид натрия), с лекарственными веществами-субстратами Р-гр с малой шириной терапевтического действия проводить с осторожностью, с учетом

возможных фармакокинетических межлекарственных взаимодействий на уровне данного белка-транспортера.

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Влияние нитрозативного стресса на функционирование конститутивного андростанового рецептора и прегнан Х рецептора / **Е.А. Судакова**, А.А. Сеидкулиева, М.О. Порошина [и др.] // *Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье: материалы XXIV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей.* – СПб. : СПбГУ, Сциентиа, 2021. – С.768-769. – (Соавт.: Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин).

2. Влияние окислительного и нитрозативного стресса на функционирование прегнан Х рецептора / А.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина, **Е.А. Судакова** [и др.] // *Материалы международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация».* – Пушкино, 2021. – С. 310-313. – (Соавт.: А.А. Слепнев, Е.Н. Якушева).

3. Динамика биохимических показателей при моделировании нитрозативного стресса *in vitro* / **Е.А. Судакова**, М.О. Порошина, Ю.В. Абаленихина [и др.] // *Материалы III Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Естественнонаучные основы медико-биологических знаний».* – Рязань, 2021. – С. 3-5. – (Соавт.: А.А. Сеидкулиева, А.В. Щулькин).

4. Моделирование нитрозативного стресса на клетках линии Сасо-2 / **Е.А. Судакова**, Ю.В. Абаленихина, А.А. Сеидкулиева, А.В. Щулькин // *Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста: сборник докладов VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов.* – Рязань, 2021. – С.91-93.

5. Роль прегнан Х рецептора в резистентности клеток к нитрозативному и окислительному стрессу / Ю.В. Абаленихина, **Е.А. Судакова**, П.Д. Ерохина [и др.] // *Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT +M&Ec`2021 (Крым, Ялта-Гурзуф, 2021. Весенняя сессия).* – Крым, Ялта-Гурзуф, 2021. – С. 270-274. – (Соавт.: А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева).

6. Влияние донора оксида азота S-нитрозоглутатиона на экспрессию конститутивного андростанового рецептора / Ю.В. Абаленихина, **Е.А. Судакова**, А.А. Сеидкулиева [и др.] // **Журнал эволюционной биохимии и физиологии.** – 2022. – Т. 58, № 5. – С. 410-420. – (Соавт.: А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева).

7. Влияние нитрозоглутатиона на активность белка-транспортера Р-гликопротеина / **Е.А. Судакова**, Ю.В. Абаленихина, А.А. Сеидкулиева, А.В. Щулькин // *Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье: материалы XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей.* – Санкт-Петербург, 2022. – Т. 25. – С. 436-437.

8. Влияние нитрозоглутатиона на функционирование белка-транспортера гликопротеина-Р / **Е.А. Судакова**, Ю.В. Абаленихина, А.А. Сеидкулиева, А.В. Щулькин // *Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева: сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием.* – Рязань, 2022. – С. 80-82.

9. Влияние оксида азота на функционирование белка-транспортера гликопротеина-P / Ю.В. Абаленихина, **Е.А. Судакова**, А.В. Шулькин [и др.] // **Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.** – 2022. – Т. 173, № 1. – С. 38-42. – (Соавт.: А.А. Слепнев, Е.Н. Якушева).

10. Изучение влияния нитрозативного стресса на количество конститутивного андростанового рецептора в условиях *in vitro* / **Е.А. Судакова**, Ю.В. Абаленихина, А.А. Сеидкулиева, А.В. Шулькин // Актуальные проблемы биомедицины – 2022: материалы XXVIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием. – Санкт-Петербург, 2022. – С. 266-267.

11. Изучение эффектов оксида азота на функционирование P – гликопротеина / **Е.А. Судакова**, А.В. Шулькин, Ю.В. Абаленихина, Е.Н. Якушева // Информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии: материалы Международной конференции NT + ME`22 (Крым, Ялта-Гурзуф, 2022. Весенняя сессия). – Крым, Ялта-Гурзуф, 2022. – С. 230-235.

12. Механизмы регуляции функционирования белка-транспортёра P-гликопротеина под действием оксида азота / А.В. Шулькин, Ю.В. Абаленихина, **Е.А. Судакова** [и др.] // **Биохимия.** – 2022. – Т. 87, № 4. – С. 523-538. – (Соавт.: П.Ю. Мыльников, Е.Н. Якушева).

13. Функционирование конститутивного андростанового рецептора в условиях нитрозативного стресса / **Е.А. Судакова**, А.А. Сеидкулиева, А.В. Шулькин [и др.] // Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста: материалы VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов. – Рязань, 2022. – (Соавт.: Ю.В. Абаленихина, Е.Н. Якушева).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

МТТ – раствор бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолий

НС – нитрозативный стресс

рГЦ – растворимая гуанилатциклаза

цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ABC (adenosine triphosphate (ATP)-binding cassette) – транспортеры – АТФ – связывающие кассетные транспортеры

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

Caco-2 – клеточная линия аденокарциномы ободочной кишки человека

CAR – конститутивный андростановый рецептор

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

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа

GSNO – S-нитрозоглутатион

M – среднее арифметическое

MDR1 (multidrug resistance protein 1) – ген множественной лекарственной устойчивости, кодирующий P-гликопротеин

NO – оксид азота II

Nrf2 – ядерный фактор эритроидного происхождения 2

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

P-gr – P-гликопротеин

Papp (apparent permeability coefficient) – коэффициент кажущейся проницаемости

PXR – прегнан X рецептор

SD – стандартное отклонение

TEER – трансэпителиальное сопротивление