

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

На правах рукописи

АБАЛЕНИХИНА Юлия Владимировна

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

1.5.4. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
профессор Е.Н. Якушева

Рязань – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	19
1.1. Р-гликопротеин. Строение, функции и механизмы регуляции	19
1.1.1. Строение Р-гликопротеина.....	19
1.1.2. Локализация и функции Р-гликопротеина	25
1.1.3. Характеристика лигандов и ингибиторов Р-гликопротеина	29
1.1.4. Механизмы регуляции Р-гликопротеина.....	32
1.1.5. Конститутивный андростановый рецептор и прегнан Х рецептор как регуляторы экспрессии гена <i>MDR1</i>	35
1.1.6. Изменение активности синтезированного белка-транспортера.....	38
1.2. Современные представления об окислительном стрессе	40
1.2.1. Концепция окислительного стресса	40
1.2.2. Повреждение мембранных и внутриклеточных липидов и белков в результате окислительного стресса.....	43
1.2.3. Регуляторная роль окислительного стресса	51
1.2.4. Роль Nrf2 в окислительном стрессе.....	54
1.2.5. Роль фактора, индуцируемого гипоксией в окислительном стрессе.....	56
1.2.6. Роль малонового диальдегида в окислительном стрессе.....	59
1.3. Влияние окислительного стресса на Р-гликопротеин	62
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	64
2.1. Объект экспериментальных исследований.....	64
2.2. Культивирование клеток линии Сасо-2	64
2.3. Экспериментальные группы и серии	65
2.3.1. Первая группа – изучение влияния экзогенного окислительного стресса на активность и количество Р-гликопротеина	65
2.3.2. Вторая группа – исследование влияния эндогенного окислительного стресса на активность и количество Р-гликопротеина	66
2.3.3. Третья группа – оценка принадлежности бутионинсульфоксимины к модуляторам активности Р-гликопротеина.....	66

2.3.4. Четвертая группа – изучение роли транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Р-гликопротеина при экзогенном окислительном стрессе	68
2.3.5. Пятая группа – изучение роли транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Р-гликопротеина при эндогенном окислительном стрессе	69
2.3.6. Шестая группа – оценка принадлежности малонового диальдегида к субстратам и модуляторам активности Р-гликопротеина.....	71
2.3.7. Седьмая группа – оценка роли Р-гликопротеина при развитии окислительного стресса	73
2.4. Оценка выраженности окислительного стресса	73
2.4.1. Определение продукции активных форм кислорода	73
2.4.2. Приготовление клеточных лизатов	74
2.4.3. Определение концентрации продуктов перекисного окисления липидов....	74
2.4.4. Определение концентрации карбонильных производных белков	75
2.4.5. Определение концентрации небелковых и белковых SH-групп.....	75
2.5. Оценка количества Pgp, Nrf2, глутатионпероксидазы в клетках методом гетерогенного иммуноферментного анализа (ГИФА)	76
2.6. Определение относительного количества Pgp, HIF1 α , CAR, PXR методом вестерн-блот.....	77
2.6.1. Получение тотальных клеточных лизатов.....	77
2.6.2. Проведение анализа вестерн-блот.....	77
2.7. Исследование активности Р-гликопротеина при моделировании окислительного стресса	79
2.7.1. Транспортные эксперименты.....	79
2.7.2. Определение концентрации фексофенадина.....	80
2.8. Тестирование принадлежности бутионинсульфоксимида и малонового диальдегида к модуляторам активности Р-гликопротеина.....	81

2.9. Тестирование принадлежности малонового диальдегида к субстратам Р-гликопротеина	82
2.9.1. Транспортные эксперименты	82
2.9.2. Оценка концентрации малонового диальдегида	82
в транспортной среде	82
2.10. Оценка выживаемости клеток в ходе МТТ-теста	84
2.11. Статистический анализ	84
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	85
3.1. Моделирование и динамика развития экзогенного окислительного стресса ..	85
3.2. Моделирование и динамика развития эндогенного окислительного стресса .	99
3.3. Влияние экзогенного окислительного стресса на количество и активность Р-гликопротеина	111
3.4. Оценка принадлежности бутионинсульфоксимиона к модуляторам активности Р-гликопротеина	123
3.5. Влияние эндогенного окислительного стресса на количество и активность Р-гликопротеина	128
3.6. Изучение роли транскрипционных факторов Nrf2, NIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Pgp <i>in vitro</i> при экзогенном окислительном стрессе	137
3.7. Изучение роли транскрипционных факторов Nrf2, NIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Pgp <i>in vitro</i> при эндогенном окислительном стрессе	146
3.8. Исследование принадлежности малонового диальдегида к субстратам и модуляторам активности Р-гликопротеина	153
3.9. Оценка роли Р-гликопротеина при развитии окислительного стресса	159
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	162
ВЫВОДЫ	185
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	188
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	189
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	190
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	194

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Молекулы биологически активных веществ проникают через клеточные мембраны не только пассивной диффузией, но и с помощью транспортных систем, связанных с белками-переносчиками. Одной из основных групп таких белков является суперсемейство ABC-транспортёров (*англ.: ATP-binding cassette*), к которому относится более сотни транспортных систем, обнаруженных как у бактерий, так и у человека [49, 438]. Важнейшим представителем суперсемейства ABC-транспортёров, участвующим в эффлюксе биобиотиков и ксенобиотиков, является Р-гликопротеин (Pgp, *англ.: permeability glycoprotein*) [224, 300, 377].

Pgp – это белок, характеризующийся низкой субстратной специфичностью, так как он способен распознавать широкий спектр веществ, включающий эндогенные лиганды, такие как цитокины, сфинголипиды, короткоцепочечные фосфолипиды, фактор активации тромбоцитов [18, 31, 43], гормоны коры надпочечников [14], билирубин [294], а также лекарственные вещества: антиаритмики, антигистаминные препараты, статины, ингибиторы протеазы ВИЧ [168], бета-блокаторы [398], противоопухолевые препараты [312], некоторые психотропные средства [230], дигоксин и его метаболиты [185] и т.д. Так как Pgp обнаружен в эпителии кишечника, печени, почек и эндотелиальных клетках гистогематических барьеров, считается, что данный белок выполняет защитную функцию за счет АТФ-зависимого выведения ксенобиотиков из клеток во внеклеточное пространство или просвет органов [343]. В тонком кишечнике данный белок-транспортёр ограничивает всасывание субстратов, в почках и печени – ускоряет их выведение с мочой и желчью [223]. Показано также, что в эндотелии, выстилающем капилляры гистогематических барьеров, Pgp защищает клетки забарьерных органов от воздействия токсичных веществ [343]. Тем не менее, гипотеза о том, что функция Pgp заключается только в удалении ксенобиотиков из клетки, не объясняет высокий уровень белка-транспортёра в надпочечниках [147] или его апикальной локализации в эпителиальных клетках сосудистого сплетения

[119]. Pgp также способен блокировать развитие апоптоза в опухолевой клетке за счет модулирования активности ключевых ферментов ее запрограммированной гибели [104, 271].

Таким образом, Pgp играет ключевую роль не только в фармакокинетике лекарственных веществ, являющихся его субстратами, но и выполняет важную защитную функцию при физиологических и патологических процессах.

Активность Pgp может значительно изменяться под влиянием факторов внешней и внутренней среды, таких как генетические особенности организма, концентрация кислорода в крови, кислотно-щелочной баланс, использование ряда лекарственных веществ и др. [21].

Согласно современным представлениям, активность Pgp может меняться в результате следующих основных процессов - модуляции экспрессии гена множественной лекарственной устойчивости (*MDR1*, англ.: *multidrug resistance gene*) и активности синтезированного белка [36, 44]. При этом функционирование Pgp может как понижаться (ингибирование), так и повышаться (индукция) [64, 79].

Экспрессия гена *MDR1* инициируется сигналами от большого количества стимулов, которые сходятся на общей области промотора, называемого «*MDR1 enhanceosome*» [345]. Ядерный прегнан X рецептор (PXR, англ.: *pregnane X receptor*) представляет собой белковый транскрипционный фактор, распознающий специфические последовательности в промоторах или энхансерах генов-мишеней и модулирующий их экспрессию [132, 317]. Данный транскрипционный фактор рассматривается как сенсор ксенобиотиков, оказывающий регулирующее воздействие на транскрипцию генов транспортеров лекарственных веществ (в том числе Pgp), а также ключевых ферментов метаболизма [132]. Аналогичную функцию выполняет и конститутивный андростановый рецептор (CAR, англ.: *constitutive androstane receptor*). Показано, что CAR и PXR могут связываться с респонсивным элементом ядерного рецептора в области 7.8 пар килобаз энхансера гена *MDR1* и активируют его экспрессию через DR4 мотив, с которым данные

рецепторы взаимодействуют в качестве гетеродимера с рецептором ретиноевой кислоты или в качестве мономера [51].

Активность Pgp может изменяться в результате непосредственного взаимодействия молекулы белка-транспортера с молекулами эндогенных и экзогенных веществ. На данный момент описано три варианта ингибирования активности белка-транспортера: конкурентное, неконкурентное и аллостерическое [297].

Исследования, проведенные в 60–80-х гг. XX века показали, что повышенная продукция активных форм кислорода (АФК), характеризующая дистресс, играет важную роль в патогенезе наиболее распространенных заболеваний человека: патология сердечно-сосудистой, дыхательной, эндокринной систем, злокачественные новообразования и др. [6, 12, 13, 17, 19, 24, 25, 35, 156, 284, 351, 326]. Кроме того, физиологические концентрации АФК (эустресс), образуемые нейрохимическими и биоэнергетическими системами клетки в нормальных условиях, играют существенную роль в различных сторонах ее жизнедеятельности [1, 319, 359, 390]. Субстратами свободно-радикального окисления служат многие биологически важные соединения: белки, липиды [5, 29], углеводы, нуклеиновые кислоты. Принято считать, что свободно-радикальному окислению в клетках подвергаются преимущественно молекулы липидов. По-видимому, это связано с тем, что АФК имеют высокую константу взаимодействия с полиненасыщенными жирными кислотами, являющимися основными структурными компонентами фосфолипидов мембран [2, 27, 38, 219]. Однако рядом авторов было показано, что свободно-радикальному окислению подвергаются в первую очередь не липиды, а белки цитоплазматических мембран. Модификации может подвергаться как полипептидная цепь, так и боковые части аминокислотных остатков белков, что может приводить к разрывам пептидной связи и образованию различных стабильных метаболитов аминокислот [30, 130, 157, 264, 282].

Свободно-радикальное окисление липидов и других биомолекул приводит к развитию окислительного стресса (ОС), а именно дистресса, характеризующегося

накоплением первичных (органические гидропероксиды) и вторичных (карбонильные соединения) высокотоксичных продуктов окисления в крови и тканях [30, 285]. Окислительная модификация как липидов, так и белков приводит к изменению вязкости, упругости и текучести мембран, что существенно влияет на взаимодействие клеток между собой, на митоз и эндоцитоз [69, 135, 199]. Поэтому клеточная мембрана может рассматриваться как биосенсор ОС [322, 389].

По механизму возникновения можно выделить 2 типа ОС: эндогенный и экзогенный. Увеличение количества свободных радикалов, которое вызвано экзогенным воздействием прооксидантов (пероксид водорода, использование препаратов, способствующих генерации супероксида, например, паракват, менадион) приводит к развитию экзогенного ОС. Ингибирование компонентов антиоксидантной системы способствует эндогенному синтезу АФК, вызывая эндогенный ОС. При моделировании эндогенного ОС ингибируют каталазу и супероксиддисмутазу с помощью 3-аминотриазола [73] и диэтилдитиокарбамата натрия [253] соответственно, а также истощают количество глутатиона в клетке под действием бутионинсульфоксимиона [65].

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

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

Степень разработанности темы

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

Окислительный стресс является типовым патологическим состоянием. Именно поэтому определение маркеров ОС является обязательным этапом исследования. На кафедре биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России был разработан метод оценки уровня карбонильных производных белков, и изучено изменение их количества в различных экспериментальных условиях [15, 37, 39].

В настоящее время имеются данные о влиянии прооксидантов на экспрессию Pgp. Так в исследовании [321] на культуре крысиных гепатоцитов было показано, что H_2O_2 в концентрации 0,5–1 мМ при инкубации в течение 72 ч вызывал повышение количества Pgp, экспрессии его гена и активности белка-транспортёра. В работе [296] выявлено, что H_2O_2 в концентрации до 500 мкМ при воздействии в течение 48 ч на первичную культуру эндотелия крыс повышал экспрессию Pgp и в меньшей степени влиял на активность белка-транспортёра.

Научный коллектив кафедры фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России на протяжении нескольких лет занимается изучением транспорта лекарственных веществ внутрь клеток через цитоплазматическую мембрану, а именно исследует лекарственные препараты на принадлежность к субстратам, ингибиторам и индукторам Pgp [22]. Также была изучена активность белка-транспортёра при моделировании патологических состояний: нарушение мозгового кровообращения [7, 40], гипоксия [3], неврологические расстройства [8], патология эндокринной системы [10]. Было установлено, что при окклюзии средней мозговой артерии крыс с последующей реперфузией (модель фокальной ишемии мозга) и билатеральной окклюзии сонной артерии (модель глобальной

ишемии мозга) происходит возрастание абсолютного количества Pgp [40], что коррелирует с уровнем ОС. Моделирование острой гипоксической гипобарической гипоксии у крыс Wistar приводило к повышению относительного количества Pgp [3]. Показано, что данные патологические процессы сопровождаются активацией ПОЛ и истощением антиоксидантной защиты в ткани головного мозга. Таким образом, полученные результаты демонстрируют влияние редокс-статуса клетки на количество белка-транспортера Pgp, что согласуется с данными литературы.

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

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

Задачи исследования

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Воспроизвести модель экзогенного окислительного эустресса и дистресса *in vitro* с помощью пероксида водорода на клетках линии Сасо-2.
2. Воспроизвести модель эндогенного окислительного эустресса и дистресса *in vitro* с помощью ингибитора синтеза глутатиона – DL-бутионинсульфоксимины на клетках линии Сасо-2.
3. Оценить количество и активность Pgp в условиях экзогенного окислительного стресса *in vitro*.

4. Исследовать принадлежность DL-бутионинсульфоксими́на к модуляторам активности Pgp.
5. Оценить количество и активность Pgp в условиях эндогенного окислительного стресса *in vitro*.
6. Изучить роль транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Pgp *in vitro* при экзогенном окислительном стрессе.
7. Изучить роль транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Pgp *in vitro* при эндогенном окислительном стрессе.
8. Исследовать принадлежность малонового диальдегида к субстратам и модуляторам активности Pgp.
9. Оценить роль Pgp в выживаемости клеток при развитии окислительного стресса.

Научная новизна

В ходе выполнения работы впервые показано, что:

1. При развитии эустресса, вызванного воздействием H₂O₂ и БСО происходит повышение количества и активности Pgp, при возникновении дистресса, напротив, количество и активность белка-транспортера снижаются.
2. БСО является прямым ингибитором Pgp с IC₅₀ (концентрация, ингибирующая активность Pgp на 50%) 17,21 \pm 2,46 мкМ.
3. В механизмах повышения количества Pgp при развитии экзогенного ОС, вызванного H₂O₂, доминирующая роль принадлежит сигнальному пути Nrf2-keap1; HIF1 α и CAR также принимают участие в данном процессе. PXR не оказывает существенного влияния на регуляцию белка-транспортера при экзогенном ОС.
4. При моделировании эндогенного ОС с помощью ингибитора синтеза глутатиона - БСО, все протестированные транскрипционные факторы и сигнальные пути (Nrf2-keap1, HIF1 α , PXR, CAR) вносят вклад в индукцию Pgp.
5. Малоновый диальдегид в концентрации 10 мкМ транспортируется Pgp.

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

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

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе настоящего исследования установлено, что активность и количество Pgr в условиях экзогенного (воздействие пероксида водорода) и эндогенного (ингибирование синтеза глутатиона DL-бутионинсульфоксимином) ОС возрастает при умеренном воздействии (эустресс), и снижается при выраженном и более продолжительном стрессе (дистресс). Однако, имеются различия в регуляции белка-транспортера. При развитии экзогенного ОС в повышении количества Pgr, вызванного инкубацией клеток линии Caco-2 с H_2O_2 , вероятно, доминирующая роль принадлежит сигнальному пути Nrf2-Keap1, который участвует в регуляции белка-транспортера при длительности воздействия и 24, и 72 ч. Транскрипционный фактор HIF1 α принимает участие в регуляции Pgr при воздействии H_2O_2 в течение 24 ч, а транскрипционный фактор CAR – при времени инкубации 72 ч. PXR, видимо, не вносит существенный вклад в регуляцию белка-транспортера при данной модели ОС.

При моделировании эндогенного ОС на клетках Caco-2 с помощью ингибитора синтеза глутатиона – БСО установлено, что Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR участвуют в индукции Pgr. Регуляция активности Pgr в условиях ОС имеет сложный молекулярный механизм, основанный на сигнальной функции продуктов пероксидации, причем, наибольшее значение имеет МДА, а также прямом и опосредованном влиянии транскрипционных факторов, которые могут взаимодействовать между собой и быть взаимозаменяемыми и/или дублирующими в отношении Pgr. Активация транскрипционных факторов и Pgr имеет важное адаптивное значение в условиях ОС, направленное на сохранение

жизнеспособности клеток и поддержание их функционирования. В представленном исследовании впервые была выявлена важная биологическая функция Pgp – транспорт МДА из клетки, опосредующая цитопротекторный эффект. В работе установлено, что БСО обладает бимодальным действием – с одной стороны, является ксенобиотиком, который напрямую ингибирует Pgp, с другой стороны, вызывает индукцию белка-транспортера опосредовано через изученные транскрипционные факторы.

Полученные результаты могут иметь практическое значение. Проникновение веществ через монослой клеток линии Caco-2 является классической модельной системой абсорбции веществ в тонком кишечнике [338, 388]. Выявленное в нашем исследовании снижение активности Pgp и повышение проницаемости монослоя клеток для субстрата белка-транспортера фексофенадина при развитии ОС может свидетельствовать о повышении абсорбции веществ-субстратов Pgp в тонком кишечнике при развитии заболеваний, сопровождающихся ОС, что в свою очередь может приводить к увеличению их концентрации в плазме крови и сопровождаться развитием побочных эффектов фармакотерапии.

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

Методология и методы исследования

Уровень внутриклеточных АФК определяли с помощью флуоресцентных зондов MitoTracker Red CM-H₂ XRos. Степень развития ОС оценивали фотометрическими методами по концентрации карбонильных производных белков, продуктов перекисного окисления липидов, белковых и небелковых SH-групп.

Функциональную активность Pgp в работе оценивали в экспериментах *in vitro* на клеточной линии Caco-2 по проникновению маркерного субстрата Pgp –

фексофенадина через билипидную мембрану клеток. Концентрацию фексофенадина определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием. Абсолютное количество Pgp, Nrf2 и глутатионпероксидазы оценивали методом гетерогенного иммуноферментного анализа. Относительное количество Pgp и транскрипционных факторов HIF1 α , CAR, PXR анализировали методом вестерн-блот. Определение концентрации МДА в транспортной среде выполняли методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием хроматографической системы «Dionex Ultimate 3000» и тандемного масс-селективного детектора TSQ Fortis.

Для изучения механизмов влияния экзогенного и эндогенного ОС на количество Pgp в клетках линии Сасо-2 были использованы селективные ингибиторы транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR, PXR.

Полученные результаты обрабатывали статистическими методами.

Положения, выносимые на защиту

1. Пероксид водорода в концентрациях 5-50 мкМ и длительности инкубации 3, 24 и 72 ч на клетках линии Сасо-2 вызывает развитие компенсированного ОС (эустресса). Концентрация H₂O₂ 100 мкМ при всех сроках экспозиции является токсичной для линии клеток Сасо-2 и приводит к возникновению некомпенсированного ОС (дистресса) и гибели клеток.

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

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

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

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

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

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

8. МДА в концентрации 10 мкМ может транспортироваться Pgp в клетках линии Сасо-2. МДА в концентрациях 10 и 50 мкМ и длительности экспозиции 24 ч повышает относительное количество и активность Pgp, действуя через транскрипционные факторы CAR и PXR.

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

Степень достоверности

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных на иммортализованной клеточной линии Сасо-2 (закупленной в ФГБУН ИНЦ РАН) и на современном аналитическом оборудовании, с применением адекватных и информативных биохимических методик, и реактивов, обладающими необходимыми паспортами качества.

Компьютерная и математическая обработка полученных данных выполнена с использованием лицензионного программного обеспечения и адекватных статистических критериев.

Общие подходы к оценке активности Pgp соответствуют международным рекомендациям (FDA и EMA) и рекомендациям Международного консорциума по изучению транспортеров (International Transporter Consortium).

Апробация результатов

Основные положения диссертации доложены, обсуждены и опубликованы в материалах: Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Современные достижения химико-биологических наук в профилактической и клинической медицине» (Санкт-Петербург, 2020); Международной конференции NT+M&Ec`2020 «Новые технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Гурзуф, 2020, 2021, 2022); VI, VII и VII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2020, 2021, 2022); ежегодной научной конференции Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, посвящённой 70-летию основания ВУЗа на Рязанской земле (Рязань, 2020, 2021); 24-й Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2020); Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2021); 45-го конгресса Европейских Биохимических Обществ (FEBS) «Molecules of Life: towards new horizons» (Ljubljana, 2021); VII съезда биохимиков России, X Российского симпозиума «Белки и пептиды» (Сочи, Дагомыс, 2021); XXVII и XXVII Всероссийских конференциях молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины - 2021» (Санкт-Петербург, 2021, 2022); VI Всероссийской конференции по молекулярной онкологии «Успехи молекулярной онкологии» (Москва, 2021); XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина - человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2022); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2022); 25-й Пущинской школе-конференции молодых ученых с международным участием «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2022); 76-й международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Достижения

фундаментальной, прикладной медицины и фармации», (Самарканд, 2022); Всероссийского конгресса молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (Томск, 2022); VI Сеченовского международного биомедицинского саммита (SIBS-2022) (Москва, 2022); Международной научно-практической конференции «Педиатрия и фармация XXI века» (Самарканд, 2022); V Национального конгресса по регенеративной медицине (Москва, 2022).

Апробация работы состоялась 19 декабря 2022 года на заседании центральной научно-исследовательской лаборатории и кафедр: фармакологии; биологической химии с курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО; нормальной физиологии с курсом психофизиологии; фармацевтической химии; фармацевтической технологии; биологии; онкологии; сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики; управления и экономики фармации; фармакогнозии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Московского НИИ психиатрии – филиала ФГБУ «НМИЦ ПН им. В.П. Сербского» Минздрава России.

Внедрение результатов исследования в практику

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

Личный вклад автора

Автором самостоятельно подготовлен аналитический обзор литературы по изучаемой проблеме, составлена программа исследования, проведены эксперименты *in vitro*, биохимические исследования, обработка и интерпретация

данных, подготовка публикаций по диссертационной работе. В целом, личный вклад автора в исследование превышает 90%.

Публикации

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

Конфликт интересов

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

Структура и объем диссертации

Объем работы составляет 249 страниц печатного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка использованной литературы.

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

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Р-гликопротеин. Структура, функции и механизмы регуляции

Мембранные белки-транспортеры выполняют важную биологическую функцию, удаляя токсичные вещества из цитозоля или облегчая проникновение необходимых питательных веществ внутрь клетки. Эти защитные функции важны для выживания всех организмов. Многочисленные исследования доказали важную роль белков-транспортеров в абсорбции, распределении, метаболизме и выведении многих лекарственных веществ, а также в транспорте эндогенных молекул [21].

Выделяют два основных семейства белков-транспортеров: АТФ-связывающие кассетные транспортеры (ABC, *англ.: ATP-binding cassette*, например, ABCB1, ABCG2) и транспортеры растворенных веществ (SLC, *англ.: solute carrier*, например, SLC22A6, SLC22A8) [232].

Р-гликопротеин (Pgp, *англ.: permeability glycoprotein*, ABCB1, MDR1-белок) был открыт более 40 лет назад и является наиболее идентифицированным и охарактеризованным белком-транспортером.

1.1.1. Структура Р-гликопротеина

Р-гликопротеин, относящийся к суперсемейству ABC-транспортеров [233], представляет собой АТФ-зависимый эффлюксный N-гликозилированный белок массой 170 кДа, состоящий из 1280 аминокислот, расположенный в фосфолипидном бислое и состоит из двух гомологичных трансмембранных доменов (TMD, *англ.: transmembrane domain*), каждый из которых содержит шесть пронизывающих мембрану α -спиралей и один цитоплазматический нуклеотид-связывающий домен (NBD, *англ.: nucleotide binding domain*) [198] (Рисунок 1). Два TMD связаны между собой «гибким» 75-аминокислотным белком, содержащим несколько сайтов фосфорилирования [378].

Внутренняя полость окружена 12 α -спиралями, которые располагаются от центра фосфолипидного двойного слоя к цитоплазме [371]. Обращенная внутрь конформация Pgp также имеет различные связывающие карманы, содержащие как ароматические, так и гидрофобные остатки, а также аминокислоты с полярными боковыми цепями, такие как Gln343, Gln721, Gln942, Gln986 и Ser975. Такое расположение обеспечивает образование как ван-дер-ваальсовых, так и водородных связей, что позволяет широкому спектру субстратов взаимодействовать с белком [96, 187, 217]. Было показано, что Pgp взаимодействует с различными стереоизомерами одного и того же соединения [432]. Третичная структура Pgp обеспечивает повышенную «гибкость» с возможностью трехмерной переориентации, что дополнительно облегчает его взаимодействие с широким спектром субстратов [228, 377].

В отличие от белков, которые связываются в соответствии с моделью «индуцированного соответствия» или моделью «замка и ключа», Pgp не имеет фиксированного кармана для связывания лиганда [183, 208, 260, 334].

Таким образом, полярные, неполярные, линейные, гидрофобные и ароматические соединения с различной молекулярной массой в диапазоне от 250 до 4000 Да были идентифицированы как субстраты Pgp [260, 354].

Как и у всех белков суперсемейства ABC-транспортёров, каждый NBD Pgp состоит из двух областей (walker):

1. walker A – Gly-X-Gly-Lis-Ser-Thr, где X — неспецифическая аминокислота;
2. walker B – Asp-Glu-Ala-Thr-Ser-Ala-Leu-Asp.

Различие между ABC-белками-транспортёрами и ABC-белками, не выполняющими транспортную функцию, заключается в положении сигнатурного консервативного walker C (Leu-Ser-Gly-Gly-Gln), который у ABC-транспортёров находится между walker A и B. Эти три мотива необходимы для формирования двух активных сайтов АТФаз, каждая из которых состоит из мотивов walker A и B одного NBD и walker C из другого [110, 265, 372, 377].

Поскольку цитозольная концентрация АТФ намного выше, около 1–10 мМ, по сравнению с константой связывания домена (0,01 мМ), оба сайта связывания АТФ присутствуют на внутриклеточной стороне [103, 218]. Несмотря на то, что конформация, обращенная внутрь, более энергетически выгодна, Pgp обычно существует в конформации, обращенной наружу [272].

Каждый из NBD содержит высококонсервативный остаток глутамата, который действует как каталитическая основа для гидролиза АТФ. Несколько исследований показали, что изменения в любом из этих глутаматных сайтов могут снижать активность АТФазы, тогда как мутации в обоих сайтах фиксируют структуру Pgp в закрытой нуклеотидной конформации [82, 204].

Переключение с конформации, обращенной внутрь, на конформацию, обращенную наружу, включает в себя наклон и вращение обоих TMDs, что приводит к сокращению внутренней полости, обращенной к цитоплазме и обеспечивает отток нескольких субстратов из клетки [205]. Во внешней конформации NBDs димеризуются в форме «голова к хвосту», при этом каждый участок связан с молекулой АТФ для стабилизации структуры [218].

Эта обращенная наружу конформация достигается, когда трансмембранная область (ТМ) 4 и 5 первого TMD поворачиваются внутрь вместе с ТМ 10 и 11 второго TMD. Структура дополнительно стабилизируется за счет вытягивания наружу ТМ 7 и 8 от ТМ 9 к 12 [218].

Еще одним важным элементом, задействованным в этой структурной перестройке, является остаток, который находится между NBD и TMD, и получивший название петля Q. Было показано, что петля Q (Q475 NBD1 и Q1118 NBD2) увеличивает силу связи ван-дер-ваальса с мотивом С другого NBD с использованием иона магния и фосфата для связывания АТФ [164, 205 218]. В дополнение к Q-петле некоторые внутриклеточные спирали, в том числе 1 и 2, и другие трансмембранные (ТМ) спирали претерпевают изменения из-за ван-дер-ваальсовых связей между 3 α -Q-петлей и спиралями [205]. Эти изменения в структуре включают образование связей между ТМ6 и ТМ4, ТМ6 и ТМ5 и

диссоциацию связей между ТМ1 и ТМ6. Скручивание областей ТМ3 и ТМ6 приводит к сокращению внутренней полости и открытию внеклеточных ворот. По сравнению с развернутой формой в конформации, обращенной внутрь, ТМ4 также приобретает более спиральную структуру [205]. Эта обращенная наружу конформация дополнительно стабилизируется взаимодействием Glu620-Arg644 до тех пор, пока субстраты не будут удалены [205]. Мутация Gli132 на валин в составе ТМ1-3 мутанта ABCB1 Gli132Val вызывает 10-кратное увеличение активности АТФазы, но механизм, лежащий в основе этого изменения, остается неясным [241].

На сегодняшний день не наблюдалось существенных структурных различий в NBD-TMD во время переключения с конформации, обращенной внутрь, на конформацию, обращенную наружу. Данный факт позволяет предположить, что вся эта область функционирует как единое целое во время транспорта субстратов [218, 378].

Даже в обращенной наружу конформации внеклеточные ворота чрезвычайно узкие, что обеспечивает активный однонаправленный транспорт субстратов из клетки [72, 218].

Это переключение с внутренней на внешнюю ориентацию приводит к перераспределению остатков, связывающих субстраты, с большим количеством этих областей связывания, обращенных к внеклеточной стороне [218].

АТФ играет существенную роль в стабилизации этой конформации, и ряд исследований описывают связь между АТФ-азной активностью Pgp и оттоком субстрата, приводящим к лекарственной устойчивости [62, 67, 70, 174].

Показано, что Pgp может иметь более низкое субстратное сродство в присутствии АТФ [84, 178], в то время как использование аналога АТФ, аденилимидодифосфата, приводит к оттоку субстрата [52]. Эти результаты позволяют предположить, что несмотря на то, что связывание АТФ способствует обращенной наружу конформации Pgp, именно отток лекарственных субстратов приводит к гидролизу АТФ [218].

Pgp имеет два активных центра АТФ-азной активности, но гидролизуется только одна молекула АТФ за один раз [242]. Другие эксперименты по захвату нуклеотидов дополнительно подтвердили эти данные, обнаружив активность только в одном каталитическом сайте [298, 341], что указывает на структурную асимметрию двух сайтов АТФазы в обращенной наружу конформации. Эти результаты также указывают на то, что гидролиз АТФ в любом из этих сайтов достаточен для дестабилизации структуры [218]. Дестабилизация приводит к тому, что потенциальная энергия, хранящаяся в спиральных областях ТМ3 и ТМ6, преобразуется в упругую пружиноподобную силу, что приводит к быстрому повороту обращенной наружу структуры обратно к конформации, обращенной внутрь (Рисунок 3 и 4) [205].

Таким образом, происходит активное удаление молекулы лекарственного вещества – субстрата Pgp из полости транспортера во внеклеточное пространство.

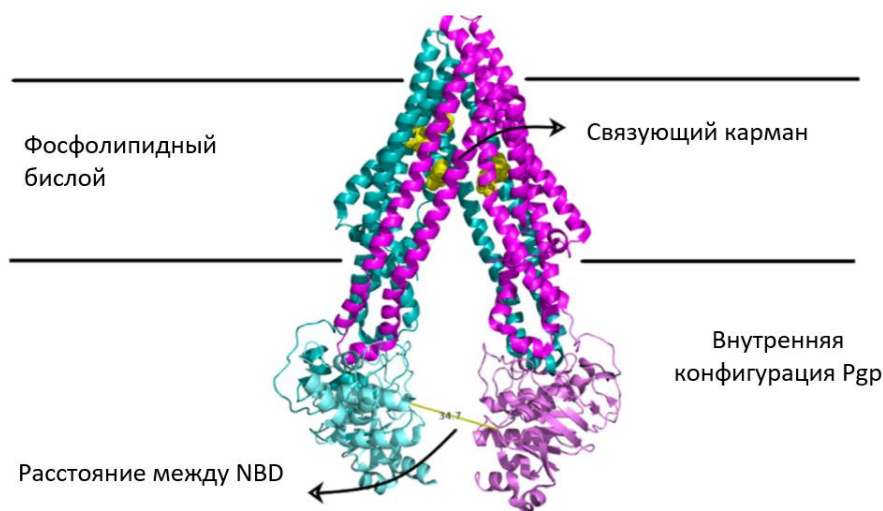


Рисунок 3 – Трехмерная структура переносчика Pgp фосфолипидов

(Цит. по: I. Juvale et al., 2022) [302]

На рисунке 3 карманы активного связывания Pgp во внутренней конфигурации с разделенными доменами связывания нуклеотидов и карманами представлены в виде желтых сфер, а расстояние между NBD показано желтыми точками.

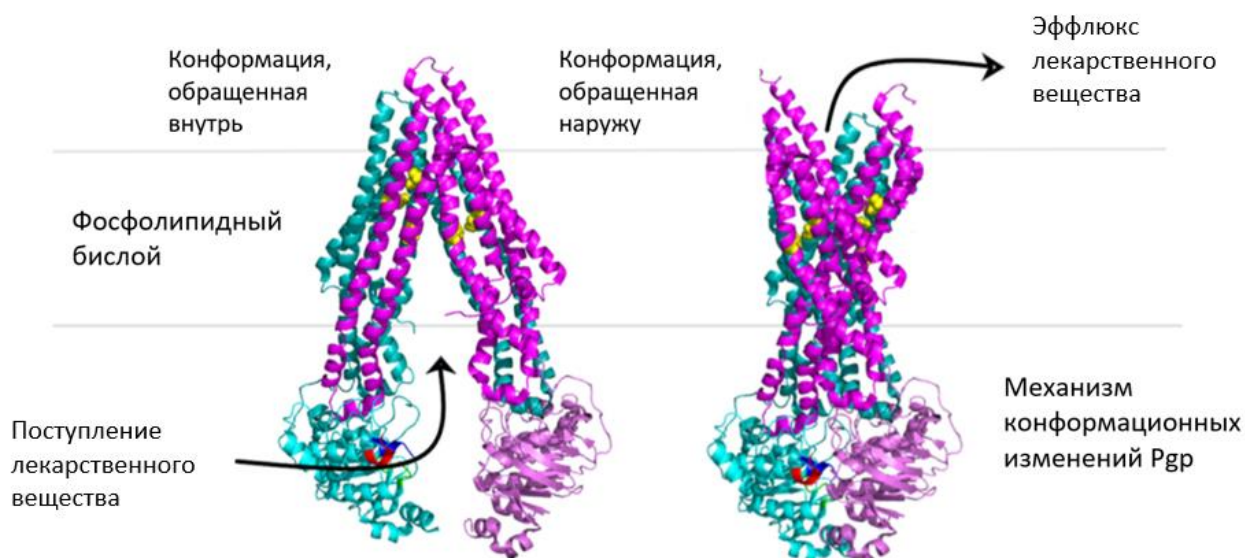


Рисунок 4 – Конформация Pgp в бислое фосфолипидов

(Цит. по: I. Juvale et al., 2022) [302]

На рисунке 4 показана структура, обращенная внутрь, способствует связыванию лекарственного вещества, тогда как структура, обращенная наружу, облегчает процесс эффлюкса. Поры канала для обращенной наружу структуры узкие, поэтому лекарство активно удаляется во внеклеточное пространство.

1.1.2. Локализация и функции Р-гликопротеина

Высокие уровни Pgp экспрессируется в эпителиальных клетках толстой и тонкой кишки, проксимальных канальцев почек и желчных протоков, а также в эндотелиальных клетках гемато-тестикулярного барьера и гематоэнцефалического барьера [85, 144, 206, 234, 243]. Его экспрессия также была обнаружена на люминальной поверхности эндометрия беременной матки, а также в плацентарных трофобластах [146, 306].

Pgp выполняет важную функцию в защите клеток от воздействия ксенобиотиков за счет их эффлюкса во внеклеточное пространство и биологические жидкости, а также в транспорте эндогенных веществ [213].

В энтероцитах Pgp экспрессируется на апикальной поверхности и препятствует всасыванию субстратов в системный кровоток [158]. Сообщается, что уровни

мРНК *MDR1* в тонкой кишке увеличиваются от верхнего отдела двенадцатиперстной кишки к нижнему отделу подвздошной кишки [86, 171]. В подвздошной кишке уровни мРНК *MDR1* самые высокие в нижней части, но имеют тенденцию к снижению от верхнего отдела подвздошной кишки к центральному [400]. С другой стороны, активность Pgp наиболее высока в центральной части подвздошной кишки, где наблюдается максимальный эффлюкс родамина 123. Более того, субстраты Pgp, такие как винбластин, всасываются из двенадцатиперстной и подвздошной кишок, но не из средней части тонкой кишки и тощей кишки [436]. Таким образом, ясно, что уровни мРНК не всегда коррелируют с активностью Pgp.

В гепатоцитах Pgp экспрессируется на биллиарной поверхности, обеспечивая выведение ксенобиотиков в желчь [117, 195]. Показано, что нокаут Pgp также может влиять на экскрецию желчи [197, 303]. В свою очередь, лекарственные препараты, такие как азитромицин, эритромицин, циклоспорин А и доксорубицин блокируют выведение субстратов с желчью, опосредованное Pgp [126, 227, 430].

В почках Pgp обеспечивает выведение субстратов в просвет проксимальных почечных канальцев [342]. Например, в клетках канальцев собачьей почки Мадина Дарби (MDCK, *англ.: Madin-Darby canine kidney*), трансфицированных геном *ABCB1*, базолатерально-апикальный транспорт (отток) ингибитора тирозинкиназы gefitinib был значительно повышен по сравнению с соответствующими контрольными клетками [120]. В присутствии ингибитора Pgp, (2R)-анти-5-(3-[4-(10,11-дифторметанодинбензо-субер-5-ил)пиперазин-1-ил]-2 гидроксипропокси) тригидрохлорида хинолина (LY335979), отток gefitinib в клетках, трансфицированных *MDR1*, снижался до того же уровня, что и в контрольных клетках [229, 343]. Доказана роль *MDR1*, влияющая на транспорт и токсичность почечных токсинов [440]. Повышенные уровни Pgp в почках в ответ на эндотоксемию [270] ишемически-реперфузионное повреждение [56] были зарегистрированы в нескольких исследованиях на животных. Однако у пациентов

с нарушением плазматических клеток, сопровождающимся протеинурией, экспрессия Pgp в почечных канальцах значительно снижена [328].

Pgp является важным участником в процессе распределения лекарственных веществ. Он локализован во всех тканевых барьерах, в том числе в гематоэнцефалическом и плацентарном барьерах. Это может влиять на распределение некоторых лекарственных препаратов, а также снижать их активацию в организме [59]. В гематоэнцефалическом барьере Pgp обеспечивает защиту головного мозга от воздействия токсических веществ. У мышей с нокаутом Pgp концентрация субстрата в головном мозге увеличивалась в 17–83 раза, тогда как уровни в других органах, таких как печень, почки и кишечник, повышались только в 2–3 раза [355]. По сравнению с мышами дикого типа мышам с нокаутом Pgp требуется более низкая доза пилокарпина для индукции судорог [305]. Снижение активности Pgp вследствие полиморфизма гена *MDR1*, кодирующего белок-транспортер у людей, была связана с более значительными побочными эффектами морфина, включая угнетение дыхания [278]. Pgp в гематоэнцефалическом барьере также участвует в качестве эффлюксного переносчика амилоида- β , ключевого компонента патологических бляшек у пациентов с болезнью Альцгеймера [301].

Положительная роль Pgp кишечника была описана при листериозе [200]. *Listeria monocytogenes* является грамположительной бактерией и распространенным патогеном желудочно-кишечного тракта [292]. Во время инвазии клетки кишечника подвергаются воздействию не только бактерий, но и нескольких поверхностных белков, генерируемых бактериями. Как *in vivo*, так и *in vitro* эксперименты показали, что ингибирование Pgp способствует бактериальной инвазии, тогда как сверхэкспрессия Pgp приводит к резистентности [200]. Экспрессия Pgp приводила к оттоку бактериальных белков с базолатеральной поверхности на апикальную поверхность, и ингибирование Pgp приводило к уменьшению этого оттока [200]. В другом исследовании позже сообщалось, что Pgp-опосредованная активация комплекса S100A8/S100A9 ответственна за эту

устойчивость к инфекции посредством фосфорилирования Ser552 с помощью α -катенина [225]. Было показано, что Pgp снижает фосфорилирование фосфоинозитид-3-киназы (PI3K, *англ.: phosphoinositide 3-kinases*) бактериями, что снижает вероятность проникновения бактерий в клетки кишечника через щелевые контакты. При листериозе бактерии размножаются в цитоплазме и инфицируют соседние клетки, не вызывая клеточного лизиса [109]. Чувствуя эту репликацию в клетках-хозяинах, цитозольные рецепторы врожденной иммунной системы активируют интерфероновый ответ типа I, что приводит к секреции интерферона- β [369]. Недавние исследования показали, что Pgp необходим для этого врожденного ответа [396].

Гиперэкспрессия Pgp является основной причиной множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) раковых клеток. Pgp перемещает широкий спектр структурно и функционально различных цитотоксических соединений из клетки, используя энергию, обеспечиваемую АТФ. Изменение этого механизма оттока Pgp является важным методом для преодоления МЛУ и повышения эффективности на протяжении всей терапии [442]. Включение ингибиторов Pgp в препараты, в отношении которых вырабатывалась резистентность, может быть полезным для снижения активности Pgp [267]. Высокая экспрессия Pgp в раковых клетках по сравнению с нормальными клетками является основной причиной МЛУ. Pgp снижает минимальную терапевтическую концентрацию, что понижает общую проницаемость лекарственного вещества для достижения мишени действия.

При вирусной инфекции Pgp, по-видимому, инициирует продукцию эффекторных Т-клеток, тогда как при бактериальной инвазии Pgp выполняет защитную функцию по отношению к Т-клеткам памяти [304]. Сообщалось, что экспрессирующие Pgp поликлональные CD8⁺ Т-клетки демонстрировали больший фенотип эффекторной памяти по сравнению с нативными клетками, лишенными Pgp. Последующие исследования *in vivo* показали, что ингибирование Pgp приводило к активации генов и факторов транскрипции, связанных с аутофагией и апоптозом. Подавление Pgp также снижает продукцию АТФ и увеличивает

образование MitoSOX (флюоресцентные зонды), что является индикатором окислительного стресса (ОС) [240, 446]. Таким образом, нормально функционирующий Pgp обеспечивает выживание клеток за счет подавления ОС и сохранения митохондриальной функции в развивающихся Т-клетках [304].

Pgp необходим для нормального развития Т-регуляторных клеток [384], он также защищает Т-хелперные клетки (Th1 и Th17) от ОС в тонком кишечнике [407].

1.1.3. Характеристика лигандов и ингибиторов Р-гликопротеина

Активность Pgp может изменяться в результате непосредственного взаимодействия молекулы белка-транспортера с молекулами эндогенных и экзогенных веществ. При этом активность Pgp может как понижаться (ингибирование), так и повышаться (индукция).

На данный момент описано три варианта ингибирования активности белка-транспортера: конкурентное, неконкурентное и аллостерическое. При конкурентном и неконкурентном ингибировании ингибитор взаимодействует с центрами связывания субстратов, а при аллостерическом – с аллостерическим центром. Описаны три сайта связывания субстратов (транспортируемых веществ), и один регуляторный (аллостерический, М-сайт) сайт, изменяющий активность белка-транспортера.

Молекула лиганда должна быть гидрофобной для того, чтобы войти в гидрофобный карман связывания субстрата и пройти через мембрану. Многие исследования предполагают, что липофильность имеет решающее значение при разработке ингибиторов транспортера. Напротив, гидрофильность молекулы может препятствовать эффлюксу Pgp [63, 193].

Вычислительные методы и программирование в сочетании со структурным дизайном [279, 431] позволяют определить характеристики ингибиторов потенциально пригодных для клинического применения (Таблица 1):

а) высокое значение $\log P$ (определяемое коэффициентом распределения липидов и воды для лекарственного средства). Этот параметр для соединения

должен быть не менее 2,92 или выше, что необходимо для образования гидрофобного/вандер-ваальсовского взаимодействия с сайтом связывания Pgr;

b) необходима значительная молекулярная масса, и молекула должна иметь 18 или более атомов, чтобы охватить более одной области связывания Pgr;

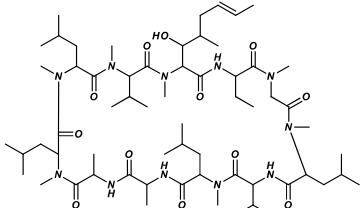
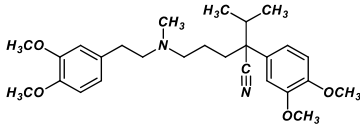
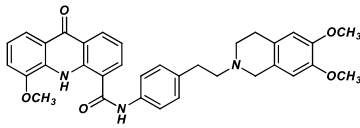
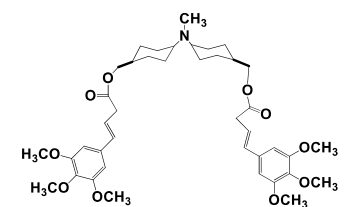
c) энергия высшей занятой молекулярной орбитали (НОМО, *англ.: highest occupied molecular orbital*) должна иметь большую степень, чтобы обеспечить нуклеофильное взаимодействие молекулы с Pgr;

d) необходим по крайней мере один третичный атом азота, и это может быть важным свойством для кандидатов в модуляторы Pgr, так как третичный амин образует катион при физиологическом pH и гарантирует связывание посредством ионного взаимодействия [375].

Во многих исследованиях сообщается об ароматических кольцах, молекулярной массе, катионном заряде, таком как протонируемый амин, и факторах донора/акцептора Н-связи. В целом ингибиторы имеют большее значение $\log P$, чем субстраты. Эти ингибиторы действуют преимущественно как доноры Н-связи, а не как акцепторы Н-связи. Их энергия НОМО высока [311, 376, 441].

Функциональные группы, включая арен, алкил, карбонил, эфир и азот, являются преобладающими фрагментами для создания сильных взаимодействий между белком и ингибитором, тем самым влияя на эффективность и фармакодинамический аспект взаимодействий (табл. 1) [209, 210, 381, 382]. Несколько исследований по изучению зависимости структура-активность показали, что липофильность и значение $\log P$ лигандов (субстрата и ингибитора) являются важными параметрами, влияющими на фармакокинетические аспекты [221]. Ингибирование Pgr может происходить и в результате изменения его структуры, так действие флавоноидов [374], ксантонов [439] и синтетических таксоидов [411] приводило к нарушению функции оттока за счет образования Н-связей и гидролиза АТФ, вызывая конформационные изменения Pgr.

Таблица 1 – Структура важных ингибиторов Pgr и взаимодействующих остатков с помощью метода молекулярного докинга (Цит по: Mollazadeh S. et al., 2018) [370]

Ингибитор	Структура ингибитора Р-гликопротеина	Важные функциональные группы	Гидрофобные и гидрофильные остатки сайта связывания	Источник
Циклоспорин А		CH ₃ (24), CONH (11)	Phe934, Val121, Leu880, Lys996, Lys930, Ser876, Gln942	[221]
Верапамил		Арен(2), CH ₃ (3), OCH ₃ (4), N(2)	Phe983, Phe770, Phe994, Phe303, Met986, Ala987, Leu724, Val991, Ile306, Gln990, Gln838, Gln725, Asn721	[151]
Элакридар		Арен(4), OCH ₃ (3), CONH (1), N(2)	Ala229, Ala230, Phe303, Phe343, Phe994, Gly346, Ser222, Ser952, Lys234	[333]
2с		OCH ₃ (6), Арен(2), CH ₃ (1), CO(2), N(1)	Phe72, Met69, Phe336, Phe343, Ile340	[333]

1.1.4. Механизмы регуляции Р-гликопротеина

Выделяют следующие механизмы регуляции Pgp.

- 1) Изменение экспрессии гена *MDR1* посредством влияния на его промотор;
- 2) Полиморфизм гена *MDR1*;
- 3) Увеличение дозы гена – амплификация участка генома, содержащего ген *MDR1*;
- 4) Стабилизация мРНК гена *MDR1*;
- 5) Влияние miRNA (микроРНК, англ.: microRNA) на экспрессию Pgp;
- 6) Передача Pgp между клетками;
- 7) Изменение активности синтезированного белка-транспортера;
- 8) Влияние на гидролиз АТФ;
- 9) Изменение свойств цитоплазматических мембран [43].

Из них первостепенное значение имеет изменение экспрессии гена *MDR1* и изменение активности синтезированного белка-транспортера.

Экспрессия и функция Pgp могут регулироваться на транскрипционном и посттранскрипционном уровнях. Транскрипция *MDR1*, кодирующего Pgp, опосредуется скоординированным действием различных факторов транскрипции на промоторе *MDR1*. Ген *MDR1* расположен на хромосоме 7q21.1 и имеет два различных промотора: восходящий промотор, расположенный в начале экзона 21, и нижний промотор, который находится внутри экзона 1 [99, 101, 207, 394, 425]. Нижний промотор генерирует основной транскрипт и предпочтительно транскрибируется. В нем есть несколько ответных элементов для факторов транскрипции, которые связываются и стимулируют активацию генов. Нижний промотор характеризуется отсутствием ТАТА-бокса, что характерно для генов переносчиков лекарственных веществ у человека [99, 346, 425].

Вместо этого последовательность инициатора [от -6 до +11 п.н. относительно сайта начала транскрипции] играет роль в направлении активации генов [429].

Инициатор взаимодействует с РНК-полимеразой II и облегчает рекрутирование комплекса фактора транскрипции комплекса предварительной

инициации РНК-полимеразы II для эффективного начала транскрипции гена [315, 429]. Анализ активности промотора с использованием делеционных мутаций позволяет предположить, что последовательность от -134 до +286 п.н. относительно сайта начала транскрипции важна для эффективной и высокой скорости транскрипции гена *MDR1* [55, 101, 191].

Действительно, существует несколько ответных элементов, расположенных в области *ABCBI* от -134 до +286 п.н., которые опосредуют связывание ключевых факторов транскрипции. Существует ССААТ-бокс-подобная последовательность (от -118 до -113 п.н.), а также инвертированный ССААТ-бокс или Y-бокс (от -82 до -73 п.н.), который имеет решающее значение для базальной экспрессии гена *MDR1* [; 55, 170, 190, 211, 425]. Y-бокс представляет собой сайт связывания ядерного транскрипционного фактора Y (NF-Y, *англ.: nuclear factor Y*). Было выявлено, что NF-Y взаимодействует с P300/CBP-ассоциированным фактором (PCAF, *англ.: P300/CBP-associated factor*), транскрипционным коактиватором с внутренней активностью ацетилтрансферазы гистонов, вызывая ацетилирование гистонов на промоторе и облегченную транскрипцию генов [211]. Описаны также боксы GC (-110 до -103 п.н., -61 до -51 п.н.), которые взаимодействуют с факторами транскрипции Sp1 и Sp3 [100, 121, 425]. Сайт ответа AP1 (от -121 до -115 п.н.) был также идентифицирован, и было показано, что он участвует в активации транскрипции *MDR1* [194].

В настоящее время описано, что miRNA-27a-3p индуцирует экспрессию и активность Pgp, в то время как ингибирование miRNA-27a-3p оказывает противоположное действие по сигнальному пути Wnt (*англ. Wingless u Int-1*), регулирующему эмбриогенез, дифференцировку клеток и развитие злокачественных опухолей [327].

Кроме этого было описано наличие элементов ответа на ксенобиотики – ксенобиотик активируемые транскрипционные факторы. Возможны два предполагаемых диоксин-ответных элемента, начинающиеся с -55 п.н. и +238 п.н. (с несовпадением одного основания), которые являются местами связывания

гетеродимеров ядерного рецептора ароматических углеводородов (АНР, *англ.: aryl hydrocarbon receptor*) [145, 191].

АНР представляет собой активируемый лигандом фактор транскрипции, который, как было показано, опосредует транскрипцию *ABCB1* в нескольких тканях. Лиганды АНР включают канцерогены, такие как 2,3,7,8-тетрахлордибензодиоксин и бензо(а)пирен, а также флавоноидные соединения, в том числе б-нафтофлаван [261].

В промоторе *ABCB1* также присутствуют мотивы связывания индуцированных стрессом регуляторов экспрессии *MDR1*, включая ядерный фактор «каппа-би» (NF-κB, *англ.: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (от -167 до 158 п.н.) и p53 (от -72 до -40 п.н.) [46, 257, 289]. Совместные взаимодействия между инициатором и разными респонсивными элементами выше сайта начала транскрипции необходимы для этой точной и прецизионной активации транскрипции [345] (Рисунок 5). На рисунке 5 показано расположение сайтов связывания ключевых факторов транскрипции в промоторе *ABCB1* человека относительно сайта начала транскрипции (TSS, *англ.: transcription start site*) [444]

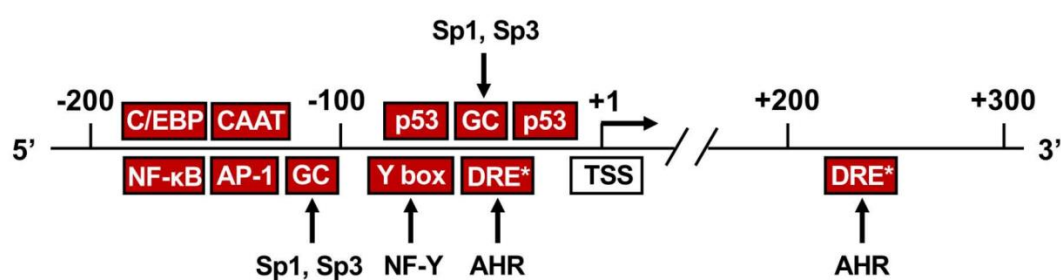


Рисунок 5 – Регуляторные элементы на промоторе гена *ABCB1* человека (Цит по: You D., 2020) [444]

1.1.5. Конститутивный андростановый рецептор и прегнан X рецептор как регуляторы экспрессии гена *MDR1*

Ядерные рецепторы — это большое суперсемейство лиганд-активируемых факторов транскрипции клеток, которые ответственны за регуляцию экспрессии генов посредством взаимодействия с соответствующими лигандами, коактиваторами и корепрессорами, тем самым контролируя дифференцировку клеток, поддержание гомеостаза и метаболические процессы организма.

Ядерные рецепторы образуют суперсемейство филогенетически родственных белков, кодирующихся у человека 48 генами: эндокринные рецепторы (лигандами являются стероидные и тиреоидные гормоны, витамины D и A), а также большая группа орфанных рецепторов, идентификация которых произошла независимо от классификации лиганда.

Основными представителями ядерных рецепторов семейства орфанных являются конститутивный андростановый рецептор (CAR, *англ.: constitutive androstane receptor*, NR1I3) и прегнан X рецептор (PXR, *англ.: pregnane X receptor*, NR1I2). До недавнего времени CAR и PXR рассматривались только в качестве ксеносенсоров, однако позже была выявлена их регуляторная роль [408].

PXR был идентифицирован как основной регулятор индукции *Pgp* [380], и, помимо экспрессии в печени и тонком кишечнике, было показано, что он экспрессируется в опухолевых клетках при следующих патологиях: рак молочной железы, толстой кишки, костей, предстательной железы и эндометрия [143, 162, 186, 244, 395].

PXR контролирует экспрессию генов через модуль PXR-чувствительного элемента в промоторной области генов-мишеней. PXR обладает широкой субстратной специфичностью, активируется лигандами различными по своей структуре: рифампицин, гиперфорин, противоопухолевый препарат паклитаксел [276].

На данный момент доказано, что PXR вовлечен в молекулярный механизм индукции *MDR1* препаратом рифампицин [337]. PXR связывается с мотивом DR4

в дистальном -7,8 килобаз энхансере *MDR1* 59-восходящей регуляторной области [161]. Кроме того, было показано, что PXR является ключевым фактором для индукции ферментов, метаболизирующих лекарственные вещества суперсемейства цитохромов (CYP, англ.: cytochrome) особенно подсемейств CYP3A и CYP2C, и других белков-транспортеров, ассоциированных с МЛУ (MRP2, англ.: multidrug resistance-associated protein 2) (обзор [416]) (Рисунок 6).



Рисунок 6 – Элементы реакции ядерного рецептора в элементе *MDR1*

(Цит по: Geick A. et al., 2018) [161]

На рисунке 6 показана последовательность энхансера *MDR1* -7,8 килобаз. Числа указывают положение относительно сайта начала транскрипции *MDR1*. Полусайты ядерных рецепторов отмечены линиями, а стрелки обозначают ориентацию. Заполненные стрелки указывают на функциональный мотив DR4(I), который необходим для трансактивации энхансера гетеродимерами PXR/Rxr [161].

Однако PXR не единственный ядерный рецептор, который, как было описано, реагирует на ксенобиотики.

Ядерный рецептор CAR индуцирует экспрессию генов CYP2B грызунов и человека с помощью индукторов фенобарбитального типа [379] и трансактивирует промоторные конструкции CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4 [192, 415, 416]. CAR проявляет конститутивную транскрипционную активность. Различные типы

химических веществ могут либо дополнительно активировать, либо деактивировать CAR [424].

В экспериментах с трансфицированными энтероцитами человека было продемонстрировано специфическое связывание CAR с элементами реакции ядерного рецептора в -7,8 килобаз энхансера *MDR1* и идентифицированы мотивы DR4(I) и DR4(II), таким образом доказано, что CAR вовлечен в регуляцию экспрессии *MDR1* в кишечнике [51], что может объяснить органоспецифичность влияния некоторых лекарственных средств на белки-транспортеры.

Физиологическая значимость CAR-зависимой регуляции *MDR1* в тонком кишечнике подтверждается значительной корреляцией между CAR и уровнем экспрессии мРНК *MDR1* в кишечнике, но не в печени [51]. Таким образом, по-видимому, CAR может играть определенную роль в регуляции экспрессии *MDR1* именно в кишечнике.

Возможные тканеспецифичные механизмы участия конститутивного андростанового рецептора в регуляции гена *MDR1* реализуются при наличии/отсутствии дополнительных факторов транскрипции и кофакторов, которые активируют/ингибируют транскрипционный фактор. Кроме этого, кишечник и печень могут экспрессировать различные относительные количества CAR и других ядерных рецепторов (особенно PXR), которые конкурируют за связывание, а также активность CAR может по-разному модулироваться в этих двух органах.

Таким образом, ряд исследований описывает молекулярный механизм активации *MDR1* с помощью ядерных рецепторов - CAR и PXR. Также доказано специфическое участие CAR в регуляции экспрессии *MDR1* в кишечнике, что может иметь особое значение, поскольку кишечник является важным местом фармакокинетического межлекарственного взаимодействия на этапе всасывания, опосредованного участием Pgp.

1.1.6. Изменение активности синтезированного белка-транспортера

Активность Pgp может изменяться в результате непосредственного взаимодействия молекулы белка-транспортера с молекулами экзогенных и эндогенных веществ.

Несколько исследований на животных показали, что нейромедиатор глутамат положительно регулирует экспрессию Pgp и транспортную функцию Pgp в головном мозге через рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDA) [140, 348]. Через рецепторы NMDA происходит огромный приток ионов кальция в клетку, что активирует фосфолипазу A2 [252].

Фосфолипаза A2 представляет собой катаболический фермент, расщепляющий фосфолипиды с высвобождением арахидоновой кислоты, [50, 116] из которой затем образуются простагландины с помощью циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) [105]. Отдельные исследования выявили связь между передачей сигналов NMDA, ЦОГ-2 и Pgp [125, 310, 348]. Было показано, что уровни ЦОГ-2 повышают уровень экспрессии Pgp [123].

Белок-активатор-1 (AP-1, *англ.: activator protein 1*) и NF-κB являются другими известными индукторами Pgp [89]. Повышенные уровни экспрессии Pgp наблюдались, когда NF-κB перемещался в ядро в ответ на фосфорилирование протеинкиназы B (Akt, *англ.: protein kinase B*) через N-концевые (терминальные) киназы c-Jun (JNK, *англ.: c-Jun N-terminal kinases*) [102, 251, 413].

Другие митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК, *англ.: mitogen-activated protein kinase*), такие как внеклеточная сигнал-регулируемая киназа (ERK, *англ.: extracellular signal-regulated kinase*) [251; 336] и цитокинин-специфический связывающий белок (CSBP или p38, *англ.: cytokinin binding protein*) [332, 433] также повышают экспрессию Pgp.

Было показано, что ферменты PI₃K, семейство протеинкиназ B, кодируемых геном *Akt*, и мишень рапамицина млекопитающих (mTOR, *англ.: mammalian target of rapamycin*) – внутриклеточный сигнальный путь PI3K/Akt/mTOR [58, 280, 331],

и сигнальный путь Wnt/бета-catenin, регулирующий дифференцировку клеток и развитие злокачественных опухолей, [153, 258] усиливают экспрессию Pgp.

Провоспалительные цитокины, такие как фактор некроза опухоли-альфа (ФНО-альфа), также являются известными индукторами Pgp [412].

Сигнальный путь трансформирующего фактора роста-бета1 (TGF-бета1, *англ.: transforming growth factor beta*) был признан положительным регулятором Pgp [299], при этом исследования показали, что активность TGF-бета1 опосредована киназами анапластической лимфомы (ALK1 и ALK5, *англ.: anaplastic lymphoma kinase*) [386].

Сам ген *ABCB1* может модулироваться эпигенетическими механизмами, такими как ацетилирование гистонов, а также предполагается, что метилирование промоторной области играет роль в индукции Pgp [134, 404].

В нескольких исследованиях доказано, что miRNA-145, miRNA-27a, miRNA-331-5p, miRNA-146-5p взаимодействуют с 3' нетранслируемой областью мРНК *ABCB1*, что снижает уровень экспрессии Pgp [245, 246].

Другие miRNA, такие как miRNA-137, могут модулировать факторы транскрипции, такие как чувствительный к нуклеазе элемент-связывающий белок 1 (YB-1, *англ.: Y box binding protein 1*), и, таким образом, косвенно снижать экспрессию Pgp [122, 249].

Было замечено, что miRNA-200c подавляет экспрессию гена *JNK2*, тем самым ингибируя передачу сигналов JNK2/p-JNK/p-c-Jun/*ABCB1* и снижая уровни экспрессии Pgp [250]. Исследования также выявили, что малые ГТФазы (малые G-белки) могут модулировать транспортировку и поверхностную экспрессию Pgp [150].

Таким образом, регуляция Pgp – это сложный многоступенчатый процесс, который способен протекать по разным механизмам, а идентификация определенного пути в тех или иных условиях может иметь практическое значение для преодоления направленной регуляции активности белка-транспортера и множественной лекарственной устойчивости.

1.2. Современные представления об окислительном стрессе

1.2.1. Концепция окислительного стресса

В интактных клетках продукция активных форм кислорода (АФК) сбалансирована с системами антиоксидантной защиты. Однако в результате дисбаланса в сторону прооксидантов, в клетке постоянно происходит АФК-зависимое повреждение макромолекул (белки, липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты). Другими словами, антиоксидантная защита контролирует уровни АФК, а не устраняет их. Это может быть связано со следующими причинами [172, 426]:

1. Поддержание избыточной антиоксидантной защиты потребует затрат энергии — может быть энергетически «дешевле» восстановить или заменить поврежденные биомолекулы;

2. Антиоксиданты могут быть неспособны перехватывать некоторые АФК. Например, $\text{OH}\cdot$, образующийся *in vivo*, т.е. путем гомолитического деления воды из-за воздействия фонового уровня ионизирующего излучения, будет хаотично реагировать с клеточными компонентами. Данный процесс является неконтролируемым, вследствие чего остановить его практически невозможно, поэтому необходимо заменить поврежденные молекулы;

3. Ключевым фактором является то, что АФК играют важную роль *in vivo*. Установлена регуляция клеточных процессов путем фосфорилирования и дефосфорилирования ферментов и факторов транскрипции. Антиоксидантная система защиты должна свести к минимуму уровни большинства АФК, в то же время оставляя их в достаточном количестве для выполнения сигнальных функций.

При нарушении баланса между продукцией АФК и их инактивацией в пользу преобладания первых, происходит развитие ОС. АФК по своей природе классифицируются на радикальные, имеющие один или несколько неспаренных электронов на внешней орбитали, и нерадикальные.

Классификация АФК радикальной и нерадикальной природы представлена в Таблице 2.

Таблица 2 – Классификация активных форм кислорода (Цит по: Wexler P., 2018) [435]

АФК радикальной природы		АФК нерадикальной природы	
Название	Формула	Название	Формула
Супероксид	$O_2^{\cdot -}$	Пероксид водорода	H_2O_2
Гидроксильный радикал	OH^{\cdot}	Хлорноватистая кислота	$HOCl$
Пероксильный радикал	ROO^{\cdot}	Гипобромистая кислота	$HOBr$
Алкоксильный радикал	RO^{\cdot}	Озон	O_3
Гидропероксильный радикал	HO_2^{\cdot}	Синглетный кислород	1O_2
Липидный пероксильный радикал	LOO^{\cdot}	Липидный пероксид	$LOOH$

Концепция была сформулирована в 1985 г., под термином ОС, под которым понимали «нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса в пользу первого» [356]. В то время основное внимание в научных исследованиях уделялось окислительному повреждению клеток и органов, изучению различных прооксидантов и антиоксидантов [358]. В последующие десятилетия было сделано большое количество фундаментальных открытий в понимании окислительно-восстановительной регуляции и сигнализации. Это потребовало обновления концепции ОС [212, 235] и способствовало формированию представления о нем как «дисбалансе между оксидантами и антиоксидантами в пользу оксидантов, что приводит к нарушению окислительно-восстановительной сигнализации и контроля и/или молекулярному повреждению».

Из данного определения следует, что ОС можно классифицировать по интенсивности, причем шкала интенсивности варьирует от физиологического ОС (эустресс) до токсической окислительной нагрузки, повреждающей биомолекулы

(дистресс) [74, 357]. Низко-интенсивное воздействие используется для передачи окислительно-восстановительных сигналов путем воздействия на специфические мишени, тогда как высоко-интенсивное приводит к нарушению регуляторных механизмов и/или повреждению клеток [71, 357].

ОС может развиваться или в результате уменьшения количества антиоксидантов, или вследствие увеличения генерации АФК.

Уменьшение количества антиоксидантов может происходить в результате мутаций, снижающих уровни ферментов антиоксидантной защиты, таких как глутатион или марганец-зависимая супероксиддисмутаза [330]. Генерация АФК происходит при воздействии повышенных концентраций O_2 , чрезмерной активации фагоцитирующих клеток.

Повреждение, которое может возникнуть в результате ОС, а именно воздействие АФК на живой организм, называют окислительным повреждением [173].

Последствия ОС могут включать любое из перечисленных ниже явлений или любую их комбинацию в зависимости от исследуемой клетки/ткани, а также тяжести и продолжительности ОС [26, 172] (Рисунок 7):

1. повышенная пролиферация - многие клетки реагируют на умеренный ОС делением клеток;
2. адаптация клетки или организма в результате активации защитных систем или приобретения устойчивости к более высоким уровням ОС;
3. повреждение клеток - окисляются отдельные или все молекулярные мишени: белки, липиды, углеводы, нуклеиновые кислоты. Стоит отметить, что повреждения, вызванные ОС, могут быть *первичными* (прямое взаимодействие АФК с мишенями) и *вторичными* (взаимодействие ПОЛ с аминокислотными остатками белков);
4. старение - клетка выживает, но больше не может делиться;
5. гибель клеток - окислительное повреждение, особенно ДНК, может вызвать апоптоз, некроз.

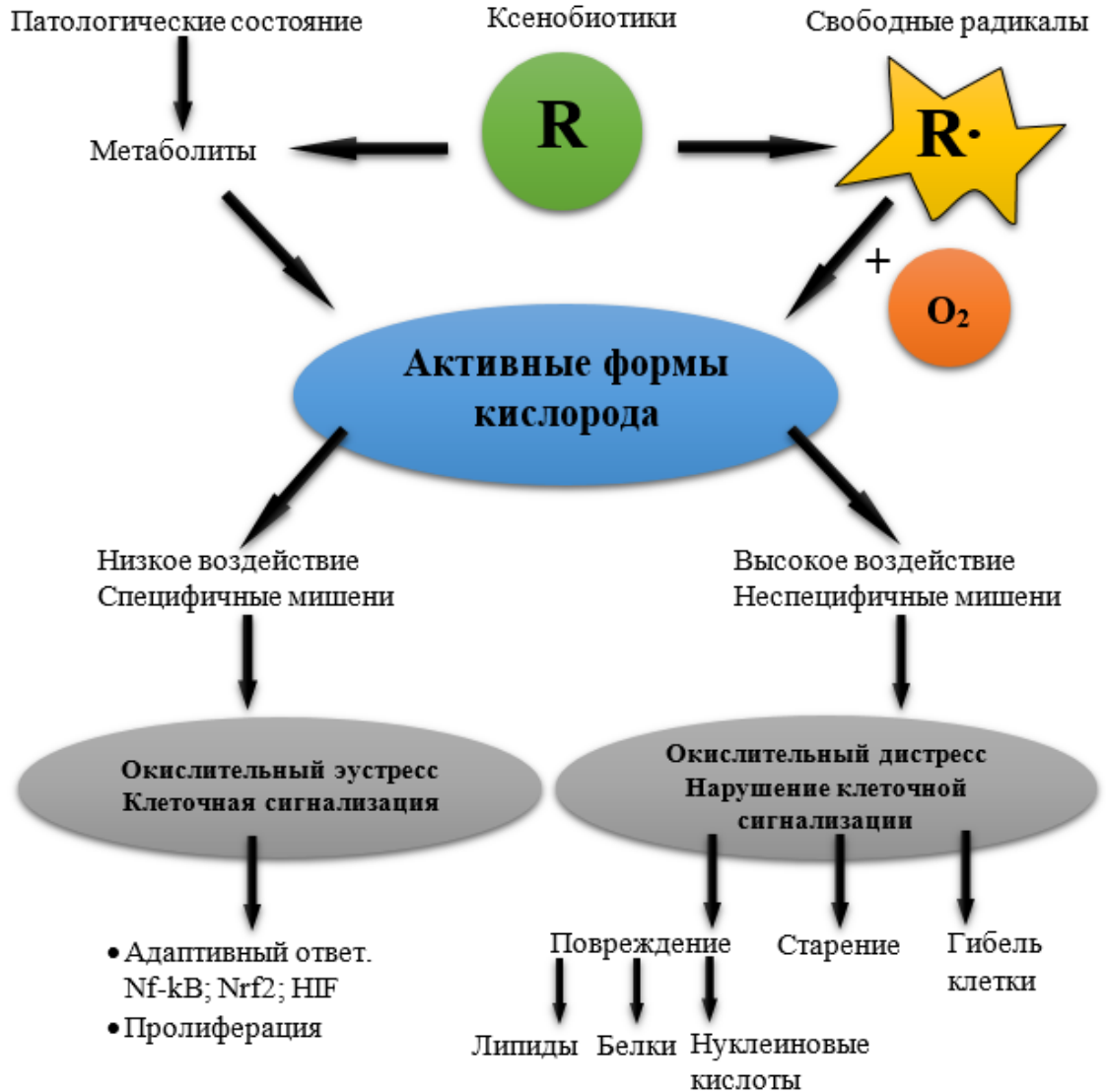


Рисунок 7 – Причины и последствия окислительного стресса

1.2.2. Повреждение мембранных и внутриклеточных липидов и белков в результате окислительного стресса

Основными составляющими биологических мембран являются липиды и белки. Количество белка возрастает с увеличением числа функций, выполняемых мембраной. В миелиновой оболочке, которая служит в основном для изоляции нервных аксонов, только около 20% сухого веса мембраны составляет белок, но большинство мембран содержат 50% или более белка, а внутренние митохондриальные и хлоропластные тилакоидные мембраны составляют около

80% белка. Таким образом, в результате ОС в большинстве биологических мембран, скорее всего, повреждаются как мембранные белки, так и липиды [108].

Мембранные липиды, как правило, амфипатические, то есть они содержат гидрофобные участки, которые группируются вдали от воды, рядом с полярными частями и склонны связываться с водой. В мембранах животных клеток преобладающими липидами являются фосфолипиды, сложные эфиры на основе спирта глицерина, наиболее распространенным компонентом в мембранах животных выступает лецитин (фосфатидилхолин). Некоторые мембраны, особенно плазматические, содержат значительное количество сфинголипидов и холестерина [360].

Боковые участки жирных кислот мембранных липидов в клетках животных имеют неразветвленные углеродные цепи и содержат четное число атомов углерода, обычно от 14 до 24, а двойные связи имеют цис-конфигурацию, вызывающую «перегибы» в структуре [81, 220, 259]. По мере увеличения числа двойных связей в жирной кислоте ее температура плавления падает. Например, стеариновая кислота (18:0) является твердой при комнатной температуре, тогда как линолевая кислота (18:2) является жидкой [219].

В каждой части бислоя (верхней и нижней) белковые и липидные молекулы могут быстро диффундировать - перемещаться от одного участка мембраны к другому через несколько секунд. Эта текучесть мембраны в значительной степени обусловлена наличием полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК, кислоты, содержащие две или более углерод-углеродные двойные связи), которые снижают температуру плавления внутренней мембраны. Текучесть биологических мембран необходима для их правильного функционирования, а повреждение остатков ПНЖК может ее снизить, поэтому является важным биологическим показателем. Так, уменьшение текучести мембран эритроцитов может быть маркером ретинопатии у пациентов с сахарным диабетом 1 типа [135]. ПНЖК модифицируют клеточные мембраны, встраиваясь в нее и изменяя сигнальные свойства клеточных рецепторов [69].

Воздействию АФК в первую очередь подвергаются ПНЖК. Стоит отметить, что насыщенные и мононенасыщенные липиды также могут окисляться, но данный процесс идет медленнее и сложнее [118], а сами ПНЖК в результате окисления могут быть источником липидных медиаторов [90].

Общие эффекты перекисного окисления липидов (ПОЛ) заключаются в снижении текучести мембраны, облегчении обмена фосфолипидов между бислоем, увеличении «проницаемости» мембраны для веществ, в норме не проникающих через билипидный слой, а также повреждении мембранных белков, инактивации рецепторов, ферментов, транспортных белков и т. д. Сшивание мембранных белков снижает их латеральную и вращательную подвижность. Одной из причин этих изменений является то, что пероксильные радикалы и пероксиды более полярны, чем внутренняя часть нормальных мембран, и поэтому имеют тенденцию изменять структуру, поскольку они «стремятся» быть ближе к воде. Термин «липидные висеры» (*от англ. lipid whisker* – липидный ус) используется при описании процесса сборки продуктов окисления на поверхности мембраны, в результате чего они выступают наружу [83].

Повышение уровня Ca^{2+} , вызванное ОС, может активировать фосфолипазу А₂, которая высвобождает арахидоновую кислоту из мембранных фосфолипидов. Свободная арахидоновая кислота может затем подвергаться ПОЛ, а также стимулировать синтез эйкозаноидов. Лизофосфолипиды, которые после действия фосфолипазы А₂ остаются в мембране, обладают мягким детергентным действием и могут способствовать дезорганизации мембраны, если они накапливаются в больших количествах. Фосфолипаза А₂ также может селективно отщеплять остатки окисленной арахидоновой кислоты от мембран, однако механизм данного процесса пока неизучен [419].

Дальнейшее окисление боковых цепей жирных кислот и их фрагментация с образованием альдегидов и углеводов приводит к потере целостности мембраны. Например, разрыв лизосомальных мембран приводит к выбросу гидролитических ферментов и ионов железа в клетку. В результате перекисного

окисления мембран эритроцитов, они теряют способность изменять форму и проникать через мелкие капилляры [135]. Окислительное повреждение эндоплазматического ретикулума или аппарата Гольджи снижает способность клеток гликозилировать и экспортировать белки [80, 167, 401].

Пероксильные и алкоксильные радикалы, альдегиды и некоторые другие конечные продукты перекисного окисления могут повреждать рецепторы и ферменты, такие как глюкозо-6-фосфатаза, Ca^{2+} -АТФаза эндоплазматического ретикулума, Na^{+} -, K^{+} -АТФаза и K^{+} -каналы [111, 263, 269, 364].

Повреждение белков в результате ОС может происходить в результате:

- прямого воздействия свободных радикалов (наиболее реакционноспособный OH^{\bullet});
- продуцентов АФК (например, HOCl , ONOOH);
- «вторичного повреждения», включающего реакцию с конечными продуктами ПОЛ, такими как изокетали, малоновый диальдегид (МДА) и гидроксинonenаль [352, 437].

Некоторые «повреждения» белков являются обратимыми, например, образование дисульфидных связей, сульфеновой кислоты, метионинсульфоксида, S-нитрозилирование, разрушение кластеров Fe-S под действием $\text{O}^{\bullet-}$ [157, 264]. Другие повреждения, такие как окисление боковых цепей аминокислот или расщепление пептидного остова, могут быть необратимыми, и тогда белок подвергается протеолизу [130]. Окислительное повреждение ДНК (через мутацию) и РНК (неверная транскрипция) также могут привести к дефектам белков и быть маркером при патологии [5, 13, 15, 24, 25, 29, 35, 37, 60].

Кроме того, ОС может препятствовать синтезу белка путем воздействия на факторы инициации, например, фактор инициации 2, который инактивируется фосфорилированием, вызванным ОС. Инактивация фактора инициации 2 регулирует реакции эндоплазматического ретикулума на стресс. Этот механизм помогает уменьшить общий синтез протеинов в условиях ОС, чтобы не «затопить» клетку поврежденными белками, и, возможно, дать время для

перепрограммирования синтеза белка для пополнения белками теплового шока, антиоксидантными ферментами и т.д. [169].

Протеомные методы анализа показывают, что в клетках, подвергнутых ОС, повреждаются определенные белки, тем не менее механизм этой селективности остается неясными. Например, *Escherichia coli*, обработанных H_2O_2 , основными мишенями являются алкогольдегидрогеназа E, фактор элонгации G, енолаза, белок наружной мембраны и олигопептид-связывающий белок A [383]. В фибробластах кожи, обработанных H_2O_2 , отдельные белки в эндоплазматическом ретикулуме (протеиндисульфидизомераза, IgG-связывающий белок, калнексин, эндоплазмин и белок 58) окислялись в ответ на ОС [133].

В начале 1900-х годов С. J. Dillard, A. L. Tappel и их коллеги показали, что в белковых растворах, подвергнутых облучению, образуется широкий спектр карбониллов и пероксидов [118]. Начальная атака $OH\cdot$ на белки приводит к генерации свободных радикалов, которые реагируют с O_2 с образованием алкоксильных ($RO\cdot$) и пероксильных радикалов ($ROO\cdot$), способных отщеплять $H\cdot$ и образовывать пероксиды. Алкоксильные радикалы могут фрагментироваться путем β -разрыва, высвобождая карбонилы из белков. Пероксиды могут образовываться на пептидном остове и на боковых цепях аминокислотных остатков. Пероксиды аминокислот, как и пероксиды липидов, довольно стабильны при физиологической температуре, но могут разлагаться на алкоксильные радикалы ($RO\cdot$) при нагревании или добавлении ионов переходных металлов. Поскольку многие белки связывают ионы металлов (железа и меди), то последующее воздействие H_2O_2 приводит к генерации гидроксильного радикала ($OH\cdot$), который избирательно повреждает аминокислотные остатки в месте связывания.

При образовании аминокислотных радикалов в белке, электроны могут «мигрировать» от них к другим остаткам, т.е. конечные продукты не обязательно должны представлять собой начальные участки воздействия АФК на белок. Например, радикалы метионина могут окислять триптофан, а радикалы триптофана

могут окислять тирозин. Радикалы тирозина-О[•] могут реагировать с антиоксидантами глутатионом, аскорбатом, а также с О^{•-} с образованием 2 гидропероксидов. Таким образом, хотя О^{•-} редко вступает в непосредственную реакцию с белками, его присутствие может изменить распределение продуктов, образующихся при воздействии более реакционноспособных соединений, таких как ОН[•].

Тиоловые группы, входящие в состав цистеина и метионина, легко окисляются АФК и ионами переходных металлов с образованием тиольных радикалов, дисульфидов и других продуктов окисления, таких как сульфеновая, сульфиновая и сульфоновая кислоты. Для индукции модификации цистеина необходимо окисление SH-группы до тиолят-аниона, который представляет собой реактивную форму. Аналогичные продукты могут быть получены двухэлектронными окислителями, например, синглетный кислород, HOCl и ONOON. Воздействие этих агентов на ферменты часто приводит к потере их активности [157, 264].

Одноэлектронное **окисление метионина** (например, ОН[•]) до сульфоксида протекает через катион-радикал серы (metS^{•+}) и последующую реакцию с водой. Сульфоксид метионина более гидрофилен, чем метионин; это может нарушить структуру белка, вследствие выхода внутренних остатков на поверхность [318]. Остатки метионина часто необходимы для функционирования белка, поэтому окисление метионина снижает активность, например, инактивация α 1-антипротеиназы [288]. У пациентов с хронической почечной недостаточностью фактор фон Виллебранда может окисляться на остатках метионина. Этот гликопротеин плазмы помогает тромбоцитам фиксироваться к участкам повреждения кровеносных сосудов и запускать процесс тромбообразования. Окисление метионина усиливает его протромботическое действие [281].

Повреждение **остатков гистидина** в белках часто приводит к изменению их структурно-функциональных свойств [128]. Гистидин быстро реагирует с ОН[•] и синглетным кислородом, образуя пероксиды и 2-оксогистидин. Способность

гистидина связывать ионы переходных металлов, таких как Cu^{2+} , делает его основной мишенью окислительного повреждения [47].

Окисление остатков *пролина и аргинина* может привести к образованию глутаматного полуальдегида, 5-гидрокси-2-аминовалерьяновой кислоты соответственно [68], тогда как *лизина* - 2-аминоадипинового полуальдегида [329].

Остатки *триптофана* чувствительны к повреждению АФК ($^1\text{O}_2$, RO^\bullet , OH^\bullet , ONOOH и HOCl). Они могут образовывать продукты циклического гидроксирования или нитрования, пероксильные радикалы, пероксиды и, конечные флуоресцентные продукты окисления - N-формилкинуренин и кинуренин, которые являются маркерами сахарного диабета [182]. Индольное кольцо триптофана может гидроксироваться по 2,4,5,6,7 положению, что приведет к последующему разрыву пятичленной структуры В митохондриях сердца человека N-формилкинуренин был обнаружен во многих белках, особенно в комплексах I и V, что свидетельствует о продолжающемся окислительном повреждении остатков триптофана в этих органеллах в норме [283].

Остатки *тирозина* в белках могут подвергаться воздействию АФК, что приведет к образованию дитирозина [239] или гидроксированию тирозина до дигидроксифенилаланина (ДОФА), который легко окисляется АФК. Воздействие HOCl , HOBr , ONOOH на тирозин приводит к формированию соединений-биомаркеров, которые включают атомы исходного окислителя – 3-хлорТур, 3-бромТур, 3-нитроТур соответственно [149, 163]. Воздействие OH^\bullet на фенилаланин приводит к образованию промежуточных радикалов, а далее - орто-, пара- и мета-тирозинов [214].

Алифатические аминокислоты (валин, лейцин, изолейцин, лизин, глутамин) и гидроксикислоты (треонин) в составе белков подвергаются воздействию АФК на связи C–H в боковых цепях с образованием соответствующего продукта (Таблица 3).

Таблица 3 – Окислительная модификация белков по отдельным аминокислотным остаткам

Остаток аминокислоты	Промежуточные и конечные продукты воздействия активных форм кислорода
Алифатические незамещенные и замещенные аминокислоты	
Валин	β -гидропероксивалин, γ -гидропероксивалин
Лизин	2-аминоадипиновый полуальдегид
Аргинин	Глутаминовый полуальдегид, 5-гидрокси-2-аминовалерьяновая кислота
Цистеин	Нитрозотиинины, тиоловые радикалы, цистин, конъюгаты с глутатионом
Метионин	Метионинсульфоксид, метионин сульфон
Глутамат	Пировиноградная кислота
Аспарат	Пировиноградная кислота
Циклические аминокислоты	
Фенилаланин	2,3-дигидроксифенилаланин; 4-гидроксифенилаланин
Тирозин	3,4-дигидроксифенилаланин, дитирозин, 3-нитротирозин, хлортирозин
Триптофан	Кинуренин, 3-гидроксикинуренин, гидропироллиндол, оксииндол, N-формилкинуренин, 3-гидроксикинуренин
Гистидин	2-оксогистидин, 4-ОН-глутамат, аспарат, аспарагин
Пролин	Глутаминовый полуальдегид, 5-гидрокси-2-аминовалерьяновая кислота

Таким образом, окислительная модификация белков может привести к повреждению специфических аминокислотных остатков, образованию новых антигенов, фрагментации, потере ферментативной (или другой) функции, конформационным изменениям, приводящим к расположению гидрофобных остатков на поверхности белка и разной степени агрегации, чему отчасти способствует появление поверхностных гидрофобных участков.

1.2.3. Регуляторная роль окислительного стресса

Характерной особенностью ОС является инициирование стрессовой реакции, реализуемой через сигнальные механизмы, которые вызывают активацию экспрессии генов защитных систем для восстановления редокс баланса.

Трансдукция сигнала описывает механизмы, с помощью которых клетки воспринимают окружающую среду и реагируют на нее: от обнаружения индуцирующего фактора (H_2O_2 , фактора роста, цитокина) до передачи информации через другие молекулы в ядро, где транскрипция генов отвечает за клеточный ответ и изменяет его. Например, связывание лигандов с некоторыми рецепторами факторов роста активирует домены тирозинкиназы на этих рецепторах, которые затем фосфорилируют и активируют последующие белки в сигнальном каскаде.

В дополнение к внутриклеточной передаче сигналов, многоклеточным организмам требуются сложные межклеточные и межтканевые сигнальные сети для организации и координации функций различных клеток и органов с целью поддержания гомеостаза, защиты от патогенов, восстановления повреждений и развития. В тканевых структурах сигнальные сети необходимы для ремоделирования и предотвращения злокачественных новообразований.

H_2O_2 и другие АФК играют ключевую роль в передаче сигналов *in vivo*. Следовательно, активность и локализация систем, генерирующих АФК (НАДФН-оксидаза, митохондриальный транспорт электронов) связаны с ферментами, которые их удаляют. Накопление АФК должно быть кратковременным, а их избыток необходимо удалить после получения сигнала.

Активность некоторых киназ напрямую зависит от ОС, в том числе протеинказы C, G, D, протоонкогенной тирозин-протеинкиназы Src (*c-src*, *англ.: cellular sarcoma*), киназного домена рецептора эпидермального фактора роста (EGFR, *англ.: epidermal growth factor receptor*), киназы пируватдегидрогеназы [94, 314]. Известно, что ОС активирует фосфорилирование путем ингибирования дефосфорилирования. Протеинфосфатазы постоянно активны в клетках и функционируют, дефосфорилируя белки, тем самым ограничивая степень и

продолжительность передачи сигналов. Основным субстратом для протеинфосфатаз *in vivo*, по-видимому, является фосфотидилинозитол (3,4,5)-трифосфат (PIP3, *англ.: phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*) [222].

Фосфатаза с субстратной специфичностью, продукт гена *PTEN* (фосфатаза с двойной субстратной специфичностью, гомолог фосфатазы и тензина удаленного на хромосоме 10, *англ.: phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10*), гидролизует PIP3 и, как следствие препятствует активации фосфоинозитид-3-киназы (PI3K/Akt). Таким образом, инактивация *PTEN* (пероксиредоксины снижают его активность) может способствовать выживанию клеток за счет повышенного фосфорилирования Akt [319].

Инактивация фосфатаз обычно происходит путем окисления незаменимых остатков цистеина до сульфеновых кислот (cys-SOH). Активные формы, такие как ONOO⁻, H₂O₂, органические пероксиды, HOCl и хлорамины, способны инактивировать протеинфосфатазы *in vivo* [152, 155].

Инактивация фосфатаз с помощью H₂O₂ усиливается в присутствии CO₂/HCO₃⁻, что приводит к образованию пероксомонокарбоната фосфатазы [387]. Дальнейшие реакции окисления фосфатаз до сульфеновой кислоты происходят в результате реакции с амидным азотом соседнего серинового остатка с образованием сульфениламидных (S-N) частиц, что предотвращает последующее окисление сульфеновой кислоты в сульфоновые (-SO₃H) или сульфиновые (-SO₂H) кислоты, которые труднее преобразовать обратно в активный остаток цистеина [291].

Кроме этого механизма, инактивация фосфатаз может происходить путем глутатионилирования. Так, например, инактивация *PTEN* АФК происходит не за счет образования cys-SOH, а за счет формирования дисульфидного мостика в молекуле [325]. Другой фосфатазой, чувствительной к ОС, является кальциневрин (Ca²⁺/кальмодулин-зависимая серин/треонинфосфатаза или протеинфосфатаза 3, или кальций-зависимая серин-треониновая фосфатаза), выполняющая важные

функции для мозга, сердца, хрящей и лимфоцитов. Инактивация происходит путем окисления $O^{\cdot-}$ ионов железа в активном центре молекулы [262].

Например, тиоредоксин связывается и инактивирует ASK1 (киназа, регулирующая сигнал к апоптозу, тип 1; *англ. apoptosis signal-regulating kinase 1*). ОС вызывает окисление тиоредоксина, и в следствие этого его диссоциацию от ASK1. Этот биохимический каскад вызывает активацию ASK1, что затем может привести к фосфорилированию JNK и p38, действуя как киназа киназы MAP-киназы [152, 226].

Процесс превращения окисленных фосфатаз в активные формы является малоизученным и требует дальнейших исследований. В настоящее время имеются доказательства, что восстановленный тиоредоксин имеет важную биологическую роль [349]. Данный факт свидетельствует о том, что связывание лиганда и активация ассоциированных с ним рецепторов протеинкиназ не может вызвать достаточное фосфорилирование для обеспечения формирования сигнального ответа и возникает потребность во временной инактивации фосфатаз H_2O_2 .

Так, например, связывание эпидермального фактора роста (EGF, *англ.: epidermal growth factor*) со своим рецептором EGFR приводит к образованию H_2O_2 , который окисляет тиоловую группу до сульфеновой кислоты в рецепторе EGF. Другой пример, активация пути PI_3K через малые G-белки Rac1 (*англ.: Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*), которые в свою очередь активируют НАДФН-оксидазу и повышают синтез $O^{\cdot-}$ и, следовательно, H_2O_2 [291]. Для участия H_2O_2 в регуляторных процессах аквапорины обеспечивают необходимую локализацию прооксиданта [423].

Таким образом, развитие умеренного окислительного стресса приводит к активации сигнальных путей и транскрипционных факторов, что способствует запуску адаптационных механизмов, направленных на выживание клеток.

1.2.4. Роль Nrf2 в окислительном стрессе

Элементы антиоксидантного ответа (ARE, *англ.: antioxidant response elements*) представляют собой последовательности ДНК, с которыми могут связываться белки - ядерные факторы, родственные эритроидному 2, факторы 1 или 2 (Nrf1 и Nrf2, *англ.: nuclear factor E2-related factor 2*) [66]. Больше внимания было уделено Nrf2. Его связывание с ARE позволяет увеличить транскрипцию генов, кодирующих ферменты, метаболизирующие ксенобиотики, в том числе NAD(P)H-хиноноксидоредуктазу, глутатионтрансферазу, УФ-глюкуронилтрансферазу, CYP2A5, Р-гликопротеин и белки, ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью (MDR, *англ.: multiple drug resistance*) [78]. Кроме того, активация Nrf2 увеличивает экспрессию генов, кодирующих гемоксигеназу и антиоксидантную защиту, такую как глутатионпероксидаза, пероксиредоксин, тиоредоксин, сульфуредоксин, тиоредоксинредуктазу и γ -глутамилцистеинсинтетазу. Эти изменения способствуют метаболизму и удалению ксенобиотиков, а также делают клетки более устойчивыми к ОС. Название «антиоксидантный элемент» возникло из-за его роли в реакции на агенты, такие как трет-бутилгидрохинон, обладающий антиоксидантными свойствами в экспериментах *in vitro*. Как ни странно, Nrf2 обычно реагирует на прооксиданты *in vivo* [77, 160,176].

Nrf2 экспрессируется в тканях животных, но сохраняется в неактивной форме в цитозоле за счет связывания с Kelch-подобным ECH-ассоциированным белком 1 (Keap1, *англ.: kelch-like ECH-associated protein 1*), что также способствует его быстрой деградации протеасомой. Многие ксенобиотики вызывают ОС и образуют электрофильные агенты, которые реагируют с белками, ДНК или липидами (например, ненасыщенные альдегиды – 4-гидроксиноненаль, образующиеся во время ПОЛ). В условиях окислительного/электрофильного стресса активируется протеинкиназа С и фосфорилируется цитоплазматический Nrf2, который диссоциирует от Keap1, мигрирует в ядро и связывается с ARE. Некоторые другие киназы также могут фосфорилировать Nrf2 и освободить его

от Keap1. Кроме того, Keap1 богат цистеиновыми остатками и при воздействии АФК формируются дисульфидные связи, что также приводит к диссоциации с Keap1 [274] (Рисунок 8).

Описанный механизм является классическим, и деградация Keap1 может происходить с помощью аппарата аутофагии при участии убиквитин-связывающего белка p62/SQSTM1 (секвистома1, *англ.: sequestosome-1*) [256, 290, 365], а количество белка Nrf2 снижается при взаимодействии с E3 убиквитин-лигазами [184, 405].

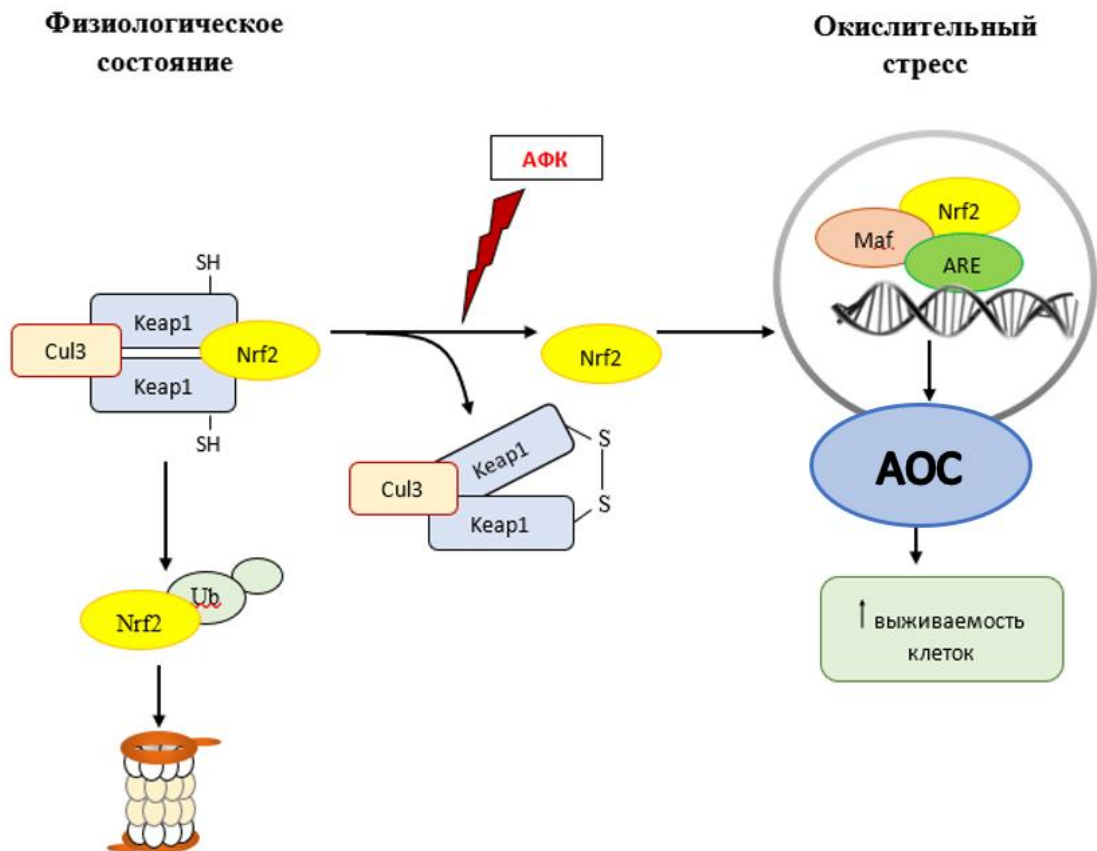


Рисунок 8 – Активация Nrf2 по Keap1-механизму за счет окисления SH-групп

1.2.5. Роль фактора, индуцируемого гипоксией в окислительном стрессе

Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF1, *англ.: hypoxia-inducible factor*) — это транскрипционный фактор, играющий ключевую роль в адаптации клеток к снижению напряжения кислорода в тканях [344, 392]. HIF1 представляет собой гетеродимер, состоящий из двух белковых субъединиц — HIF1 α и HIF-1 β : существует по три типа каждого (1- α ; 2- α ; 3- α ; 1- β ; 2- β ; 3- β). Функциональный статус HIF1 определяется экспрессией и активностью его α -субъединицы.

В условиях гипоксии клетки должны адаптироваться, и ключевую роль в этом процессе играет HIF, особенно HIF1. HIF представляют собой факторы транскрипции, которые способствуют экспрессии генов, кодирующих белки, регулирующие адаптацию к низкому содержанию O₂. К таким белкам относятся:

- *переносчики глюкозы*, транспортирующие больше глюкозы в клетки [393];
- *фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, англ.: vascular endothelial growth factor)*, способствующий ангиогенезу (росту новых кровеносных сосудов) [445];
- *эритропоэтин* - гормон, необходимый для эритропоэза, образования новых эритроцитов [385];
- *трансферрин, церулоплазмин* - белки, участвующие в доставке железа в клетки [417].

Определение уровня HIF-1 α и HIF-2 α имеет важное клиническое значение при диагностике раковых заболеваний [92, 93, 142, 399]. В настоящее время имеются данные, что HIF1 α и Pgr положительно коррелируют при рефрактерной эпилепсии [203], следовательно, механизм регуляции белка-транспортера в условиях гипоксии может стать важным звеном в лечении заболеваний центральной нервной системы [136, 309]

Из-за физиологического и клинического значения HIF, активно изучается его регуляция. В некоторых работах предполагается, что АФК, продуцируемые в митохондриях, а также ферментом НАДФН-оксидазой, могут способствовать

поддержанию уровней HIF1 α в гипоксических условиях в ткани за счет снижения скорости общего пути катаболизма [181, 216, 409].

HIF представляют собой гетеродимеры α - и β -субъединиц. Клетки поддерживают приблизительно постоянные уровни HIF1 β . Субъединицы HIF-1 α продуцируются, однако быстро разрушаются убиквитин-протеасомной системой при нормальных концентрациях O₂. Экспрессия и активность α -субъединицы HIF регулируется на нескольких уровнях: транскрипции, трансляции, посттрансляционных изменений, транслокации в ядро [215]. При этом основную роль отводят посттрансляционным модификациям молекулы HIF1 α . В нормоксических условиях уровень α -субъединицы регулируется убиквитин-зависимой протеасомной деградацией. Консервативные остатки пролина в субъединице гидроксилируются O₂-зависимыми пролилгидроксилазами, а затем модифицированные остатки убиквитинируются комплексом убиквитин E3 лигазы фон Гиппеля-Линдау (p-VHL, *англ.: von Hippel Lindau*), и гидролизуются протеасомой. Однако при гипоксии субъединица HIF-1 α стабилизируется за счет ингибирования пролингидроксилаз и, таким образом, взаимодействует с HIF-1 β [344].

При низких уровнях O₂ ферменты пролингидроксилазы неактивны, а, следовательно, HIF-1 α не разрушается, что позволяет ему собираться, связываться с ДНК и способствовать транскрипции. Однако, следует учитывать, что различные факторы роста и цитокины также стабилизируют HIF-1 α , а в результате фосфорилирования происходит окончательная активация HIF-1 до функционального фактора транскрипции. Также при гипоксии увеличивается транскрипция гена, кодирующего HIF1 α . O₂-зависимый фермент аспарагингидроксилаза обеспечивает вторую стадию «проверки уровня O₂»: если фермент активен, гидроксилирование остатков аспарагина предотвращает работу HIF1 α в качестве фактора транскрипции (Рисунок 9).

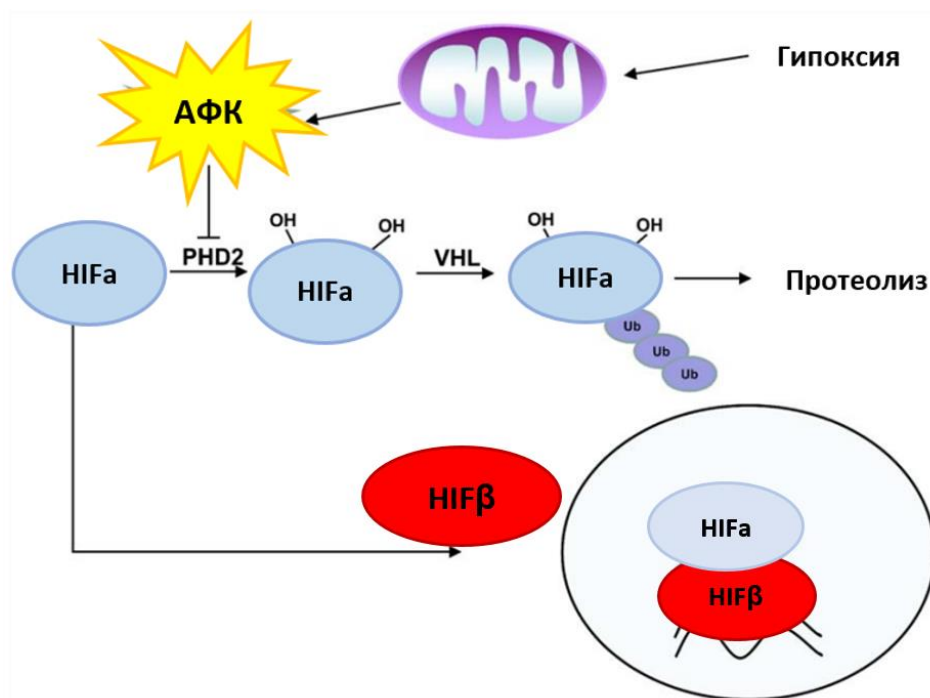


Рисунок 9 – Пути метаболизма HIF в условиях гипоксии и нормоксии (Цит. по: Hamaoka R.B., 2009) [175]

Поскольку пролингидроксилаза является Fe-зависимой, она может ингибироваться хелаторами железа, что иногда приводит к развитию эффекта подобного гипоксии. Ионы кобальта (Co^{2+}) также могут «имитировать гипоксию», вытесняя железо с образованием неактивного фермента. Кроме того, есть предположения, что в клетках, подвергшихся острой гипоксии, продукция H_2O_2 митохондриями может способствовать стабилизации уровней HIF1 α , хотя механизм этого не ясен [175].

Обобщая вышеизложенные данные, можно заключить, что HIF1 α – основной транскрипционный фактор, обуславливающий долгосрочную адаптацию клеток к гипоксии. Он усиливает образование VEGF, эритропоэтина и ферментов гликолиза, стимулирует ангиогенез и индуцирует транскрипцию ряда генов, участвующих в поддержании кислородного гомеостаза и метаболизма.

1.2.6. Роль малонового диальдегида в окислительном стрессе

МДА образуется в результате перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот, таких как линоленовая, арахидоновая и докозагексаеновая кислоты. Он представлен в различных формах в зависимости от pH. При физиологических значениях pH большая часть «свободного» МДА существует в виде енолят-аниона, имеющего низкую реакционную способность по отношению к аминогруппам. По мере снижения pH реактивность увеличивается, и белки могут быть атакованы МДА, что приводит к модификации нескольких остатков (особенно лизина) и образованию внутри- и межмолекулярных поперечных связей (Рисунок 10).

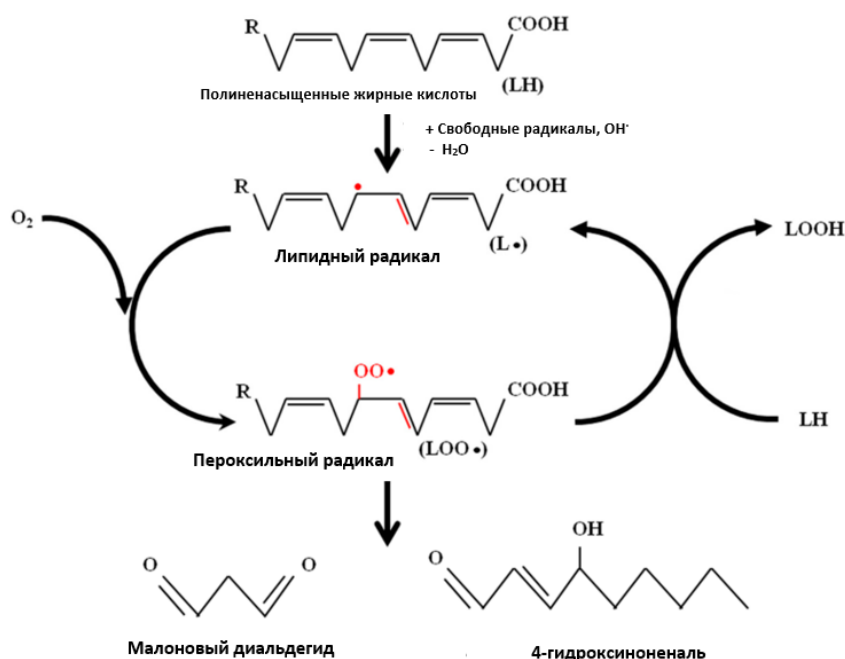


Рисунок 10 – Схема образования малонового диальдегида

МДА реагирует с основаниями ДНК и может вызывать мутагенные повреждения. Гуанин является основной мишенью. Если ДНК, предварительно обработанная МДА, экспрессируется в *E. coli*, то наблюдается примерно десятикратное увеличение частоты мутаций: преобладают трансверсии G → T, переходы A → G и переходы C → T, но встречаются сдвиги рамки считывания и

делеции. Такая ДНК также является мутагенной в клетках человека, вызывая большие вставки и делеции, а также замены пар оснований [238].

МДА быстро метаболизируется в тканях млекопитающих под действием альдегиддегидрогеназы до малонового полуальдегида, который декарбоксилируется до ацетальдегида и далее окисляется альдегиддегидрогеназами до ацетата. В настоящее время МДА рассматривается не только в качестве маркера ОС, но и сигнальной молекулы. Так, в исследованиях [362] было продемонстрировано, что МДА стимулирует экспрессию гена *coll1a1* в первичной культуре клеток перицитов (HSC, звездчатые клетки печени, жирозапасающие клетки, *англ. hepatic stellate cell*) в зависимости от концентрации и времени [362]. Аналогичные результаты были получены на клетках фибробластов человека и крысы [236, 367]. МДА активировал экспрессию гена *coll1a1*, воздействуя на элементы ДНК, расположенные в сегменте на 200 п.н. выше от сайта начала транскрипции. МДА активирует экспрессию гена *coll1a1* воздействуя на участки FP2 (последовательности между 82 и 103 п.н. промотора) и FP3 (последовательности между 110 и 129 п.н.) через экспрессию гена белка специфичности 1 (Sp1, *англ.: specificity protein 1*) и уровни белков Sp1 и Sp3. Ряд авторов показали, что 4-гидроксиноненаль также стимулирует ген *coll1a1* в HSC [196, 340, 368], что доказывает участие альдегид- и белковых аддуктов в регуляции экспрессии гена коллагена.

В исследованиях [137] было показано, что МДА дозозависимо регулирует секрецию инсулина в поджелудочной железе мышей [137]. Роль МДА доказана в патогенезе сахарного диабета [20, 107], однако связь между МДА, гиперинсулинемией и развитием диабета 2 типа [98] все еще неясна. Результаты исследований [112] показали, что МДА в концентрациях 0-1 мкМ не влияет на секрецию инсулина [112]. Умеренные (физиологические) концентрации МДА 5-10 мкМ приводили к повышению соотношения АТФ /АДФ и цитозольного уровня Ca^{2+} , что влияло на изменение активности глюкокортикоидов, переносчиков глюкозы (GLUT2, *англ.: glucose transporter 2*), фактор промотора инсулина 1

(PDX1, *англ.: pancreatic and duodenal homeobox 1*) и митохондриальный разобщающий белок, кодируемый геном (UCP2, *англ.: mitochondrial uncoupling proteins*) в культивируемых островках Лангерганса [137].

Таким образом, МДА в умеренных концентрациях (до 10 мкМ) функционирует как сигнальная молекула, являющаяся регулятором биологических процессов.

МДА, образующийся в результате ОС, в течение многих лет находится в центре внимания, выступая в качестве маркера при патологических состояниях: атеросклероз [366], диабет [17, 237], преэклампсия [138], лимфедема нижних конечностей [11], эндотелиальная дисфункция [42].

Количественное определение МДА имеет важное биологическое и клиническое значение. Наиболее распространенным методом количественного определения МДА является фотометрический анализ, в основе которого лежит его способность реагировать с тиобарбитуровой кислотой (ТБК) и образовывать окрашенный аддукт (МДА-(ТБК)₂) [248].

Реакция с ТБК является удобным и простым методом, однако она имеет невысокую специфичность к МДА и требует большого объема пробы, что затрудняет клинический анализ. ТБК может вступать в реакции с широким спектром компонентов, присутствующих в плазме, таких как альдегиды, сахара и мочевины [61]. За последнее десятилетие было разработано несколько технологий определения МДА, таких как газовая хроматографическая масс-спектрометрия (GC-MS/MS), жидкостная хроматографическая масс-спектрометрия (LC-MS/MS) [420]. Все эти методы требуют предварительной дериватизации с ТБК [179], 2,4-динитрофенилгидразином [97], пентафторбензилбромидом в водном ацетоне [420], пентафторбензилом [115] и не учитывают стадию высвобождения МДА из связанного состояния, на долю которого приходится до 90% [114].

Таким образом, МДА имеет важное биологическое и клиническое значение, а способы его определения требуют оптимизации.

1.3. Влияние окислительного стресса на Р-гликопротеин

В настоящее время имеются данные в пользу редокс-зависимой регуляции в «обращении» лекарственной устойчивости опухолевых клеток [30, 324]. В ряде исследований оценивалось влияние ОС на экспрессию и активность Pgp.

Показано, что воздействие перекиси водорода (200 мкМ) приводило к развитию ОС и повышению уровня Pgp и мРНК *mdr1a* и *mdr1b* в культуре эндотелиальных клеток сосудов головного мозга крыс. Увеличение экспрессии белка-транспортера блокировалось предварительной обработкой культуры клеток полиэтиленгликолем-каталазой и снижалось при совместном культивировании с первичными астроцитами крыс [295].

В митохондриях клеток пигментного эпителия сетчатки (D 407) пероксид водорода (100-800 мкмоль/л) усиливал экспрессию и функциональную активность Pgp, а антиоксидант N-ацетилцистеин (10 ммоль/л) подавлял вызванную ОС экспрессию Pgp [255]. Доксорубин и CoCl_2 использовались в качестве источников АФК в клетках рака толстой кишки и способствовали экспрессии мРНК Pgp при действии в течение 24 ч [286].

Сакситоксины оказывали токсическое действие на нервные клетки - отмечалось снижение жизнеспособности клеток (МТТ-тест), повышение продукции АФК, увеличение эффлюксной активности Pgp. Перечисленные изменения нивелировались внесением в питательную среду антиоксиданта – липоевой кислоты, что указывает на индукцию Pgp за счет ОС [106].

Обработка гепатоцитов крысы ингибитором каталазы 3-амино-1,2,4-триазолом (2-4 мМ в течение 72 ч или 10 мМ в течение 1 ч) приводила к усилению экспрессии мРНК *mdr1b* и Pgp. Напротив, антиоксиданты (1 мМ аскорбат, 10 мМ маннит) заметно подавляли экспрессию мРНК *mdr1b* и избыточную экспрессию Pgp [321].

При инкубировании ряда культур опухолевых клеток (KB31, KBV1, A549 и DMS-53) на гипо- и гипергликемических средах показано развитие ОС за счет НАДФН-зависимой оксидазы 4 и дестабилизации митохондриальных мембран, а

также активация транскрипционного фактора NF1 и повышение его экспрессии, ядерной транслокации р65-субъединицы транскрипционного фактора NF-kB, а также значительная активация функциональной активности Pgp, приводящая к резистентности к доксорубину (субстрату транспортера) [347]. Исследования на крысах показали, что при введении 1,2-диметилгидразина в дозе 20 мг/кг массы тела наблюдалось снижение ПОЛ, повышение содержания глутатиона, увеличение активности каталазы и на фоне этого снижение экспрессии гена *MDR1* в тканях толстой кишки [75].

В настоящее время известно, что ОС является одной из распространенных причин, вызывающих повреждение плаценты. Выявленные тяжелые окислительные повреждения в плацентах беременных, у плодов которых установлена сердечная дисфункция, сопровождались подавлением экспрессии Pgp. Однако введение витамина С уменьшало ОС и восстанавливало защитный механизм плаценты [139].

Концентрация лекарственных веществ внутри клеток с МЛУ является результатом конкуренции между активным удалением лекарств с помощью эффлюксных переносчиков, таких как Pgp, и их пассивным проникновением лекарств через плазматическую мембрану. Поэтому изменение транспорта лекарственных веществ может происходить либо за счет ингибирования мембранных белков-транспортеров, либо за счет ускорения проникновения лекарственного вещества в клетку. Подавление МЛУ за счет блокады Pgp при индукции внутриклеточного ОС используется для усиления эффективности химиотерапии опухолей [201].

Таким образом, в большинстве исследований установлено, что воздействие проксидантов повышает экспрессию и активность Pgp, которые, в то же время, могут снижаться при срыве адаптационных процессов и развитии декомпенсированного ОС, однако механизмы данных процессов остаются недоказанными.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект экспериментальных исследований

Исследование выполнено на линии клеток Caco-2 (клетки аденокарциномы ободочной кишки человека, *англ.: cancer coli, colon cancer*), полученной из ФГБУН ИИЦ РАН, Санкт-Петербург.

Данная клеточная линия широко используется для изучения транспорта био- и ксенобиотиков с участием Pgp, исследования влияния различных веществ на активность белка-транспортера, а также как *in vitro* модель для прогнозирования абсорбции лекарственных веществ в тонком кишечнике [428].

2.2. Культивирование клеток линии Caco-2

Клетки линии Caco-2 культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) («Sigma-Aldrich», Германия), содержащей L-глутамин (4 мМ) («Sigma-Aldrich», Германия), 15% эмбриональной бычьей сыворотки («Sigma-Aldrich», Германия), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина («Sigma-Aldrich», Германия) соответственно. После достижения 70-90% конфлюентности клетки снимали с фласка добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия) и высевали в 96-луночные планшеты, 24-луночные планшеты, 6-луночные планшеты, в трансвеллы (с плотностью 10⁵/см²) («Corning», США).

Клетки культивировали в течение 21 сут, поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, гиперэкспрессирующие Pgp [180].

На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения (n=3), при экспозиции 72 ч смену питательной среды проводили каждые 24 ч.

2.3. Экспериментальные группы и серии

Было сформировано 7 экспериментальных групп:

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

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

Третья группа – оценка принадлежности DL-бутионинсульфоксимиона (БСО, 2-амино-4-(бутилсульфонимидоил)бутановая кислота) к модуляторам Pgr [188].

Четвертая группа – изучение роли транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Pgr при экзогенном ОС.

Пятая группа – исследование роли транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Pgr при эндогенном ОС.

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

Седьмая группа – оценка роли Pgr при развитии ОС.

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

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

Данная группа включала следующие серии экспериментов:

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

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

Клетки культивировали в 24- и 6-луночных планшетах и трансвеллах. 24-луночные планшеты использовали для анализа уровня АФК, 6-луночные планшеты

– для оценки выраженности ОС, количества Pgp, Nrf2, HIF1 α , CAR, PXR, трансвеллы – для определения активности Pgp (по транспорту маркерного субстрата белка-транспортера - фексофенадина).

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

Эндогенный ОС воспроизводили с помощью ингибитора синтеза глутатиона - БСО (ингибитор γ -глутамилцистеинсинтетазы) в конечных концентрациях в питательной среде 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ. Длительность экспозиции составила 3 ч, 24 ч и 72 ч.

Данная группа включала следующие серии экспериментов:

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

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

Клетки культивировали в 24- и 6-луночных планшетах и трансвеллах. 24-луночные планшеты использовали для оценки уровня АФК, 6-луночные планшеты – для оценки выраженности окислительного стресса, количества Pgp и Nrf2, HIF1 α , CAR, PXR, трансвеллы – для оценки активности Pgp (по транспорту маркерного субстрата белка-транспортера – фексофенадина).

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

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

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

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

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

Четвертая серия – клетки, на которых оценивали транспорт субстрата Pgp – фексофенадина после предварительной преинкубации в течение 30 мин с верапамилом (классическим ингибитором белка-транспортера) в концентрациях 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ. Длительность транспортного эксперимента составляла 3 ч, фексофенадин использовали в концентрации 150 мкМ.

Общая схема экспериментального исследования влияния ОС на функционирование Pgp приведена на рисунке 11.



Рисунок 11 – Схема исследования изменений активности и количества Р-гликопротеина, Nrf2, HIF1α, CAR, PXR в условиях моделирования экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*

2.3.4. Четвертая группа – изучение роли транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Р-гликопротеина при экзогенном окислительном стрессе

Данная группа включала 7 серий экспериментов. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах:

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

Вторая серия – индукция Pgr в условиях моделирования экзогенного ОС. Экзогенный ОС моделировали добавлением в питательную среду H₂O₂ в концентрациях 0,1; 0,5; 1 мкМ сроком инкубации 24 ч и 10 мкМ сроком инкубации 72 ч. Выбор концентраций прооксиданта и длительности экспозиции был обусловлен результатами, полученными в первой группе экспериментов (в которой было показано повышение количества Pgr под действием H₂O₂).

Третья серия – ингибирование ОС – одновременно с добавлением прооксиданта в питательную среду вносили антиоксидант глутатион в концентрации 1 мМ [166].

Четвертая серия – оценка роли Nrf2-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления H₂O₂ вносили ингибитор Nrf2 N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин (AEM1, «Sigma-Aldrich», Германия) в концентрации 5 мкМ [53].

Пятая серия – оценка роли HIF1 α -опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления H₂O₂ вносили ингибитор HIF1 α N,N'-(дисульфандиилбис(этан-2,1-диил))бис(2,5-дихлорбензолсульфонамид (KC7F2, «Sigma-Aldrich», Германия) в концентрации 7,5 мкМ [215].

Шестая серия – оценка роли CAR-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления H₂O₂ вносили ингибитор CAR 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5Н-

дибензо[b,f]азепин-3-ил]этиловый эфир карбаминовой кислоты (CINPA 1, «Toctris», Великобритания) в концентрации 10 мкМ [91];

Седьмая серия – оценка роли PXR-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления H₂O₂ вносили ингибитор PXR – кетоконазол в концентрации 10 мкМ («Sigma Aldrich», Германия) [87].

2.3.5. Пятая группа – изучение роли транскрипционных факторов Nrf2, Nrf1α, CAR и PXR в изменении количества Р-гликопротеина при эндогенном окислительном стрессе

Данная группа включала 7 серий экспериментов. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах.

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

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

Третья серия - ингибирование ОС – одновременно с добавлением прооксиданта в питательную среду вносили антиоксидант глутатион в концентрации 1 мМ [166].

Четвертая серия - оценка роли Nrf2-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления БСО вносили ингибитор Nrf2 N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин (AEM1, «Sigma Aldrich», Германия) в концентрации 5 мкМ [53].

Пятая серия - оценка роли *HIF1 α* -опосредованного механизма в индукции *Pgp* при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления БСО вносили ингибитор *HIF1 α* N,N'-(дисульфандиилбис(этан-2,1-диил))бис(2,5-дихлорбензолсульфонамид (KC7F2, «Sigma-Aldrich», Германия) в концентрации 7,5 мкМ [215].

Шестая серия – оценка роли *CAR*-опосредованного механизма в индукции *Pgp* при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления БСО вносили ингибитор *CAR* 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5Н-дibenzo[b,f]азепин-3-ил]этиловый эфир карбаминовой кислоты (CINPA 1, «Tocris», Великобритания) в концентрации 10 мкМ [91];

Седьмая серия - оценка роли *PXR*-опосредованного механизма в индукции *Pgp* при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления БСО вносили ингибитор *PXR* - кетоконазол в концентрации 10 мкМ («Sigma Aldrich», Германия) [87].

Общая схема экспериментального исследования роли транскрипционных факторов в механизмах регуляции *Pgp* приведена на рисунке 12.

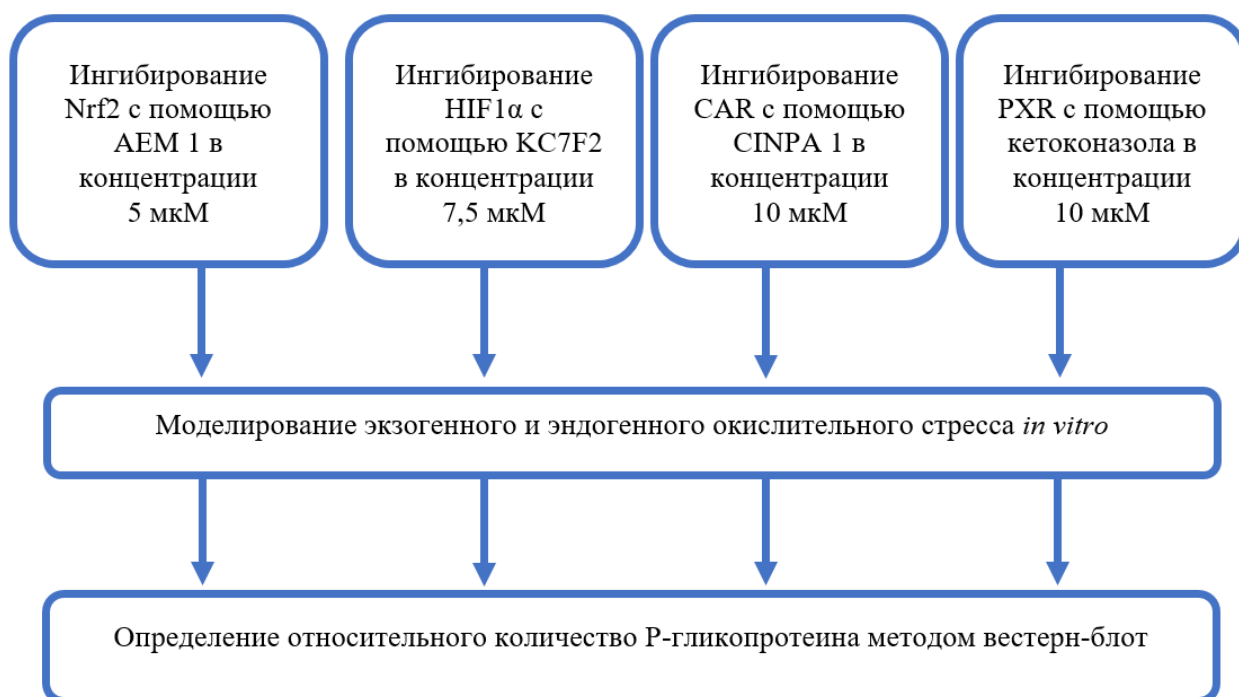


Рисунок 12 – Схема исследования роли транскрипционных факторов *Nrf2*; *HIF1 α* ; *CAR*; *PXR* в изменении количества Р-гликопротеина

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

Данная группа включала 6 серий экспериментов:

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

Вторая серия – оценка влияния верапамила – ингибитора Pgp на транспорт МДА через монослой клеток линии Caco-2 – клетки культивировали в трансвеллах и оценивали влияние верапамила в концентрации 200 мкМ [391] на транспорт МДА в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ через монослой клеток линии Caco-2.

Третья серия – оценка влияния МДА на активность Pgp – клетки культивировали в трансвеллах и оценивали влияние МДА в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ на транспорт субстрата Pgp фексофенадина в концентрации 150 мкМ [418] через монослой клеток линии Caco-2.

Четвертая серия – оценка влияния МДА на количество Pgp – клетки инкубировали в питательной среде с добавлением МДА в концентрациях 10, 50, 100, 150 мкМ в течение 24 ч и оценивали количество Pgp. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах.

Пятая серия – оценка роли CAR-опосредованного механизма в индукции Pgp при воздействии МДА – клетки культивировали в 6-луночных планшетах. К ним в питательную среду за 30 мин до добавления МДА вносили ингибитор CAR 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-добензо[b,f]азепин-3-ил] этиловый эфир карбаминовой кислоты (CINPA 1, «Tocris», Великобритания) в концентрации 10 мкМ [91] и инкубировали 24 ч.

Шестая серия – оценка роли PXR-опосредованного механизма в индукции Pgp при воздействии МДА – клетки культивировали в 6-луночных планшетах. К ним в питательную среду за 30 мин до добавления МДА вносили ингибитор PXR кетоконазол в концентрации 10 мкМ («Sigma-Aldrich», Германия) [87] и инкубировали 24 ч.

Схема экспериментального исследования принадлежности МДА к субстратам и модуляторам Pgp приведена на рисунке 13.

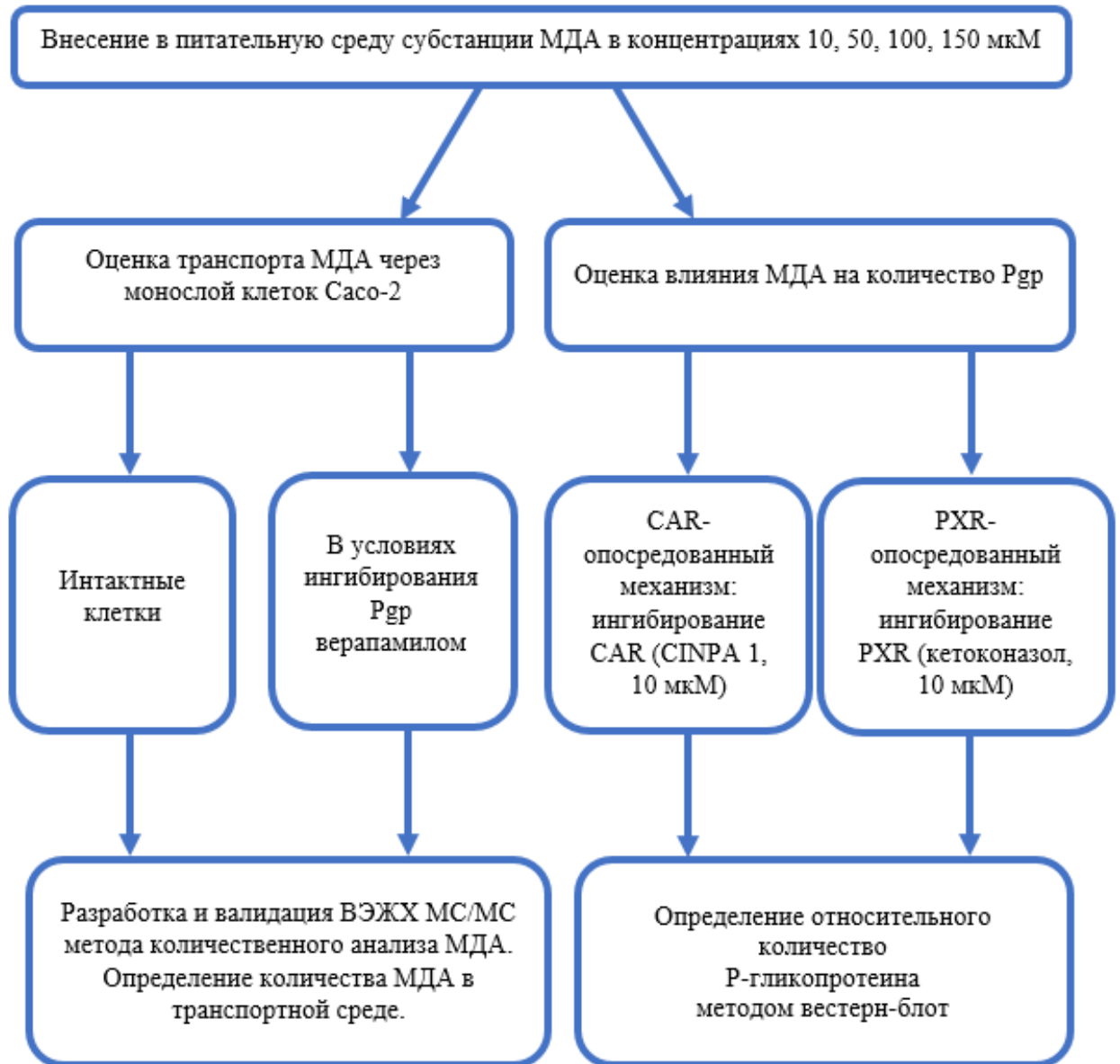


Рисунок 13 – Схема экспериментального исследования оценки принадлежности малонового диальдегида к субстратам и модуляторам активности P-гликопротеина

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

Клетки культивировали в 96-луночных планшетах.

Данная группа включала следующие серии экспериментов:

Первая серия – контроль – клетки инкубировали в питательной среде с добавлением в эквивалентном объеме воды для инъекций (растворитель H_2O_2 и БСО).

Вторая серия – моделирование ОС – клетки культивировали в питательной среде в течение 24 ч с добавлением H_2O_2 в концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5; 10, 50 и 100 мкМ или БСО в концентрациях 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ и оценивали их выживаемость по результатам МТТ-теста.

Третья серия – влияние ингибирования Pgr на выживаемость клеток под действием H_2O_2 /БСО. За 30 мин до добавления H_2O_2 /БСО в питательную среду вносили ингибитор Pgr - верапамил в концентрации 200 мкМ.

Четвертая серия – влияние индукции Pgr на выживаемость клеток под действием H_2O_2 /БСО. За 24 ч до добавления H_2O_2 /БСО в питательную среду вносили индуктор Pgr – рифампицин в концентрации 10 мкМ [337, 402].

2.4. Оценка выраженности окислительного стресса

2.4.1. Определение продукции активных форм кислорода

Гиперпродукцию АФК под действием используемых прооксидантов подтверждали с помощью флюоресцентных зондов. Для этого клетки культивировали в 24-луночных планшетах. После инкубации клеток с H_2O_2 и БСО уровень внутриклеточных АФК оценивали с помощью окраски клеток MitoTracker Red CM-H2 XRos («Invitrogen», США). Восстановленный дигидроксирозамин проникает в живые клетки и окисляется АФК до флюоресцентного зонда, который связывается с тиоловыми группами в митохондриях. Таким образом, по интенсивности флюоресценции можно судить об уровне АФК в клетке. Визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа

Olympus СКХ-53 («Olympus», Япония). Затем клетки снимали с лунок, лизировали с помощью 0,2% Triton X-100 («Sigma-Aldrich», Германия). Количественную оценку уровня свободных радикалов в лизате клеток определяли по степени флюоресценции ($\lambda_{ext} = 579$ нм, $\lambda_{em} = 599$ нм) с помощью спектрофлюориметра («Shimadzu RF-6000», Япония) и пересчитывали на количество клеток (счетчик и анализатор жизнеспособности клеток «Countess 3 Automated Cell Counter», США).

2.4.2. Приготовление клеточных лизатов

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», Германия).

Полученные клетки (3×10^6) промывали изотоническим раствором NaCl («Медпро», Россия), добавляли 450 мкл лизирующего буфера (50 мМ рН 7,4 Tris-HCl, 150 мМ KCl, 0,5% тритон X-100, смесь ингибиторов протеиназ (4-(2-аминоэтилбензенсульфонил) флуорида гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ, апротинин 0,3 мкМ, бестатин 130 мкМ, ЭДТА 1мМ, *транс*-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4-гуанидино)бутан (E-64) 14 мкМ, лейпептин 1 мкМ, «Sigma-Aldrich», Германия)), встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g (СМ-50, «Eppendorf», Германия). Цитоплазматическую (экстраядерную) фракцию переносили в отдельные пробирки и использовали для биохимических исследований [410].

2.4.3. Определение концентрации продуктов перекисного окисления липидов

В лизате клеток с помощью коммерческого набора определяли концентрацию продуктов ПОЛ («Elabscience», Китай).

Метод определения продуктов ПОЛ – МДА и 4-гидрокси-олефинов (4-гидрокси-2-ноненаля и 4-гидрокси-2-гексеналя) – основан на их взаимодействии с 1-метил-2-фенилиндолом с образованием стабильного хромофора, который имеет

максимум поглощения при 586 нм [320]. Полученные результаты выражали в мкмоль/мг белка.

2.4.4. Определение концентрации карбонильных производных белков

В полученном лизате клеток с помощью коммерческого набора определяли концентрацию продуктов карбонильных производных белков («Sigma-Aldrich», США).

Метод определения карбонильных производных белков основан на их взаимодействии с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрировали при длине волны 375 нм. Концентрацию карбонильных производных белков рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции $\epsilon_{375} = 22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [434]. Результаты выражали в нмоль/мг белка.

2.4.5. Определение концентрации небелковых и белковых SH-групп

Концентрацию белковых SH-групп определяли по разнице между уровнем общих и низкомолекулярных (небелковых) SH-групп. Анализ содержания общих SH-групп в лизате клеток проводили по методу Элмана с 5,5'-дитиобис(2-нитро)-бензоатом (DTNB) в неденатурирующих условиях [54]. К 100 мкл образца добавляли 100 мкл 2 мМ DTNB («Serva», Германия) в 1 М трис-HCl буфере (pH 8,0) и 1000 мкл дистиллированной воды, после экспозиции 30 мин количественно оценивали содержание 5-тио-2-нитробензойной кислоты при 412 нм на планшетном фотометре Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США). Концентрацию SH-групп рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции $\lambda_{412} = 13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [131]. Для определения содержания низкомолекулярных SH-групп пробу предварительно смешивали с охлажденной 5% трихлоруксусной кислотой («Химмед», Россия), инкубировали на льду 15 мин, затем центрифугировали при 11000 g (CM-50, «Eppendorf», Германия) 5 мин при 4°C. Полученный супернатант нейтрализовали

с помощью 1% NaOH и использовали для определения низкомолекулярных SH-групп по реакции с DTNB. Результаты выражали в мкмоль/мг белка.

2.5. Оценка количества Pgp, Nrf2, глутатионпероксидазы в клетках методом гетерогенного иммуноферментного анализа (ГИФА)

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», Германия). Полученные клетки (2×10^6) трехкратно промывали фосфатным буфером pH 7,4 («ПанЭко», Россия) и лизировали трехкратным циклом замораживания-размораживания в 200 мкл буфера при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и использовали для проведения ИФА (данный способ лизиса указан в инструкции к использованным наборам).

В лизате клеток методом ГИФА определяли количество Pgp, Nrf2 и глутатионпероксидазы коммерческими наборами (Human Permeability glycoprotein ELISA Kit, Human Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 ELISA Kit и Glutathione peroxidase ELISA Kit соответственно; «Blue gene», Китай). Светопоглощение измеряли при 450 нм на иммуноферментном планшетном анализаторе Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США). Полученные результаты выражали в нг/мг белка.

Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, «ThermoFisher», США) [76]. Метод основан на связывании красителя Coomassie brilliant Blue G250 с остатками основных и ароматических аминокислот, с последующим развитием синей окраски. Количество белка оценивалось спектрофотометрическим методом по интенсивности окраски на микропланшетном анализаторе Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США) при длине волны 595 нм. Полученные результаты рассчитывали с помощью калибровочного графика (в качестве стандарта использовался бычий сывороточный альбумин, входящий в состав набора) и выражали в мг/мл белка.

2.6. Определение относительного количества Pgp, HIF1 α , CAR, PXR методом вестерн-блот

2.6.1. Получение тотальных клеточных лизатов

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», Германия), трижды промывали раствором фосфатного буфера («BioRad», США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo («Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (4-(2-аминоэтилбензенсульфонил)флуорида гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ, апротинин 0,3 мкМ, бестатин 130 мкМ, ЭДТА 1 мМ, *транс*-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4гуанидино)бутан (E-64) 14 мкМ, лейпептин 1 мкМ, «Sigma-Aldrich», Германия) в течение 30 минут при +4 °С и постоянном перемешивании из расчета 10⁷ клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 5000 g (СМ-50, «Eppendorf», Германия). Супернатант использовали для выполнения биохимических анализов.

2.6.2. Проведение анализа вестерн-блот

20 мкг белков супернатанта клеточного лизата подвергали электрофорезу с использованием 7,5% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США) в буферной системе Laemmli («BioRad», США).

Образцы смешивали с буфером Laemmli («Bio-Rad», США), содержащем 50 мМ β -меркаптоэтанола («BioRad», США) в соотношении 1:3, инкубировали 10 мин при температуре 70°С. Гели подвергали электрофорезу при 100 В в течение 90 мин.

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

Белки на мембране блокировали 1% раствором Casein Blocker («Bio-Rad», США), содержащим 0,1% Tween-20 («Sigma», Германия), при инкубации в течение 1 ч и комнатной температуре.

Детекцию белков Pgp, HIF1 α , CAR, PXR проводили с использованием первичных мышинных моноклональных антител (P-Glycoprotein Antibody MA5-13854, «Invitrogen», США; HIF1 α (HIF1A Antibody MA1-16517, «Invitrogen», США); MB67 CAR Monoclonal Antibody, «Invitrogen», США; MA5-31808 PXR Monoclonal Antibody 1D12G1, «Invitrogen», США) в концентрации 1:200 в блокирующем растворе Casein blocker («Bio-Rad», США) в течение 2 ч при 37°C. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen», США) в разведении 1:4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре.

Хемилюминесценцию фиксировали с помощью ChemiDocXRS+ («Bio-Rad», США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad», США).

Молекулярная масса Pgp, HIF1 α , CAR, PXR была подтверждена путем сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, «Bio-Rad», США).

Содержание Pgp, HIF1 α , CAR, PXR оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, *англ.: glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase* первичные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 («Invitrogen», США), разведение 1:1000, вторичные кроличьи антитела – Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP («Invitrogen», США), разведение 1:4000).

На рисунках 52-73 представлены результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab, и фото бэндов, полученных с помощью ChemiDocXRS⁺.

2.7. Исследование активности Р-гликопротеина при моделировании окислительного стресса

2.7.1. Транспортные эксперименты

Клетки культивировали в трансвеллах, состоящих из двух камер апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры представлено полупроницаемой мембраной, на которую высеивали клетки линии Сасо-2 с плотностью $10^5/\text{см}^2$ и культивировали в течение 21 суток (Рисунок 14).

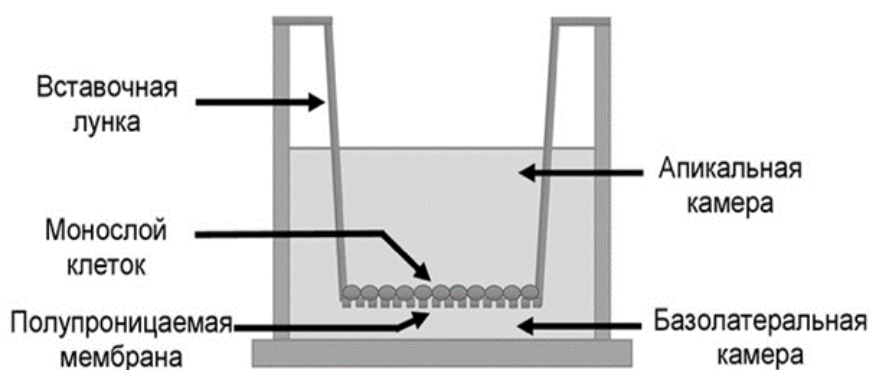


Рисунок 14 – Структура трансвелл-системы

Клетки культивировали в трансвеллах. После культивирования клеток более 21 сут и достижения трансэпителиального сопротивления (TEER, *англ.: transepithelial / transendothelial electrical resistance*) более $500 \text{ мОм} \times \text{см}^2$ лунки использовали для выполнения транспортных экспериментов.

После окончания инкубации культуральную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich», Германия) с 25 мМ HEPES («Sigma-Aldrich», Германия) и 1% диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия). Затем добавляли субстрат Pgp – фексофенадин («Sigma-Aldrich», Германия) – в апикальную камеру в конечной концентрации 150 мкМ [418]. Через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из базолатеральной камеры-реципиента для определения концентрации субстрата (*a-b* транспорт, обусловленный пассивной диффузией против функционирования Pgp). В аналогичных трансвеллах

оценивали транспорт фексофенадина из базолатеральной камеры в апикальную (*b-a* транспорт, обусловленный пассивной диффузией и функционированием Pgp). Для этого субстрат в той же концентрации добавляли в базолатеральную камеру, а затем через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из апикальной камеры для определения концентрации фексофенадина.

Транспорт субстрата (фексофенадина) рассчитывали по формуле [428]:

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

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

Затем рассчитывали отношение коэффициентов кажущейся проницаемости: *b-a* к *a-b*, характеризующее общий вклад Pgp в транспорт фексофенадина через билипидную мембрану.

2.7.2. Определение концентрации фексофенадина

Концентрацию фексофенадина в транспортной среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ детектированием при длине волны 220 нм. Исследование выполняли на ВЭЖХ хроматографе «Стайер» (Россия) по оригинальной методике. Полученную пробу транспортной среды (50 мкл), содержащую фексофенадин, разводили в 150 мкл подвижной фазы, и 100 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

При анализе использовали хроматографическую колонку Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250×4,6) (США) с зернением 4 мкм. Температура разделения – 45°C. Скорость потока – 1 мл/мин. Состав подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила («PanReac AppliChem», Испания), 267,4 мл воды деионизированной, 6,33 мл кислоты уксусной ледяной («PanReac AppliChem», Испания), с

добавлением триэтиламина («PanReac AppliChem», Испания) до pH=6,7. Время удерживания фексофенадина в данных условиях составляло 12,8 мин. Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составлял 1,2–57,4 мкМ.

Биоаналитическая методика была валидирована согласно EMA Guideline on bioanalytical method validation по следующим параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения, точность (внутрицикловая и межцикловая), прецизионность, перенос пробы, стабильность образцов.

2.8. Тестирование принадлежности бутионинсульфоксимиона и малонового диальдегида к модуляторам активности P-гликопротеина

Метод *in vitro* позволяет оценить прямое влияние тестируемых веществ на активность белка-транспортера Pgp.

Культуральную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich», Германия) с 25 мМ HEPES («Sigma-Aldrich», Германия) и 1% диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия) с добавлением тестируемых веществ (БСО или МДА) или эквивалентный объем воды для инъекций (растворитель БСО и МДА) и проводили преинкубацию в течение 30 мин.

После окончания преинкубации добавляли субстрат Pgp – фексофенадин в концентрации 150 мкМ («Sigma-Aldrich», Германия) или в апикальную, или базолатеральную камеру и оценивали *a-b* или *b-a* транспорт фексофенадина в присутствии тестируемых веществ.

Затем рассчитывали коэффициенты кажущейся проницаемости *b-a* и *a-b* фексофенадина и их отношение.

2.9. Тестирование принадлежности малонового диальдегида к субстратам Р-гликопротеина

2.9.1. Транспортные эксперименты

Клетки культивировали в трансвеллах. Через 21 сут культивирования питательную среду заменяли на транспортную среду с добавлением МДА («Sigma-Aldrich», Германия) в апикальную камеру в конечной концентрации 5, 10, 100 мкМ. Через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из базолатеральной камеры-реципиента для определения концентрации тестируемого вещества (*a-b* транспорт, обусловленный пассивной диффузией против функционирования Pgp). Затем аналогичным образом оценивали транспорт МДА из базолатеральной камеры в апикальную (*b-a* транспорт, обусловленный пассивной диффузией и функционированием Pgp).

Рассчитывали коэффициент кажущейся проницаемости МДА $P_{app} a-b$, $P_{app} b-a$ и их отношение. Значение данного отношения более «2» свидетельствует об асимметрии транспорта МДА через монослой клеток Caco-2. Для подтверждения участия Pgp в формировании асимметрии транспорта выполнялись транспортные эксперименты с ингибитором белка-транспортера – верапамилом. Для этого его в концентрации 200 мкМ добавляли в обе камеры трансвеллов за 30 мин до внесения МДА. Выравнивание транспорта МДА по обе стороны от монослоя клеток Caco-2 на фоне верапамила свидетельствует об участии Pgp в транспорте продукта пероксидации.

2.9.2. Оценка концентрации малонового диальдегида в транспортной среде

Оценка концентрации МДА в транспортной среде выполнялась методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием хроматографической системы «Dionex Ultimate 3000» и тандемного масс-селективного детектора TSQ Fortis («ThermoFisher», США). Хроматографию проводили на колонке UCT Selectra C18 4,6 mm×100 mm, 3µm, 100Å в комплексе с предколонкой Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-3UM; температура колонки 35°C. Был использован изократический

режим элюирования со скоростью потока 300 мкл/мин подвижной фазой, состоящей из 20% ацетонитрила и 80% водного раствора формиата аммония с концентрацией 10 мМоль/л.

Детектирование МДА проводили при следующих условиях. Осуществлялась ионизация путём формирования электроспрея в негативном режиме при атмосферном давлении. В ходе работы использовались условия источника ионов: напряжение электроспрея 2700 В, оболочечный газ (sheath gas) 50 arb, вспомогательный газ (aux gas) 10 arb, продувочный газ (sweep gas) 1 arb, температура испарителя 350°C, ион-транспортующей трубки 300°C. Для детектирования использовали режим мониторинга множественных реакций (MRM, *англ.: monitoring of multiple reactions*) со следующими параметрами: разрешение Q1 и Q3 установлено на 0,7, при давлении аргона (CID gas) 1 мТорр. Для количественного определения использовали переход m/z 71,1 Да \rightarrow 41 Да. Для качественного анализа использовали переходы m/z 71,1 Да \rightarrow 43 Да, m/z 71,1 Да \rightarrow 53 Да. С целью подготовки проб к хроматографированию проводили осаждение белков путём смешивания 10 мкл пробы с 90 мкл ацетонитрила, последующим встряхиванием и дальнейшим центрифугированием при 10000g в течение 10 мин при температуре +4°C. Полученный супернатант переносили в вials («ThermoFisher», США) со специальными вставками объёмом 300 мкл, после чего пробы помещали в автосемплер с поддерживаемой температурой +6°C. Объём вводимой пробы составил 5 мкл, время удерживания МДА при указанных условиях соответствовало 3,05 мин. Общее время анализа – 7 мин.

Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составил 600 – 20000 нмоль/л. Биоаналитическая методика была валидирована согласно EMA Guideline on bioanalytical method validation (European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2011) по следующим параметрам: селективность, линейность, нижний предел количественного определения, точность

(внутрицикловая и межцикловая), прецизионность, перенос пробы, стабильность образцов, матричный эффект.

2.10. Оценка выживаемости клеток в ходе МТТ-теста

Клетки культивировали в 96-луночном планшете. После завершения экспозиции с тестируемыми веществами в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 20 мкл 0,5% раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1% раствора диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия) [414]. Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США).

Жизнеспособность клеток Сасо-2 рассчитывали по формуле:

$$\text{Жизнеспособность} = \frac{\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}}{\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}} \times 100\%$$

где ОП — оптическая плотность.

2.11. Статистический анализ

Полученные результаты анализировали с помощью программ StatSoft Statistica 13,0, Microsoft Excel, GraphPad Prism8. Статистическую значимость различий оценивали дисперсионном анализом (ANOVA), парные сравнения с контролем выполняли с помощью теста Даннетта. При анализе всего двух групп оценку проводили с помощью t-критерия Стьюдента. Результаты в таблицах и на графиках приведены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Для анализа взаимосвязи признаков использовали коэффициент корреляции Пирсона (r).

Расчет значений IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) P_{gr} выполняли с помощью встроенного модуля программы GraphPad Prism8.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Моделирование и динамика развития экзогенного окислительного стресса

Экзогенный ОС моделировали добавлением в питательную среду H_2O_2 в концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5; 10, 50 и 100 мкМ и инкубированием в течение 3, 24 и 72 ч.

Уровень АФК в клетках оценивали с помощью Mito tracker Red CM H_2XROS .

Экспозиция клеток линии Сасо-2 с H_2O_2 в диапазоне концентраций 0,1-100 мкМ в течение 3 ч приводила к повышению интенсивности флюоресценции в лизате клеток после окраски Mito tracker Red CM H_2XROS на 21,5% ($p=0,05$), 27,3% ($p=0,046$), 45,4% ($p=0,004$), 54,7% ($p=0,001$), 61,1% ($p=0,001$), 63,3% ($p<0,0001$) и 85,6% ($p=0,0003$) соответственно (Рисунок 15, 16).

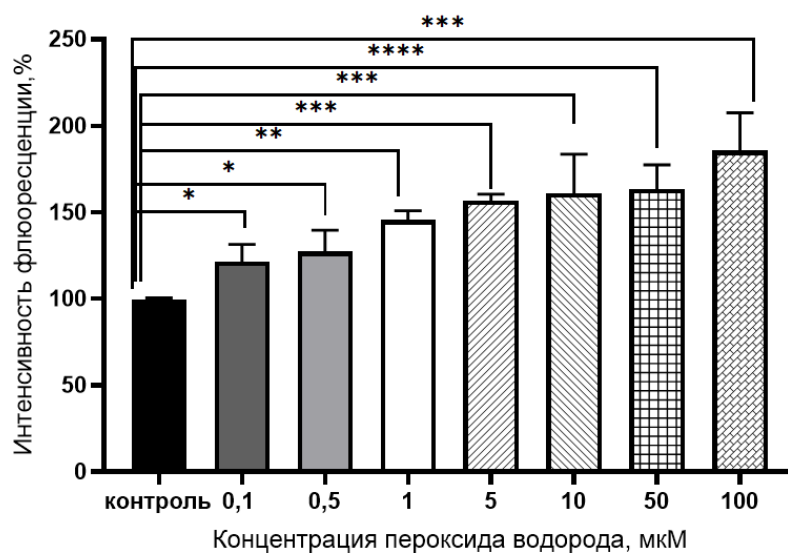


Рисунок 15 – Интенсивность флюоресценции в лизате клеток после воздействия пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3 ч при окраске Mito tracker Red CM H_2XROS ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** - $p \leq 0,001$; **** $p<0,0001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результат дисперсионного анализа – $F=12,4$; $p<0,0001$

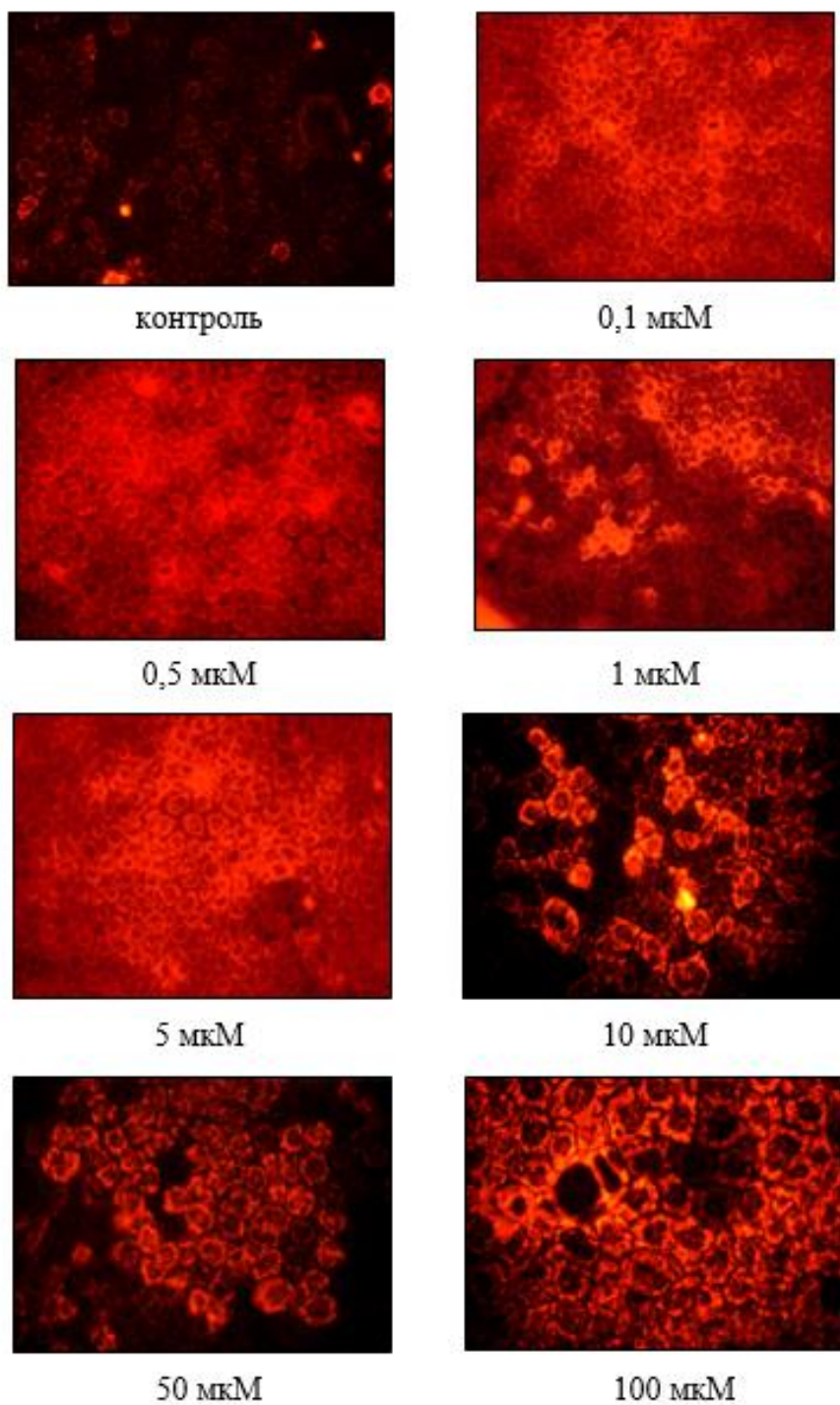


Рисунок 16 – Изменение уровня АФК в клетках линии Сасо-2 под действием пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3 ч, окрашивание с помощью MitoTracker Red CM-H2 XRos

Примечание: визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа Olympus СКХ-53 («Olympus», Япония), ув $\times 400$

Срок воздействия 24 ч приводил к снижению флюоресценции на 25,3% ($p=0,03$) и 36,3% ($p=0,01$) в концентрациях H_2O_2 50 и 100 мкМ (Рисунок 17, 19), а при длительности экспозиции 72 ч – на 32,3% ($p=0,0002$), 36,1% ($p<0,0001$), 41,1% ($p<0,0001$) при концентрациях прооксиданта 10, 50 и 100 мкМ соответственно относительно контрольных значений (Рисунок 18, 20).

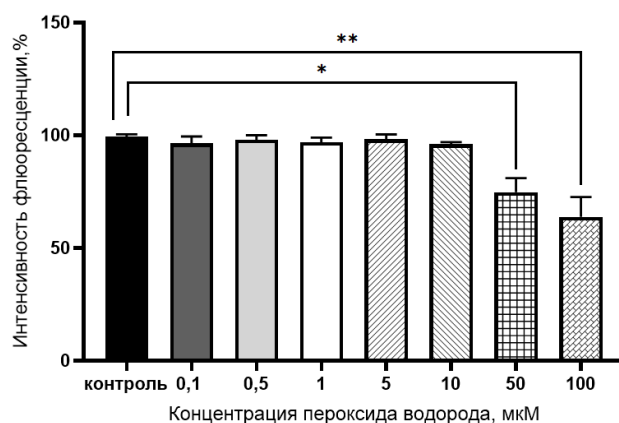


Рисунок 17 – Интенсивность флюоресценции в лизате клеток после воздействия пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 24 ч при окраске Mito tracker Red CM H_2XROS ($M\pm SD$, $n=3$)

Примечание: * – $p<0,05$; ** – $p\leq 0,01$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результат дисперсионного анализа – $F=30,2$; $p<0,0001$

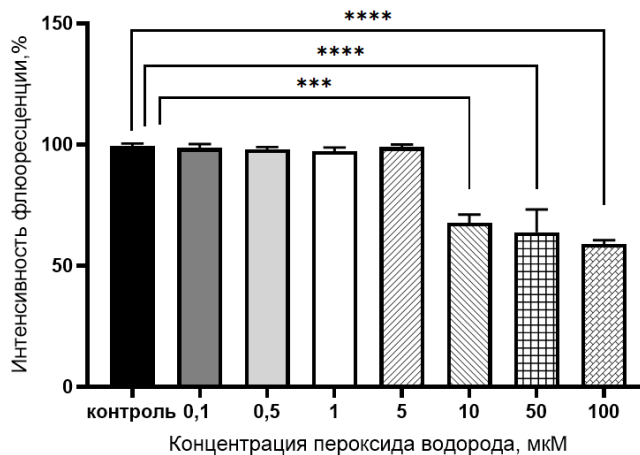


Рисунок 18 – Интенсивность флюоресценции в лизате клеток после воздействия пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 72 ч при окраске Mito tracker Red CM H_2XROS ($M\pm SD$, $n=3$)

Примечание: *** – $p<0,001$; **** – $p\leq 0,0001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результат дисперсионного анализа – $F=40,9$; $p<0,0001$

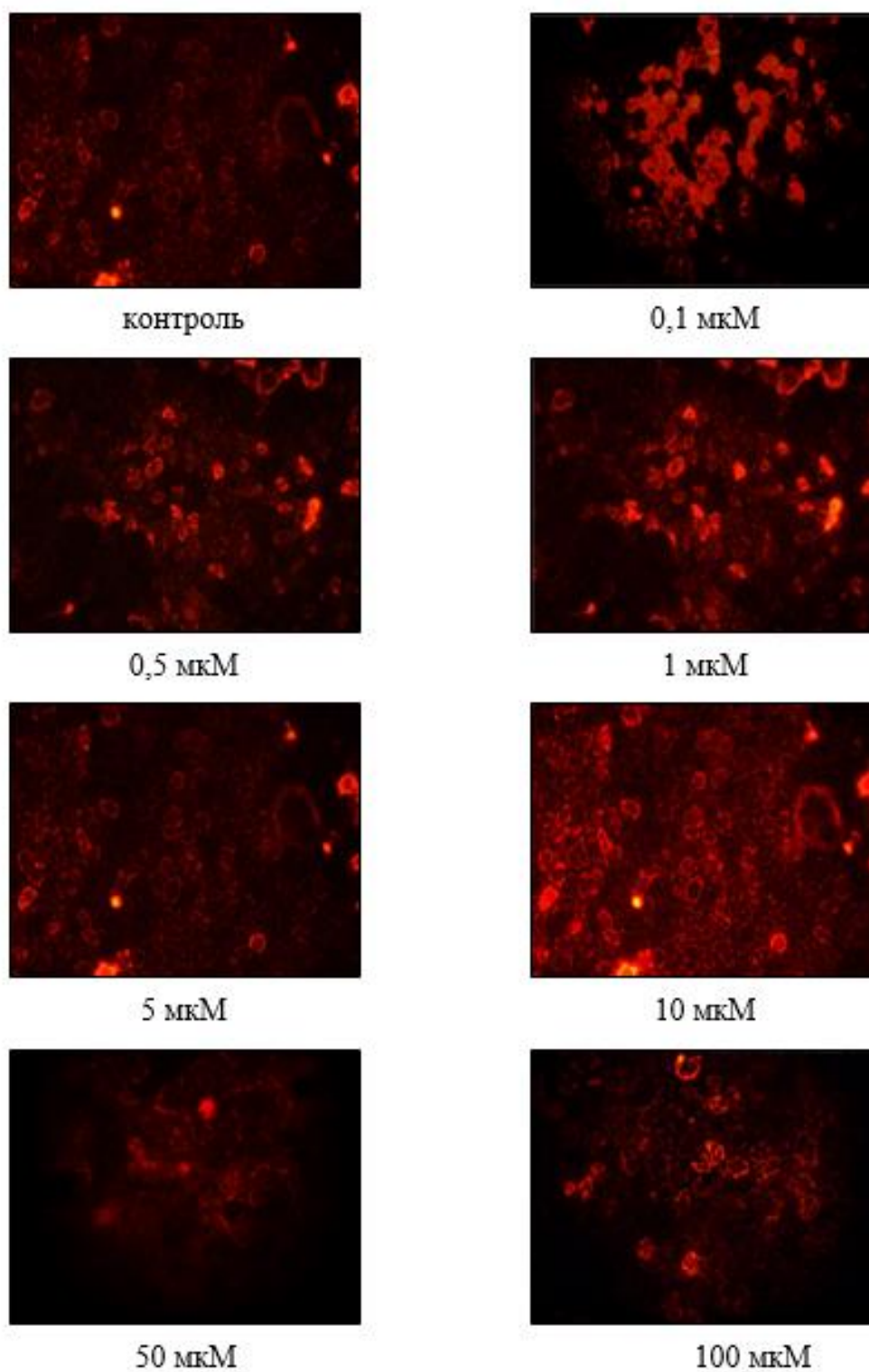


Рисунок 19 – Изменение уровня АФК в клетках линии Caco-2 под действием пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 24 ч, окрашивание с помощью MitoTracker Red CM-H2 XROs

Примечание: визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа Olympus СКХ-53 («Olympus», Япония), ув $\times 400$

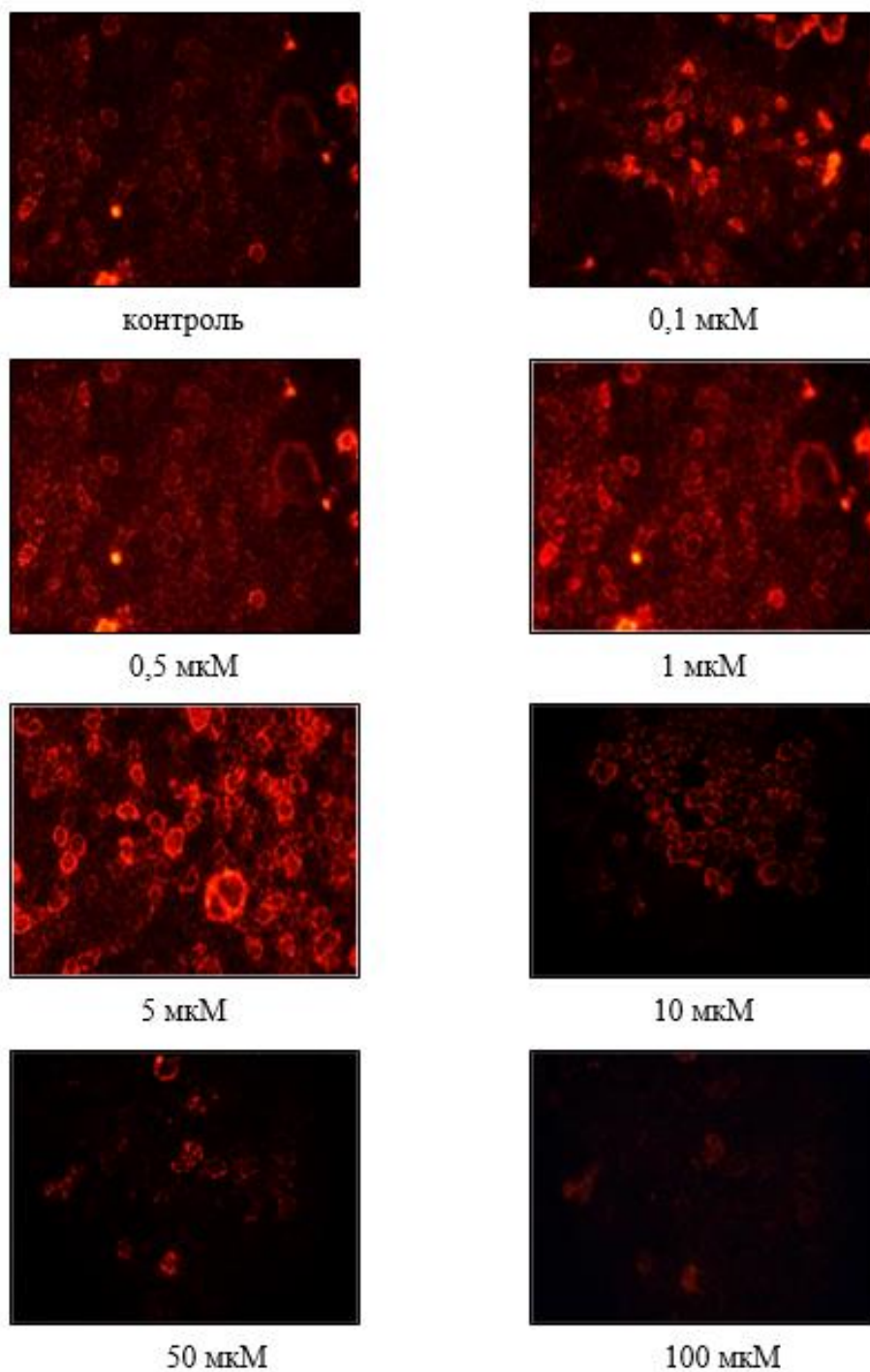


Рисунок 20 – Изменение уровня АФК в клетках линии Сасо-2 под действием пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 72 ч, окрашивание с помощью MitoTracker Red CM-H2 XRos

Примечание: визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа Olympus СКХ-53 («Olympus», Япония), ув $\times 400$

Анализ полученных результатов уровня продуктов ПОЛ в клетках линии Сасо-2 при воздействии H₂O₂ выявил следующие тенденции.

Инкубация клеток линии Сасо-2 с H₂O₂ продолжительностью 3 ч в концентрации 100 мкМ приводила к увеличению уровня МДА и 4-гидроксиолефинов в лизате клеток линии Сасо-2 на 35,7% (p=0,04) по сравнению с контролем, а в остальных концентрациях достоверного эффекта не оказывала (Таблица 4).

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

Концентрация H ₂ O ₂ , мкМ	Продукты перекисного окисления липидов		
	3 часа эксперимента	24 часа эксперимента	72 часа эксперимента
контроль	2,246±0,235	2,402±0,116	2,183±0,130
0,1	2,216±0,405	2,617±0,189	1,962±0,160
0,5	1,777±0,229	2,080±0,202	2,055±0,335
1	1,912±0,054	2,362±0,212	2,270±0,197
5	2,155±0,364	2,487±0,328	2,416±0,201
10	2,124±0,068	2,656±0,305	2,659±0,260
50	2,296±0,215	3,413±0,302**	6,439±0,576***#
100	3,047±0,349*	3,774±0,203**	9,236±0,599***#

Примечание: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001 – статистически значимые отличия от показателей контроля. # - статистически значимые отличия относительно группы 24 ч эксперимента. Результаты дисперсионного анализа для 3 ч эксперимента - F=5,878; p=0,0016; для 24 ч эксперимента – F=16,86; p<<0,0001, для 72 ч эксперимента – F=175,95; p<<0,0001

Наиболее выраженные изменения содержания продуктов ПОЛ в лизате клеток линии Сасо-2 относительно контроля произошли при инкубации в течение 72 ч: уровень МДА и 4-гидроксиолефинов в лизате клеток при концентрациях

прооксиданта 50 мкМ и 100 мкМ увеличился на 194,9% ($p=0,0002$) и 323,1% ($p=0,00016$), соответственно. В остальных концентрациях достоверного влияния H_2O_2 выявлено не было (Таблица 4).

Экспозиция с H_2O_2 в течение 24 ч, также приводила к статистически значимому повышению содержания продуктов ПОЛ при концентрациях H_2O_2 50 мкМ и 100 мкМ на 42,1% ($p=0,006$) и 57,1% ($p=0,007$) соответственно по сравнению с контролем. В остальных концентрациях статистически значимого эффекта H_2O_2 не оказал (Таблица 4).

Содержание продуктов ПОЛ, образующееся при воздействии H_2O_2 в течение 24 ч в концентрациях 50 и 100 мкМ повышалось к 72 ч эксперимента на 46,9% ($t=8,06$; $p=0,0013$) и 59,1% ($t=14,9$; $p=0,0001$) соответственно, что демонстрирует усугубление ОС (Таблица 4).

При оценке уровня карбонильных производных белков (продуктов свободно-радикального повреждения белков) были получены следующие результаты.

H_2O_2 в концентрациях 50 и 100 мкМ при длительности воздействия 3 ч в клетках линии Сасо-2 вызывал повышение содержания карбонильных производных белков на 88,9% ($p=0,0005$) и 137,1 % ($p=0,0004$) по сравнению с контролем соответственно, а в остальных концентрациях достоверного эффекта не оказывал (Таблица 5). При увеличении длительности воздействия прооксиданта до 24 ч уровень карбонильных производных белков увеличивался по сравнению со значениями контроля при концентрациях H_2O_2 5, 10, 50 и 100 мкМ на 74,8% ($p=0,01$), 97,1% ($p=0,01$), 150,5% ($p=0,001$) и 189,3% ($p=0,0005$) соответственно (Таблица 5). При сроке инкубации 72 ч содержание карбонильных производных белков в лизате клеток Сасо-2 повышалось при концентрации H_2O_2 50 и 100 мкМ на 36,7% ($p=0,001$) и 110,0% ($p=0,001$) соответственно, а при остальных концентрациях достоверно не изменялось (Таблица 5).

Содержание карбонильных производных белков, фиксируемое при воздействии H_2O_2 в течение 24 ч в концентрациях 5, 10, 50 мкМ снижалось к 72 ч эксперимента на 49,1% ($t=6,4$; $p=0,001$), 53,1% ($t=5,36$; $p=0,01$) и 44,6% ($t=3,99$;

$p=0,01$) соответственно, что связано с включением защитных механизмов к 24 и 72 ч инкубации (Таблица 5).

Таблица 5 – Изменение концентрации карбонильных производных белков (нмоль/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация H_2O_2 , мкМ	Карбонильные производные белков		
	3 часа эксперимента	24 часа эксперимента	72 часа эксперимента
контроль	0,271±0,032	0,270±0,084	0,300±0,052
0,1	0,330±0,183	0,241±0,072	0,290±0,020
0,5	0,341±0,028	0,358±0,062	0,281±0,054
1	0,281±0,098	0,323±0,030	0,247±0,010
5	0,316±0,030	0,531±0,055**	0,269±0,007#
10	0,376±0,049	0,641±0,063**	0,300±0,022#
50	0,511±0,022***	0,741±0,088***	0,410±0,051***#
100	0,642±0,041***	0,671±0,021***	0,630±0,044***#

Примечание: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – статистически значимые различия с показателями контроля; # – статистически значимые отличия относительно группы 24 ч эксперимента. Результаты дисперсионного анализа для 3 ч эксперимента - $F=7,87$; $p=0,00033$, для 24 ч эксперимента – $F=29,0$; $p < 0,00001$, для 72 ч эксперимента – $F=34,5$; $p < 0,00001$

При оценке содержания белковых и небелковых SH-групп в лизате клеток Сасо-2 при воздействии H_2O_2 были получены следующие результаты.

Уровень небелковых SH-групп при инкубации с H_2O_2 в течение 3 ч не отличался от показателей контрольной группы. При воздействии пероксида водорода в течение 24 ч уровень небелковых SH-групп возрастал в концентрациях 0,1 мкМ на 70,1% ($p=0,0075$); 0,5 мкМ – на 83,7% ($p=0,00341$) и 1 мкМ – на 68,5% ($p=0,00343$) по сравнению с контролем, а в концентрациях 5, 10, 50 и 100 мкМ наоборот уменьшался на 44,2% ($p=0,041$), 69,0% ($p=0,0084$), 81,5% ($p=0,0065$) и

78,4% ($p=0,0058$) соответственно. После 72 ч инкубации с H_2O_2 в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ содержание небелковых SH-групп снижалось на 98,6 % ($p=0,0226$), 77,3% ($p=0,0377$) и 81,5% ($p=0,0489$) соответственно, относительно контрольных значений (Таблица 6).

Таблица 6 – Изменение концентрации небелковых SH-групп (мкмоль/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч, ($M \pm SD$, $n=3$).

Концентрация H_2O_2 , мкМ	Небелковые SH-группы		
	3 часа эксперимента	24 часа эксперимента	72 часа эксперимента
контроль	0,107±0,009	0,090±0,009	0,110±0,010
0,1	0,131±0,025	0,154±0,016**	0,131±0,025
0,5	0,131±0,053	0,166±0,049**	0,131±0,053
1	0,146±0,084	0,152±0,031**	0,146±0,084
5	0,103±0,030	0,050±0,004*	0,103±0,030
10	0,157±0,026	0,028±0,002**	0,218±0,011*
50	0,159±0,013	0,017±0,002**	0,025±0,001*
100	0,155±0,025	0,020±0,014**	0,020±0,003*

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 3 ч эксперимента – $F=0,91$; $p=0,523$; для 24 ч эксперимента – $F=25,91$; $p \ll 0,0001$; для 72 ч эксперимента – $F=8,61$; $p=0,0002$

Индукция ОС пероксидом водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3 ч не привела к статистически значимым изменениям концентрации белковых SH-групп в клетках линии Сасо-2 по сравнению со значениями контроля (Таблица 7). При инкубации в течении 24 ч концентрация белковых SH-групп была статистически значимо ниже чем в контрольной группе на 46,6% ($p=0,0003$) при воздействии H_2O_2 в концентрации 0,1мкМ, на 53,0% ($p=0,0002$) – при 0,5 мкМ, на 62,6% ($p=0,00018$) – при 1 мкМ, на 51,3% ($p=0,00024$) – при 5 мкМ, на 41,4%

($p=0,00018$) – при 10 мкМ, на 27,2% ($p=0,0036$) – при 50 мкМ и на 36,4% ($p=0,00097$) при 100 мкМ (Таблица 7).

При воздействии пероксида водорода в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ в течение 72 ч наблюдалось статистически значимое снижение уровня белковых SH-групп на 52,4% ($p=0,021$), 38,1% ($p=0,02$), 40,4% ($p=0,02$) соответственно по сравнению с показателями контроля (Таблица 7).

Таблица 7 – Изменение концентрации белковых SH-групп (мкмоль/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация H_2O_2 , мкМ	Белковые SH-группы		
	3 часа эксперимента	24 часа эксперимента	72 часа эксперимента
контроль	0,207±0,011	0,189±0,006	0,211±0,034
0,1	0,191±0,008	0,101±0,014***	0,217±0,098
0,5	0,184±0,025	0,089±0,018***	0,213±0,074
1	0,184±0,040	0,071±0,024***	0,173±0,024
5	0,182±0,013	0,092±0,016***	0,180±0,018
10	0,161±0,028	0,111±0,027***	0,100±0,010*
50	0,162±0,017	0,138±0,022**	0,130±0,009*
100	0,158±0,017	0,120±0,011***	0,126±0,014*

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 3 ч эксперимента - $F=1,76$; $p=0,164$, для 24 ч эксперимента – $F=11,84$; $p < 0,0001$, для 72 ч эксперимента – $F=2,79$; $p=0,04$

В ходе оценки уровня транскрипционного фактора Nrf2 при воздействии H_2O_2 на клетки линии Сасо-2 были получены следующие результаты. Действие прооксиданта во всех тестируемых концентрациях в течение 3 ч достоверно не изменяло количество транскрипционного фактора Nrf2 (Рисунок 21).

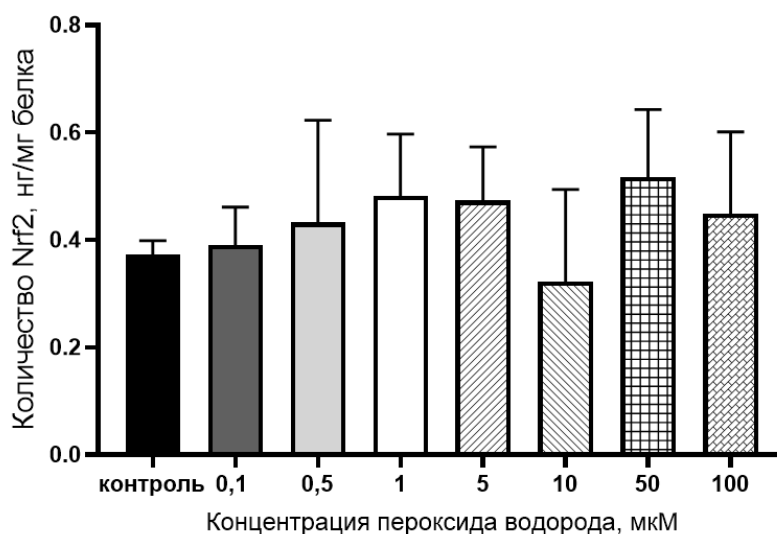


Рисунок 21 – Изменение количества Nrf2 в лизате клеток линии Caco-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: результаты дисперсионного анализа – $F=0,74$; $p=0,641$

Увеличение срока инкубации до 24 часов способствовало повышению уровня Nrf2 при концентрациях пероксида водорода 0,1 мкМ на 394,1% ($p=0,006$); 0,5 мкМ – на 311,7% ($p=0,01$) и 1 мкМ – на 214,7% ($p=0,03$) соответственно (Рисунок 22).

После 72 часов инкубации с пероксидом водорода в концентрациях 10 и 50 мкМ происходило увеличение количества Nrf2 на 302,5% ($p=0,02$) и 237,5% ($p=0,03$) по сравнению с контролем соответственно, а в концентрации 100 мкМ – его снижение на 46,5% ($p=0,042$) (Рисунок 23).

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

Полученные результаты подтверждают, что активация Nrf2 происходит по классическому механизму (за счет окисления SH-групп в keap 1). Корреляционная прямая представлена на Рисунке 24.

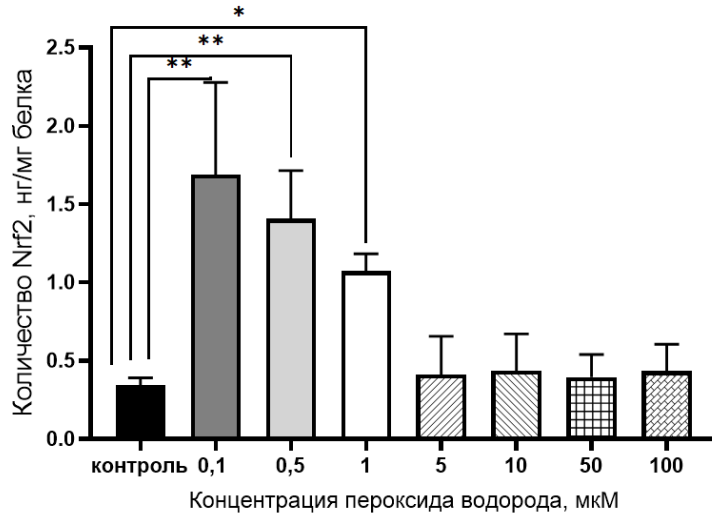


Рисунок 22 – Изменение количества Nrf2 в лизате клеток линии Caco-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p \leq 0,01$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа – $F=10,87$; $p=0,000048$

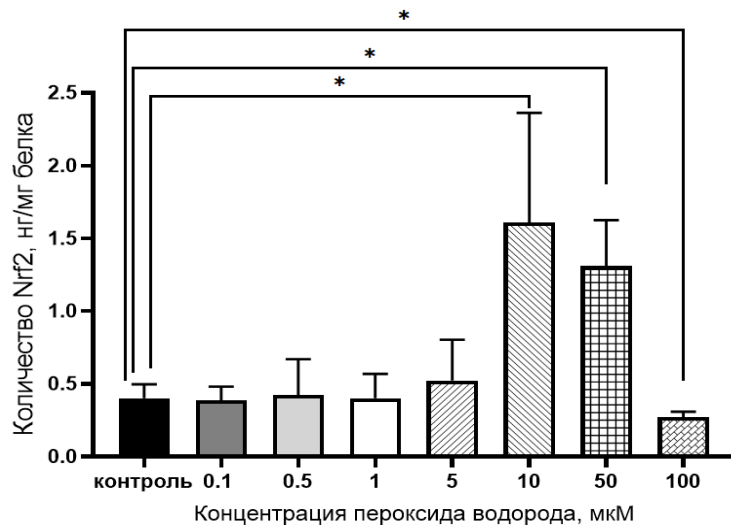


Рисунок 23 – Изменение количества Nrf2 в лизате клеток линии Caco-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа – $F=7,55$; $p=0,00042$

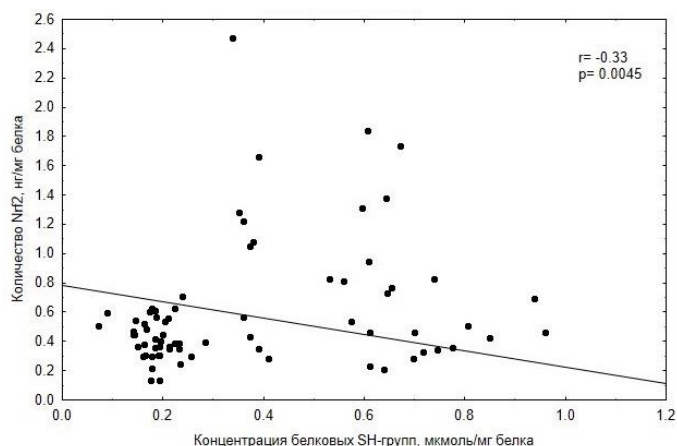


Рисунок 24 – Корреляционная зависимость между концентрацией белковых SH-групп (мкмоль/мг белка) и количеством Nrf2 (нг/г белка) под действием пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3, 24, 72 ч. Изменения уровня антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы при развитии экзогенного ОС представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Изменение количества глутатионпероксидазы (нг/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация H_2O_2	Глутатионпероксидаза		
	3 часа эксперимента	24 часа эксперимента	72 часа эксперимента
контроль	30,14±1,47	30,82±1,91	30,12±1,57
0,1	29,73±1,63	36,13±0,22**	32,21±1,85
0,5	31,32±1,94	40,46±6,62**	28,96±3,34
1	28,71±2,16	36,17±1,92**	29,13±1,63
5	30,85±1,70	31,59±0,63	36,78±3,27
10	30,98±1,88	31,23±0,86	53,84±6,23***#
50	31,67±1,92	31,34±0,91	34,13±3,35
100	21,35±1,11**	31,18±1,22	28,52±2,34

Примечание: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. # - статистически значимые отличия относительно группы 24 ч. Результаты дисперсионного анализа для 3 ч эксперимента – $F=3,75$; $p=0,01$, для 24 ч эксперимента – $F=5,96$; $p=0,0015$, для 72 ч эксперимента – $F=20,41$; $p \ll 0,0001$

Моделирование экзогенного ОС сопровождалось следующим изменением жизнеспособности клеток по результатам МТТ-теста. Жизнеспособность клеток в контроле была принята за 100%. При воздействии H_2O_2 в диапазоне концентраций 0,1-10 мкМ и сроках инкубации 3, 24 и 72 ч средний показатель выживаемости составлял $87,6 \pm 9,3\%$, что статистически значимо не отличалось от контроля (Рисунок 25).

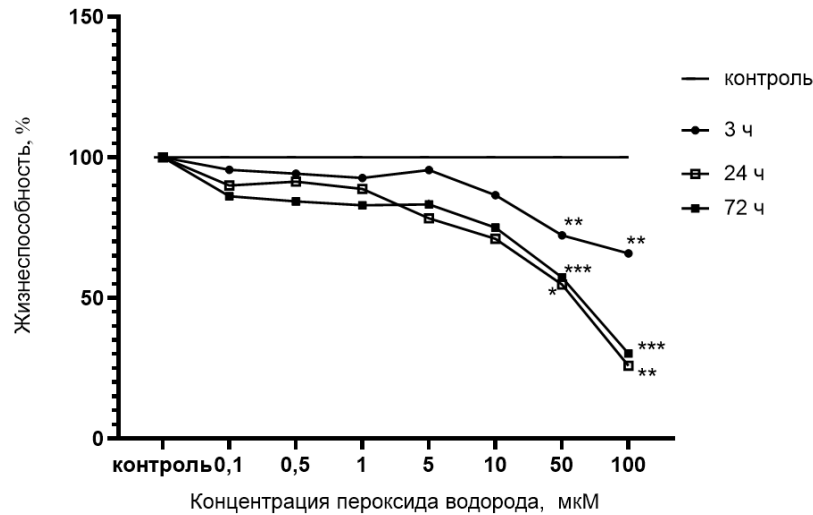


Рисунок 25 – Изменение жизнеспособности клеток линии Caco-2 в зависимости от концентрации пероксида водорода при инкубации в течение 3, 24 и 72 ч

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 3 ч эксперимента – $F=3,29$; $p=0,02$, для 24 ч эксперимента – $F=39,9$; $p < 0,0001$, для 72 ч эксперимента – $F=11,9$; $p < 0,0001$

Экспозиция с пероксидом водорода в концентрациях 50 и 100 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч приводила к статистически значимому снижению жизнеспособности клеток относительно контроля. В частности, H_2O_2 в концентрации 50 мкМ и экспозиции 3, 24 и 72 ч снижал жизнеспособность клеток линии Caco-2 на 28,7% ($p=0,01$), 45,9% ($p=0,001$) и 41,2% ($p=0,02$), соответственно, а в концентрации 100 мкМ – на 29,1 % ($p=0,006$), 73,2% ($p=0,0003$) и 65,7% ($p=0,002$) соответственно (Рисунок 25), что сопровождалось нарушением целостности клеточного монослоя (Рисунок 26).

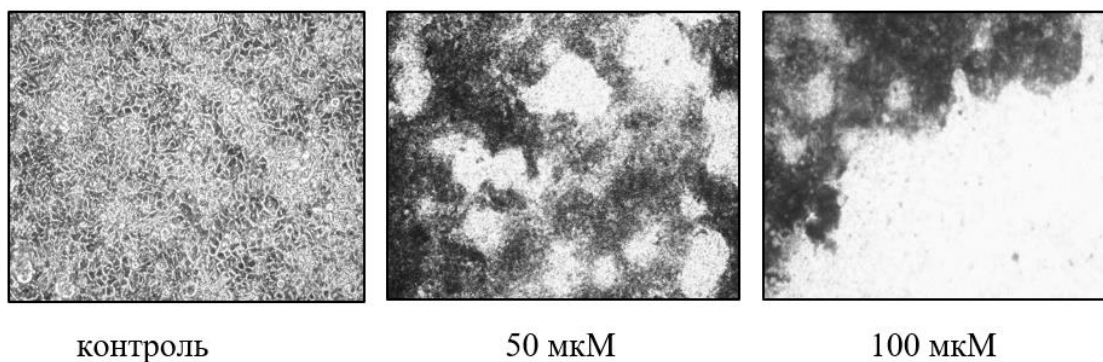


Рисунок 26 – Состояние клеточного монослоя в норме и при воздействии токсических концентраций пероксида водорода (50 и 100 мкМ 72ч)

Примечание: визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа Olympus SKX-53 («Olympus», Япония), ув $\times 400$

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

3.2. Моделирование и динамика развития эндогенного окислительного стресса

Эндогенный ОС моделировали с помощью ингибитора синтеза глутатиона – DL-бутионинсульфоксимины (БСО, ингибитор γ -глутамилцистеинсинтетазы) в конечных концентрациях в питательной среде 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ.

Воздействие БСО в течение 3 ч достоверно не влияло на интенсивность флюоресценции (Рисунок 27).

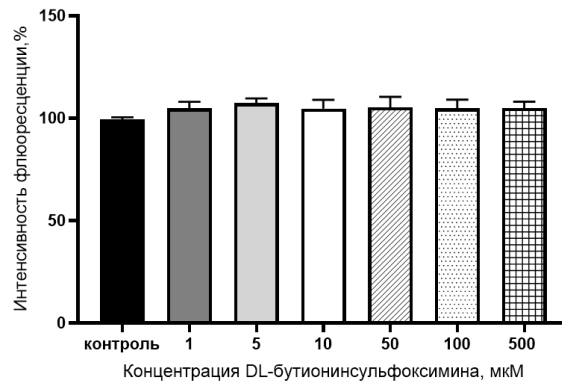


Рисунок 27 – Интенсивность флюоресценции в лизате клеток Caco-2 после воздействия DL-бутионинсульфоксими́на в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3 ч при окраске Mito tracker Red CM-H₂ XROS

Примечание: результат дисперсионного анализа – $F=1,39$; $p=0,286$

При воздействии БСО в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ в течение 24 ч интенсивность флюоресценции клеток Caco-2 после окраски Mitotracker Red CM-H₂ XRos возрастала на 38,8% ($p=0,001$), 46,5% ($p=0,0004$) и 70,2% ($p=0,0001$) соответственно по сравнению со значениями контроля (Рисунок 28, 29). При воздействии БСО в течение 72 ч в концентрациях 50 и 100 мкМ интенсивность флюоресценции клеток Caco-2 возрастала на 12,7% ($p=0,026$) и 15,7% ($p=0,007$) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 30, 31).

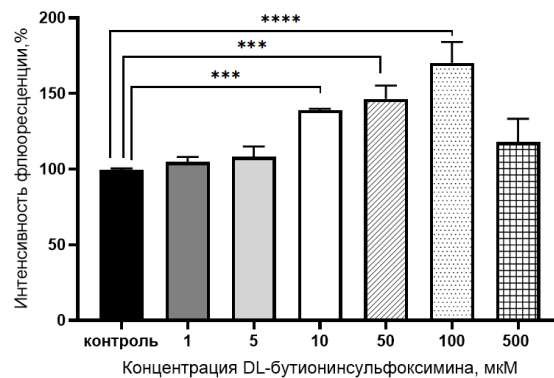


Рисунок 28 – Интенсивность флюоресценции в лизате клеток Caco-2 после воздействия DL-бутионинсульфоксими́на в концентрациях 1-500 мкМ в течение 24 ч при окраске Mito tracker Red CM-H₂ XROS

Примечание: *** – $p \leq 0,001$; **** – $p < 0,0001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результат дисперсионного анализа – $F=25,5$; $p < 0,0001$

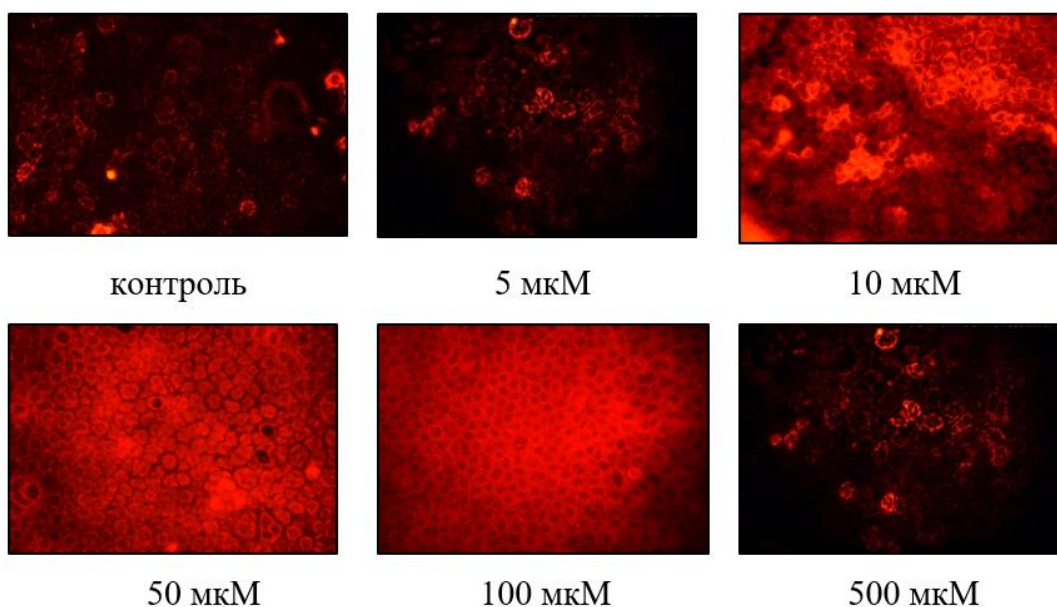


Рисунок 29 – Изменение уровня АФК в клетках линии Caco-2 под действием D,L-бутионинсульфоксимины в концентрациях 1-500 мкМ в течение 24 ч, окрашивание с помощью MitoTracker Red CM-H₂ XROS

Примечание: визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа Olympus SKX-53 («Olympus», Япония), ув ×400

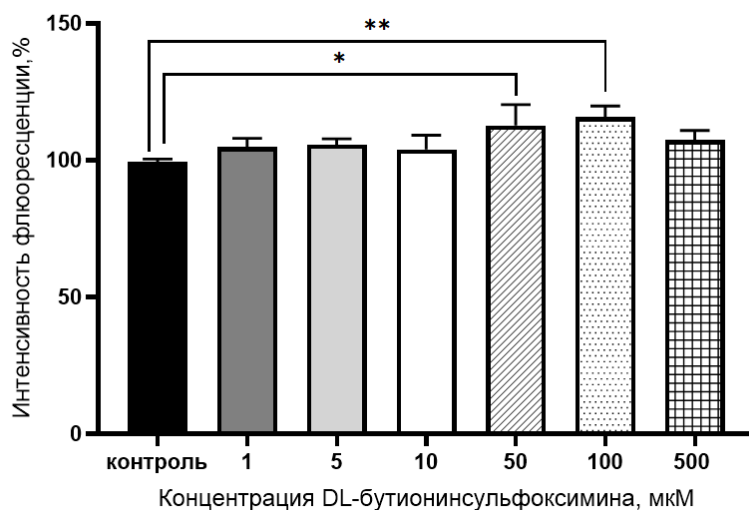


Рисунок 30 – Интенсивность флюоресценции в лизате клеток после воздействия DL-бутионинсульфоксимины в концентрациях 1-500 мкМ в течение 72 ч при окраске Mito tracker Red CM-H₂ XROS

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результат дисперсионного анализа – $F=3,63$; $p < 0,05$

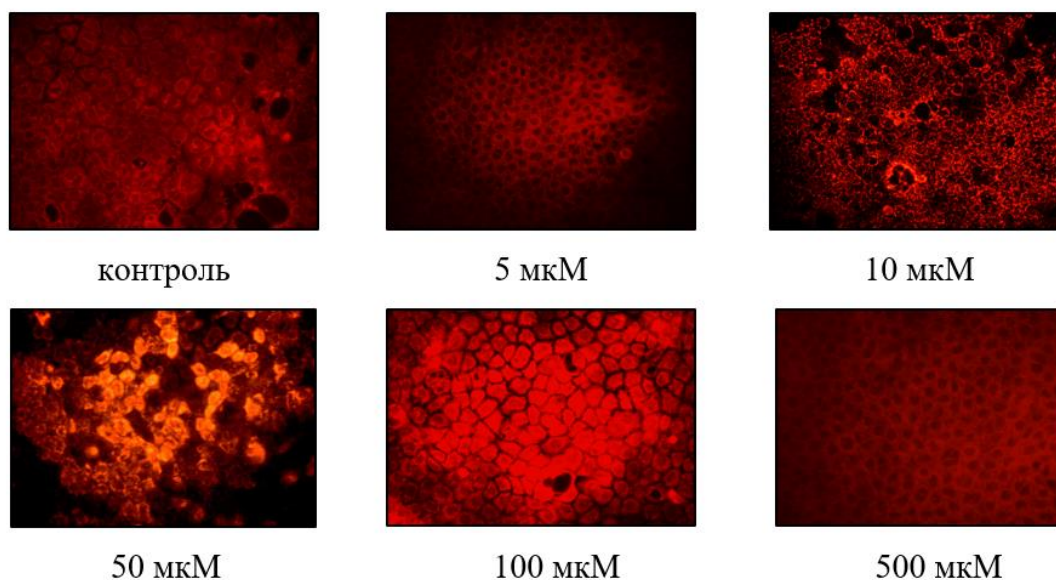


Рисунок 31 – Изменение уровня АФК в клетках линии Caco-2 под действием D,L-бутионинсульфоксими́на в концентрациях 1-500 мкМ в течение 72 ч, окрашивание с помощью MitoTracker Red CM-H₂ XRos

Примечание: визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа Olympus CKX-53 («Olympus», Япония), ув ×400

При анализе уровня продуктов ПОЛ в клетках линии Caco-2 в условиях воздействия БСО были выявлены следующие изменения. Инкубация клеток линии Caco-2 в течение 3 ч с БСО в концентрации 500 мкМ способствовала повышению уровня МДА и 4-гидроксиолефинов на 6,66% ($p=0,04$) по сравнению с показателями контроля. Инкубация в течение 24 ч не приводила к статистически значимому изменению концентрации МДА и 4-гидроксиолефинов. При инкубации длительностью 72 ч и концентрации БСО 500 мкМ отмечалось повышение уровня продуктов ПОЛ на 13,3% ($p=0,03$) по сравнению с показателями контроля.

Изменение концентрации продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида и 4-гидрокси-олефинов, мкмоль/мг белка) в лизате клеток линии Caco-2 при экспериментальном моделировании эндогенного окислительного стресса под действием DL-бутионинсульфоксими́на в концентрациях 1-500 мкМ представлено в Таблице 9.

Таблица 9 – Концентрация продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида и 4-гидрокси-олефинов, мкмоль/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при экспериментальном моделировании эндогенного окислительного стресса под действием DL-бутионинсульфоксимида в концентрациях 1-500 мкМ ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация БСО, мкМ	Продукты перекисного окисления липидов		
	3 часа эксперимента	24 часа эксперимента	72 часа эксперимента
контроль	2,464±0,016	2,482±0,028	2,424±0,081
1	2,427±0,039	2,452±0,043	2,523±0,008
5	2,481±0,047	2,457±0,036	2,464±0,027
10	2,459±0,020	2,418±0,064	2,540±0,098
50	2,534±0,004	2,497±0,061	2,632±0,172
100	2,555±0,105	2,429±0,013	2,621±0,054
500	2,628±0,050*	2,534±0,017	2,746±0,046*

Примечание: * – $p < 0,05$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 3 ч эксперимента - $F=5,61$; $p=0,004$, для 24 ч эксперимента – $F=2,79$; $p=0,053$, для 72 ч эксперимента – $F=4,94$; $p=0,006$

При оценке уровня карбонильных производных белков не было получено изменений при сроке экспозиции с БСО 3 ч. Инкубация клеток линии Сасо-2 с БСО в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ в течение 24 и 72 ч приводила к увеличению уровня карбонильных производных белков на 15,6% ($p=0,01$) и 36,6% ($p=0,004$); 19,9% ($p=0,003$) и 37,6% ($p=0,005$); 21,2% ($p=0,002$) и 63,1% ($p=0,0002$); 150,0% ($p=0,0002$) и 69,1% ($p=0,0002$) соответственно (Таблица 10). Содержание карбонильных производных белков возрастало на 24,7% ($t=4,4$; $p=0,01$) и снижалось на 49,4% ($t=16,96$; $p < 0,0001$) при концентрациях БСО 100 и 500 мкМ соответственно в группе 72 ч эксперимента относительно серии инкубации 24 ч (Таблица 10).

Таблица 10 – Концентрация карбонильных производных белков (нмоль/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при экспериментальном моделировании эндогенного окислительного стресса под действием DL-бутионин-сульфоксимида в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация БСО, мкМ	Карбонильные производные белков		
	3 часа эксперимента	24 часа эксперимента	72 часа эксперимента
контроль	0,298±0,017	0,302±0,054	0,298±0,017
1	0,256±0,011	0,305±0,031	0,332±0,034
5	0,271±0,007	0,266±0,087	0,363±0,041
10	0,284±0,013	0,349±0,070**	0,407±0,012**
50	0,299±0,017	0,362±0,031**	0,410±0,058**
100	0,305±0,013	0,366±0,045**	0,486±0,010***#
500	0,344±0,039	0,753±0,023***	0,504±0,011***#

Примечание: ** – $p \leq 0,01$; *** – $p < 0,001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. # - статистически значимые отличия относительно группы 24 ч. Результаты дисперсионного анализа для 3 ч эксперимента – $F=0,98$; $p=0,05$, для 24 ч эксперимента – $F=29,05$; $p \ll 0,0001$, для 72 ч эксперимента – $F=17,92$; $p \ll 0,0001$

При оценке уровня белковых и небелковых SH-групп в лизате клеток Сасо-2 при воздействии БСО были получены следующие результаты.

При инкубации с БСО в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3 ч уровень небелковых SH-групп не изменялся относительно значений контрольной группы (Таблица 11).

Инкубация в течение 24 ч и 72 ч при концентрациях БСО 10; 50; 100; 500 мкМ приводила к снижению уровня небелковых SH-групп. Так при концентрации 10 мкМ снижение на 40,71% ($p=0,002$) и 31,96% ($p=0,007$); при 50 мкМ – 57,6% ($p=0,0004$) и 48,36% ($p=0,0006$); при 100 мкМ – 67,8% ($p=0,0002$) и 62,29% ($p=0,0002$); при 500 мкМ – 55,9% ($p=0,0004$) и 57,4% ($p=0,0002$) соответственно (Таблица 11).

Таблица 11 – Концентрация небелковых SH-групп (мкмоль/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при экспериментальном моделировании эндогенного окислительного стресса под действием DL-бутионин-сульфоксимида в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация БСО, мкМ	Небелковые SH-группы		
	3 часа эксперимента	24 часа эксперимента	72 часа эксперимента
контроль	0,122±0,018	0,118±0,015	0,122±0,018
1	0,134±0,005	0,120±0,019	0,134±0,005
5	0,119±0,022	0,117±0,022	0,119±0,022
10	0,109±0,012	0,070±0,010**	0,083±0,013***
50	0,113±0,005	0,050±0,004***	0,063±0,002***
100	0,121±0,026	0,038±0,008***	0,046±0,008***
500	0,119±0,015	0,052±0,011***	0,052±0,012***

Примечание: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 3 ч эксперимента – $F=0,67$, $p=0,67$, для 24 ч эксперимента – $F=20,7$; $p \ll 0,0001$, для 72 ч эксперимента – $F=23,2$; $p \ll 0,0001$

Уровень белковых SH-групп при воздействии БСО в диапазоне концентраций 1-500 мкМ в течении 3 ч не изменялся (Таблица 12).

При увеличении длительности экспозиции до 24 ч отмечалось снижение содержания белковых SH-групп на 25,5% ($p=0,02$) при концентрации БСО 10 мкМ, на 32,2% ($p=0,01$) – при 50 мкМ, на 50,0% ($p=0,001$) – при 100 мкМ и на 44,7% ($p=0,002$) – при 500 мкМ, а при концентрациях 1 и 5 мкМ достоверных отличий от контроля получено не было.

При сроке инкубации 72 ч наблюдалось снижение уровня белковых SH-групп при воздействии БСО в концентрациях 50; 100 и 500 мкМ на 37,1% ($p=0,03$); 64,9% ($p=0,008$) и 54,3% ($p=0,003$) соответственно, а при концентрациях 1-10 мкМ изменений не отмечалось (Таблица 12).

Таблица 12 – Концентрация белковых SH-групп (мкмоль/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при экспериментальном моделировании эндогенного окислительного стресса под действием DL-бутионин-сульфоксимида в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация БСО, мкМ	Белковые SH-группы		
	3 часа эксперимента	24 часа эксперимента	72 часа эксперимента
контроль	0,208±0,024	0,208±0,024	0,208±0,024
1	0,214±0,020	0,170±0,033	0,210±0,028
5	0,187±0,057	0,191±0,031	0,187±0,057
10	0,170±0,030	0,155±0,012*	0,172±0,012
50	0,172±0,012	0,141±0,014**	0,131±0,032*
100	0,176±0,031	0,104±0,014***	0,073±0,011**
500	0,164±0,016	0,115±0,015**	0,095±0,011**

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 3 ч эксперимента – $F=1,2$; $p=0,35$, для 24 ч эксперимента – $F=8,98$; $p=0,0004$, для 72 ч эксперимента – $F=10,52$; $p=0,0002$

Оценка уровня транскрипционного фактора Nrf2 при воздействии БСО на клетки линии Сасо-2 продемонстрировала следующие результаты.

Инкубация клеток линии Сасо-2 с БСО во всех тестируемых концентрациях в течение 3 ч не вызывала изменений количества транскрипционного фактора Nrf2 (Рисунок 32).

При экспозиции с БСО в концентрациях 1; 5 и 500 мкМ в течение 24 ч количество Nrf2 также не изменялось, но возрастало при концентрации прооксиданта 10 мкМ на 157,8% ($p=0,005$), 50 мкМ – на 146,7% ($p=0,0003$), 100 мкМ – на 164,4% ($p=0,006$) (Рисунок 33). Воздействие БСО в течение 72 ч приводило к увеличению количества Nrf2 при концентрации ингибитора 50 мкМ на 195,7% ($p=0,001$), 100 мкМ – на 210,8% ($p=0,001$), а при концентрациях 1; 5; 10 и 500 мкМ статистически значимого эффекта не оказывало (Рисунок 34).

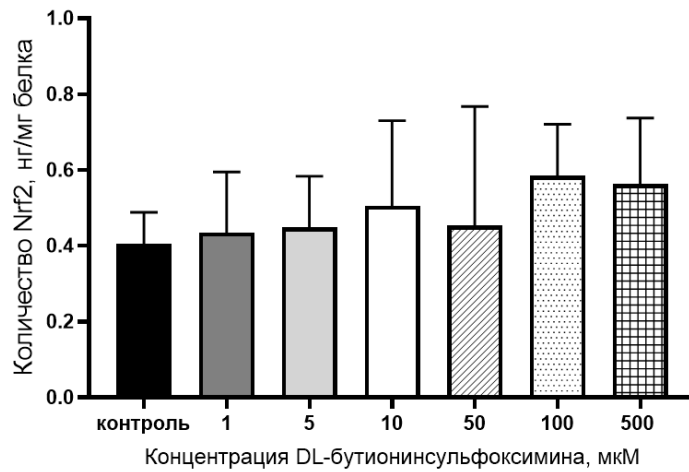


Рисунок 32 – Изменение количества Nrf2 в лизате клеток линии Caco-2 при индукции окислительного стресса DL-бутионинсульфосимином в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечание: результаты дисперсионного анализа – $F=0,38$; $p=0,87$

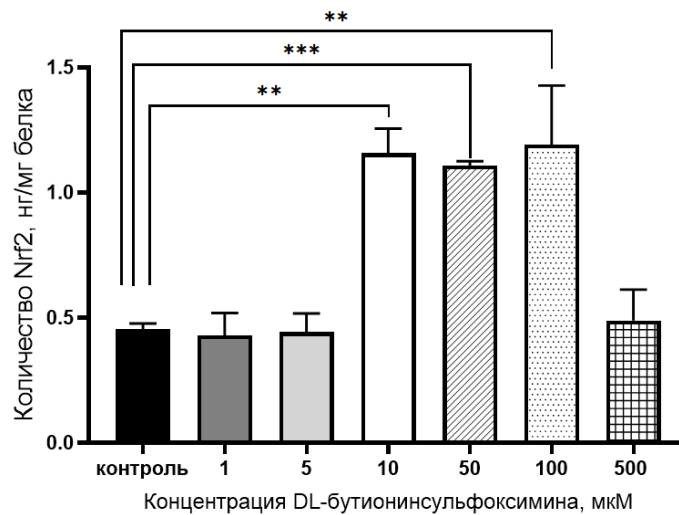


Рисунок 33 – Изменение количества Nrf2 в лизате клеток линии Caco-2 при индукции окислительного стресса DL-бутионинсульфосимином в концентрациях 1–500 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечание: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 24 ч эксперимента – $F=30,9$, $p < 0,0001$

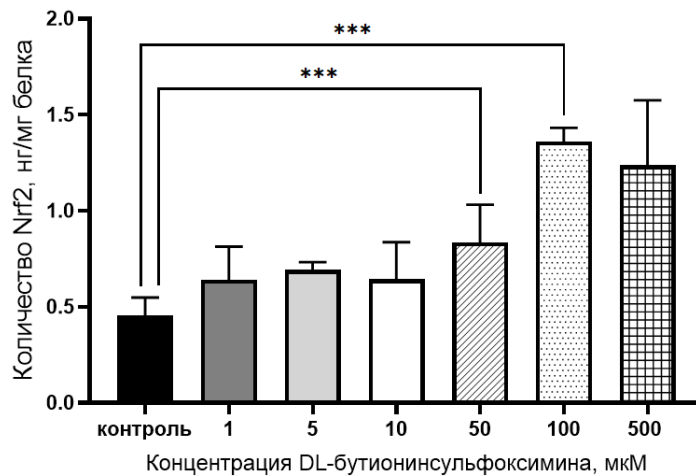


Рисунок 34 – Изменение количества Nrf2 в лизате клеток линии Caco-2 при индукции окислительного стресса DL-бутионинсульфоксимином в концентрациях 1-500 мкМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечание: *** – $p < 0,001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 72 ч эксперимента – $F=10,01$, $p=0,0002$

В ходе исследования установлено, что в диапазоне концентраций от 1 до 500 мкМ и сроках инкубации 3-72 ч уровень Nrf2 был обратно пропорционален содержанию белковых SH-групп (Рисунок 35) ($r=-0,56$, $p=0,00001$), что свидетельствует об обратной зависимости между концентрацией восстановленных тиолов и экспрессией транскрипционного фактора Nrf2.

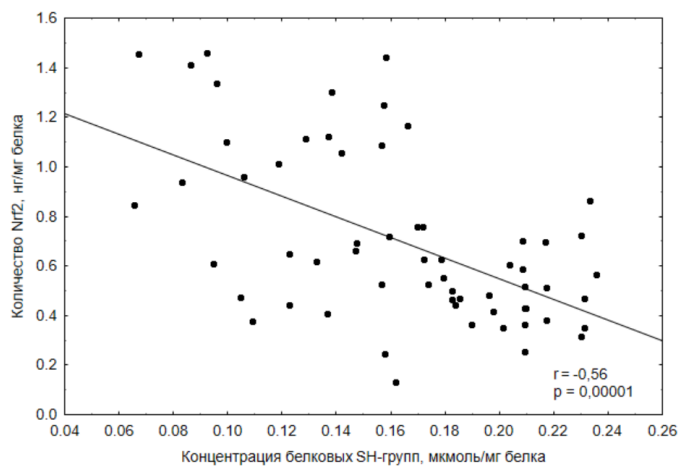


Рисунок 35 – Корреляционная зависимость между концентрацией белковых SH-групп (мкмоль/мг белка) и количеством Nrf2 (нг/г белка) под действием DL-бутионинсульфоксимины в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3, 24, 72 ч

При длительности воздействия 3 ч БСО во всех тестируемых концентрациях достоверно не влиял на уровень глутатионпероксидазы (Таблица 13). При действии БСО в течение 24 ч в концентрациях 1, 5, 10, 50 и 100 мкМ количество глутатионпероксидазы увеличивалось на 17,9% ($p=0,003$), 35,2% ($p=0,0002$), 52,4% ($p=0,00019$), 71,1% ($p=0,0002$) и 64,6% ($p=0,0002$) соответственно, а при инкубации в течение 72 ч и концентрациях 10 и 50 мкМ на 20,3% ($p=0,006$) и 15,7% ($p=0,012$) соответственно по сравнению с контролем и снижалось при концентрации 500 мкМ на 15,8% ($p=0,02$) (Таблица 13). Стоит отметить, что при увеличении срока инкубации до 72 ч количество фермента снижалось относительно срока инкубации 24 ч на 16,9% ($t=3,8$; $p=0,02$), 21,1% ($t=4,34$; $p=0,01$), 32,3% ($t=7,57$; $p=0,002$), 36,8% ($t=7,85$; $p=0,001$) при концентрациях БСО 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ соответственно (Таблица 13).

Таблица 13 – Изменение количества глутатионпероксидазы (нг/мг белка) в лизате клеток линии Сасо-2 при моделировании эндогенного окислительного стресса под действием DL-бутионинсульфоксимиона в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3, 24, 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация БСО, мкМ	Глутатионпероксидаза		
	3 часа эксперимента	24 часа эксперимента	72 часа эксперимента
контроль	33,5±2,9	33,5±2,9	33,4±2,9
1	34,2±3,1	39,5±1,6**	30,2±1,4
5	32,3±2,4	45,3±1,6***	37,6±3,1#
10	31,9±3,1	51,1±3,2***	40,3±2,8***#
50	32,5±2,7	57,3±1,9***	38,8±3,8***#
100	32,7±2,1	55,1±1,1***	34,8±4,4#
500	29,7±3,6	30,1±0,4	28,2±1,3*#

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. # - статистически значимые отличия относительно группы 24 ч эксперимента. Результаты дисперсионного анализа для 3 ч эксперимента – $F=0,38$; $p=0,87$, для 24 ч эксперимента – $F=30,9$, $p \ll 0,0001$, для 72 ч эксперимента – $F=10,01$, $p=0,0002$

Моделирование эндогенного ОС сопровождалось следующими изменениями жизнеспособности клеток по результатам МТТ-теста. Жизнеспособность клеток в контроле была принята за 100%. При воздействии БСО во всех тестируемых концентрациях жизнеспособность клеток линии Сасо-2 не изменялась при сроке инкубации 3 ч (Рисунок 37).

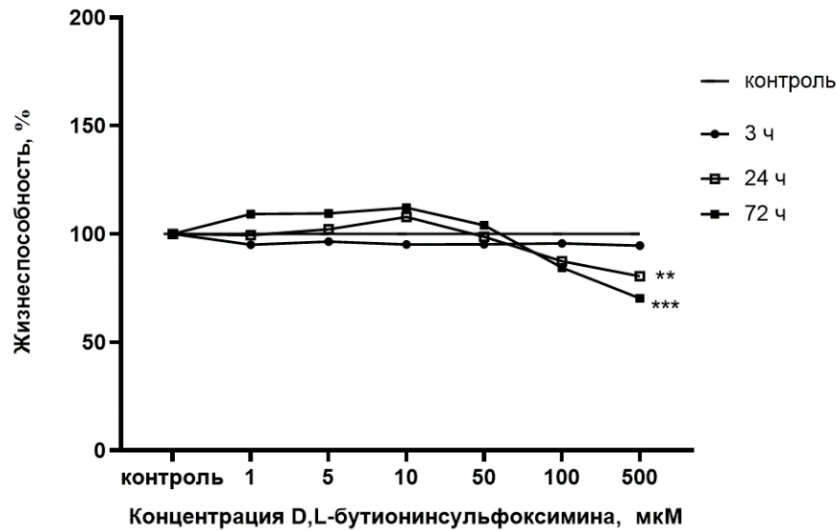


Рисунок 36 – Изменение жизнеспособности клеток линии Сасо-2 в зависимости от концентрации БСО при инкубации в течение 3, 24 и 72 ч

Примечание: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 3 ч эксперимента – $F=0,38$; $p=0,88$; для 24 ч эксперимента – $F=18,0$; $p < 0,0001$; для 72 ч эксперимента – $F=4,36$; $p=0,011$

При концентрациях БСО 1-100 мкМ и сроке инкубации 24 и 72 ч жизнеспособность клеток также не отличалась от значений контрольной группы, а при концентрации 500 мкМ снижалась на 23,9% ($p=0,003$) и 30,1% ($p=0,001$) соответственно (Рисунок 36), что сопровождалось нарушением целостности клеточного монослоя (Рисунок 37).

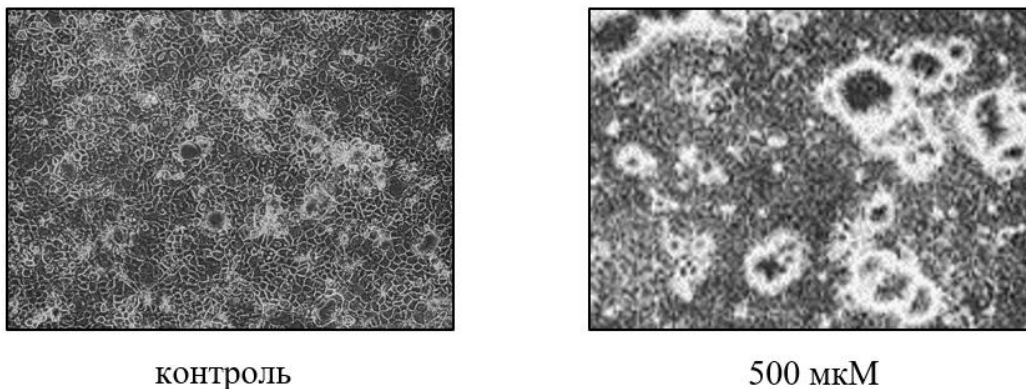


Рисунок 37 – Состояние клеточного монослоя в норме и при воздействии D,L-бутионинсульфоксимины в концентрации 500 мкМ в течение 72 ч

Примечание: визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного микроскопа Olympus СКХ-53 («Olympus», Япония), ув $\times 400$

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

3.3. Влияние экзогенного окислительного стресса на количество и активность Р-гликопротеина

Экзогенный ОС моделировали добавлением в питательную среду H_2O_2 в концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5; 10, 50 и 100 мкМ и инкубированием в течение 3, 24 и 72 ч.

Количество Pgp в контрольных клетках, оцененное с помощью иммуноферментного анализа, составило $118,1 \pm 10,6$ нг/мг белка.

При анализе изменений количества Pgp в условиях моделирования экзогенного окислительного стресса были получены следующие результаты.

Количество Pgp статистически значимо не изменялось при воздействии H_2O_2 в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 3 ч, однако при максимальной концентрации пероксида водорода 100 мкМ статистически значимо снижалось на 55,3% ($p=0,003$) по сравнению с контролем (Рисунок 38).

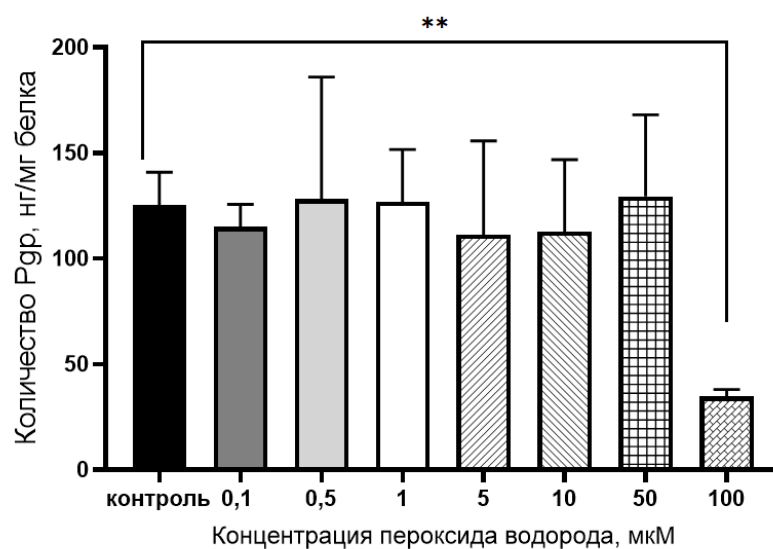


Рисунок 38 – Изменение количества Pgp в лизате клеток линии Caco-2 при индукции экзогенного окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: ** – $p < 0,01$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа $F=2,65$; $p=0,05$

При инкубации клеток Caco-2 с пероксидом водорода в течение 24 ч при концентрациях 0,1 мкМ; 0,5 мкМ и 1 мкМ происходило увеличение количества Pgp на 78,9% ($p=0,01$), 67,1% ($p=0,02$) и 44,6% ($p=0,04$) соответственно относительно контроля. При концентрациях H_2O_2 5, 10 и 50 мкМ уровень белка-транспортера достоверно не изменялся ($p > 0,05$), а в максимальной концентрации - 100 мкМ количество Pgp статистически значимо снижалось на 65,1% ($p=0,02$) (Рисунок 39).

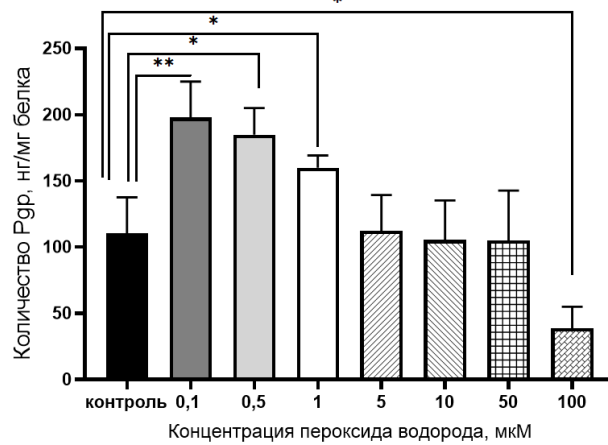


Рисунок 39 – Изменение количества Pgr в лизате клеток линии Caco-2 при индукции экзогенного окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–100 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p \leq 0,01$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа – $F=12,1$; $p < 0,0001$

При инкубации с прооксидантом в течение 72 ч установлено, что уровень Pgr статистически значимо не изменялся при воздействии H_2O_2 в концентрациях 0,1-5 мкМ, в концентрации 10 мкМ – повышался на 68,9% ($p=0,01$), а при 50 и 100 мкМ статистически значимо снижался на 68,9% ($p=0,01$) и 65,8% ($p=0,01$) соответственно, относительно значений контрольной группы (Рисунок 40).

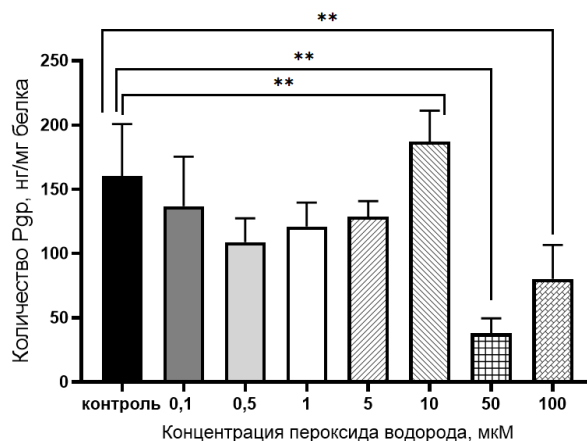


Рисунок 40 – Изменение количества Pgr в лизате клеток линии Caco-2 при индукции экзогенного окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–100 мкМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: ** – $p \leq 0,01$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 72 ч эксперимента – $F=9,56$; $p=0,0001$

Активность Pgp оценивали по транспорту его субстрата фексофенадина через монослой клеток линии Caco-2.

Перед выполнением транспортных экспериментов анализировали плотность межклеточных контактов до добавления H_2O_2 и после окончания экспозиции по величине трансэпителиального сопротивления монослоя клеток. Воздействие H_2O_2 в течение 3 ч в концентрациях 0,1–50 мкМ статистически значимо не влияло на величину трансэпителиального сопротивления ($p>0,05$).

Однако, в концентрации 100 мкМ прооксидант вызывал статистически значимое снижение трансэпителиального сопротивления в клетках Caco-2 после эксперимента на 39,1% ($t=15,77$; $p=0,006$) относительно значений, установленных в клетках до начала эксперимента (Таблица 14).

Таблица 14 – Значения трансэпителиального сопротивления (TEER, $mOm \times cm^2$) монослоя клеток линии Caco-2 до и после воздействия пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация H_2O_2 , мкМ	TEER до воздействия H_2O_2	TEER после воздействия H_2O_2
Контроль	744,33±51,47	761,00±104,99
0,1	713,67±64,08	753,00±26,76
0,5	788,75±55,43	703,50±79,58
1	783,80±52,09	819,80±97,68
5	604,00±46,75	619,00±59,43
10	657,80±40,77	819,80±92,09
50	641,00±76,88	751,33±86,03
100	468,33±75,48	285,00±47,22**

Примечание: ** – $p<0,01$ статистически значимые отличия от показателей до эксперимента

При инкубации в течение 24 ч H_2O_2 в концентрациях 0,1–1 мкМ достоверно не влиял на величину трансэпителиального сопротивления клеток ($p>0,05$).

В концентрациях 5, 10, 50 и 100 мкМ пероксид водорода вызывал снижение данного показателя на 15,2% ($t=5,77$; $p=0,0022$), 17,2% ($t=7,21$; $p=0,0008$), 17,4% ($t=2,8$; $p=0,0379$) и 59,8% ($t=11,62$; $p=0,000083$), относительно исходного уровня зафиксированного до начала экспозиции (Таблица 15).

Таблица 15 – Значения трансэпителиального сопротивления (TEER, $\text{мОм}\times\text{см}^2$) монослоя клеток линии Сасо-2 до и после воздействия пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 24 ч ($M\pm SD$, $n=3$)

Концентрация H_2O_2 , мкМ	TEER до воздействия H_2O_2	TEER после воздействия H_2O_2
Контроль	761,00 \pm 104,99	791,00 \pm 76,09
0,1	768,25 \pm 29,65	802,50 \pm 81,39
0,5	716,83 \pm 54,26	703,50 \pm 79,58
1	797,00 \pm 59,06	819,80 \pm 97,68
5	667,33 \pm 88,66	566,00 \pm 96,95**
10	686,17 \pm 48,22	567,83 \pm 65,28***
50	537,50 \pm 16,05	444,17 \pm 75,39*
100	501,67 \pm 36,01	201,67 \pm 36,01****

Примечание: * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$; *** – $p<0,001$; **** – $p<0,0001$ – статистически значимые отличия от показателей до эксперимента

При воздействии в течение 72 ч H_2O_2 в концентрациях 0,1-1 мкМ статистически значимо не влиял на показатели трансэпителиального сопротивления клеток ($p>0,05$).

В данной серии H_2O_2 снижал трансэпителиального сопротивления относительно исходных значений до эксперимента в концентрации:

5 мкМ – на 18,1% ($t=11,17$; $p=0,00036$);

10 мкМ – на 13,6% ($t=3,92$; $p=0,0035$);

50 мкМ - на 57,8% ($t=8,26$; $p=0,00042$);

100 мкМ – на 57,6% ($t=13,46$; $p=0,00004$) (Таблица 16).

Таблица 16 – Значения трансэпителиального сопротивления (TEER, $\text{mOm} \times \text{cm}^2$) монослоя клеток линии Сасо-2 до и после воздействия пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация H_2O_2 , мкМ	TEER до воздействия H_2O_2	TEER после воздействия H_2O_2
Контроль	756,33±54,14	708,00±110,10
0,1	716,00±56,71	640,00±31,02
0,5	752,20±51,03	680,00±60,33
1	724,20±56,24	829,17±160,08
5	795,00±18,71	651,00±21,91***
10	698,00±59,4	603,30±40,97**
50	481,67±58,79	203,00±32,95***
100	436,67±27,33	185,00±25,10****

Примечание: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$ статистически значимые отличия от показателей до эксперимента

При изучении активности P_{gr} были получены следующие результаты. Коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} \text{ } b-a$ фексофенадина, характеризующий его транспорт из базолатеральной камеры в апикальную за счет пассивной диффузии и работы P_{gr} , в среднем составил $3,08 \times 10^{-6} \pm 0,94 \times 10^{-6}$ см/с, а коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} \text{ } a-b$, оценивающий транспорт субстрата из апикальной камеры в базолатеральную за счет пассивной диффузии против работы P_{gr} , равнялся $1,13 \times 10^{-6} \pm 0,6 \times 10^{-6}$ см/с.

Представленные данные показывают, что транспорт, обусловленный P_{gr} , почти в 3 раза интенсивнее транспорта, происходящего за счет пассивной диффузии против функционирования белка-транспортера ($p=0,004$) (Таблица 17).

При концентрациях H_2O_2 0,1–5 мкМ и сроке воздействия 3 ч коэффициенты кажущейся проницаемости $P_{app} \text{ } b-a$ фексофенадина и $P_{app} \text{ } a-b$ достоверно не отличались от показателей контроля ($p > 0,05$).

В концентрации 10 мкМ пероксид водорода вызывал снижение коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ на 56,3% ($p=0,0004$) и повышение коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} a-b$ на 50,4% ($p=0,01$). Аналогичным образом при концентрации 50 мкМ пероксид водорода вызывал снижение коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ на 18,4% ($p=0,01$) и повышение коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} a-b$ на 155,6% ($p=0,01$) (Таблица 17).

Стоит отметить, что при концентрациях прооксиданта 10 и 50 мкМ значения коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ и $P_{app} a-b$ фексофенадина выравнивались и достоверно между собой не различались.

Полученные результаты свидетельствуют о снижении активности P_{gr} при воздействии H_2O_2 в указанных концентрациях.

При увеличении концентрации прооксиданта до 100 мкМ происходило повышение коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ на 59,2% ($p=0,03$) и коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} a-b$ – на 340,2% ($p=0,02$) (Таблица 17). Данные показатели между собой также не различались.

Выявленные изменения свидетельствуют об усилении транспорта фексофенадина через монослой клеток линии Caco-2 как в эффлюксном направлении функционирования P_{gr} , так и в противоположном, то есть проницаемость клеточного монослоя повышается, что согласуется с полученными данными плотности клеточных контактов (Таблица 17).

Отношение коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app} b-a / P_{app} a-b$ при воздействии H_2O_2 в концентрациях 0,1-5 мкМ не изменялось.

При концентрациях прооксиданта 10, 50 и 100 мкМ отношение $P_{app} b-a / P_{app} a-b$ статистически значимо снижалось относительно контроля.

Так при концентрации H_2O_2 10 мкМ снижение $P_{app} b-a / P_{app} a-b$ было на 71,2% ($p<0,0001$), 50 мкМ – 68,7% ($p=0,0001$) и 100 мкМ – 59,9% ($p=0,0004$) соответственно.

Таблица 17 – Влияние пероксида водорода в диапазоне концентраций 0,1–100 мкМ в течение 3 ч на транспорт субстрата Pgr (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток Caco-2 ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация H_2O_2 , мкМ	$P_{app} b-a, \times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} a-b, \times 10^{-6}$ см/с
Контроль	$3,09 \pm 0,13$	$1,17 \pm 0,15$
0,1	$3,08 \pm 0,11$	$0,94 \pm 0,16$
0,5	$2,90 \pm 0,59$	$1,17 \pm 0,03$
1	$2,79 \pm 0,42$	$1,16 \pm 0,09$
5	$2,52 \pm 0,43$	$1,26 \pm 0,06$
10	$1,35 \pm 0,13^{***}$	$1,76 \pm 0,18^{**}$
50	$2,52 \pm 0,16^{**}$	$2,99 \pm 0,65^{**}$
100	$4,92 \pm 0,96^*$	$5,15 \pm 1,81^*$

Примечание: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для $P_{app} b-a$ – $F=3,8$; $p=0,02$; для $P_{app} a-b$ – $F=5,6$; $p=0,015$

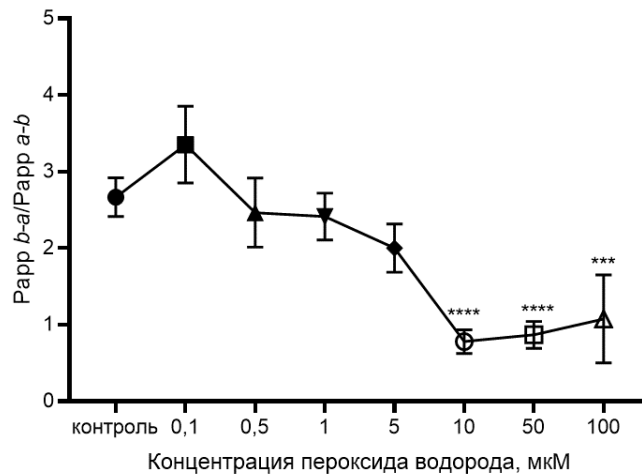


Рисунок 41 – Изменение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app} b-a / P_{app} a-b$ в клетках линии Caco-2 под действием пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: *** – $p \leq 0,001$; **** – $p \leq 0,0001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа – $F=19,6$; $p < 0,0001$

При воздействии пероксида водорода на клетки линии Caco-2 в течение 24 ч были получены следующие результаты.

Пероксид водорода в концентрациях 0,1–5 мкМ достоверно не влиял на коэффициенты кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ и $P_{app} a-b$ фексофенадина, их значения достоверно не отличались от показателей контроля.

В концентрации 10 мкМ пероксид водорода повышал коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} a-b$ фексофенадина на 145,6% ($p=0,04$) по сравнению со значениями контроля и не влиял на коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$.

Полученные результаты свидетельствуют о снижении активности P_{gr} и повышении проницаемости клеточного монослоя.

Увеличение концентрации H_2O_2 до 50 и 100 мкМ вызывало как повышение коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ на 68,6% ($p=0,006$) и 155,2% ($p=0,0003$), так и повышение коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} a-b$ на 435,9% ($p=0,0003$) и 768,9% ($p=0,0005$), соответственно (Таблица 18).

Отношение коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app} b-a / P_{app} a-b$ при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-5 мкМ не изменялось. При концентрациях прооксиданта 10, 50 и 100 мкМ отношение $P_{app} b-a / P_{app} a-b$ статистически значимо снижалось по сравнению с контролем: на 53,1% ($p=0,002$), 71,9% ($p=0,0001$) и 73,7% ($p=0,0001$) соответственно (Рисунок 42).

Нарушение ассиметрии транспорта маркерного субстрата P_{gr} – фексофенадина и снижение отношения $P_{app} b-a / a-b$ по сравнению с контролем в данной серии экспериментов является следствием увеличения проницаемости клеточного монослоя в обоих направлениях и согласуется с показателями плотности межклеточных контактов.

Влияние пероксида водорода в диапазоне концентраций 0,1-100 мкМ в течение 24 ч на транспорт субстрата P_{gr} (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток Caco-2 представлено в Таблице 18.

Таблица 18 – Влияние пероксида водорода в диапазоне концентраций 0,1-100 мкМ в течение 24 ч на транспорт субстрата Pgp (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток Сасо-2 ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация H_2O_2 , мкМ	$P_{app} b-a, \times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} a-b, \times 10^{-6}$ см/с
Контроль	$3,06 \pm 0,35$	$1,03 \pm 0,34$
0,1	$2,96 \pm 0,25$	$0,95 \pm 0,11$
0,5	$3,65 \pm 0,76$	$1,18 \pm 0,08$
1	$3,59 \pm 0,61$	$1,36 \pm 0,43$
5	$2,85 \pm 0,76$	$1,19 \pm 0,05$
10	$3,82 \pm 0,65$	$2,53 \pm 0,39^*$
50	$5,16 \pm 0,47^{**}$	$5,52 \pm 0,38^{***}$
100	$7,81 \pm 0,18^{***}$	$8,95 \pm 1,05^{***}$

Примечание: ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для $P_{app} b-a$ – $F=4,3$; $p=0,02$; для $P_{app} a-b$ – $F=6,9$; $p=0,01$

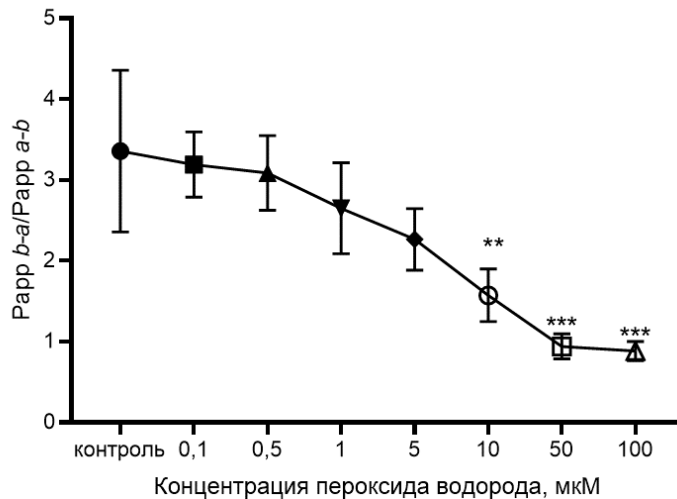


Рисунок 42 – Изменение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $P_{app} b-a / P_{app} a-b$ в клетках линии Сасо-2 под действием пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа $F=12,1$; $p < 0,0001$

При экспозиции в течение 72 ч пероксид водорода в концентрациях 0,1-5 мкМ достоверно не влиял на транспорт субстрата Pgr – фексофенадина из базолатеральной в апикальную камеру и в обратном направлении (Таблица 19), сохранялась исходная асимметрия транспорта маркерного субстрата. В концентрации 10 мкМ H₂O₂ вызывал повышение коэффициента кажущейся проницаемости Papp *b-a* фексофенадина по сравнению с контролем на 98,1% (p=0,056) и не влиял на коэффициент кажущейся проницаемости Papp *a-b* (Таблица 19). При увеличении концентрации H₂O₂ до 50 и 100 мкМ происходило повышение коэффициента кажущейся проницаемости Papp *b-a* фексофенадина на 260,7% (p=0,001) и 269,8% (p=0,001) и увеличение коэффициента кажущейся проницаемости Papp *a-b* на 1029,2% (p=0,001) и 1421,2% (p=0,001) соответственно по сравнению с контролем. Коэффициент кажущейся проницаемости Papp *b-a* выравнивался с коэффициентом кажущейся проницаемости Papp *a-b* (Таблица 19).

Таблица 19 – Влияние пероксида водорода в диапазоне концентраций 0,1–100 мкМ в течение 72 ч на транспорт субстрата Pgr (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток Caco-2 (M±SD, n=3)

Концентрация H ₂ O ₂ , мкМ	Papp <i>b-a</i> , ×10 ⁻⁶ см/с	Papp <i>a-b</i> , ×10 ⁻⁶ см/с
Контроль	3,08±0,94	1,13±0,6
0,1	3,02±0,85	1,23±0,59
0,5	3,19±0,53	1,32±0,26
1	3,73±1,29	1,79±0,14
5	3,37±0,41	1,18±0,45
10	6,10±0,82*	2,64±1,44
50	11,11±2,96***	12,76±3,39***
100	11,39±3,09***	17,19±3,74***

Примечание: * – p≤0,05; *** - p≤0,001 – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для Papp *b-a* – F=14,2; p<0,0001; для Papp *a-b* – F=33,6; p<0,0001

При воздействии H_2O_2 в концентрациях 0,1-10 мкМ (72 ч) отношение $\text{Papp } b-a$ к $\text{Papp } a-b$ не изменялось. При увеличении концентрации H_2O_2 до 50 и 100 мкМ отношение $\text{Papp } b-a$ к $\text{Papp } a-b$ снижалось на 71,0% ($p=0,039$) и 78,4% ($p=0,026$) соответственно (Рисунок 43).

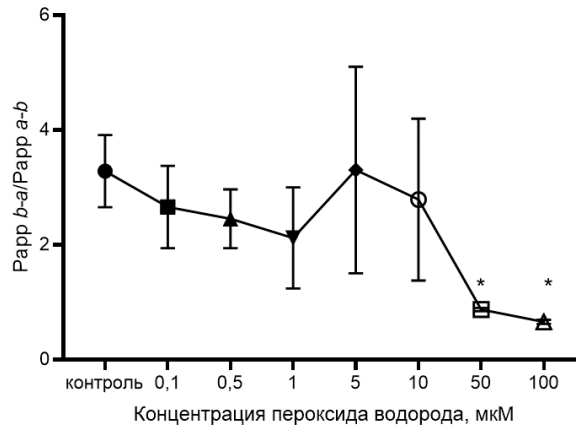


Рисунок 43 – Изменение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $\text{Papp } b-a / \text{Papp } a-b$ в клетках линии Сасо-2 под действием пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: * – $p < 0,05$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа – $F=3,41$; $p=0,02$

Таким образом, при воздействии H_2O_2 в течение 3 ч в концентрациях выше 10 мкМ происходит снижение активности Pgp, а в концентрации 100 мкМ также повышение проницаемости клеточного монослоя в обоих направлениях для субстрата Pgp – фексофенадина, что сопровождается снижением количества белка-транспортера. Увеличение длительности экспозиции до 24 ч не только снижает активность Pgp, но и повышает проницаемость клеточного монослоя для субстрата Pgp уже в концентрации прооксиданта 10 мкМ. Количество Pgp в этих условиях возрастает при концентрациях прооксиданта 0,1-1 мкМ и снижается при 100 мкМ. Воздействие H_2O_2 в концентрации 10 мкМ в течение 72 ч повышает активность Pgp клеток линии Сасо-2 и сопровождается увеличением количества белка-транспортера. При более высокой концентрации H_2O_2 и сроке инкубации 72 ч происходит повреждение как клеточной мембраны, так и Pgp, что подтверждается снижением его количества в лизате клеток и существенным повышением проницаемости клеточной мембраны в обоих направлениях.

3.4. Оценка принадлежности бутионинсульфоксимины к модуляторам активности Р-гликопротеина

Исследование прямого влияния БСО на активность Рgp выполняли в трансвеллах. После культивирования клеток более 21 сут и достижения трансэпителиального сопротивления более $500 \text{ мОм} \times \text{см}^2$ лунки использовали для выполнения транспортных экспериментов.

Культуральную среду заменяли на транспортную среду с добавлением БСО в концентрациях 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ и проводили преинкубацию в течение 30 мин. Данного времени достаточно для того чтобы ингибитор соединился с центрами связывания Рgp и вызвал изменение его активности, но недостаточно для изменения количества белка-транспортера. Поэтому период преинкубации длительностью 30 мин используется для оценки прямой (за счет связывания с молекулой Рgp) ингибирующей активности веществ.

После окончания 30 мин преинкубации добавляли фексофенадин – субстрат Рgp в базолатеральную камеру в конечной концентрации 150 мкМ и оценивали его проникновение в апикальную камеру (*b-a* транспорт фексофенадина, обусловленный пассивной диффузией и эффлюксной активностью белка транспортера).

В других трансвеллах аналогичным образом оценивали *a-b* транспорт фексофенадина, обусловленный пассивной диффузией против работы Рgp. Затем рассчитывали отношение коэффициентов кажущейся проницаемости: $\text{Papp } b-a / \text{Papp } a-b$.

Если вещество является ингибитором Рgp, то оно снижает *b-a* транспорт фексофенадина и отношение $\text{Papp } b-a / \text{Papp } a-b$, и, наоборот, увеличивает *a-b* транспорт субстрата белка-транспортера.

В ходе исследования были получены следующие результаты.

БСО в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ достоверно не влиял на изучаемые параметры транспорта фексофенадина через монослой клеток линии Сасо-2, что свидетельствует об отсутствии влияния ингибитора синтеза глутатиона на

активность Pgp в указанном диапазоне концентраций.

В то же время БСО в концентрациях 50, 100 и 500 мкМ снижал коэффициент кажущейся проницаемости $b-a$ (Papp $b-a$) для фексофенадина на 35,1% ($p=0,049$), 46,0% ($p=0,042$) и 47,7% ($p=0,040$) и отношения коэффициентов кажущейся проницаемости Papp $b-a$ / Papp $a-b$ на 47,2% ($p=0,046$), 65,5% ($p=0,041$) и 66,9% ($p=0,040$) соответственно (Таблица 20).

Коэффициент кажущейся проницаемости $a-b$ при этом достоверно не изменялся. В совокупности данные результаты свидетельствуют о снижении активности белка-транспортера в диапазоне концентраций БСО от 50 до 500 мкМ (Таблица 20).

Таблица 20 – Влияние DL-бутионинсульфоксимиона (БСО) в диапазоне концентраций 1-500 мкМ после 30 мин преинкубации на транспорт субстрата Р-гликопротеина (Pgp) фексофенадина через билипидную мембрану клеток Caco-2 ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация БСО, мкМ	Papp $b-a$, $\times 10^{-6}$ см/с	Papp $a-b$, $\times 10^{-6}$ см/с	Papp $b-a$ / Papp $a-b$
контроль	3,02 \pm 0,12	1,11 \pm 0,37	2,90 \pm 0,89
1	3,52 \pm 1,01	1,27 \pm 0,19	2,82 \pm 1,35
5	3,10 \pm 0,71	1,39 \pm 0,18	2,15 \pm 0,51
10	2,95 \pm 0,21	1,42 \pm 0,22	2,12 \pm 0,47
50	1,96 \pm 0,25*	1,31 \pm 0,32	1,53 \pm 0,27*
100	1,63 \pm 0,29*	1,66 \pm 0,25	1,00 \pm 0,26*
500	1,58 \pm 0,28*	1,67 \pm 0,17	0,96 \pm 0,23*

Примечание: * $p < 0,05$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для Papp $b-a$ – $F=6,37$; $p=0,002$, для Papp $a-b$ – $F=1,96$; $p=0,14$, для Papp $b-a$ / Papp $a-b$ – $F=4,03$; $p=0,015$

В качестве препаратов сравнения использовали классические ингибиторы Pgp – хинидин и верапамил в эквивалентных концентрациях.

В ходе исследования было показано, что хинидин в концентрациях 5-

500 мкМ снижал коэффициент кажущейся проницаемости *b-a* фексофенадина максимально на 79,1% ($p=0,0002$) в концентрации 500 мкМ.

Коэффициент кажущейся проницаемости *a-b* достоверно не отличался от уровня контроля во всем диапазоне изученных концентраций. Снижение отношения $\text{Papp } b-a / \text{Papp } a-b$ отмечено при концентрациях хинидина 1–500 мкМ максимально на 84,4% ($p=0,0002$) при наибольшей концентрации хинидина 500 мкМ (Таблица 21).

Таблица 21 – Влияние хинидина в диапазоне концентраций 1-500 мкМ после 30 мин преинкубации на транспорт субстрата Р-гликопротеина (Pgp) фексофенадина через билипидную мембрану клеток Caco-2 ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация хинидина, мкМ	$\text{Papp } b-a, \times 10^{-6}$ см/с	$\text{Papp } a-b, \times 10^{-6}$ см/с	$\text{Papp } b-a / \text{Papp } a-b$
Контроль	3,02±0,12	1,11±0,37	2,90±0,89
1	2,92±0,36	1,54±0,21	1,90±0,05*
5	2,04±0,09**	1,29±0,02	1,59±0,05**
10	0,94±0,08***	1,15±0,12	0,83±0,09***
50	0,69±0,16***	1,33±0,42	0,54±0,05***
100	0,65±0,09***	1,31±0,37	0,51±0,08***
500	0,63±0,14***	1,54±0,79	0,45±0,11***

Примечание: ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для $\text{Papp } b-a$ – $F=4,04$; $p=0,033$, для $\text{Papp } a-b$ – $F=1,01$; $p=0,44$, для $\text{Papp } b-a / \text{Papp } a-b$ – $F=15,2$; $p=0,0003$

Следует отметить, что хинидин ингибировал активность Pgp в более низких концентрациях по сравнению с БСО: IC50, рассчитанная по коэффициенту кажущейся проницаемости *b-a* фексофенадина для хинидина составила $5,16 \pm 0,59$ мкмоль/л, для БСО – $17,21 \pm 2,46$ мкМ ($p=0,001$) (Рисунок 44).

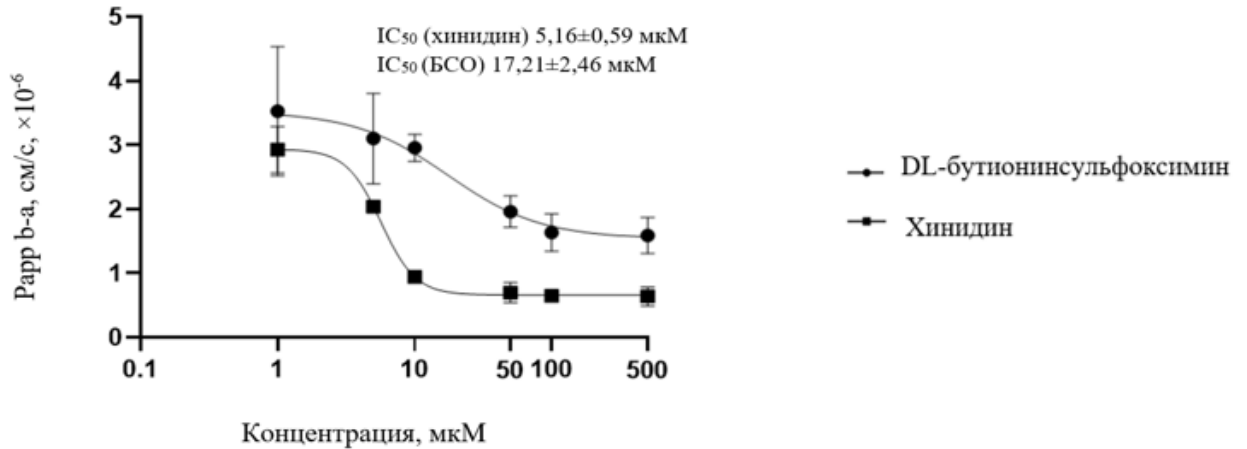


Рисунок 44 – Изменение коэффициента кажущейся проницаемости *b-a* ($P_{app} b-a$) фексофенадина под действием DL-бутионинсульфоксими́на (БСО) и хинидина в концентрациях 1–500 мкМ; IC_{50} – концентрация полумаксимального ингибирования

В ходе исследования было показано, что верапамил в концентрациях 10–500 мкМ снижал коэффициент кажущейся проницаемости *b-a* фексофенадина максимально на 68,2% ($p < 0,0001$) в концентрации 500 мкМ.

Коэффициент кажущейся проницаемости *a-b* достоверно не отличался от уровня контроля при использовании всех тестируемых концентраций. Снижение отношения $P_{app} b-a / P_{app} a-b$ отмечено при концентрациях верапамила 10–500 мкМ максимально на 68,9% ($p < 0,0001$) при наибольшей концентрации верапамила 500 мкМ (Таблица 22).

Полученные результаты демонстрируют, что верапамил ингибировал активность P_{gr} в концентрациях близких к БСО: IC_{50} , рассчитанная по коэффициенту кажущейся проницаемости *b-a* фексофенадина для верапамила составила $9,6 \pm 3,98$ мкМ, для БСО — $17,21 \pm 2,46$ мкМ ($p = 0,056$) (Рисунок 45).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что БСО является прямым ингибитором активности P_{gr} с IC_{50} , рассчитанной по коэффициенту кажущейся проницаемости *b-a* фексофенадина $17,21 \pm 2,46$ мкМ.

Таблица 22 – Влияние верапамила в диапазоне концентраций 1-500 мкМ после 30 мин преинкубации на транспорт субстрата Р-гликопротеина (Pgp) фексофенадина через билипидную мембрану клеток Сасо-2 ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация верапамила, мкМ	$P_{app} b-a, \times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} a-b, \times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} b-a / P_{app} a-b$
Контроль	$3,02 \pm 0,12$	$1,11 \pm 0,37$	$2,90 \pm 0,89$
1	$3,55 \pm 0,91$	$1,29 \pm 1,06$	$2,73 \pm 0,08$
5	$3,54 \pm 0,39$	$1,29 \pm 1,06$	$2,00 \pm 0,32$
10	$2,38 \pm 0,22^*$	$1,22 \pm 0,28$	$2,00 \pm 0,32^*$
50	$1,41 \pm 0,19^{**}$	$1,03 \pm 0,12$	$1,37 \pm 0,04^{**}$
100	$1,19 \pm 0,13^{***}$	$1,26 \pm 0,10$	$0,95 \pm 0,08^{***}$
500	$0,96 \pm 0,40^{****}$	$1,06 \pm 0,19$	$0,90 \pm 0,04^{***}$

Примечание: * – $p \leq 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$; **** – $p < 0,0001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для $P_{app} b-a$ – $F=25,1$; $p < 0,0001$, для $P_{app} a-b$ – $F=0,65$; $p=0,68$, для $P_{app} b-a / P_{app} a-b$ – $F=16,5$; $p=0,0001$

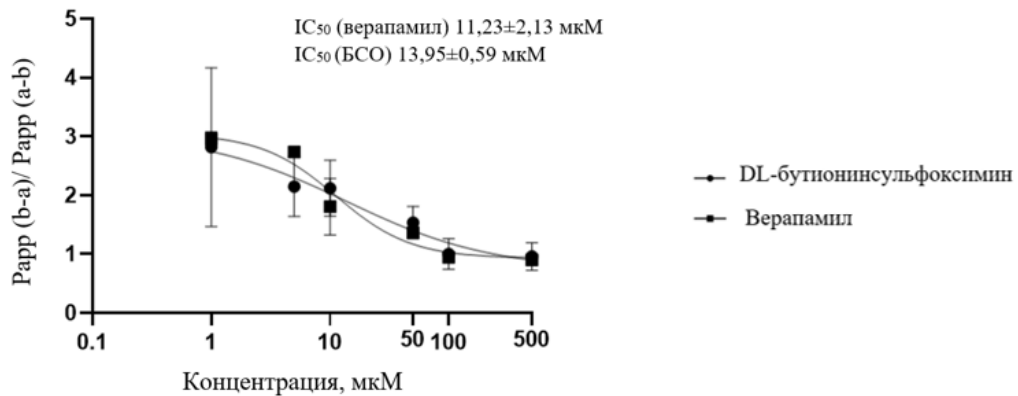


Рисунок 45 – Изменение коэффициента кажущейся проницаемости $b-a$ ($P_{app} b-a$) фексофенадина под действием DL-бутионинсульфоксимины (БСО) и верапамила в концентрациях 1–500 мкМ; ИС₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования

3.5. Влияние эндогенного окислительного стресса на количество и активность Р-гликопротеина

Эндогенный ОС воспроизводили с помощью ингибитора синтеза глутатиона – DL-бутионинсульфоксимины (БСО, ингибитор γ -глутамилцистеинсинтетазы) в конечных концентрациях в питательной среде 1, 5, 10, 50, 100 и 500 мкМ. Количество Рgr в контрольных клетках, оцененное с помощью иммуноферментного анализа, составило $118,1 \pm 10,6$ нг/мг белка. При воздействии БСО в течение 3 ч в концентрациях 1-500 мкМ количество Рgr в клетках Сасо-2 статистически значимо не изменялось (Рисунок 46).

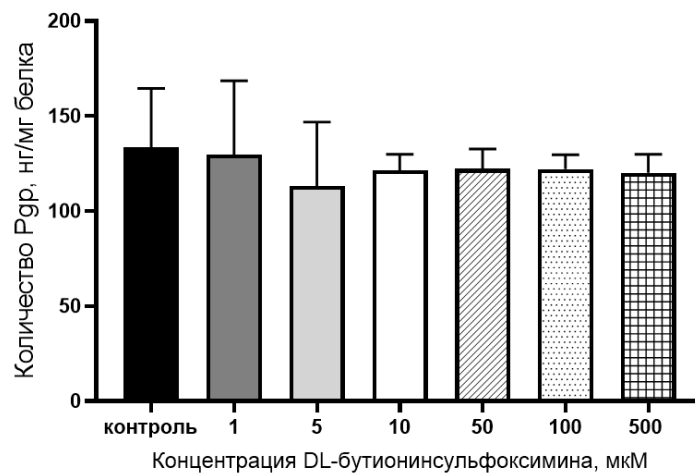


Рисунок 46 – Изменение количества Рgr в лизате клеток линии Сасо-2 при индукции эндогенного окислительного стресса DL-бутионинсульфоксимином в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: результаты дисперсионного анализа для 3 ч эксперимента – $F=0,23$; $p=0,95$

При увеличении длительности экспозиции до 24 ч БСО в концентрациях 10; 50 и 100 мкМ увеличивал количество Рgr в клетках Сасо-2 на 71,6% ($p=0,002$); 51,6% ($p=0,007$) и 25,4% ($p=0,05$) соответственно, при концентрациях 1; 5 и 500 мкМ - достоверного эффекта не оказал (Рисунок 47). При воздействии БСО в течение 72 ч в концентрациях 1-100 мкМ количество Рgr в клетках не изменялось, а в концентрации 500 мкМ снижалось на 35,6% ($p=0,002$) (Рисунок 48).

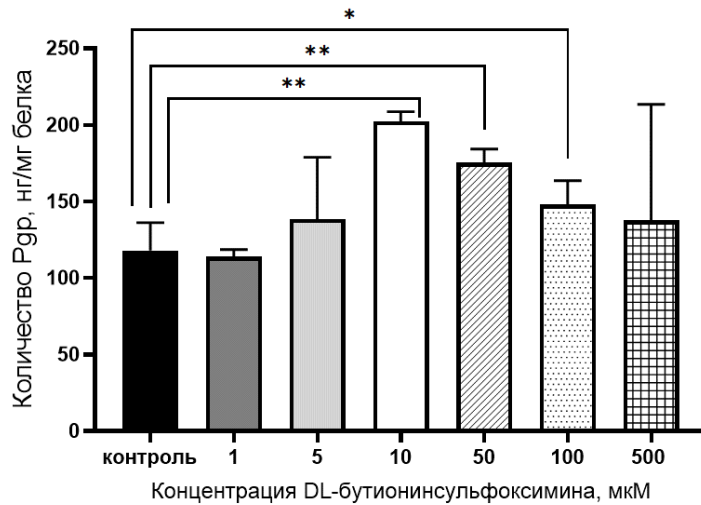


Рисунок 47 – Изменение количества Pgr в лизате клеток линии Caco-2 при индукции эндогенного окислительного стресса DL-бутионинсульфоксимином в концентрациях 1–500 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 24 ч эксперимента – $F=2,8$; $p=0,051$

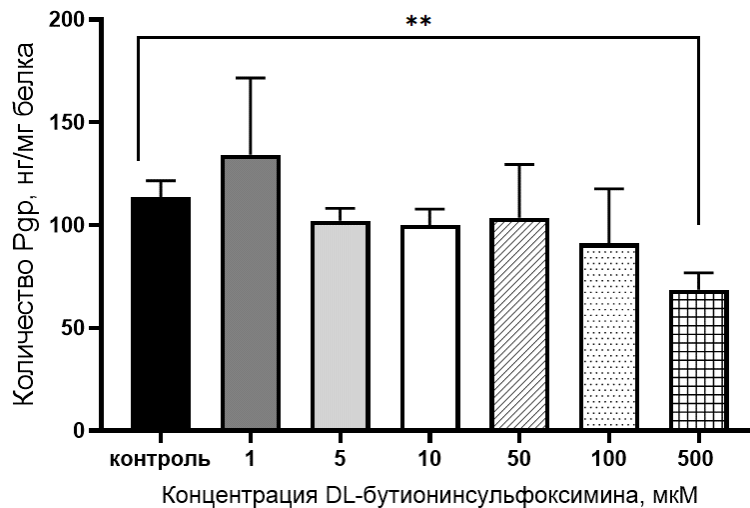


Рисунок 48 – Изменение количества Pgr в лизате клеток линии Caco-2 при индукции эндогенного окислительного стресса DL-бутионинсульфоксимином в концентрациях 1-500 мкМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечание: ** – $p < 0,01$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 72 ч эксперимента – $F=2,85$; $p=0,05$

Активность Pgp оценивали по транспорту его субстрата фексофенадина через монослой клеток линии Caco-2. Перед выполнением транспортных экспериментов анализировали плотность межклеточных контактов до добавления БСО и после окончания экспозиции по величине TEER монослоя клеток. Воздействие БСО в течение 3 ч в концентрациях 1–100 мкМ не влияло на величину TEER ($p>0,05$). Однако, при концентрации 500 мкМ TEER клеточного монослоя снижалось на 18,38% ($t=4,18$; $p=0,03$) (Таблица 23).

Таблица 23 – Значения трансэпителиального сопротивления (TEER, мОм×см²) монослоя клеток линии Caco-2 до и после воздействия DL-бутионинсульфоксимины (БСО) в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3 ч ($M\pm SD$, $n=3$)

Концентрация БСО, мкМ	TEER до воздействия БСО	TEER после воздействия БСО
Контроль	905,83±81,02	865,33±108,1
1	846,67±78,40	806,50±78,03
5	811,67±84,95	825,67±72,32
10	800,67±59,01	768,50±57,53
50	826,67±177,39	782,33±126,41
100	846,67±103,28	814,67±100,42
500	846,34±28,34	706,23±21,22*

Примечание: * – $p<0,05$ статистически значимые отличия от показателей контроля

При инкубации в течение 24 часов БСО в концентрациях 1–50 мкМ достоверно не влиял на величину TEER клеток ($p>0,05$). В концентрациях 100 и 500 мкМ БСО вызывал снижение данного показателя на 28,41% ($t=3,78$; $p=0,044$) и на 47,51% ($t=11,49$; $p=0,0005$) относительно уровня, до начала экспозиции (Таблица 24). При инкубации в течение 72 ч в концентрациях 1–50 мкМ БСО статистически значимо не влиял на величину TEER ($p>0,05$). Однако, при увеличении концентраций с 1-50 до 100 и 500 мкМ TEER снижалось на 22,7% ($t=8,15$; $p=0,0009$) и 58,21% ($t=12,33$; $p=0,00001$) соответственно (Таблица 25).

Таблица 24 – Значения трансэпителиального сопротивления (TEER, мОм×см²) монослоя клеток линии Сасо-2 до и после воздействия DL-бутионинсульфоксимины (БСО) в концентрациях 1-500 мкМ в течение 24 ч (M±SD, n=3)

Концентрация БСО, мкМ	TEER до воздействия БСО	TEER после воздействия БСО
Контроль	955,83 ± 134,4	898,67 ± 158,51
1	841,67 ± 151,45	750 ± 136,24
5	807,32 ± 117,21	743,00 ± 171,91
10	855,23 ± 51,67	711,67 ± 157,15
50	955,15 ± 149,37	806 ± 127,35
100	780,34 ± 150,68	643,33 ± 202,45*
500	935,23 ± 107,24	471,67 ± 105,34***

Примечание: * – p<0,05; *** – p<0,001 статистически значимые отличия от показателей контроля

Таблица 25 – Значения трансэпителиального сопротивления (TEER, мОм×см²) монослоя клеток линии Сасо-2 до и после воздействия DL-бутионинсульфоксимины (БСО) в концентрациях 1-500 мкМ в течение 72 ч (M±SD, n=3)

Концентрация БСО, мкМ	TEER до воздействия БСО	TEER после воздействия БСО
Контроль	955,83±134,4	898,67±158,51
1	844,17±171,07	750,31±136,24
5	702,67±205,1	807,33±117,25
10	753,33±249,13	661,67±206,73
50	955,83±134,40	898,67±158,51
100	753,31±133,20	582,0±76,04*
500	826,38±121,43	345,32±72,41***

Примечание: * – p<0,05; *** – p<0,001 статистически значимые отличия от показателей контроля

При изучении активности Pgp были получены следующие результаты. В контроле коэффициент кажущейся проницаемости $b-a$ фексофенадина, характеризующий его транспорт из базолатеральной камеры в апикальную за счет пассивной диффузии и работы Pgp, в среднем составил $2,94 \times 10^{-6} \pm 0,54 \times 10^{-6}$ см/с, а коэффициент кажущейся проницаемости $a-b$, оценивающий транспорт из апикальной камеры в базолатеральную за счет пассивной диффузии против работы Pgp, равнялся $0,93 \times 10^{-6} \pm 0,26 \times 10^{-6}$ см/с.

Из представленных данных видно, что транспорт обусловленный Pgp в 3,27 раз выше транспорта, происходящего за счет пассивной диффузии, против работы белка-транспортера ($p=0,013$) (Таблица 26).

Таблица 26 – Влияние DL-бутионинсульфоксимины (БСО) в диапазоне концентраций 1-500 мкМ в течение 3 ч на транспорт субстрата Pgp фексофенадина через билипидную мембрану клеток Caco-2 ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация БСО, мкМ	$P_{app} b-a, \times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} a-b, \times 10^{-6}$ см/с
Контроль	$3,02 \pm 0,12$	$1,11 \pm 0,37$
1	$3,18 \pm 1,43$	$1,44 \pm 0,42$
5	$3,08 \pm 0,54$	$1,34 \pm 0,77$
10	$2,72 \pm 0,41$	$1,41 \pm 0,38$
50	$1,88 \pm 0,45^{***}$	$1,33 \pm 0,33$
100	$1,59 \pm 0,28^{***}$	$1,47 \pm 0,29$
500	$1,29 \pm 0,16^{**}$	$1,31 \pm 0,19$

Примечание: ** – $p < 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для $P_{app} b-a$ – $F=5,11$; $p=0,005$ и для $P_{app} a-b$ – $F=0,11$; $p=0,99$

БСО в концентрациях 1, 5 и 10 мкМ и длительности экспозиции 3 ч достоверно не влиял на изучаемые параметры транспорта фексофенадина через монослой клеток линии Caco-2, что характеризует сохранение функциональной активности Pgp на исходном уровне. Воздействие БСО в концентрациях 50, 100 и

500 мкМ в течение 3 ч приводило к снижению коэффициента кажущейся проницаемости $b-a$ на 37,7% ($p=0,001$), 47,4% ($p=0,001$) и 57,3% ($p=0,005$) (Таблица 26) и отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $b-a / a-b$ на 48,9% ($p=0,048$), 62,4% ($p=0,03$) и 65,9% ($p=0,03$) соответственно (Рисунок 49). Коэффициент кажущейся проницаемости $a-b$ при этом достоверно не изменялся.

Полученные результаты свидетельствуют о снижении активности белка-транспортера.

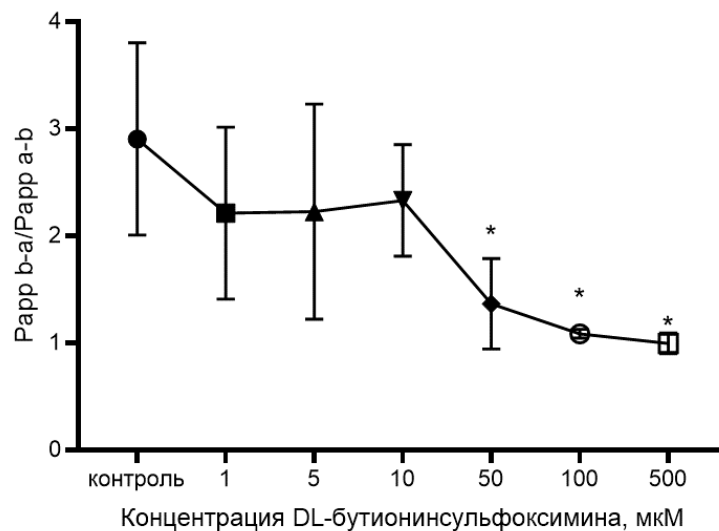


Рисунок 49 – Изменение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $b-a / a-b$ в клетках линии Caco-2 под действием DL-бутионинсульфоксими́на в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: * – $p < 0,05$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа $P_{app} b-a / P_{app} a-b$ – $F=19,6$; $p=0,013$

БСО в концентрациях 1 и 5 мкМ и сроке инкубации 24 ч достоверно не влиял на коэффициенты кажущейся проницаемости $b-a$ и $a-b$. БСО в концентрации 10 мкМ вызывал повышение коэффициента кажущейся проницаемости $b-a$ на 45,6% ($p=0,028$) (Таблица 27) и отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $b-a / a-b$ на 47,2% ($p=0,02$) по сравнению с контролем (Рисунок 50), что характеризует повышение активности Ргр.

В концентрации БСО 50 мкМ отмечалось снижение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $b-a / a-b$ на 44,8% ($p=0,01$) (Рисунок 50),

а в концентрации 100 мкМ уменьшение коэффициента кажущейся проницаемости $b-a$ на 45,9% ($p=0,029$) (Таблица 27) и отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $b-a / a-b$ на 62,2% ($p=0,002$) по сравнению с контролем (Рисунок 50), что свидетельствует о снижении активности изучаемого белка-транспортера.

Дальнейшее повышение концентрации БСО до 500 мкМ приводило к увеличению коэффициента кажущейся проницаемости $b-a$ и $a-b$ на 32,4% ($p=0,05$) и 264,5% ($p=0,0003$) соответственно по сравнению со значениями контроля. Отношение коэффициентов кажущейся проницаемости $b-a / a-b$ снижалось на 64,7% ($p=0,0002$), что свидетельствует не только о снижении активности Pgp, но и повреждении клеточного монослоя и увеличении транспорта фексофенадина – субстрата белка-транспортера через мембрану в обе стороны.

Таблица 27 – Влияние DL-бутионинсульфоксимины в диапазоне концентраций 1-500 мкМ в течение 24 ч на транспорт субстрата Pgp (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток Caco-2 ($M \pm SD$, $n = 3$)

Концентрация БСО, мкМ	$P_{app} b-a, \times 10^{-6} \text{ см/с}$	$P_{app} a-b, \times 10^{-6} \text{ см/с}$
Контроль	$2,81 \pm 0,77$	$0,76 \pm 0,17$
1	$2,83 \pm 0,47$	$0,72 \pm 0,16$
5	$2,76 \pm 0,06$	$0,71 \pm 0,11$
10	$4,09 \pm 0,13^*$	$0,76 \pm 0,03$
50	$2,24 \pm 0,64$	$1,09 \pm 0,27$
100	$1,52 \pm 0,52^*$	$1,09 \pm 0,35$
500	$3,72 \pm 0,11^*$	$2,77 \pm 0,25^{***}$

Примечание: * – $p \leq 0,05$; *** – $p < 0,001$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для $P_{app} b-a$ – $F=10,1$; $p=0,0002$, $P_{app} a-b$ – $F=42,5$; $p \ll 0,0001$

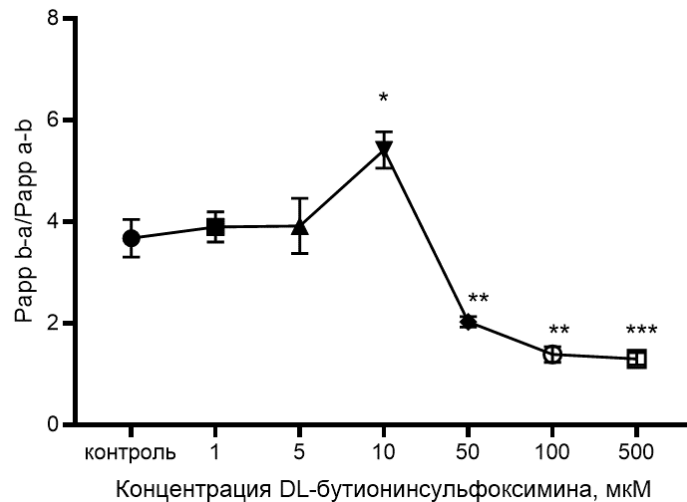


Рисунок 50 – Изменение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $b-a / a-b$ в клетках линии Caco-2 под действием DL-бутионинсульфоксими́на в концентрациях 1-500 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; *** – $p < 0,001$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа $P_{app} b-a / P_{app} a-b$ – $F=71,7$; $p \ll 0,0001$

В концентрациях 1-10 мкМ и длительности экспозиции 72 ч БСО достоверно не влиял на показатели транспорта фексофенадина - субстрата Pgp через монослой клеток линии Caco-2 ($p > 0,05$). Воздействие БСО в концентрациях 50 и 100 мкМ при инкубации в течение 72 ч приводило к снижению коэффициента кажущейся проницаемости $b-a$ на 61,7% ($p=0,001$) и 65,1% ($p=0,002$) (Таблица 28) и отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $b-a / a-b$ на 59,4% ($p=0,002$) и 65,6% ($p=0,002$) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 51), что характеризует снижение активности белка-транспортера.

При увеличении концентрации БСО до 500 мкМ отмечалось повышение коэффициентов кажущейся проницаемости $b-a$ и $a-b$ на 37,9% ($p=0,02$) и 301,1% ($p=0,0002$) соответственно. Отношение коэффициентов кажущейся проницаемости $b-a / a-b$ снижалось по сравнению с контролем на 64,4% ($p=0,002$), что свидетельствует о снижении активности Pgp, а также о повреждении клеточного монослоя и увеличении транспорта фексофенадина через мембрану в двух направлениях.

Таблица 28 – Влияние DL-бутионинсульфоксимины в диапазоне концентраций 1-500 мкМ в течение 72 ч на транспорт субстрата Pgp (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток Caco-2 ($M \pm SD$, $n=3$)

Концентрация БСО, мкМ	$P_{app} b-a, \times 10^{-6}$ см/с	$P_{app} a-b, \times 10^{-6}$ см/с
Контроль	$2,98 \pm 0,72$	$0,76 \pm 0,17$
1	$3,27 \pm 0,31$	$0,72 \pm 0,16$
5	$1,95 \pm 0,90$	$0,71 \pm 0,11$
10	$2,05 \pm 0,72$	$0,76 \pm 0,03$
50	$1,14 \pm 0,27^{***}$	$1,09 \pm 0,27$
100	$1,04 \pm 0,10^{**}$	$1,09 \pm 0,35$
500	$4,11 \pm 0,49^*$	$2,77 \pm 0,25^{***}$

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для $P_{app} b-a$ – $F=11,8$; $p=0,0008$, для $P_{app} a-b$ – $F=18,2$; $p < 0,0001$

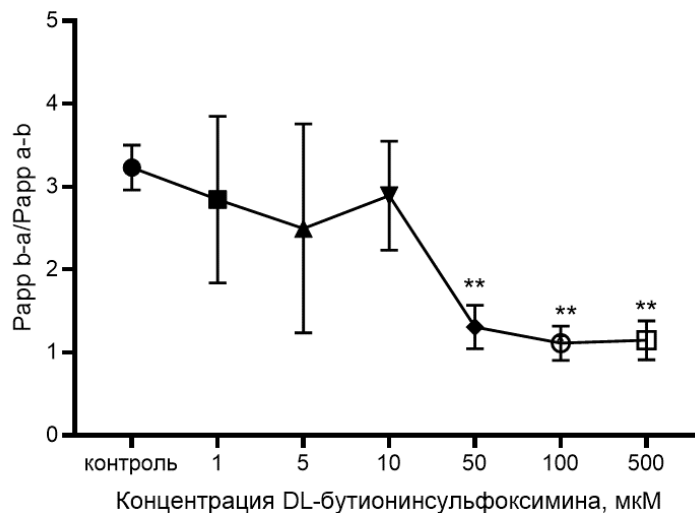


Рисунок 51 – Изменение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $b-a / a-b$ в клетках линии Caco-2 под действием DL-бутионинсульфоксимины в концентрациях 1-500 мкМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: ** – $p < 0,01$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа $P_{app} b-a / P_{app} a-b$ – $F=5,5$; $p=0,004$

Таким образом, при кратковременном воздействии БСО (3 ч) в концентрациях 50, 100 и 500 мкМ отмечается ингибирующее действие на Pgp, не связанное с изменением его количества (прямое ингибирование). При увеличении срока инкубации до 24 ч и концентрации БСО 10 мкМ активность Pgp возрастает и сопровождается увеличением его количества. При увеличении концентрации БСО до 50 и 100 мкМ и длительности воздействия до 24 и 72 ч наблюдается снижение активности Pgp, что может быть обусловлено повреждением молекулы белка-транспортера, а также прямой ингибирующей активностью БСО.

При концентрации БСО 500 мкМ и длительности воздействия 24 и 72 ч происходит усиление ОС, повреждение целостности клеточного монослоя и увеличение транспорта фексофенадина – субстрата белка-транспортера через мембрану в двух направлениях.

3.6. Изучение роли транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Pgp *in vitro* при экзогенном окислительном стрессе

На следующем этапе исследования изучались механизмы повышения количества Pgp при развитии экзогенного ОС.

Для этого моделировали ОС добавлением в питательную среду H₂O₂ в концентрациях 0,1; 0,5; 1 мкМ и сроком инкубации 24 ч и 10 мкМ сроком инкубации 72 ч. Выбор концентраций прооксидантов и длительности экспозиции был обусловлен результатами, полученными в первой группе экспериментов (в указанных сериях было установлено повышение количества Pgp под действием H₂O₂). Для подтверждения индукции Pgp, связанной именно с развитием ОС, были выполнены эксперименты с классическим антиоксидантом глутатионом.

В ходе выполнения данных серий экспериментов были получены следующие результаты. Воздействие H₂O₂ (моделирование экзогенного ОС) в течение 24 ч в концентрациях 0,1; 0,5 и 1 мкМ вызывало повышение количества Pgp на 78,9%

($p=0,0013$), 67,1% ($p=0,0019$) и 44,6% ($p=0,029$) соответственно по сравнению со значениями контроля (Рисунок 52).

Увеличение длительности экспозиции до 72 ч приводило к повышению уровня Pgp при концентрации H_2O_2 10 мкМ – на 68,9% ($p=0,0033$) по сравнению с контрольными показателями (Рисунок 52).

Добавление глутатиона в концентрации 1 мМ в питательную среду с H_2O_2 во всех указанных выше концентрациях и сроках инкубации предотвращало повышение количества Pgp, его уровень достоверно не отличался от показателей контроля (Рисунок 53).

Данный факт подтверждает, что причиной индукции синтеза белка-транспортера явилось развитие ОС.

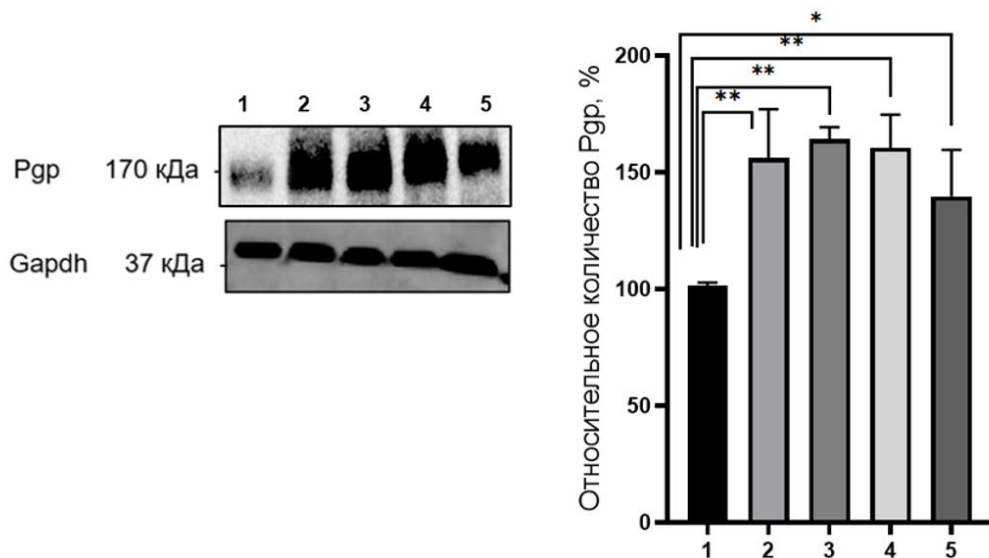


Рисунок 52 – Относительное количество Р-гликопротеина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии H_2O_2 : 1- контроль; 2, 3, 4, 5 – пероксид водорода в концентрациях 10 мкМ (72 ч), 0,1; 0,5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно

Примечание: * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 24 ч эксперимента – $F=15,8$; $p=0,01$. Здесь и далее слева – фото бендов, полученных с помощью ChemiDocXRS⁺; справа – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

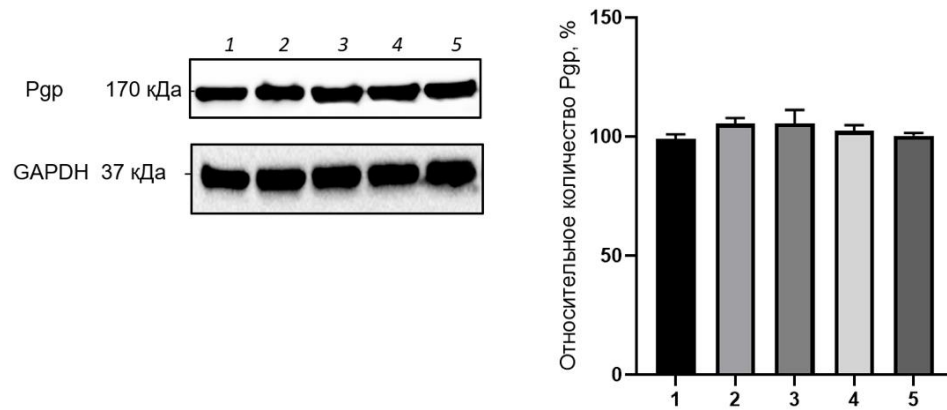


Рисунок 53 – Относительное количество Р-гликопротеина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии H₂O₂ в сочетании с глутатионом (1 мМ): 1- контроль; 2, 3, 4, 5 – пероксид водорода в концентрациях 10 мкМ (72 ч), 0,1; 0,5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно

Примечание: результаты дисперсионного анализа для 24 ч эксперимента – F=0,54; p=0,66

Для оценки участия транскрипционных факторов HIF1 α , CAR и PXR в развитии ОС оценивали их относительное количество в условиях ОС.

Количество Nrf2 возрастало при моделировании экзогенного ОС при инкубации с H₂O₂ в концентрациях 0,1-1 мкМ и 10, 50 мкМ в течение 24 и 72 ч соответственно (см. главу 3.1, рисунки 22 и 23).

При индукции ОС пероксидом водорода, было показано, что при инкубации 24 ч и концентрации пероксида водорода 50 мкМ количество HIF1 α в клетках Сасо-2 возрастало на 42,2% (p<0,0001) (Рисунок 54).

Относительное количество HIF1 α в клетках Сасо-2, оцененное методом вестерн-блот, при сроке инкубации 72 ч и концентрации прооксиданта 50 и 100 мкМ – на 26,2% (p=0,0015) и 19,5% (p=0,016) соответственно относительно контрольных значений. Полученные результаты представлены в виде фото бендов, полученных с помощью ChemiDocXRS+ и результатов денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab. денситометрического анализа и фото бендов на Рисунке 54.

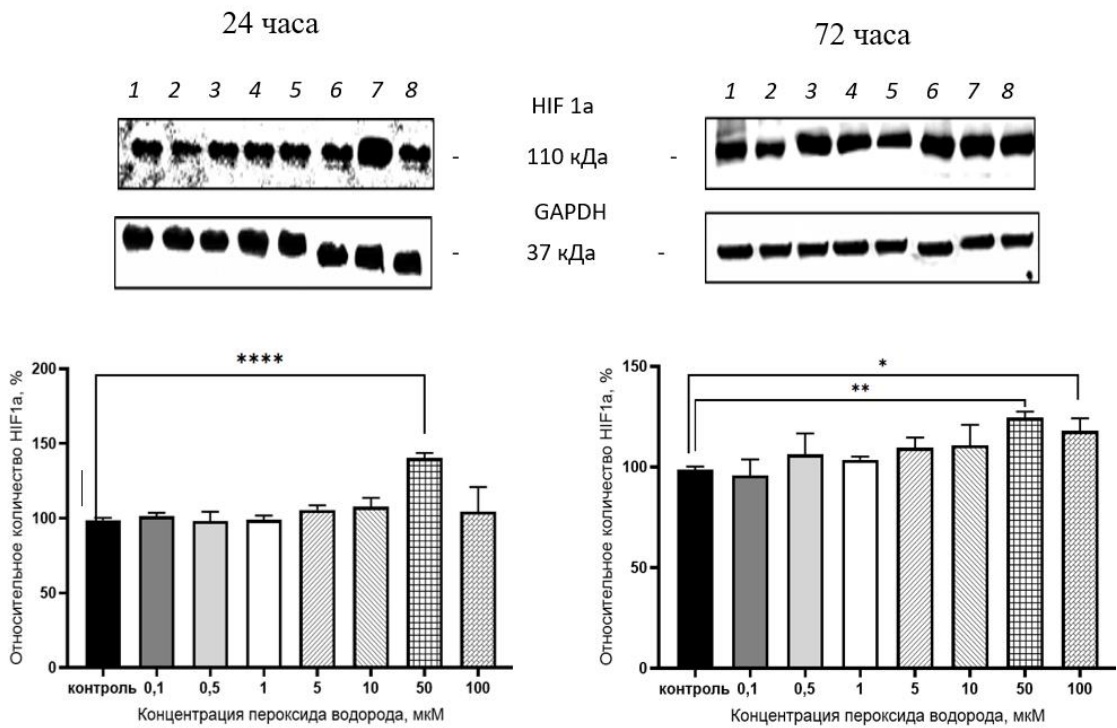


Рисунок 54 – Относительное количество фактора, индуцируемого гипоксией (HIF1 α) в клетках линии Caco-2 в норме (1) и при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ (2-8) в течение 24 и 72 ч (M \pm SD, n=3)

Примечание: * – p<0,05; ** – p<0,01; **** – p<0,0001 статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 24 ч эксперимента – F=12,0; p<0,0001, для 72 ч – F=6,18, p=0,0013

Воздействие H₂O₂ в течение 24 ч во всех протестированных концентрациях (0,1-100 мкМ) достоверно не влияло на относительное количество CAR в клетках линии Caco-2.

Увеличение времени экспозиции клеток с прооксидантом до 72 ч приводило к значимому повышению количества CAR относительно контрольных значений в концентрациях H₂O₂ 5, 10 и 50 мкМ на 21,9% (p=0,03), 47,4% (p=0,0005), 34,9% (p=0,003) соответственно, а в концентрации 100 мкМ — к снижению на 22,9% (p=0,02) (Рисунок 55).

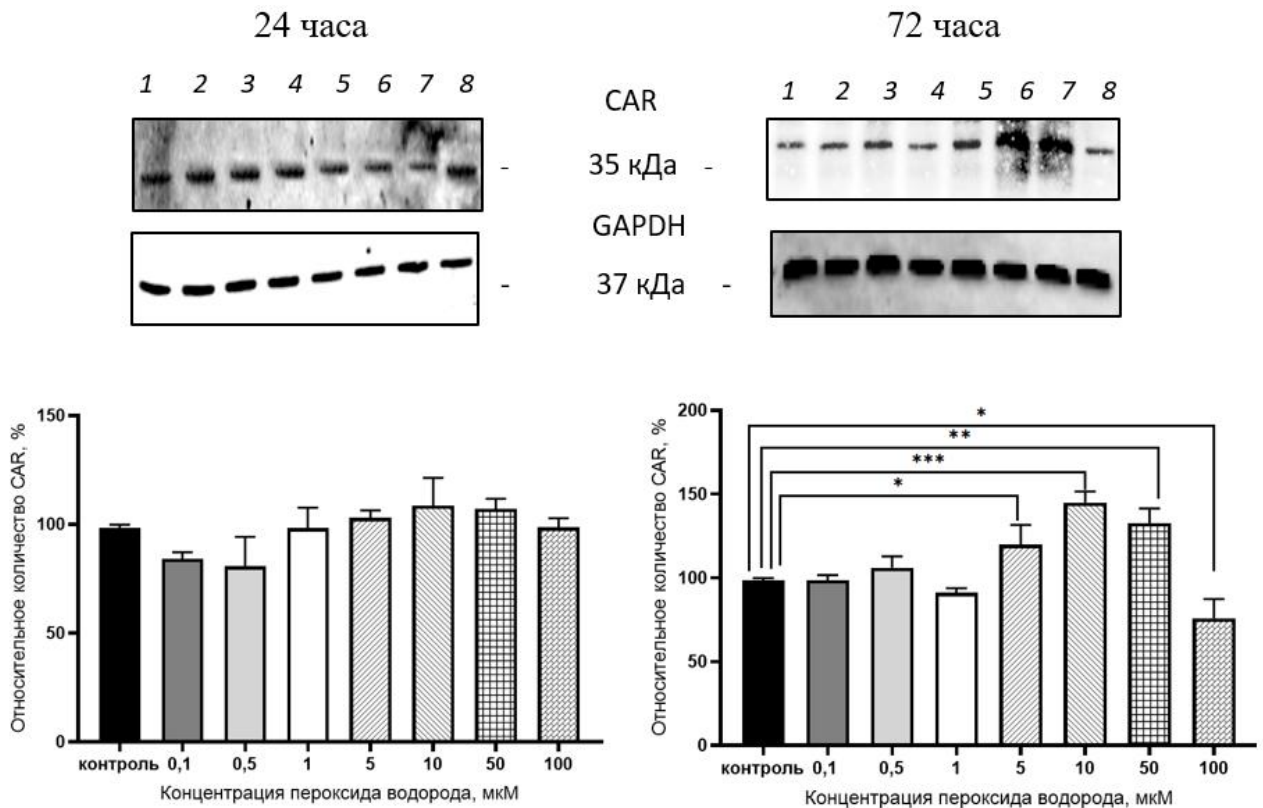


Рисунок 55 – Относительное количество конститутивного андростанового рецептора (CAR) в лизате клеток линии Caco-2 в норме (1) и при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ (2-8) в течение 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 24 ч эксперимента – $F=0,61$; $p=0,7$, для 72 ч – $F=26,8$; $p < 0,0001$

Воздействие пероксида водорода на клетки линии Caco-2 в течение 24 ч вызывало повышение количества PXR при концентрации прооксиданта 10, 50 и 100 мкМ на 67,1% ($p=0,03$), 25,9% ($p=0,0003$) и 35,9% ($p=0,0003$) соответственно (Рисунок 56). Увеличение длительности воздействия до 72 ч сопровождалось нормализацией уровня PXR при концентрации H₂O₂ 0,1–10 мкМ и его снижением при концентрации 50 мкМ на 18,6% ($p=0,0003$) и при концентрации 100 мкМ на 26,9% ($p=0,03$) по сравнению с контролем (Рисунок 56).

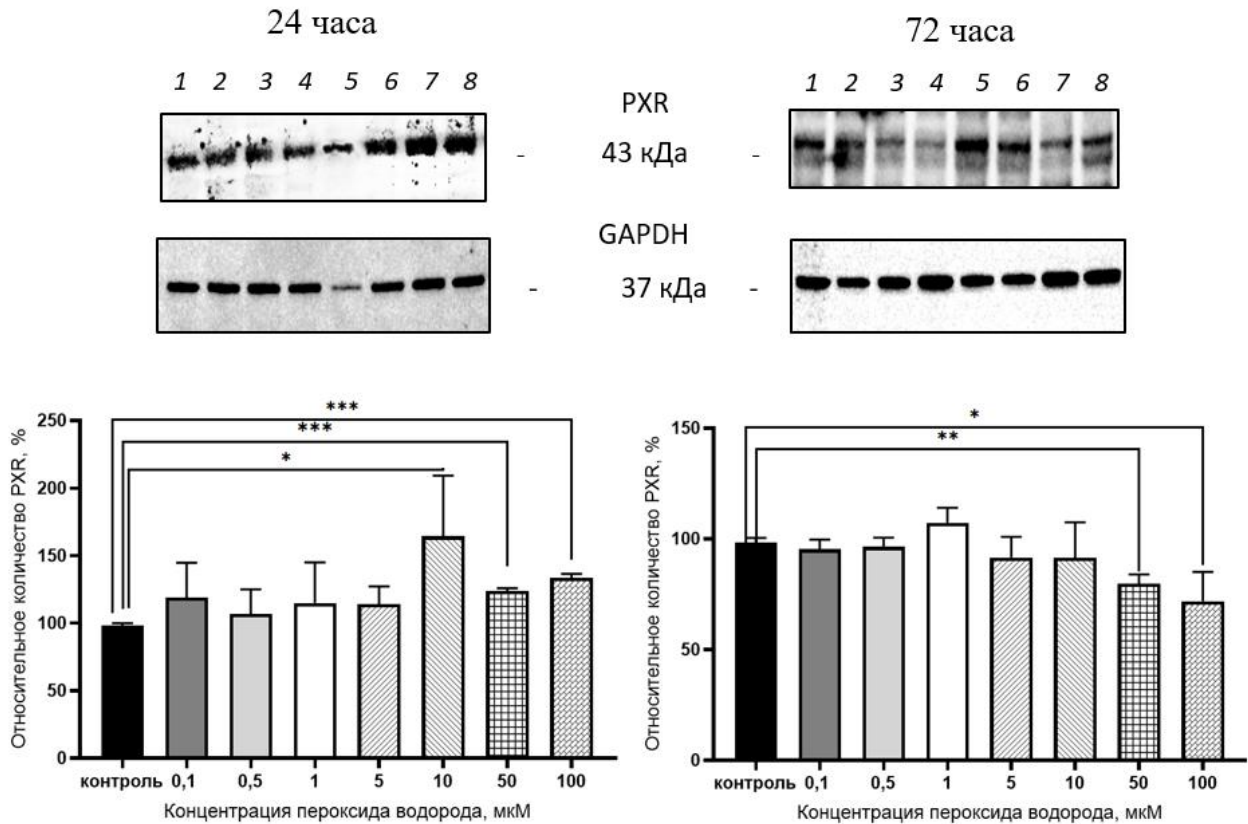


Рисунок 56 – Относительное количество прегнан Х рецептора (PXR) в клетках линии Сасо-2 в норме (1) и при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ (2-8) в течение 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 24 ч эксперимента – $F=3,65$; $p=0,04$, для 72 ч – $F=4,67$; $p=0,005$

В целях изучения роли транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в регуляции Pgr были выполнены эксперименты с их специфическими ингибиторами АЕМ1 (ингибитор Nrf2), КС7F2 (ингибитор HIF1 α), СІNРА 1 (ингибитор CAR), кетоконазол (ингибитор PXR).

Ингибитор Nrf2 – АЕМ1 при совместной инкубации с H₂O₂ во всех концентрациях и сроках экспозиции предотвращал повышение относительного количества Pgr, его уровень достоверно не отличался от показателей контроля (Рисунок 57).

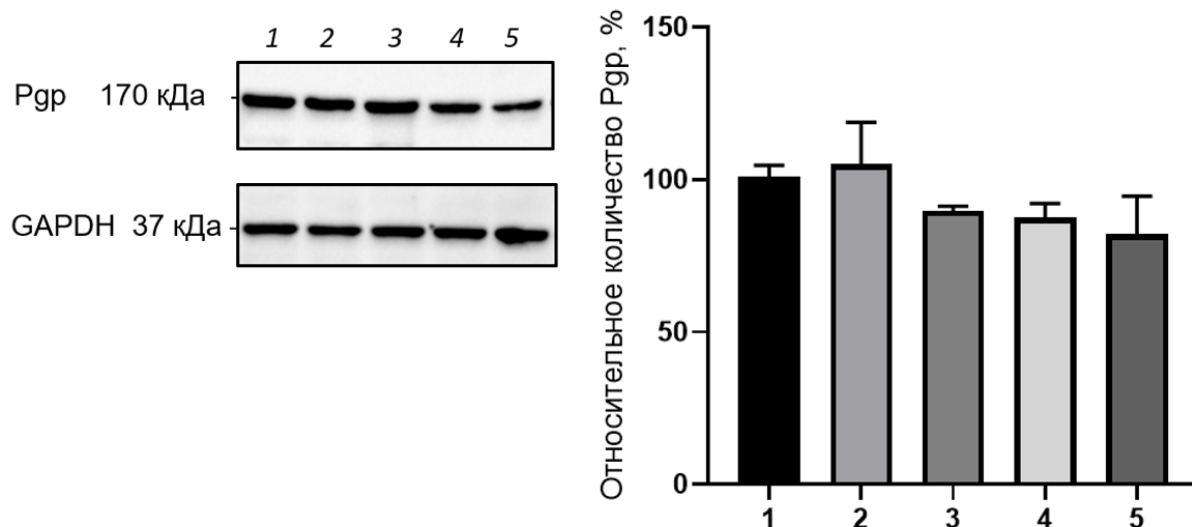


Рисунок 57 – Относительное количество Р-гликопротеина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии ингибитора ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (АЕМ1, 5 мкМ) в сочетании с H₂O₂: 1- контроль; 2, 3, 4, 5 – пероксид водорода в концентрациях 10 мкМ (72 ч), 0,1, 0,5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно

Примечание: результаты дисперсионного анализа – F=4,05; p=0,051

Ингибитор HIF1a КС7F2 при длительности воздействия H₂O₂ 24 ч во всех концентрациях прооксиданта препятствовал повышению уровня транспортера (относительное количество Рgp достоверно от контроля не отличалось), а при инкубации 72 ч не оказывал статистически значимого эффекта на относительное количество Рgp – его содержание увеличивалось на 37% по сравнению с контролем (p=0,0004) (Рисунок 58).

Ингибитор CAR CINPA 1 при добавлении к H₂O₂ и длительности эксперимента 24 ч не подавлял эффект прооксиданта: относительное количество Рgp увеличивалось на 51,5% (p=0,0008), 46,5% (p=0,0019) и 31,3% (p=0,02) при концентрациях H₂O₂ 0,1, 0,5 и 1 мкМ соответственно, по сравнению со значениями контроля (Рисунок 59). В то же время при длительности воздействия 72 ч CINPA 1 препятствовал повышению уровня Рgp под действием H₂O₂ в концентрации 10 мкМ (Рисунок 59).

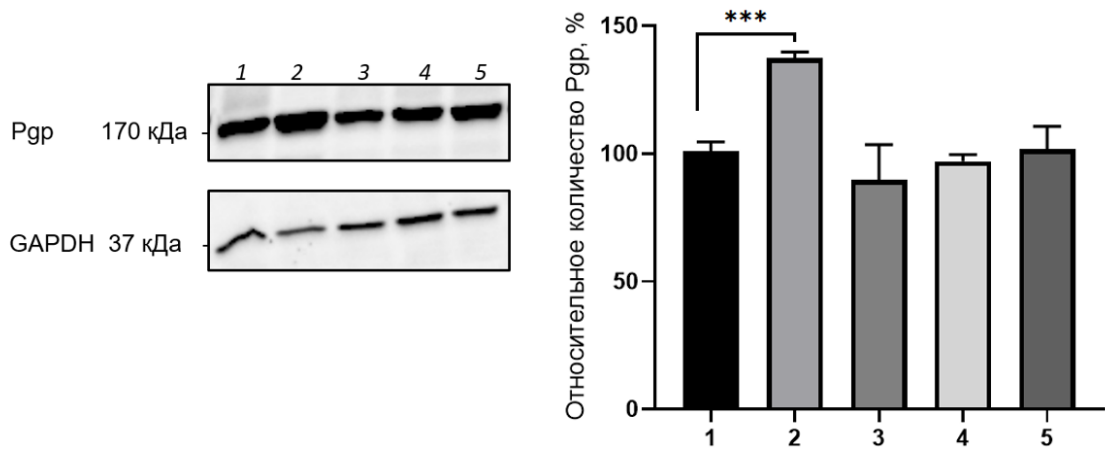


Рисунок 58 – Относительное количество Р-гликопротеина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии ингибитора фактора, индуцируемого гипоксией (КС7F2, 7,5 мкМ) в сочетании с H_2O_2 : 1- контроль; 2, 3, 4, 5 – H_2O_2 в концентрациях 10 мкМ (72 ч), 0,1; 0,5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно

Примечание: *** – $p < 0,001$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа – $F=1,21$; $p=0,37$

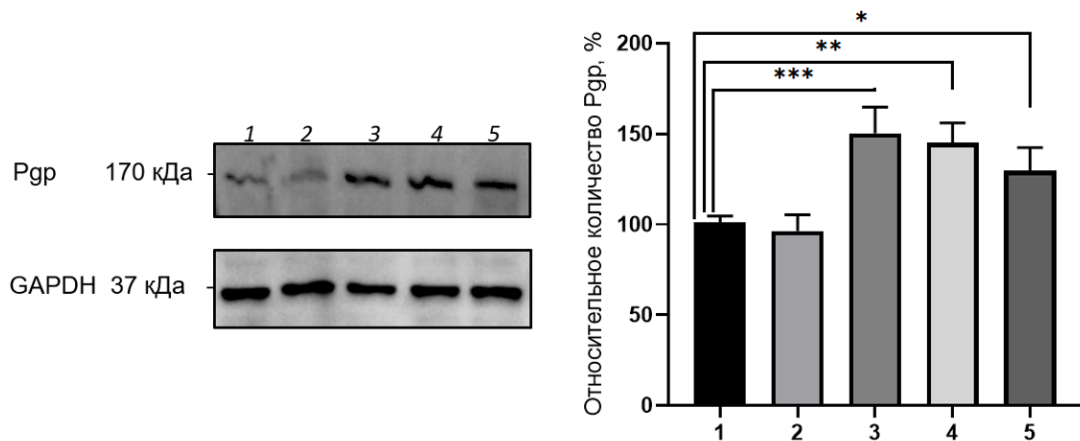


Рисунок 59 – Относительное количество Р-гликопротеина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии ингибитора конститутивного андростанового рецептора (СINРА1, 5 мкМ) в сочетании с H_2O_2 : 1- контроль; 2, 3, 4, 5 – пероксид водорода в концентрациях 10 мкМ (72 ч), 0,1, 0,5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$, статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа – $F=12,6$; $p=0,0021$

Ингибитор PXR кетоконазол (10 мкМ) при сочетанном применении с H_2O_2 не подавлял эффект индуктора окислительного стресса. Относительное количество Pgp возрастало по сравнению со значениями контроля соответственно на 64,6%, 53,5% и 36,4% при воздействии H_2O_2 сроком 24 ч в концентрациях 0,1; 0,5 и 1 мкМ и на 62,6% при воздействии H_2O_2 сроком 72 ч в концентрации 10 мкМ ($p < 0,0001$ для каждой серии эксперимента, Рисунок 60).

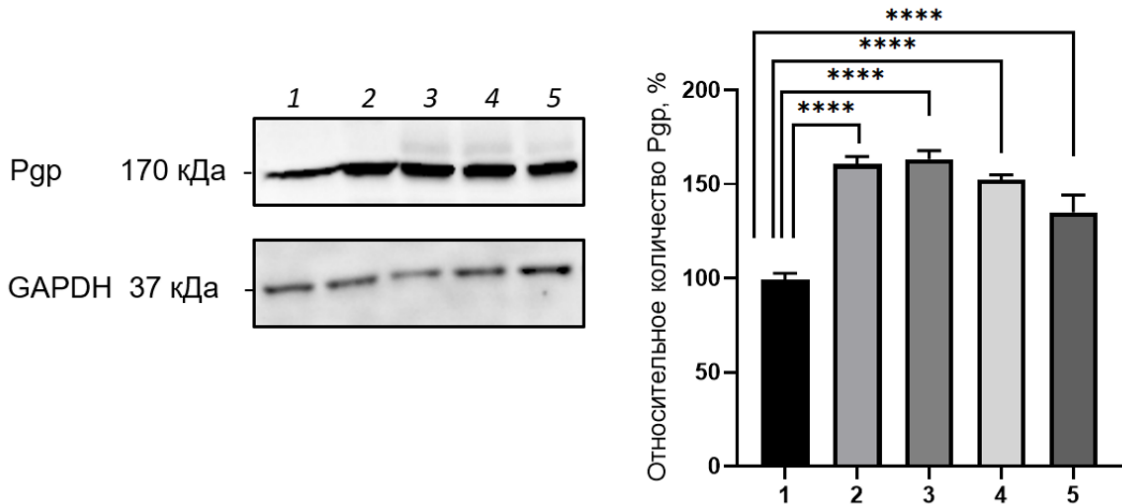


Рисунок 60 – Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии ингибитора прегнан X рецептора (кетоконазола, 10 мкМ) в сочетании с H_2O_2 : 1- контроль; 2, 3, 4, 5 – пероксид водорода в концентрациях 10 мкМ (72 ч), 0,1, 0,5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно

Примечание: **** – $p < 0,0001$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа – $F=77,1$; $p < 0,0001$

Таким образом, в повышении количества Pgp при развитии экзогенного ОС, вызванного H_2O_2 , вероятно, доминирующая роль принадлежит сигнальному пути Nrf2-keap1, который принимает участие в регуляции белка-транспортера при длительности воздействия 24 и 72 ч. Транскрипционный фактор HIF1a участвует в регуляции Pgp при длительности воздействия H_2O_2 24 ч, а транскрипционный фактор CAR – при воздействии 72 ч. PXR, видимо, не вносит существенный вклад в регуляцию белка-транспортера при использованной модели патологии.

3.7. Изучение роли транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в изменении количества Pgr *in vitro* при эндогенном окислительном стрессе

Для изучения механизмов индукции Pgr моделировали эндогенный ОС с помощью ингибитора синтеза глутатиона - DL-бутионинсульфоксимины (БСО, ингибитор γ -глутамилцистеинсинтетазы) в конечных концентрациях в питательной среде 10, 50 и 100 мкМ. Выбор концентраций прооксиданта и длительности экспозиции был обусловлен результатами, полученными во второй группе экспериментов, в которой было установлено повышение количества Pgr под действием БСО.

Для подтверждения индукции Pgr обусловленной именно результатами развития ОС, были выполнены эксперименты с классическим антиоксидантом глутатионом.

В ходе выполнения данных серий экспериментов были получены следующие результаты. Инкубация клеток линии Сасо-2 с БСО (моделирование эндогенного ОС) в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ в течение 24 ч приводила к увеличению относительного количества Pgr на 71,6% ($p < 0,0001$), 51,6% ($p < 0,0001$) и 25,4% ($p = 0,007$) (Рисунок 61). Глутатион (1 мМ) предотвращал повышение уровня Pgr, вызванное воздействием БСО в течение 24 ч в концентрациях 10 и 50 мкМ. При сочетанном использовании глутатиона и БСО в концентрации 100 мкМ и длительности инкубации 24 ч относительное количество Pgr возрастало на 19,7% ($p = 0,003$) по сравнению с контролем, однако данное повышение было ниже, чем при изолированном применении прооксиданта (Рисунок 62).

Для оценки участия транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в развитии эндогенного ОС определяли их относительное количество при воздействии БСО в концентрациях 1-500 мкМ. Количество Nrf2 возрастало при моделировании эндогенного ОС при инкубации с БСО в концентрациях 10-100 мкМ и 50-100 мкМ в течение 24 и 72 ч соответственно (см. главу 3.2, рисунки 33 и 34).

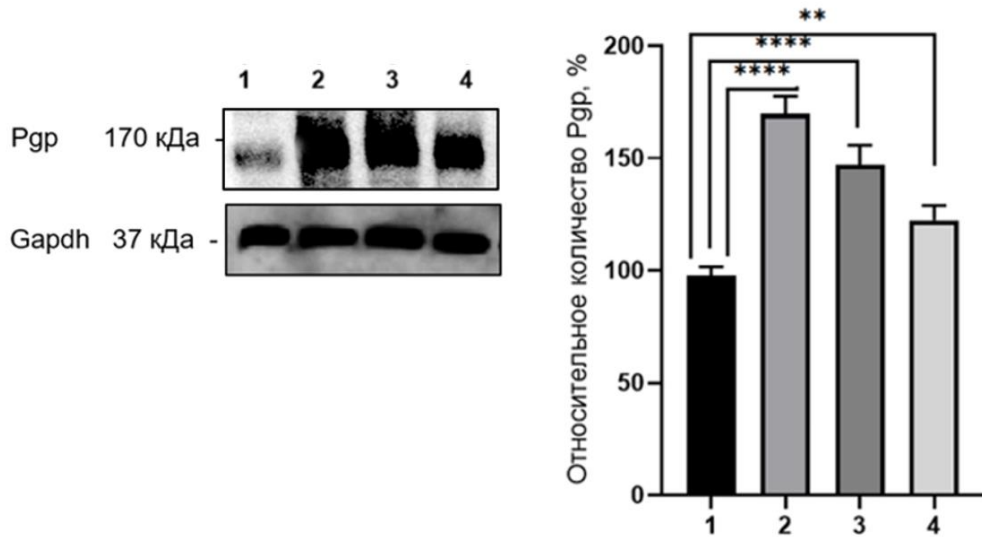


Рисунок 61 – Относительное количество Р-гликопротеина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии DL-бутионинсульфоксимины: 1 – контроль; 2, 3, 4 - DL-бутионинсульфоксимины в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно

Примечание: ** – $p < 0,01$; **** – $p < 0,0001$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа $F=59,5$; $p < 0,0001$

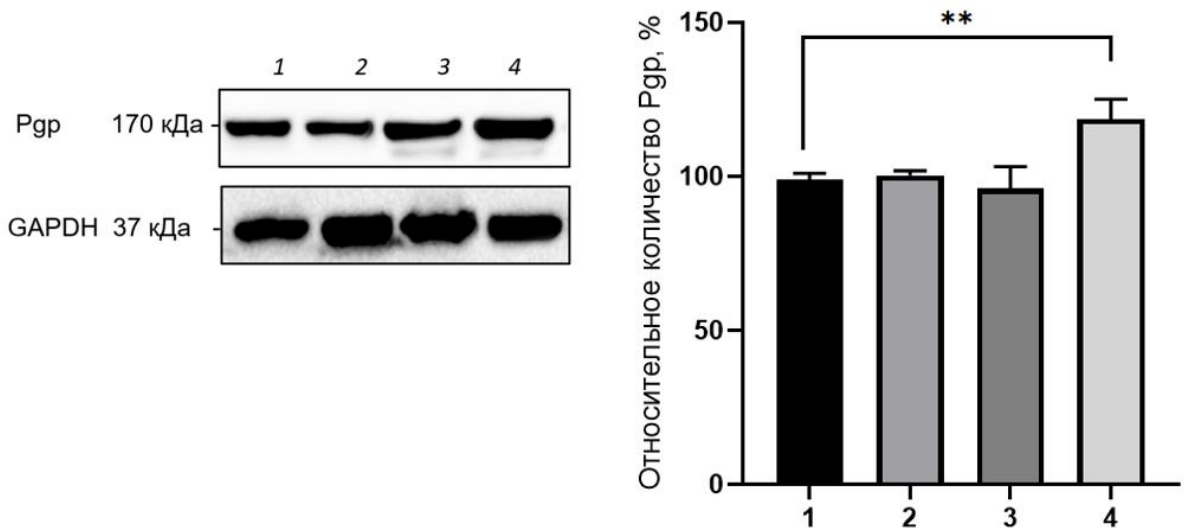


Рисунок 62 – Относительное количество Р-гликопротеина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии DL-бутионинсульфоксимины в сочетании с глутатионом (1 мМ): 1 – контроль; 2, 3, 4 - DL-бутионинсульфоксимины в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно

Примечание: ** – $p < 0,01$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа – $F=13,4$; $p=0,0017$

При сроке инкубации 24 ч и концентрациях БСО 10, 50 и 100 мкМ количество HIF1 α в клетках линии Сасо-2 увеличивалось на 47,2% (p=0,01), 48,0% (p=0,01) и 53,1% (p=0,008) соответственно (Рисунок 63). При сроке инкубации клеток 72 ч и концентрациях БСО 50, 100 и 500 мкМ относительное количество HIF1 α возрастало соответственно на 52,6% (p<0,0001), 42,6% (p<0,0001) и 98,8% (p<0,0001) относительно контроля (Рисунок 63).

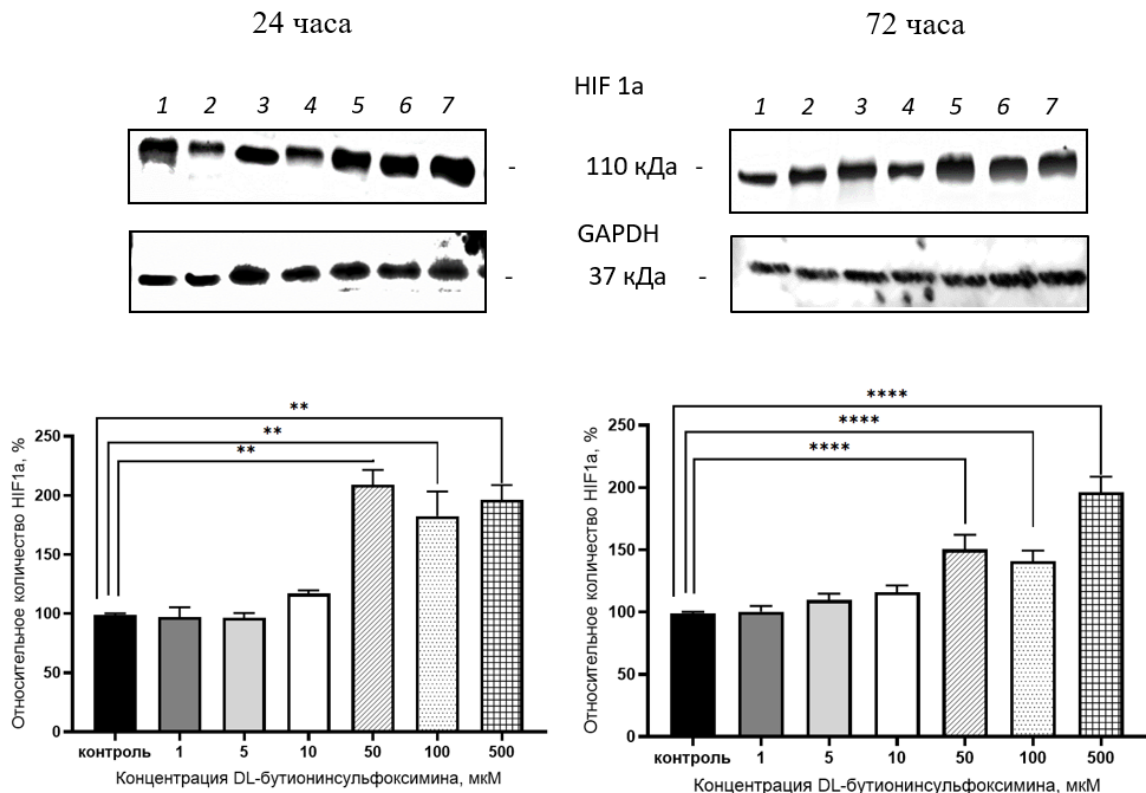


Рисунок 63 – Относительное количество фактора, индуцируемого гипоксией (HIF1 α) в клетках линии Сасо-2 в норме (1) и при индукции окислительного стресса D,L-бутионинсульфоксимином в концентрациях 1–500 мкМ (2-7) в течение 24 и 72 ч (M \pm SD, n=3)

Примечание: ** – p \leq 0,01; **** – p<0,0001 статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 24 ч эксперимента – F=28,8; p<<0,0001 и для 72 ч – F=57,5; p<<0,0001

При воздействии БСО на клетки линии Сасо-2 24 ч в концентрациях 50 и 100 мкМ относительное количество CAR статистически значимо возросло на 32,7%

($p=0,0006$) и 39,6% ($p=0,0001$) соответственно (Рисунок 64). Инкубация клеток с БСО в течение 72 ч и концентрациях 10 и 50 мкМ приводила к увеличению относительного количества CAR на 24,9% ($p=0,45$) и 43,3% ($p=0,0007$) соответственно (Рисунок 64).

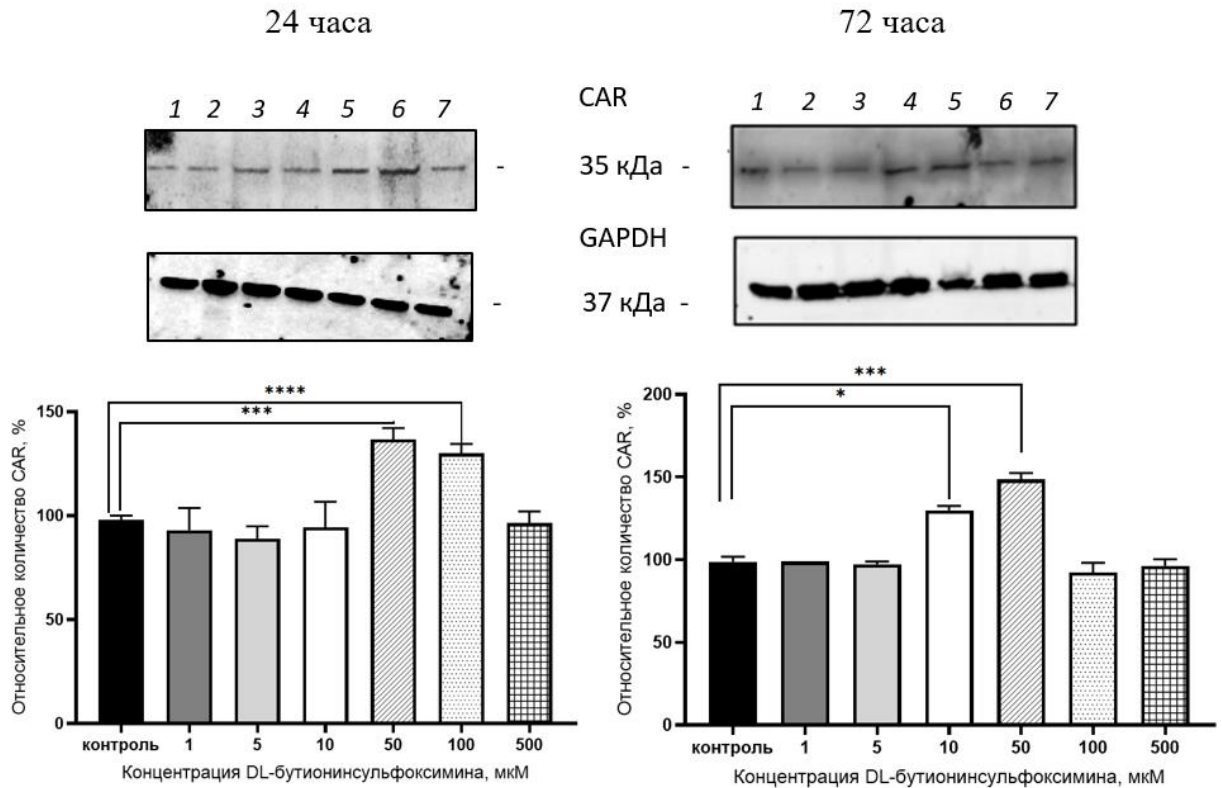


Рисунок 64 – Относительное количество конститутивного андростанового рецептора (CAR) в лизате клеток линии Caco-2 в норме (1) и при индукции окислительного стресса D,L-бутионинсульфоксимином в концентрациях 1–500 мкМ (2-7) в течение 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; **** – $p \leq 0,0001$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 24 ч эксперимента – $F=8,6$; $p=0,0005$ и для 72ч – $F=57,5$; $p < 0,0001$

Относительное количество PXR клеток линии Caco-2 при инкубации 24 ч в концентрациях БСО 100 и 500 мкМ статистически значимо возросло на 33,6% ($p < 0,0001$) и 40,5% ($p < 0,0001$), а при инкубации 72 ч и концентрациях БСО 50, 100 и 500 мкМ на 26,4% ($p=0,047$), 41,5% ($p=0,002$) и 36,5% ($p=0,06$) соответственно (Рисунок 65).

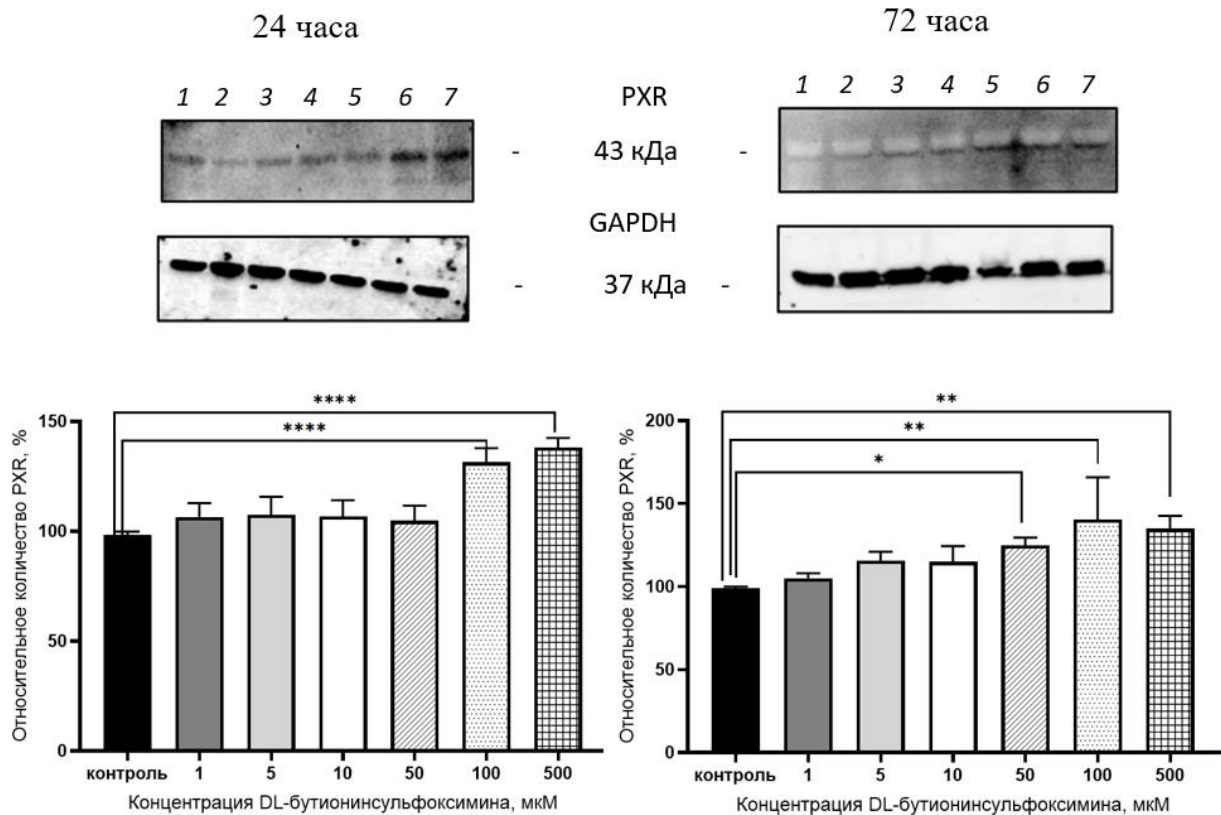


Рисунок 65 – Относительное количество прегнан X рецептора (PXR) в лизате клеток линии Caco-2 в норме (1) и при индукции окислительного стресса D,L-бутионинсульфоксимином в концентрациях 1-500 мкМ (2-7) в течение 24 и 72 ч (M±SD, n=3)

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; **** – $p \leq 0,0001$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для 24 ч эксперимента – $F=17,6$; $p < 0,0001$ и для 72 ч – $F=5,61$; $p=0,0037$

Для изучения роли транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR в процессе индукции Pgp были выполнены эксперименты с их специфическими ингибиторами AEM1 (ингибитор Nrf2), KC7F2 (ингибитор HIF1 α), CINPA 1 (ингибитор CAR), кетоконазол (ингибитор PXR).

Добавление к клеткам AEM1 в сочетании с БСО в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ и сроке инкубации 24 ч препятствовало повышению относительного количества Pgp (уровень белка-транспортера не отличалось от значений контроля) (Рисунок 66).

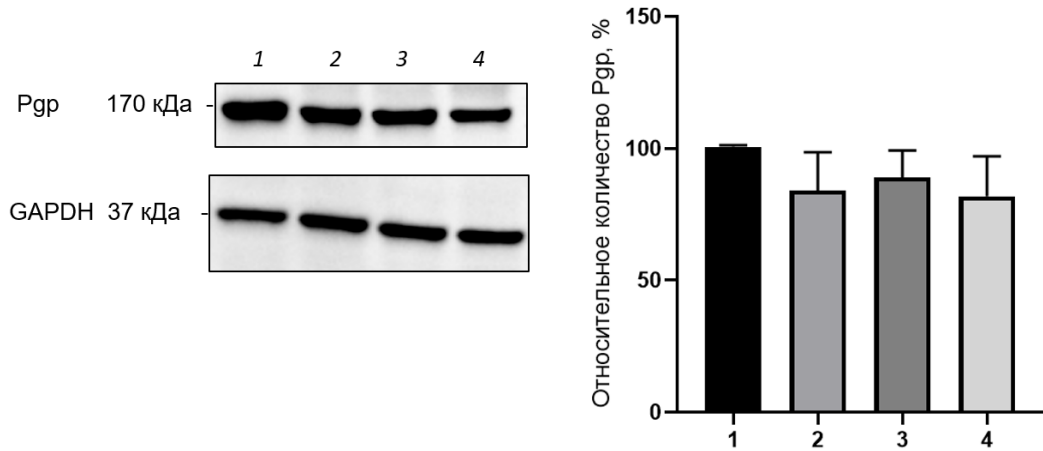


Рисунок 66 – Относительное количество Р-гликопротеина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии ингибитора ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (АЕМ1, 5 мкМ) в сочетании DL-бутионинсульфоксимином: 1 – контроль; 2, 3, 4 - DL-бутионинсульфоксимин в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно

Примечание: результаты дисперсионного анализа – $F=1,54$; $p=0,28$

Ингибитор HIF1 α KC7F2 при добавлении к БСО в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ также приводил к нормализации относительного количества Рgp в клетках линии Сасо-2, его уровень достоверно не отличался от контроля (Рисунок 67).

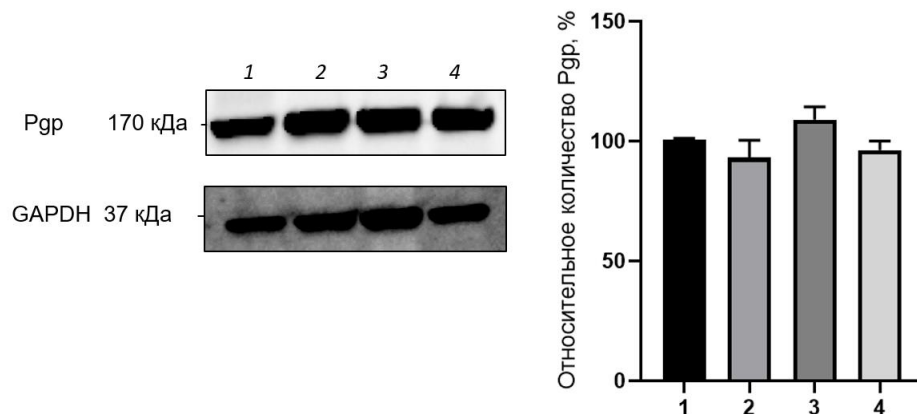


Рисунок 67 – Относительное количество Р-гликопротеина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии ингибитора фактора, индуцируемого гипоксией (KC7F2, 7,5 мкМ) в сочетании с DL-бутионинсульфоксимином: 1 – контроль; 2, 3, 4 - DL-бутионинсульфоксимин в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно

Примечание: результаты дисперсионного анализа – $F=2,88$; $p=0,061$

Влияние CINPA 1 (5 мкМ) и кетоконазола (10 мкМ) на количество Pgp в условиях моделирования эндогенного окислительного стресса представлены на Рисунке 68 и Рисунке 69 соответственно.

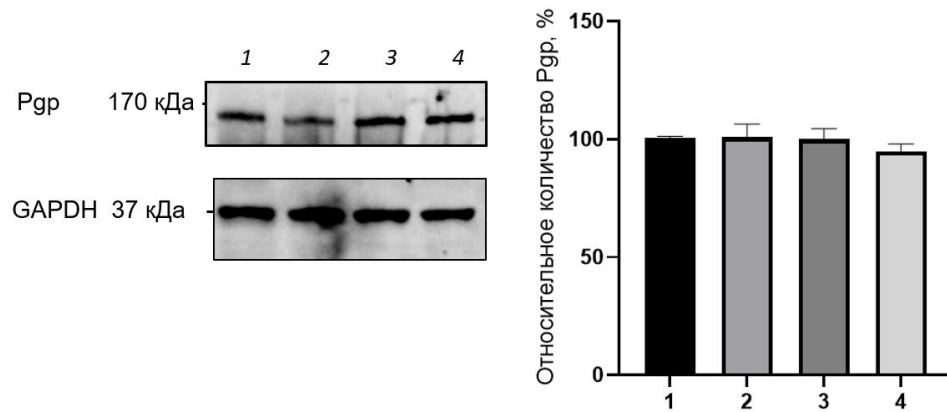


Рисунок 68 – Относительное количество Р-гликопротеина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии ингибитора конститутивного андростанового рецептора (CINPA1, 5 мкМ) в сочетании с DL-бутионинсульфоксимином: 1 – контроль; 2, 3, 4 - DL-бутионинсульфоксимин в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно

Примечание: результаты дисперсионного анализа – $F=0,15$; $p=0,99$

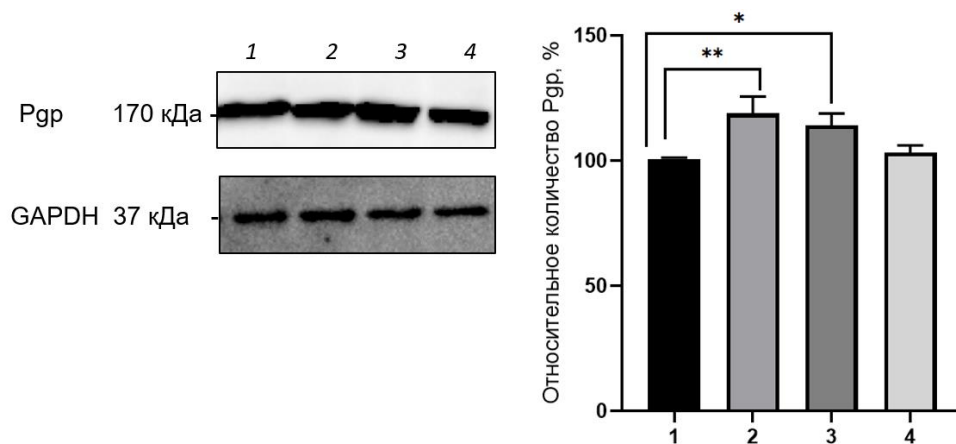


Рисунок 69 – Относительное количество Р-гликопротеина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии ингибитора прегнан Х рецептора (кетоконазола, 10 мкМ) в сочетании с DL-бутионинсульфоксимином: 1 – контроль; 2, 3, 4 - DL-бутионинсульфоксимин в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно

Примечание: * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$ статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа – $F=11,4$; $p=0,0029$

Ингибитор CAR CINPA 1 при сочетанном применении с БСО в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ предотвращал повышение относительного количества Pgp, уровень белка-транспортера в клетках Caco-2 достоверно не отличался от показателей контроля (Рисунок 68).

Ингибитор PXR кетоконазол (10 мкМ) предотвращал повышение количества Pgp в клетках Caco-2 под действием БСО в концентрации 100 мкМ, и не влиял на эффекты прооксиданта в концентрациях 10 и 50 мкМ, уровень Pgp повышался на 18,8% ($p=0,0027$) и 14,1% ($p=0,015$) соответственно по сравнению с контролем (Рисунок 69).

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

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

На следующем этапе исследования оценивалось влияние конечного продукта ПОЛ – МДА на количество и активность Pgp, а также его принадлежность к субстратам белка-транспортера. В ходе эксперимента были выполнены следующие анализы: количество Pgp анализировали методом вестерн-блот; активность белка-транспортера – по транспорту его маркерного субстрата фексофенадина через монослой клеток линии Caco-2; принадлежность МДА к субстратам белка-транспортера - по его транспорту через монослой клеток линии Caco-2 без и с ингибитором Pgp - верапамилом в концентрации 200 мкМ. Для оценки роли транскрипционных факторов CAR и PXR в индукции Pgp под действием МДА были выполнены эксперименты с их специфическими ингибиторами – CINPA1 и кетоконазолом соответственно.

Воздействие МДА на клетки линии Сасо-2 в концентрациях 10 и 50 мкМ в течение 24 ч приводило к повышению уровня Pgp на 61,6% ($p=0,006$) и 49,5% ($p=0,016$) соответственно (Рисунок 70).

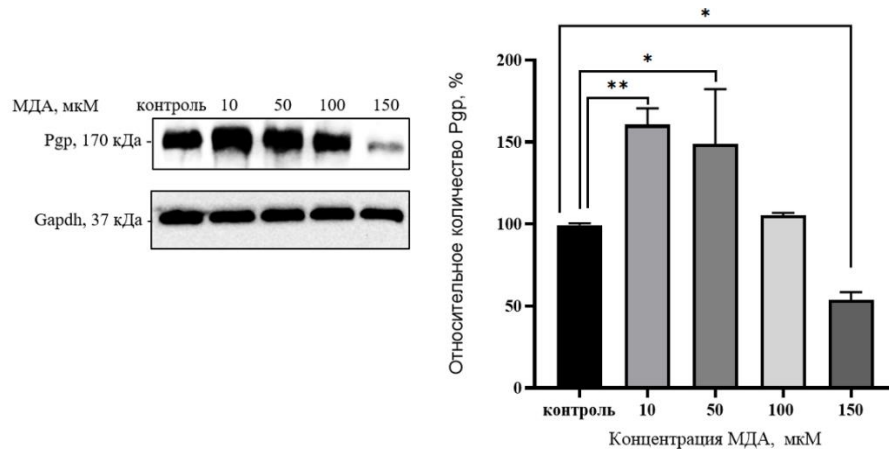


Рисунок 70 – Относительное количество Р-гликопротеина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии малонового диальдегида в концентрациях 10-150 мкМ в течение 24 ч

Примечание: * – $p<0,05$; ** – $p<0,01$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа – $F=12,6$; $p=0,0006$

МДА в концентрации 100 мкМ не влиял на количество белка-транспортера ($p>0,05$), а в концентрации 150 мкМ вызывал снижение Pgp на 46,5% ($p=0,018$) по сравнению со значениями контроля (Рисунок 70).

Изменение количества Pgp в клетках Сасо-2 под действием МДА сопровождалось следующей динамикой его активности.

Кратковременное воздействие МДА на клетки в течение 30 мин не влияло на коэффициенты кажущейся проницаемости $P_{app} a-b$ и $P_{app} b-a$ субстрата Pgp фексофенадина – данные показатели достоверно от контроля не отличались. Полученные результаты свидетельствуют о том, что МДА прямо не влияет на функционирование Pgp, то есть не является прямым ингибитором или активатором его молекулы (Таблица 29).

В то же время увеличение длительности воздействия МДА до 24 ч в концентрации 10 мкМ приводило к увеличению коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ на 35,7% ($p<0,0001$) (Таблица 29), отношения $P_{app} b-a /$

Рарр $a-b$ на 85,4% ($p=0,003$) (Рисунок 71) и снижению коэффициента кажущейся проницаемости Рарр $a-b$ на 31,1% ($p=0,04$) по сравнению с контролем (Таблица 29), а в концентрации 50 мкМ – к увеличению коэффициента кажущейся проницаемости Рарр $b-a$ на 14,7% ($p=0,007$) (Таблица 29) и отношения Рарр $b-a$ / Рарр $a-b$ на 67,0% ($p=0,003$) (Рисунок 71), коэффициент кажущейся проницаемости Рарр $a-b$ снижался на 31,6% ($p=0,04$) относительно контроля (Таблица 29).

В концентрации 100 мкМ и длительности экспозиции 24 ч МДА достоверного влияния на изучаемые показатели транспорта фексофенадина в клетках Сасо-2 не оказал (Таблица 29 и Рисунок 71). Полученные данные свидетельствуют о повышении количества и активности Ргр в клетках Сасо-2 под действием МДА в концентрациях 10 и 50 мкМ при длительности воздействия 24 ч.

Таблица 29 – Влияние малонового диальдегида в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ в течение 30 мин и 24 ч на транспорт субстрата Ргр - фексофенадина через билипидную мембрану клеток линии Сасо-2 ($M \pm SD$, см/сек)

Время инкубации	Экспериментальная группа	Рарр $b-a$, $\times 10^{-6}$, см/с	Рарр $a-b$, $\times 10^{-6}$, см/с
	Контроль	$5,43 \pm 0,13$	$1,93 \pm 0,19$
30 мин	МДА 10 мкМ	$5,45 \pm 0,20$	$1,96 \pm 0,16$
	МДА 50 мкМ	$5,51 \pm 0,26$	$2,04 \pm 0,11$
	МДА 100 мкМ	$5,98 \pm 1,18$	$1,76 \pm 0,13$
24 ч	МДА 10 мкМ	$7,37 \pm 0,26^{****}$	$1,33 \pm 0,18^*$
	МДА 50 мкМ	$6,23 \pm 0,23^{**}$	$1,32 \pm 0,05^*$
	МДА 100 мкМ	$5,64 \pm 0,92$	$1,89 \pm 0,57$

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; **** – $p < 0,0001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для срока инкубации 30 мин: Рарр $b-a$ – $F=1,69$; $p=0,24$; для Рарр $a-b$ – $F=1,94$; $p=0,20$, для 24 ч: Рарр $b-a$ – $F=28,5$; $p=0,0001$; для Рарр $a-b$ – $F=11,6$; $p=0,0028$

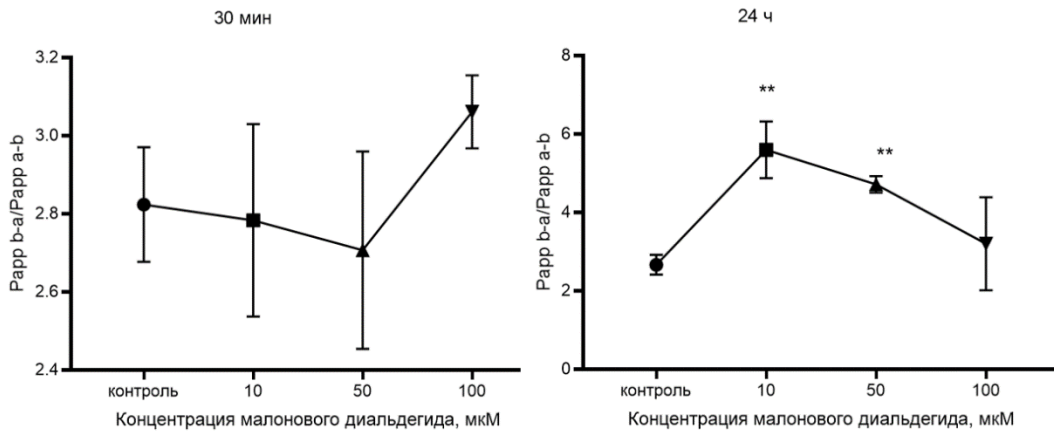


Рисунок 71 – Изменение отношения коэффициентов кажущейся проницаемости $b-a/a-b$ в клетках линии Caco-2 под действием малонового диальдегида в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ в течение 30 мин и 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание: ** – $p < 0,01$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа для срока инкубации 30 мин – $F=1,81$; $p=0,22$ и для 24ч – $F=10,8$; $p=0,0035$

В ходе исследования было установлено, что ингибитор CAR - CINPA1 в концентрации 10 мкМ предотвращал повышение количества Pgr при воздействии МДА на клетки Caco-2 в концентрации 10 и 50 мкМ в течении 24 ч, данный показатель достоверно от контроля не отличался. Инкубация клеток линии Caco-2 с МДА в концентрации 100 мкМ совместно с CINPA1 сопровождалась снижением относительного количества Pgr на 25,5% ($p=0,0002$) по сравнению с контролем (Рисунок 72).

Ингибитор PXR - кетоконазол не изменял индуцирующее действие МДА на количество Pgr в концентрации 10 мкМ, уровень белка-транспортера превышал показатели контроля на 26,1% ($p = 0,015$), но при этом препятствовал его индукции в концентрации МДА 50 мкМ (количество Pgr достоверно не отличалось от значений контроля) (Рисунок 73). Полученные результаты представлены в виде фото бендов, полученных с помощью ChemiDocXRS+ и результатов денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab. денситометрического анализа и фото бендов.

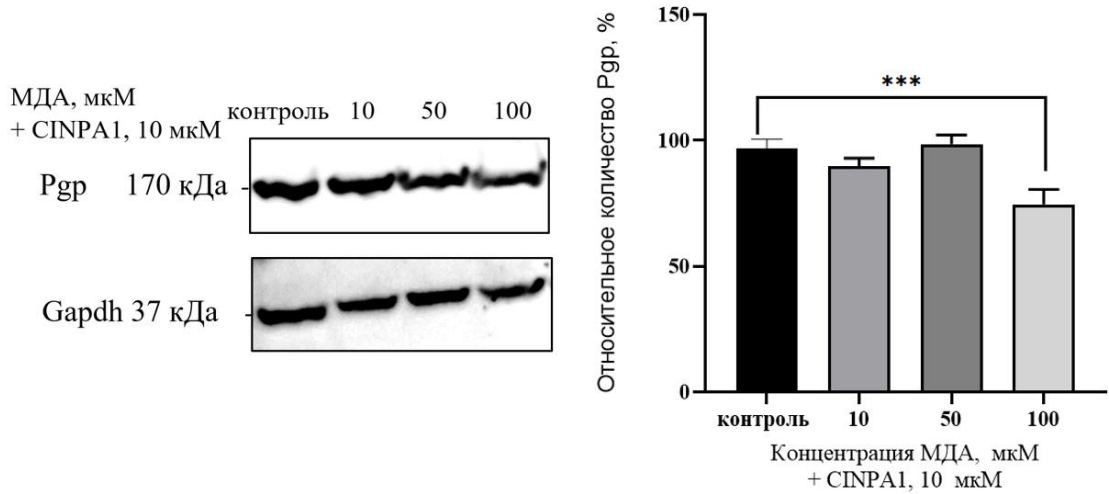


Рисунок 72 – Относительное количество Р-гликопротеина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии малонового диальдегида в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ в течение 24 ч в присутствии ингибитора CAR (CINPA1 в концентрации 10 мкМ)

Примечание: *** $p < 0,001$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа – $F=3,79$; $p=0,045$

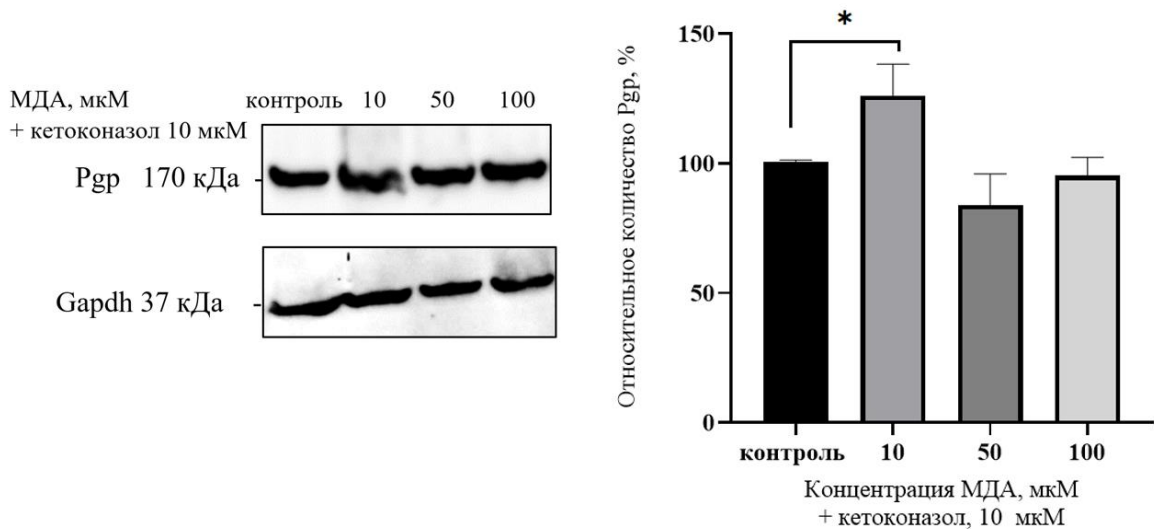


Рисунок 73 – Относительное количество Р-гликопротеина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии малонового диальдегида в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ в течение 24 ч в присутствии ингибитора PXR (кетоконазол, 10 мкМ)

Примечание: * – $p < 0,05$ – статистически значимые отличия от показателей контроля. Результаты дисперсионного анализа – $F=7,61$; $p=0,01$

При оценке принадлежности МДА к субстратам Pgp были получены следующие результаты. При воздействии на клетки Сасо-2 концентрации МДА 10 мкМ коэффициент кажущейся проницаемости Papp *b-a* МДА (характеризующий транспорт МДА за счет работы Pgp и пассивной диффузии) достоверно превышал коэффициент кажущейся проницаемости Papp *a-b* (характеризующий транспорт МДА за счет пассивной диффузии против работы Pgp) на 94,8% ($p=0,00001$), что демонстрирует асимметрию транспорта МДА, характерную для субстрата Pgp (Таблица 30).

Таблица 30 – Транспорт малонового диальдегида в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ при инкубации в течение 30 мин через билипидную мембрану клеток линии Сасо-2 без и в присутствии ингибитора Pgp верапамила ($M \pm SD$, см/сек)

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

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ – статистически значимые отличия от серии МДА без верапамила

Ингибитор Pgp – верапамил вызывал снижение коэффициента кажущейся проницаемости Papp *b-a* для МДА на 28,8% ($p=0,038$), что сопровождалось выравниванием уровня МДА по обе стороны мембраны ($p=0,018$).

Повышение концентрации МДА до 50 и 100 мкМ сопровождалось нивелированием асимметрии транспорта, коэффициенты кажущейся

проницаемости Papp b-a МДА достоверно не отличались от Papp a-b (Таблица 30). Добавление в транспортную среду верапамила также существенно не влияло на изучаемые показатели в этих сериях, отмечалось только снижение коэффициента кажущейся проницаемости Papp b-a при концентрации МДА 100 мкМ на 31,7% ($p=0,0091$) (Таблица 30).

Таким образом, МДА в концентрации 10 мкМ переносится Pgp, то есть является субстратом белка-транспортера. При увеличении концентрации МДА до 50 и 100 мкМ вклад Pgp в транспорт МДА уменьшается, так как, видимо, увеличивается его перенос путем пассивной диффузии. Полученные результаты свидетельствуют о том, что МДА - конечный продукт перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот, в концентрациях 10 и 50 мкМ и длительности экспозиции 24 ч повышает относительное количество и активность Pgp, действуя через транскрипционные факторы CAR и PXR.

3.9. Оценка роли Р-гликопротеина при развитии окислительного стресса

На заключительном этапе исследования оценивалась роль Pgp при развитии ОС. Для этого изучалась выживаемость клеток линии Сасо-2 при воздействии H_2O_2 (0,1-100 мкМ) и БСО (1-500 мкМ) в течение 24 ч на фоне индукции и ингибирования Pgp. Ингибирование белка-транспортера вызывали преинкубацией клеток в течение 30 мин с верапамилем (200 мкМ), индукцию – преинкубацией клеток в течение 24 ч с рифампицином (10 мкМ).

Жизнеспособность контрольных клеток принималась за 100%. Воздействие H_2O_2 приводило к снижению жизнеспособности клеток до 45,9% ($p=0,001$) и 65,7% ($p=0,002$) при концентрациях прооксиданта 50 и 100 мкМ соответственно.

Предварительная индукция Pgp повышала резистентность клеток к ОС, о чем свидетельствовало меньшее снижение их жизнеспособности: при воздействии H_2O_2 только в концентрации 100 мкМ на 26,7% ($p=0,0012$) относительно контроля и повышение показателя на 28,5% ($t=5,17$; $p=0,005$) и 40,7% ($t=8,23$; $p=0,001$) относительно серии применения H_2O_2 в концентрациях 50 мкМ и 100 мкМ

соответственно (Рисунок 74). При ингибировании белка-транспортера, наоборот, устойчивость клеток и их жизнеспособность снижалась при использовании всего диапазона концентраций 0,1-100 мкМ, максимально при 50 и 100 мкМ на 52,9% и 77,6% ($p < 0,0001$) соответственно относительно контроля. Стоит отметить, что при предварительном ингибировании Pgp и использовании H_2O_2 даже в минимальной концентрации 0,1 мкМ жизнеспособность клеток статистически значимо снижалась на 18,7% ($t=3,75$; $p=0,01$) относительно серии воздействия пероксида водорода (Рисунок 74).

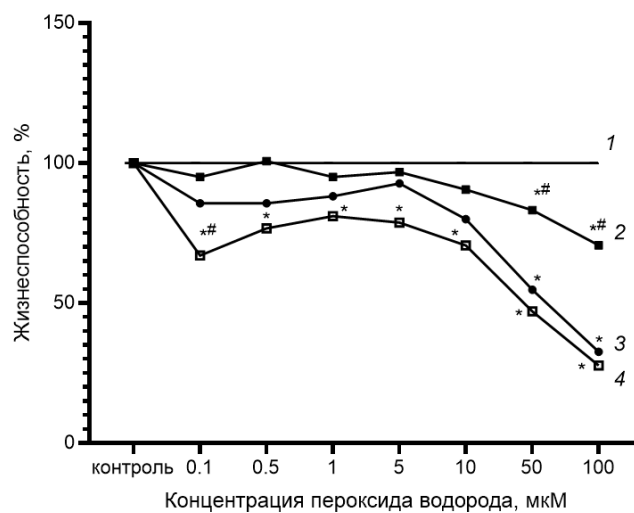


Рисунок 74 – Изменение жизнеспособности клеток в условиях моделирования окислительного стресса (3, H_2O_2), предварительной индукции (2, рифампицин, 10 мкМ) и ингибирования (4, верапамил, 200 мкМ) активности Р-гликопротеина при моделировании ОС, контроль принимали за 100 % (1)

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

Действие БСО в концентрациях 1-100 мкМ не приводило к изменению жизнеспособности клеток линии Сасо-2, а при концентрации 500 мкМ она статистически значимо снижалась на 23,9% ($p=0,003$) относительно значений контроля, принимаемых за 100%. В условиях моделирования эндогенного ОС на фоне предварительной индукции Pgp резистентность клеток возрастала. Так, жизнеспособность клеток при воздействии БСО в концентрации 500 мкМ и сроке

инкубации 24 ч при внесении рифампицина существенно не отличалась от значений контроля и была статистически значимо выше на 20,1% ($t=2,87$; $p=0,028$) относительно значений группы БСО 500 мкМ.

Применение для преинкубации ингибитора белка-транспортера (верапамил) снижало жизнеспособность клеток: при концентрации БСО 10 мкМ на 18,5% ($p=0,017$), 50 мкМ – 13,4% ($p=0,008$), 100 мкМ – 26,1% ($p=0,0004$), 500 мкМ – 45,6% ($p<0,0001$) относительно значений контроля. Важно отметить, что при предварительном ингибировании Pgp и использовании БСО в концентрациях 100 и 500 мкМ жизнеспособность клеток статистически значимо снижалась на 15,4% ($t=3,44$; $p=0,026$) и 28,4% ($t=5,103$; $p=0,0022$) также относительно серии воздействия прооксиданта (Рисунок 75).

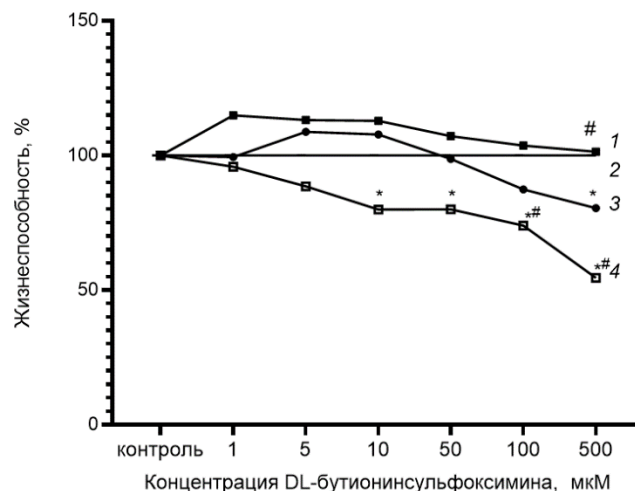


Рисунок 75 – Изменение жизнеспособности клеток в условиях моделирования окислительного стресса (3, БСО), предварительной индукции (1, рифампицин, 10 мкМ) и ингибирования (4, верапамил, 200 мкМ) активности Р-гликопротеина при моделировании ОС, контроль принимали за 100 % (2)

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

Полученные результаты свидетельствуют о том, что Pgp играет защитную роль в клетках при развитии экзогенного и эндогенного окислительного стресса, что способствует увеличению жизнеспособности клеток.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

P-гликопротеин (Pgp, *MDR1*, *ABCB1*) - АТФ-зависимый транспортер эффлюксного типа, который переносит широкий спектр гидрофобных соединений из клеток наружу. К его субстратам относятся эндогенные стероидные гормоны и ксенобиотики такие как широко используемые лекарственные средства (противоопухолевые препараты, ингибиторы ВИЧ-протеазы, новые оральные антикоагулянты, сердечные гликозиды, гистаминолитики). Pgp экспрессируется на апикальной мембране клеток в органах и тканях, участвуя в их барьерных и выделительных функциях.

Активность и экспрессия Pgp могут изменяться под воздействием различных химических и лекарственных веществ, факторов внешней и внутренней среды, физиологических и патологических процессов [442]. Например, рифампицин, дексаметазон индуцируют активность белка-транспортера, а циклоспорин, хинидин и верапамил ее ингибируют [21], что, в свою очередь ускоряет или замедляет удаление субстратов транспортера из клетки через цитоплазматическую мембрану.

Одним из факторов, влияющих на проницаемость цитоплазматической мембраны, является гиперпродукция АФК. АФК при взаимодействии с цитоплазматической мембраной клеток вызывают активацию ПОЛ, что приводит к образованию пор, уменьшению толщины бислоя, нарушению текучести и, следовательно, повышению ее проницаемости [127]. С другой стороны, гиперпродукция АФК и развитие ОС увеличивают экспрессию редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2 [66], который способен повысить экспрессию Pgp [273], ограничивающего проницаемость мембраны для субстратов, в том числе токсичных.

В ряде исследований показано, что повышение количества и активности Pgp отмечается при некоторых патологических состояниях, например, болезни Паркинсона [148], эпилепсии [202], онкологических заболеваниях (карцинома,

саркома, лимфома) [293] и др. При указанных патологиях ОС является одним из ключевых звеньев патогенеза.

В настоящее время имеются данные, что в условиях ОС активность и экспрессия Pgr изменяются [255, 287, 295, 296, 321], однако механизмы и биологическая роль данного явления не изучены.

В ходе выполнения представленного исследования изучалось функционирование, механизмы регуляции и биологическая роль Pgr в условиях экзогенного и эндогенного ОС *in vitro*.

Свободные радикалы представляют собой высокореактивные атомы или молекулы с одним или несколькими неспаренными электронами на внешней орбитали, которые могут образовываться в результате потери или принятия одного электрона при взаимодействии с кислородом, следовательно, действуя как окислители или восстановители. Термин АФК относится к реакционноспособным радикальным и нерадикальным производным кислорода. АФК вырабатываются всеми аэробными клетками и играют важную роль в клеточной сигнализации, старении и патогенезе различных заболеваний. Существуют экзогенные и эндогенные источники АФК:

- *Экзогенными источниками АФК* являются загрязнение воздуха и воды, тяжелые или переходные металлы, лекарственные препараты, промышленные растворители, пищевые продукты и радиация, химические вещества-прооксиданты, которые метаболизируются внутри организма в свободные радикалы. При этом следует учитывать, что воздействие ксенобиотиков стимулирует транскрипционные факторы CAR и PXR, которые активируют системы защиты.

- *Эндогенные источники АФК* включают NADPH⁺-оксидазу, миелопероксидазу, липоксигеназу, ангиотензин II, NADPH-оксидазу и являются основными источниками радикального супероксидного аниона (O₂^{•-}), который образуется в результате восстановления молекулярного кислорода электронами, поставляемыми NADPH⁺ во время клеточного дыхания.

Митохондрии являются основным источником внутриклеточных АФК за счет образования супероксидных радикалов при нормальном окислительном фосфорилировании. Митохондриальная продукция АФК специфична для тканей и клеточного цикла и увеличивается при старении [231]. Митохондриальный комплекс I и комплекс III ответственны за большую часть производства супероксида. Генерация АФК митохондриальным комплексом III, участвующим в цикле убихинона, регулирует активацию транскрипционных факторов, индуцируемых гипоксией (HIF) [95].

Другая внутриклеточная органелла, пероксисома, также является источником образования АФК в клетке. Как перекись водорода, так и супероксид образуются в пероксисомах с помощью пероксисомальных оксидаз, включая ацил-КоА-оксидазу и ксантинооксидазу [339]. Большая часть O_2^{\cdot} превращается в перекись водорода (H_2O_2) супероксиддисмутазой. H_2O_2 не является свободным радикалом, поскольку у него нет неспаренных электронов, но он способен образовывать высокореактивный гидроксильный ион OH^{\cdot} по реакции Фентона или Хабер–Вайса. Некоторые антиоксидантные ферменты, включая каталазу, глутатионпероксидазу, Cu,Zn-супероксиддисмутазу, эпоксидгидролазу и пероксиредоксин I [397], присутствуют в пероксисомах, поэтому эндогенный ОС может возникать в результате снижения количества или активности антиоксидантных ферментов.

Нейтрофилы, макрофаги, фагоцитарные клетки являются эндогенными источниками АФК, используя NADPH-оксидазу [113].

Исходя из того, что по этиологии ОС бывает двух типов, в представленном исследовании были использованы следующие методические подходы для моделирования ОС *in vitro*:

- *Экзогенное воздействие прооксиданта* – пероксида водорода (H_2O_2) в диапазоне концентраций 0,1-100 мкМ;
- *Эндогенная продукция АФК* в результате ингибирования компонента антиоксидантной системы – глутатиона. Бутионинсульфоксимин (БСО) в

концентрациях 1-500 мкМ использовали в качестве селективного ингибитора γ -глутамилцистеинсинтетазы – ключевого фермента синтеза глутатиона.

По интенсивности ОС классифицируют как физиологический (эустресс), так и токсический (дистресс), в ходе которого повреждаются биомолекулы, поэтому нами был выбран широкий диапазон концентраций для используемых химических веществ.

Период распада H_2O_2 составляет от миллисекунд до секунд, что позволяет ему проникать в клетку сквозь мембрану и оказывать внутриклеточное воздействие, вследствие чего H_2O_2 может действовать как вторичный посредник [361]. В то же время неконтролируемое взаимодействие H_2O_2 с переходными металлами (Fe^{2+} или Cu^+) по реакции Фентона приводит к образованию АФК. В свою очередь АФК могут быть нейтрализованы антиоксидантными системами или накапливаться в клетках, вызывая ОС, что приводит к повреждению белков, липидов, ДНК, мутагенезу и гибели клеток.

Продукцию АФК подтверждали по интенсивности флуоресценции Mito tracker Red CM H₂XROS. При моделировании экзогенного ОС были получены следующие результаты. Воздействие H_2O_2 сопровождалось повышением уровня АФК, которое наблюдалось уже через 3 ч во всем диапазоне концентраций 0,1-100 мкМ и приводило к развитию ОС, о чем свидетельствует нарастание концентрации карбонильных производных белков. Максимальной выраженности ОС достигал через 24 ч, и сопровождался увеличением концентрации окисленных белков и липидов, однако к 72 ч наблюдалось снижение уровня карбонильных белков.

Снижение выраженности ОС к 72 ч, скорее всего, связано с активацией системы защиты клетки от ОС, о чем свидетельствует повышение уровня Nrf2 и антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы (при воздействии в течение 24 ч в концентрациях 0,1-1 мкМ, при воздействии в течение 72 ч – в концентрации 10-50 мкМ).

Nrf2 – редокс-чувствительный транскрипционный фактор, реагирующий на изменение соотношения восстановленных и окисленных SH-групп в белках. Его

экспрессия повышается при развитии ОС и направлена на защиту клетки от воздействия свободных радикалов. В условиях нормы данный транскрипционный фактор находится в комплексе с белком-репрессором Кеар 1 (их связывание регулируется рядом протеинкиназ), который, с одной стороны, способствует убиквитированию и протеосомальной деградации Nrf2 (необходимым условием для этого процесса является наличие двух остатков цистеина в молекуле Кеар 1), а с другой – предотвращает его проникновение из цитоплазмы в ядро. После активации комплекс Кеар1-Nrf2 диссоциирует, и Nrf2 транслоцируется в ядро, где связывается с ARE и активирует транскрипцию антиоксидантных ферментов [45].

Концентрация H_2O_2 100 мкМ являлась токсичной для клеток линии Сасо-2, вызывала максимальное повышение уровня карбонильных производных белков без активации защитных механизмов и снижение жизнеспособности клетки.

Изучение активности Pgp показало, что воздействие пероксида водорода в течение 3 ч на клетки линии Сасо-2 в концентрациях 0,1-5 мкМ существенно не влияло на функционирование белка-транспортера Pgp и на проницаемость клеточного монослоя для его субстрата – фексофенадина, что свидетельствует о сохранении функциональной активности Pgp на фоне эустресса. Повышение концентрации H_2O_2 до 10-50 мкМ сопровождалось снижением активности Pgp, при этом количество белка-транспортера не изменялось, и сохранялась целостность клеточного монослоя. Снижение функциональной активности Pgp может быть связано с окислительным повреждением белковой молекулы транспортера, так как в его состав входят SH-группы цистеина и метионина - доля около 3%, аспартата - 4,4%, валина – 7,5%, лейцина – 9,4%, серина – 6,8%, треонина – 5,4%, триптофана - 1% [44, 353, 406]. Увеличение концентрации прооксиданта до 100 мкМ приводило к уменьшению количества и активности Pgp на фоне усиления ОС, а также к снижению жизнеспособности клеток.

При инкубировании клеток линии Сасо-2 с пероксидом водорода в течение 24 ч было показано, что H_2O_2 уже в концентрациях 0,1–1 мкМ снижал содержание белковых SH-групп. Однако при этом происходило повышение количества Pgp, что

видимо предотвращало снижение активности белка-транспортера - данный показатель достоверно не отличался от контроля, несмотря на окислительное повреждение аминокислот в его молекуле. Добавление глутатиона в концентрации 1 мМ нивелировало данные изменения, что свидетельствует о вкладе ОС в регуляцию Pgp. Увеличение концентрации H_2O_2 до 5–10 мкМ сопровождалось усилением ОС, и приводило к снижению уровня Pgp до величин нормы и уменьшению по сравнению с контролем активности белка-транспортера при концентрации прооксиданта 10 мкМ. В концентрациях H_2O_2 50–100 мкМ наблюдалось дальнейшее усугубление ОС, снижение жизнеспособности клеток, что сопровождалось уменьшением количества Pgp при концентрации прооксиданта 100 мкМ.

При воздействии H_2O_2 в течение 72 ч и концентрациях 0,1-5 мкМ изменений уровня белковых SH-групп зафиксировано не было, а в концентрации 10 мкМ отмечалось его повышение, что вызывало увеличение количества Nrf2 по классическому механизму [189]. Данный транскрипционный фактор стимулировал увеличение содержания, а в следствие этого и активности Pgp, что проявлялось в повышении транспорта субстрата белка-транспортера из базолатеральной камеры трансвелл-системы в апикальную (за счет пассивной диффузии и функционирования Pgp). Транспорт фексофенадина из апикальной камеры в базолатеральную (за счет пассивной диффузии против работы белка-транспортера) не изменился. Скорее всего, это связано с тем, что при воздействии H_2O_2 в концентрации 10 мкМ на клетки увеличивается проницаемость билипидной мембраны, но повышение активности Pgp нивелирует данное нарушение. Увеличение концентрации H_2O_2 до 50 и 100 мкМ усиливало ОС, количество Pgp снижалось, при этом уровень Nrf2 оставался повышенным, что, скорее всего, связано с локализацией изучаемых белков. Pgp находится преимущественно в цитоплазматической мембране, подверженной воздействию H_2O_2 в первую очередь, а Nrf2 – в цитоплазме и ядре [443], которые более защищены от воздействия прооксиданта в инкубационной среде. Снижение количества Pgp и

повреждение билипидной мембраны в условиях ОС (концентрация H_2O_2 50 и 100 мкМ) приводило к повышению транспорта субстрата белка-транспортера фексофенадина через цитоплазматическую мембрану как из базолатеральной камеры в апикальную, так и наоборот – из апикальной в базолатеральную. Причем значение коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} \text{ } b-a$ соответствовало коэффициенту кажущейся проницаемости $P_{app} \text{ } a-b$, что показывает нарушение ассиметрии транспорта, характерной для субстратов Pgp. Биохимические изменения при воздействии H_2O_2 в концентрациях 50 и 100 мкМ сопровождались существенным ростом гибели клеток, зафиксированной по результатам МТТ-теста.

Таким образом, при воздействии H_2O_2 в течение 3, 24 и 72 ч на монослой клеток линии Сасо-2 отмечалось сначала увеличение функциональной активности Pgp, а затем при повышении концентрации прооксиданта до 50-100 мкМ нарушалась целостность клеточного монослоя и отмечалось нарастание транспорта субстрата Pgp фексофенадина через мембрану за счет пассивной диффузии в обоих направлениях.

Однако есть и ряд отличий между временными точками инкубации. Кратковременное воздействие H_2O_2 в течение 3 ч в концентрации 10-50 мкМ снижало активность (но не количество) Pgp и уменьшало эффлюкс его субстрата, опосредованный данным белком-транспортером, при сохранении целостности клеточного монослоя. При длительности воздействия пероксида водорода 24 ч (0,1-1 мкМ) и 72 ч (10 мкМ) клетки начинали адаптироваться к возникшим патологическим условиям, повышая количество Pgp. Увеличение концентрации прооксиданта до 50-100 мкМ приводило к снижению уровня Pgp и нарушению целостности клеточного монослоя, что в совокупности вызывает повышение транспорта фексофенадина через мембрану в обе стороны.

Следует отметить, что в исследовании [321] на культуре крысиных гепатоцитов было показано, что H_2O_2 в концентрации 0,5–1 мМ при инкубации в течение 72 ч вызывал повышение количества Pgp, экспрессии его гена и активности белка-транспортера. В работе [296] выявлено, что H_2O_2 в концентрации до 500 мкМ

при воздействии в течение 48 ч на первичную культуру эндотелия крыс повышал экспрессию Pgp и в меньшей степени влиял на активность белка-транспортера. В то же время [287] установлено, что обработка клеток hCMEC/D3 (модель гематоэнцефалического барьера *in vitro*) H₂O₂ в концентрации 0,5–5 мМ при экспозиции 20 мин снижала транспортную активность Pgp. В исследовании на культуре эндотелиальных клеток сосудов головного мозга крыс было показано, что пероксид водорода в концентрации 200 мкМ вызывал развитие ОС и повышал экспрессию мРНК генов *mdr1a* и *mdr1b*, кодирующих Pgp, а также синтез самого белка Pgp. Предварительная обработка клеток полиэтиленгликолем-каталазой нивелировало данные изменения [295].

В отличие от ряда процитированных работ, в нашем исследовании, несмотря на повышение количества Pgp при воздействии H₂O₂ в течение 24 ч, активность белка-транспортера не изменялась. Данные различия могут быть связаны с разной длительностью экспозиции, концентрацией H₂O₂, типами клеток, используемыми в исследованиях, а также методиками оценки активности Pgp. В рамках настоящего исследования также были изучены возможные механизмы увеличения количества белка-транспортера в условиях ОС.

На данный момент известно несколько механизмов регуляции Pgp, основным из которых является изменение экспрессии гена *MDR1*, кодирующего белок-транспортер [335]. В ходе настоящего исследования была оценена роль транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR, которые активируются при ОС [4, 9, 33, 41] и гипотетически могут повышать количество Pgp за счет экспрессии гена *MDR1*.

Поэтому следующим этапом исследования явилось установление механизмов, приводящих к повышению количества Pgp в условиях экзогенного ОС с использованием ингибиторов транскрипционных факторов Nrf2 – АЕМ1, HIF1 α – КС7F2, CAR – СІNPA1, PXR – кетоконазола.

Сигнальный путь Nrf2 считается основным механизмом регуляции антиоксидантной защиты клетки при ОС. В физиологических условиях ядерный

фактор транскрипции Nrf2 входит в состав комплекса Keap1-Nrf2-Cullin-3, что обеспечивает его локализацию в цитозоле и блокирует специфическую активность. Nrf2 является редокс-чувствительным транскрипционным фактором, при окислении SH-групп в составе Keap1 происходит активация фактора, его транслокация в ядро и изменение биологических эффектов – индукция антиоксидантных ферментов [275].

Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF) – это транскрипционный фактор, играющий ключевую роль в адаптации клеток к снижению содержания кислорода в тканях [344]. HIF1 представляет собой гетеродимер, состоящий из двух белковых субъединиц – HIF1 α и HIF1 β . Функциональный статус HIF1 определяется экспрессией и активностью его α -субъединицы, регуляция которой осуществляется на нескольких уровнях: транскрипции, трансляции, посттрансляционных изменений, транслокации в ядро [215]. В условиях нормоксии кислород-зависимые пролингидроксилазы модифицируют пролин в структуре HIF1 α . При ОС пролингидроксилазы неактивны, в этих условиях α - и β -субъединицы способны связываться друг с другом, проникать в ядро и активировать экспрессию целевых генов.

Конститутивный андростановый рецептор (CAR, NR1I3, подсемейство 1, группа I, член 3) и прегнан-Х-рецептор (PXR, steroid and xenobiotic receptor – SXR, R1I2 – Nuclear Receptor Subfamily 1, Group I, Member 2) – входят в суперсемейство ядерных рецепторов, представленное в основном факторами транскрипции [277].

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

Роль Nrf2 в регуляции Pgp оценивали с использованием AEM1 (*англ.: ARE expression modulator 1*), который блокирует взаимодействие Nrf2 с ARE и подавляет экспрессию генов, контролируемых данным транскрипционным фактором. В ходе исследования показано, что AEM1 блокировал способность H₂O₂ индуцировать

Pgr во всех применяемых концентрациях и сроках экспозиции.

Ингибитор HIF1 α KC7F2 (*англ.: controls the biological activity of HIF1 α*) – представляет собой симметричное соединение, которое избирательно подавляет клеточный синтез белка HIF1 α , но не HIF1 β , не влияя на транскрипцию мРНК HIF1 α или стабильность белка HIF1 α . KC7F2 при воздействии H₂O₂ в течение 24 ч нормализовал количество Pgr, препятствуя индуцирующему действию прооксиданта, а при воздействии в сочетании с H₂O₂ в течение 72 ч не оказывал значимого эффекта (относительное количество Pgr возрастало под действием пероксида водорода).

Таким образом, два транскрипционных фактора – Nrf2 и HIF1 α принимают участие в регуляции Pgr при развитии экзогенного ОС. Можно предположить, что оба фактора могут связываться с промотором гена *MDR1*, кодирующего Pgr, и повышать его экспрессию. Ранее нами было показано, что при развитии ОС Nrf2 вызывает повышение экспрессии HIF1 α [33], то есть действие Nrf2 может реализоваться через HIF1 α . Поскольку ингибирование Nrf2, в отличие от HIF1 α , препятствовало индукции Pgr при инкубации в течение 24 и 72 ч в условиях экзогенного ОС, то в клетке, видимо, одновременно функционируют два описанных механизма.

В представленной работе в качестве ингибитора CAR использовали CINPA1 (*англ.: CAR inhibitor not PXR activator 1*), который взаимодействует и блокирует лиганд-связывающий домен CAR и подавляет его соединение с коактиваторами [91]. Для ингибирования PXR использовали противогрибковый препарат группы азолов – кетоконазол, который взаимодействует с областью AF-2 (*англ.: activation function*) на N-концевом лиганд-связывающем домене PXR и таким образом подавляет его активацию [57].

CINPA 1 не подавлял индукцию Pgr под действием H₂O₂ при инкубации в течение 24 ч, а при воздействии в течение 72 ч препятствовал повышению уровня Pgr. Показано, что H₂O₂ вызывает индукцию CAR [9], который, в свою очередь, видимо, повышает экспрессию Pgr при экспозиции длительностью 72 ч.

Ингибитор PXR кетоконазол, применяемый совместно с H_2O_2 , не подавлял эффект индуктора ОС.

Таким образом, в повышении количества Pgr при развитии экзогенного ОС, вызванного инкубацией клеток линии Caco-2 с H_2O_2 , вероятно, первостепенная и доминирующая роль принадлежит сигнальному пути Nrf2-Keap1, который участвует в регуляции белка-транспортера при длительности воздействия как 24, так и 72 ч. Транскрипционный фактор NIF принимает участие в регуляции Pgr при действии прооксиданта в течение 24 ч, а транскрипционный фактор CAR – при времени инкубации 72 ч. PXR, видимо, не вносит существенный вклад в регуляцию белка-транспортера при данной модели ОС.

АФК вызывают повреждение белков и липидов, причем продукты пероксидации можно рассматривать не только в качестве маркеров ОС, но и сигнальных молекул.

МДА является основным и наиболее изученным продуктом перекисного окисления ПНЖК. При этом МДА способен нарушать функционирование клеток благодаря своей способности вступать в реакцию с такими молекулами, как ДНК и белки [112]. В рамках настоящего исследования проверялась гипотеза о том, что МДА является субстратом Pgr (то есть Pgr может выводить МДА из клеток, защищая их от его токсического воздействия), а также способен модулировать активность данного белка-транспортера. Было показано, что МДА при длительности воздействия 24 ч в концентрациях 10 и 50 мкМ вызывает повышение количества Pgr, что сопровождается также увеличением активности белка-транспортера.

Однако, при длительности преинкубации 30 мин МДА в тех же концентрациях не влиял на активность белка-транспортера, определяемую по транспорту его маркерного субстрата фексофенадина, что свидетельствует о том, что молекула МДА непосредственно на Pgr не воздействует, то есть не является его прямым ингибитором.

Для изучения механизмов повышения относительного количества Pgp под действием МДА была изучена роль PXR и CAR. Известно, что данные транскрипционные факторы имеют важное значение в индукции ферментов биотрансформации и белков-транспортеров под действием ксенобиотиков [408]. В наших исследованиях установлено, что развитие ОС может приводить к повышению количества PXR [41] и CAR [9].

Ингибирование CAR предотвращало индукцию Pgp при использовании всех изученных концентраций МДА, а блокирование PXR нивелировало стимулирующий эффект МДА только в концентрации 50 мкМ. Полученные результаты свидетельствуют о том, что МДА может индуцировать Pgp через активацию CAR и PXR, при этом вклад CAR, видимо, является более существенным [26].

При тестировании МДА на принадлежность к субстратам Pgp, было показано, что в концентрации 10 мкМ белок-транспортер принимает участие в транспорте продукта пероксидации. При увеличении концентрации МДА до 50 и 100 мкМ вклад Pgp в транспорт МДА уменьшается, так как, видимо, увеличивается его транспорт путем пассивной диффузии. Молекула МДА имеет небольшую молекулярную массу и легко может проходить через монослой клеток [124, 141].

Согласно данным литературы, субстратами Pgp, в основном, являются вещества с молекулярной массой выше 300 Да [260]. Молекулярная масса МДА составляет 72 Да. Логично было бы предположить, что транспортируется не сама молекула, а продукт взаимодействия МДА с каким-либо эндогенным фосфолипидным компонентом. Но детектирование МДА методом ВЭЖХ-МС/МС по авторской методике [32] исключает это предположение.

На заключительном этапе исследования была оценена роль Pgp в защите клеток при экзогенном ОС. Для этого в ходе МТТ-теста оценивалась выживаемость клеток Сасо-2 при индукции и ингибировании Pgp на фоне экзогенного ОС. Было показано, что индукция Pgp рифампицином повышает выживаемость клеток, а ингибирование верапамилом – ее снижает.

Моделирование эндогенного ОС осуществляли с помощью DL-бутионинсульфоксимины, который ингибирует γ -глутамилцистеинсинтетазу, играющую ключевую роль в синтезе и поддержании клеточного уровня глутатиона. Глутатион – тиолсодержащий трипептид, обладающий собственной антиоксидантной активностью, а также необходимый для функционирования антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы, глутатион-S-трансферазы). Снижение уровня эндогенного глутатиона уменьшает емкость эндогенной антиоксидантной системы, что приводит к развитию ОС. Воздействие БСО повышало концентрацию АФК только к 24 ч экспозиции, когда происходило истощение эндогенного пула глутатиона, что подтверждалось в нашем исследовании при детекции АФК по интенсивности флюоресценции Mito tracker Red CM H₂XROS. Повышение концентрации АФК приводило к развитию ОС, о чем свидетельствовало увеличение концентрации карбонильных производных белков через 24 и 72 ч инкубации. В условиях ОС наиболее чувствительна к действию АФК аминокислота – цистеин. Цистеин может входить как в состав белков (белковые тиолы), так и небелковых сульфгидрилов (небелковые тиолы). Небелковые SH-группы в основном представлены глутатионом [65], поэтому оценку степени ингибирования синтеза глутатиона проводили по изменению их уровня.

При воздействии БСО в течение 3 ч в концентрациях 1-500 мкМ уровень небелковых SH-групп не изменялся. При увеличении длительности экспозиции до 24 и 72 ч и концентрации БСО 10-500 мкМ - снижался относительно значений контроля. Полученные результаты подтверждают адекватность выбранной модели эндогенного ОС.

При ОС АФК взаимодействуют с простыми белками, в результате чего происходит модификация полипептидной цепи по аминокислотным остаткам [19]. Одной из наиболее важных и изученных является модификация цистеина. Атом серы тиольной группы (-SH) имеет несколько состояний окисления, поэтому модификация боковой цепи, содержащей цистеин, происходит до различных

продуктов [154, 323]. Важность оценки окисления данной аминокислоты обусловлена тем, что цистеин встречается в виде консервативного остатка в функциональных участках белков, что позволяет рассматривать реакционноспособные SH-группы протеинов в качестве регуляторных центров [13, 307].

В ходе выполненного исследования было показано, что при воздействии БСО в течении 3 ч концентрация белковых SH-групп не изменялась. При увеличении времени инкубации до 24 и 72 ч отмечалось снижение их содержания при концентрациях БСО 10-500 мкМ.

Необратимыми белковыми продуктами ОС являются карбонильные производные белков, которые формируются за счет окисления нескольких аминокислотных остатков, а также взаимодействия с продуктами ПОЛ и редуцирующими сахарами, вследствие чего могут рассматриваться в качестве конечного продукта окислительного повреждения [19, 363].

Уровень карбонильных производных белков не изменялся при инкубации клеток с БСО в концентрациях 1-500 мкМ и времени экспозиции 3 ч, а также при концентрациях 1 и 5 мкМ и длительности воздействия 24 и 72 ч. Инкубация клеток линии Сасо-2 с БСО в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ в течение 24 и 72 ч приводила к увеличению уровня карбонильных производных белков относительно контрольных значений.

Таким образом, при воздействии БСО в концентрациях 10-500 мкМ в течение 24 и 72 ч на клетки линии Сасо-2 наблюдалось снижение уровня небелковых SH-групп (за счет глутатиона), что приводило к развитию эндогенного ОС, характеризующегося повреждением белков по SH-группам и формированием карбонильных производных белков.

Развитие эндогенного ОС сопровождалось активацией защитных систем организма, о чем свидетельствовало повышение уровня транскрипционного фактора Nrf2 при воздействии БСО в течение 24 ч в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ и в течение 72 ч в концентрациях 50 и 100 мкМ. Nrf2, в свою очередь,

опосредовал повышение уровня антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы.

Токсичной для клеток линии Сасо-2 являлась концентрации БСО 500 мкМ: при данной концентрации наблюдался максимальный уровень карбонильных производных белков и снижение жизнеспособности клеток по данным МТТ-теста, без активации защитных механизмов.

Интересно отметить, что повышение уровня глутатионпероксидазы не приводило к снижению выраженности эндогенного ОС, регистрируемого по концентрации карбонильных производных белков при увеличении экспозиции до 72 ч по сравнению с 24 ч воздействием. Скорее всего, это связано с тем, что БСО снижает концентрацию глутатиона – субстрата, необходимого для работы антиоксидантного фермента глутатионпероксидазы. Поэтому несмотря на повышение уровня антиоксидантного фермента, выполнять свою функцию он не был способен.

При воздействии БСО в течение 3 ч (1-500 мкМ) количество Pgp статистически значимо не изменялось. Уровень Pgp при воздействии БСО в течение 24 ч в концентрациях 1, 5 и 500 мкМ не изменялся, но возрастал при концентрациях 10, 50 и 100 мкМ. При воздействии БСО в течение 72 ч и концентрациях 1-100 мкМ количество Pgp не изменялось, а при 500 мкМ - снижалось.

При сочетанном использовании 1 мМ глутатиона и БСО в концентрации 100 мкМ и инкубации в течение 24 ч относительное количество Pgp возрастало по сравнению с контролем, однако это повышение было менее выраженным, чем при изолированном применении прооксиданта. При этом глутатион предотвращал повышение уровня Pgp, вызванное воздействием БСО в течение 24 ч в более низких концентрациях 10 и 50 мкМ. Частичное, а не полное подавление индукции Pgp под действием глутатиона, может быть связано с тем, что БСО, будучи ксенобиотиком, сам может повышать количество Pgp за счет стимуляции экспрессии гена *MDR1*.

Воздействие БСО в концентрациях 50, 100 и 500 мкМ в течение 3 ч приводило к снижению $R_{app} b-a$ и отношения $R_{app} b-a / a-b$, что свидетельствовало о снижении активности белка-транспортера.

При увеличении длительности экспозиции до 24 ч было показано, что БСО в концентрации 10 мкМ вызывал увеличение $R_{app} b-a$ и отношения $R_{app} b-a / a-b$, что характеризовало повышение активности Pgp. Через 24 ч инкубации отмечалось также увеличение количества Pgp, что может указывать на индукцию Pgp за счет синтеза белка, а не его активации.

При концентрации БСО 50 мкМ отмечалось снижение отношения $R_{app} b-a / a-b$, а в концентрации 100 мкМ уменьшение $R_{app} b-a$ и отношения $R_{app} b-a / a-b$, что свидетельствовало о снижении активности белка-транспортера, несмотря на увеличение его количества.

Дальнейшее повышение концентрации БСО до 500 мкМ приводило к увеличению $R_{app} b-a$ и $a-b$, при этом отношение $R_{app} b-a / a-b$ уменьшалось по сравнению с контролем, что характерно для снижения активности Pgp, повреждения клеточного монослоя и повышения транспорта фексофенадина – субстрата белка-транспортера через мембрану в обе стороны.

Воздействие БСО в концентрациях 50 и 100 мкМ в течение 72 ч приводило к снижению коэффициента кажущейся проницаемости $b-a$ и отношения $R_{app} b-a / a-b$, что указывало на снижение активности белка-транспортера.

При увеличении концентрации БСО до 500 мкМ отмечалось увеличение $R_{app} b-a$ и $a-b$, при этом отношения $R_{app} b-a / a-b$ снижались по сравнению с контролем, что свидетельствовало о снижении активности Pgp, повреждении клеточного монослоя и повышении транспорта фексофенадина – субстрата белка-транспортера через мембрану, как внутрь клетки, так и из клетки.

При моделировании эндогенного ОС с помощью ингибитора синтеза глутатиона – БСО были получены противоречивые результаты в отношении функциональной активности Pgp (снижение функциональной активности без изменения количества) при кратковременном воздействии - 3 ч и при инкубации 24

ч и концентрации БСО 100 мкМ. Одной из возможных причин полученных результатов может являться наличие собственной ингибирующей активности у БСО, что не было ранее изучено и стало одной из задач настоящего исследования.

В нашем исследовании на клетках линии Сасо-2 установлено, что БСО в концентрациях выше 50 мкМ является прямым ингибитором Pgp (снижает активность белка-транспортера и не изменяет его количество), однако по своей активности уступает классическому ингибитору белка-транспортера – хинидину и сходен по показателю с IC_{50} (концентрация полумаксимального ингибирования) с верапамилом.

Согласно общепринятым представлениям, ингибиторы Pgp чаще всего, имеют в своей структуре третичный атом азота, являются ароматическими соединениями или гетероциклами [308].

БСО (2-амино-4-(бутилсульфонимидоил) бутановая кислота) – представляет собой производное сульфоксимины, имеет молекулярную массу 222,305 кДа и третичный атом азота в структуре. Следовательно, полученные результаты согласуются с классическими представлениями об ингибиторах Pgp.

Таким образом, в ходе настоящего исследования впервые на линии клеток Сасо-2 был установлен прямой ингибирующий эффект DL-бутионинсульфоксимины на Pgp, не сопровождающийся изменением его количества.

Анализ результатов позволяет заключить, что при кратковременном воздействии БСО (3 ч) отмечалось его ингибирующее действие на Pgp, не связанное с изменением его количества, связанное с прямым ингибированием белка-транспортера. При увеличении времени инкубации до 24 ч и концентрации БСО до 10 мкМ активность Pgp возрастала и сопровождалась увеличением его количества. При повышении концентрации БСО до 50 и 100 мкМ и длительности воздействия 24 и 72 ч отмечалось снижение активности Pgp, что могло быть результатом повреждения молекулы белка-транспортера за счет усиления выраженности ОС (снижение концентрации белковых SH-групп и других

аминокислотных остатков), а также прямой ингибирующей активности БСО. При концентрации БСО 500 мкМ и длительности воздействия 24 и 72 ч отмечалось усиление ОС, повреждение целостности клеточного монослоя и повышение транспорта фексофенадина – субстрата белка-транспортера через мембрану в обе стороны.

Полученные результаты согласуются с рядом научных работ. Использование БСО в качестве ингибитора синтеза глутатиона было продемонстрировано на клеточной линии рака желудка (SNU-1) и рака яичников (OVCAR-3). БСО в концентрациях 1 мМ и 2 мМ в течение 48 ч приводил к снижению внутриклеточной концентрации небелковых тиолов более чем на 70%, на восстановление которых требовалось около 3 дней после удаления ингибитора синтеза глутатиона [129].

В исследованиях [427] было показано, что во время снижения уровня глутатиона клетки гематоэнцефалического барьера подвергаются хроническому ОС [427]. Поэтому истощение пула глутатиона имеет важное значение в патогенезе неврологических заболеваний, которые характеризуются изменением активности Pgp. Именно поэтому авторы оценивали эффект БСО на экспрессию Pgp в первичных культурах эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга крыс: при концентрации 200 мкМ повышалась активность белка-транспортера, оцененная по транспорту родамина, а при концентрации более 400 мкМ проявлялся токсический эффект [427]. Было показано, что воздействие БСО увеличивало содержание мРНК *MDR1* через 48 ч, эффект предотвращался поглотителем АФК N-ацетилцистеином [427].

В экспериментах *in vivo* было показано, что снижение уровня глутатиона повышало экспрессию мРНК *mdr1a* в гематоэнцефалическом барьере крыс, тогда как значительных изменений в экспрессии мРНК *mdr1b* обнаружено не было [165].

В представленном исследовании механизмы, приводящие к повышению количества Pgp в условиях эндогенного ОС, изучали с использованием ингибиторов транскрипционных факторов Nrf2 – AEM1, HIF1 α – KC7F2, CAR –

CINPA1, PXR – кетоконазола, стимулирующих экспрессию гена *MDR1*, кодирующего Pgp.

Добавление к клеткам АЕМ1 в сочетании с БСО (10, 50 и 100 мкМ) при инкубации в течение 24 ч препятствовало повышению относительного количества Pgp (уровень белка-транспортера не отличался от значений в контроле). Добавление КС7F2 и CINPA 1 к клеткам, инкубируемым с БСО (10, 50 и 100 мкМ), приводило к нормализации относительного количества Pgp - его уровень не отличался статистически значимо от уровня в контроле. Кетоконазол предотвращал повышение количества Pgp под действием БСО в концентрации 100 мкМ и не влиял на эффекты прооксиданта в концентрациях 10 и 50 мкМ, уровень Pgp повышался по сравнению с контролем. Таким образом, при развитии эндогенного ОС, вызванного воздействием БСО в регуляции Pgp принимают участие все изученные транскрипционные факторы – Nrf2, NIF1 α , CAR и PXR [23].

Повышение активности и количества Pgp в условиях эндогенного ОС имеет важное цитопротекторное действие. Так, по результатам МТТ-теста было доказано, что индукция Pgp, вызванная рифампицином, повышает выживаемость клеток при эндогенном ОС, а ингибирование, вызванное верапамилом – ее снижает. Важно отметить, что в условиях эндогенного ОС концентрация продуктов ПОЛ статистически значимо не изменялась при воздействии БСО в течение 24 ч, то есть при повышении количества и активности Pgp. Данный феномен объясняется тем, что МДА при определенных концентрациях может транспортироваться Pgp. Таким образом, биологическое значение индукции Pgp под действием МДА определяется его эффлюксной и цитопротекторной функциями, что обеспечивает выведение токсичного продукта перекисидации из клеток во внеклеточное пространство, в результате чего увеличивается жизнеспособность клеток [28].

Таким образом, краковременный эндогенный и экзогенный ОС (3 ч) приводили к снижению активности Pgp, без изменения его количества при действии БСО 1-500 мкМ и H₂O₂ в концентрации 0,1-50 мкМ, при этом активации изучаемых транскрипционных факторов не происходило, однако механизм

выявленных изменений разный. Так, при экзогенном воздействии прооксиданта - H_2O_2 , наблюдалась интенсивная продукция АФК, которые в первую очередь повреждают клеточную мембрану, где локализуется Pgp. Окисление белковой молекулы транспортера способствовало снижению его количества при воздействии H_2O_2 в концентрации 100 мкМ. В свою очередь, влияние БСО (модулятора эндогенного ОС) не приводило к выработке АФК, так как за столь короткое время инкубации не происходило ингибирование синтеза глутатиона. Снижение функциональной активности Pgp обусловлено тем, что БСО оказал прямой ингибирующий эффект на белок-транспортер.

При увеличении времени экспозиции до 24 ч, в условиях моделирования экзогенного и эндогенного ОС функциональная активность и количество Pgp возрастали, достигая максимального эффекта, при этом механизм индукции Pgp на фоне экзогенного ОС преимущественно опосредован Nrf2, а в условиях эндогенного - Nrf2, HIF1 α , CAR, PXR.

Долговременное воздействие модуляторов экзогенного и эндогенного ОС (24 и 72 ч) в высоких концентрациях (H_2O_2 50-100 мкМ и БСО 500 мкМ) приводило к усугублению процессов пероксидации, накоплению продуктов повреждения белков и липидов, снижению функционирования и количества Pgp, что сопровождалось низкой жизнеспособностью клеток. Установлено, что концентрация H_2O_2 10 мкМ при воздействии длительностью 72 ч оказалась регуляторной – повышались и активность, и количество Pgp, при долговременном эндогенном ОС регуляторных концентраций БСО выявлено не было.

При анализе механизмов регуляции Pgp необходимо учитывать, что продукты пероксидации могут стимулировать транскрипционные факторы, которые способны взаимодействовать между собой. Так, нами на клетках линии Сасо-2 показано, что H_2O_2 при воздействии 24 ч в концентрациях 10 и 50 мкМ вызывает развитие ОС, сопровождающееся увеличением уровней CAR и Nrf2, а в концентрации 100 мкМ приводит к их снижению. Nrf2 не участвует в регуляции CAR [34]. Уровень CAR в условиях ОС связан с уровнем внутриклеточного МДА.

Транскрипционный фактор Nrf2 в условиях ОС играет защитную роль за счёт активации синтеза антиоксидантных ферментов [45]. На основе полученных данных можно предположить, что Nrf2 напрямую не влияет на индукцию CAR, однако оказывает опосредованное действие — при снижении его количества усугубляется ОС, увеличивается уровень МДА и вследствие этого повышается количество CAR. В свою очередь активация CAR может приводить не только к индукции Pgr, но и самостоятельно участвовать в адаптивных процессах за счёт стимулирующего действия (концентрация карбонильных производных белков снижается). Одним из гипотетических механизмов данного эффекта может являться повышение экспрессии антиоксидантного фермента глутатион-S-трансферазы под действием CAR [313].

В условиях моделирования эндогенного ОС нами было доказано положительное воздействие Nrf2 на HIF1 α , который, в свою очередь, играет защитную роль. Согласно данным литературы, протекторное действие HIF1 α при развитии ОС может реализовываться следующим образом. HIF1 α снижает выработку клеточных АФК, переключая выработку энергии с окислительного фосфорилирования на гликолиз несколькими путями [351]. Так, HIF1 α подавляет митохондриальное дыхание и активность цепи переноса электронов путем активации транскрипции miRNA201, что снижает экспрессию белков сборки кластеров железа и серы ISCU1/2 и NDUFA4L2 и, соответственно, активность комплекса I [247]. Кроме того, известно, что HIF1 активирует киназу пируватдегидрогеназы, которая ингибирует пируватдегидрогеназный комплекс, пируват активно выводится из митохондрий. В результате этого уменьшается его поток через цикл трикарбоновых кислот, снижается доставка NADH₂ и FADH₂ в цепь переноса электронов и образуется больше лактата, что является важнейшим адаптивным ответом на гипоксию [350]. Еще одним важным защитным механизмом является то, что HIF1 α , подавляя цитохром C, каспазу-9, каспазу-3 и повышая соотношение Bcl-2/Bax, ингибирует митохондриально-опосредованный апоптоз и способствует увеличению жизнеспособности клеток [177].

Нами было выявлено, что ингибирование синтеза эндогенного антиоксиданта глутатиона с помощью БСО сопровождалось повышением внутриклеточного уровня свободных радикалов и увеличивало количество транскрипционного фактора Nfr2, вызывающего повышение уровня HIF1 α . При этом активация HIF1 α имела самостоятельное защитное действие, так как при ингибировании указанного транскрипционного фактора снижалась жизнеспособность клеток в условиях моделирования эндогенного ОС [351].

В представленном исследовании впервые была установлена важная биологическая функция Pgp – транспорт МДА из клетки, обеспечивающая цитопротекторный эффект. Известно, что МДА может взаимодействовать с белками и нуклеиновыми кислотами, усугубляя окислительное повреждение клеток. Именно поэтому удаление МДА из клеток тормозит дальнейшее развитие и усугубление ОС, способствуя сохранению жизнеспособности клеток.

Полученные результаты могут иметь практическое значение. Проникновение веществ через монослой клеток линии Caco-2 является классической модельной системой абсорбции веществ в тонком кишечнике [338, 388]. Выявленное в нашем исследовании снижение активности Pgp и повышение проницаемости монослоя клеток для субстрата белка-транспортера - фексофенадина при воздействии пероксида водорода может свидетельствовать о повышении абсорбции веществ-субстратов данного белка-транспортера в тонком кишечнике при развитии заболеваний, сопровождающихся ОС, что в свою очередь может приводить к увеличению их концентрации. С другой стороны, установлено, что развитие эустресса приводит к повышению количества и активности Pgp в энтероцитах кишечника, что может приводить к уменьшению абсорбции субстратов белка-транспортера и, следовательно, к снижению эффективности проводимой терапии. Развитие дистресса, наоборот, приводит к снижению количества и активности Pgp, увеличению проницаемости мембран клеток линии Caco-2 и может сопровождаться повышением абсорбции субстратов белка-транспортера,

увеличением их концентрации в плазме крови и, в конечном итоге, проявляться развитием нежелательных лекарственных реакций.

Pgp в гематоэнцефалическом барьере является одним из ключевых факторов, ограничивающих проникновение лекарственных веществ-субстратов в головной мозг, снижая тем самым эффективность терапии заболеваний центральной нервной системы (острого нарушения мозгового кровообращения, эпилепсии), а его ингибирование рассматривается в качестве терапевтической мишени при лечении данных патологий [159, 202].

В нашем исследовании показано, что развитие выраженного ОС (которое наблюдается и при данных неврологических заболеваниях) приводит к повреждению билипидных мембран и Pgp, что сопровождается повышением проницаемости цитоплазматических мембран. Транспортная и защитная роль Pgp, заключающаяся в ограничении проницаемости клеточной мембраны, зависит от выраженности ОС и реализуется только при сохранении целостности мембран, то есть в условиях патологии защитная роль Pgp сохраняется только при компенсированном ОС.

Полученные результаты относительно ингибирующей способности БСО могут иметь практическое значение, так использование БСО в комплексной терапии онкологических заболеваний возможно будет усиливать противоопухолевый эффект, что согласуется с данными литературы [48, 268].

Таким образом, показано, что регуляция активности Pgp в условиях ОС имеет сложный молекулярный механизм, основанный на сигнальной функции продуктов пероксидации, причем наибольшее значение имеет МДА, а также на прямом и опосредованном влиянии транскрипционных факторов, которые могут взаимодействовать между собой и взаимозаменяемо регулировать количество и активность Pgp. Стимуляция транскрипционных факторов и Pgp имеет важное адаптивное значение в условиях ОС, направленное на сохранение жизнеспособности клеток и поддержание их функционирования.

ВЫВОДЫ

1. Пероксид водорода в концентрациях 5-10 мкМ и длительности инкубации 3, 24 и 72 ч на клетках линии Сасо-2 вызывает развитие компенсированного окислительного стресса (эустресса), что проявляется в значимом повышении уровня свободных радикалов, карбонильных производных белков, продуктов липопероксидации, снижении содержания белковых и небелковых SH-групп, повышении уровня транскрипционного фактора Nrf2 и антиоксидантного фермента – глутатионпероксидазы. Концентрации H₂O₂ 50-100 мкМ при всех сроках экспозиции являются токсичными для линии клеток Сасо-2 и вызывают развитие некомпенсированного экзогенного окислительного стресса и существенное снижение жизнеспособности клеток.

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

3. Пероксид водорода на клетках линии Сасо-2 при длительности воздействия 3 ч в концентрациях 10 и 50 мкМ снижает активность Pgp, в концентрации 100 мкМ – и активность, и количество белка-транспортера. При длительности воздействия 24 ч H₂O₂ в концентрациях 0,1–1 мкМ (эустресс) увеличивает количество Pgp без изменения его активности, при концентрации 10 мкМ активность Pgp снижается, при концентрациях 50–100 мкМ (дистресс) происходит снижение и количества, и активности Pgp. При инкубации клеток в течение 72 ч H₂O₂ в концентрациях 0,1-5 мкМ не влияет на уровень и активность

Pgr, в концентрации 10 мкМ (эустресс) увеличивает содержание и активность белка-транспортера, в концентрациях 50-100 мкМ (дистресс) вызывает снижение количества и активности Pgr.

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

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

6. В механизмах повышения количества Pgr при развитии экзогенного ОС, вызванного H_2O_2 , доминирующая роль принадлежит сигнальному пути Nrf2, который принимает участие в регуляции белка-транспортера при двух изученных сроках воздействия прооксиданта - 24 и 72 ч. Транскрипционный фактор HIF1 α участвует в регуляции Pgr при инкубации клеток с H_2O_2 в течение 24 ч, а транскрипционный фактор CAR – в течение 72 ч. PXR не вносит существенный вклад в регуляцию белка-транспортера при использованной экспериментальной модели окислительного стресса.

7. При моделировании эндогенного окислительного стресса с помощью ингибитора синтеза глутатиона - БСО, все протестированные транскрипционные факторы и сигнальные пути (Nrf2, HIF1 α , PXR, CAR) вносят вклад в индукцию Pgr. Вероятнее всего, это связано с бимодальным влиянием БСО на Pgr за счет развития

окислительного стресса и способности стимулировать PXR и CAR в качестве ксенобиотика.

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

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

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

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

4. Разработана и валидирована методика количественного анализа МДА методом ВЭЖХ-МС/МС, которая может быть рекомендована для оценки выраженности окислительного стресса и распределения продуктов перекисного окисления липидов между внутриклеточным и внеклеточным пространством.

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

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

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

1. Выявление механизмов взаиморегуляции изученных транскрипционных факторов.
2. Оценка способности БСО ингибировать Pgp *in vivo* в экспериментальных и клинических исследованиях.
3. Проверка полученных экспериментальных данных о влиянии окислительного стресса на активность Pgp *in vivo* в экспериментальных и клинических исследованиях.
4. Проверка гипотезы о роли состояния цитоплазматической мембраны в функционировании Pgp на фоне использования мембраностабилизирующих веществ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АТФ – аденозинтрифосфат

АФК – активные формы кислорода

БСО – бутионинсульфоксимин

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГИФА – гетерогенный иммуноферментный анализ

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МДА – малоновый диальдегид

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия

ОП – оптическая плотность

ОС – окислительный стресс

П.Н. – пары нуклеотидов

ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты

ПОЛ – перекисное окисление липидов

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТБК – тиобарбитуровая кислота

ФНО-альфа – фактор некроза опухоли-альфа

ЦОГ-2 – циклооксигеназа-2

АВС – 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 (англ.: ARE expression modulator 1)

АНР – ядерный рецептор ароматических углеводородов (англ.: aryl hydrocarbon receptor)

Акт – протеинкиназа В (англ.: protein kinase B)

ALK – киназа анапластической лимфомы (англ.: anaplastic lymphoma kinase)

AP-1 – белок-активатор-1 (англ.: activator protein 1)

ARE – элементы антиоксидантного ответа (англ.: antioxidant response elements)

ASK1 – киназа, регулирующая сигнал к апоптозу, тип 1 (англ. apoptosis signal-regulating kinase 1)

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

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

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

CINPA 1 – 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-дибензо[b,f]азепин-3-ил]этиловый эфир карбаминовой кислоты (англ.: CAR inhibitor not PXR activator 1 coefficient)

CSBP – цитокинин-специфический связывающий белок (англ.: cytokinin binding protein)

CYP – цитохром (англ.: cytochrome)

DTNB – 5,5'-дителиобис(2-нитро)-бензоатом

EGF – эпидермальный фактор роста (англ.: epidermal growth factor)

EGFR – киназный домен рецептора эпидермального фактора роста (англ.: epidermal growth factor receptor)

ERK - внеклеточная сигнал-регулируемая киназа (англ.: extracellular signal-regulated kinase)

GLUT – переносчики глюкозы (англ.: glucose transporter 2)

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

HOMO – высшая занятая молекулярная орбиталь (англ.: highest occupied molecular orbital)

HSC – звездчатые клетки печени, жирозапасающие клетки (англ. hepatic stellate cell)

IC₅₀ – концентрация полумаксимального ингибирования

JNK – N-концевые (терминальные) киназы c-Jun (англ.: c-Jun N-terminal kinases)

- КС7F2 – N,N'-(дисульфандиилбис(этан-2,1-диил))бис(2,5-дихлорбензол-сульфонамид (англ.: controls the biological activity of HIF1 α)
- МАРК – митоген-активируемые протеинкиназы (англ.: mitogen-activated protein kinase)
- МДСК – клетки канальцев собачьей почки Мадина Дарби (англ.: Madin-Darby canine kidney)
- МДР – множественная лекарственная устойчивость (англ.: multiple drug resistance)
- МММ – мониторинг множественных реакций (англ.: monitoring of multiple reactions)
- МРР2 – белок-транспортер, ассоциированный с множественно лекарственной устойчивостью (англ.: multidrug resistance-associated protein 2)
- mTOR – мишень рапамицина млекопитающих (англ.: mammalian target of rapamycin)
- NBD – нуклеотид-связывающий домен (англ.: nucleotide binding domain)
- NF- κ B – ядерный фактор «каппа-би» (англ.: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
- NF- Υ – ядерный транскрипционный фактор Υ (англ.: nuclear factor Υ)
- NMDA – N-метил-D-аспартат
- Nrf – ядерные факторы, родственные эритроидному 2 (англ.: nuclear factor E2-related factor 2)
- Papp – коэффициент кажущейся проницаемости (англ. apparent permeability)
- РСАФ – Р300/СВР-ассоциированный фактор (англ.: Р300/СВР-associated factor)
- PDX – фактор промотора инсулина (англ.: pancreatic and duodenal homeobox)
- Pgp – Р-гликопротеин (англ.: permeability glycoprotein)
- PI3K – фосфоинозитид-3-киназа (англ.: phosphoinositide 3-kinases)
- PIP3 – фосфотидилинозитол (3,4,5)-трифосфат (англ.: phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate)
- PTEN – фосфатаза с двойной субстратной специфичностью, гомолог фосфатазы и тензина удаленного на хромосоме 10 (англ.: phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10)

p-VHL - E3 лигазы фон Гиппеля-Линдау (англ.: von Hippel Lindau)

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

Sp – белок специфичности (англ.: specificity protein)

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

TGF-бета1 – сигнальный путь трансформирующего фактора роста-бета1 (англ.: transforming growth factor beta)

TM – трансмембранная область

TMD – трансмембранный домен (англ.: transmembrane domain)

TSS – сайт начала транскрипции (англ.: transcription start site)

UCP – митохондриальный разобщающий белок (англ.: mitochondrial uncoupling proteins)

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (англ.: vascular endothelial growth factor)

YB-1 – элемент-связывающий белок 1 (англ.: Y box binding protein 1)

c-src – протоонкогенная тирозин-протеинкиназа Src (англ.: cellular sarcoma)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беленичев, И.Ф. Сигнальная роль активных форм кислорода в регуляции физиологических функций / И.Ф. Беленичев, О.В. Ганчева. – Текст (визуальный) : непосредственный // Патология. – 2005. – Т. 2, № 1. – С. 4-10.
2. Владимиров, Ю.А. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах / Ю.А. Владимиров, А.И. Арчаков, Г.М. Франк. – М.: Наука, 1972. – 252 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
3. Влияние гипоксии различных видов на функциональную активность и экспрессию гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Щулькин [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2016. – Т. 14, № 1. – С. 71-77.
4. Внутриклеточная локализация и функция ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (Nrf2) в условиях моделирования окислительного стресса *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, П.Д. Ерохина, А.А. Сеидкулиева [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И. П. Павлова. – 2022. – Т. 30, № 3. – С. 295-304.
5. Волкова, Ю.В. Влияние иммобилизационного стресса на содержание продуктов свободнорадикального окисления липидов и белков в субклеточных фракциях мозга крыс разного возраста / Ю.В. Волкова, В.В. Давыдов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Український біохімічний журнал. – 2009. – Т. 81, № 2. – С. 45.
6. Динамика изменений показателей свободно-радикального окисления при изолированном переломе бедренной кости в условиях системной озонотерапии / К.С. Абрамов, Е.В. Давыдова, М.В. Осиков [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2021. – Т. 65, № 1. – С. 79-85.
7. Ингибирование активности ABCB1 белка при нарушении мозгового кровообращения может повысить эффективность фармакотерапии / И.В. Черных, А.В. Щулькин, С.К. Правкин [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный //

Анналы клинической и экспериментальной неврологии. – 2021. – Т. 15, № 1. – С. 65-70.

8. Индукция белка-транспортера гликопротеина-Р в гематоэнцефалическом барьере как способ профилактики паркинсонического синдрома / М.М. Градинарь, И.В. Черных, А.В. Шулькин [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Нейрохимия. – 2020. – Т. 37, № 3. – С. 257-262.

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

10. Исследование функциональной активности и экспрессии гликопротеина-Р при аллоксаниндуцированном сахарном диабете 2-го типа / Е.Н. Якушева, Д.С. Титов, Н.М. Попова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник РУДН. – 2016. – № 4. – С. 118-126.

11. Калинин Р.Е. Клиническая эффективность биофлаваноидов в лечении вторичной лимфедемы нижних конечностей / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Д.А. Максаев – Текст (визуальный) : непосредственный// Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова – 2021. –Т. 29, № 2. – С. 245-250. doi: 10.17816/pavlovj63283.

12. Калинин, Р.Е. Изучение возможных биохимических и морфологических маркеров феномена «No-reflow» в эксперименте / Р.Е. Калинин, А.С. Пшенников, Р.В. Деев. – Текст (визуальный) : непосредственный // Клинич. и эксперим. хирургия. Журн. им. акад. Б.В. Петровского. – 2018. – № 1. – С. 62–69.

13. Карбонильный стресс и его роль в патогенезе стоматологических заболеваний / В.В. Давыдов, А.В. Бабичев, Т.П. Вавилова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Cathedra-Кафедра. Стоматологическое образование. – 2019. – № 70. – С. 34-39.

14. Карпова, С.И. Р-гликопротеин – структура, функции и роль в резистентности лейкозов к химиотерапии / С.И. Карпова, Н.Г. Тюрина. – Текст

(визуальный) : непосредственный // Пробл. гематологии и переливания крови. – 1997. – №1. – С. 37-46.

15. Короткова, Н.В. Маркеры карбонильного стресса и резервно-адаптационный потенциал тромбированной вены при остром венозном тромбозе в эксперименте / Н.В. Короткова, И.А. Сучков, М.А. Фомина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Флебология. – 2019. – Т. 13, № 4. – С. 278-284.

16. Космачевская, О.В. Неферментативные реакции в организме: роль в эволюции и адаптации / О.В. Космачевская, А.Ф. Топунов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Прикладная биохимия и микробиология. – 2021. – Т. 57, № 5. – С. 417 – 431.

17. Ланкин, В.З. Окислительный и карбонильный стресс в этиологии и патогенезе сахарного диабета / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе. – Текст (визуальный) : непосредственный // Кардиологический вестник. – 2020. – Т.15, №5. – С.10.

18. Лебедев, В.В. Фармакологическая коррекция множественной лекарственной устойчивости гидрофильными регуляторными пептидами / В.В. Лебедев, С.А. Новиков, Е.Ю. Рыбалкина. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский иммунологический журнал. – 2008. – № 2–3. – С. 310.

19. Луцак, В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма (обзор) / В.И. Луцак. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 8. – С. 995-1017.

20. Малоновый диальдегид, но не метилглиоксаль, нарушает инсулиновый каскад, синтез NO и эндотелиальный барьер / М.В. Самсонов, Н.В. Подкуйченко, В.З. Ланкин [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии. – 2021. – Т.38, №3. – С. 209-216.

21. Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей / В. Г. Кукес, С.В. Грачев, Д.А. Сычев, Г.В. Раменская. – М.: Гэотар-Медиа, 2008. – 304 с. – Текст (визуальный) : непосредственный

22. Методика определения принадлежности лекарственных средств к числу субстратов гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, И.В. Черных, А.В. Шулькин [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2015. – Т. 23, № 3. – С. 49-53.
23. Механизмы регуляции Р-гликопротеина в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro* / Ю. В. Абаленихина, А. В. Шулькин, П. Ю. Мыльников [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Acta naturae. – 2022. – Т. 14, № 3 (54). – С. 69-78.
24. Окислительный и карбонильный стресс как фактор модификации белков и деструкции ДНК при сахарном диабете / В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, Г.Г. Коновалова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Терапевтический архив. – 2018. – Т. 90, №10. – С. 46-50.
25. Окислительный стресс на локальном и системном уровне при хронических гнойных средних отитах / И.Д. Дубинец, М.Ю. Коркмазов, А.И. Сеницкий [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Медицинский совет. – 2021. – № 18. – С. 148-156.
26. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания / Е.Б. Меньщикова, Н.К. Зенков, В.З. Ланкин [и др.]. – Новосибирск: Сибирское университетское издательство, 2017. – 284 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
27. Окислительный стресс: прооксиданты и антиоксиданты / Е.Б. Меньщикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков [и др.]; Ин-т физиологии СО РАМН. – Новосибирск, 2006. – 553 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
28. Оценка принадлежности малонового диальдегида к модуляторам и субстратам белка-транспортера Р-гликопротеина / А.В. Шулькин, Ю.В. Абаленихина, П.Ю. Мыльников [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Доклады Российской Академии наук. Науки о жизни. – 2022. – Т. 507, №1 – С. 465-474.

29. Пероксидация липидов и окислительная модификация белков в патогенезе клещевого энцефалита и иксодовых клещевых боррелиозов / А.Б. Конькова-Рейдман, Д.Н. Барсукова, А.И. Синицкий [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2020. – Т. 25, № 5. – С. 215-227.
30. Подавление сигнального пути PI3K-Akt-mTOR, Антиоксидантной системы и "обращение" устойчивости опухолевых клеток к цисплатину при действии куркумина / Е.В. Калинина, А.А.Ш. Хасан, В.В. Татарский [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 173, № 3. – С. 369-374.
31. Попова, Т.Н. Свободнорадикальные процессы в биосистемах / Т.Н. Попова, А.Н. Пашков.– Старый Оскол: Кириллица, 2008. – 188 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.
32. Разработка и валидация методики количественного определения малонового диальдегида методом ВЭЖХ-МС/МС/ П.Ю. Мыльников, А.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Клиническая лабораторная диагностика. – 2022. – Т. 67, № 7. – С. 369-373.
33. Регуляция и роль фактора, индуцируемого гипоксией 1-альфа (HIF-1 α), в условиях эндогенного окислительного стресса *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, П.Ю. Мыльников, А.В. Щулькин [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. – Т. 173, № 3. – С. 301-306.
34. Регуляция конститутивного андростанового рецептора в клетках линии Сасо-2 при моделировании окислительного стресса *in vitro* / Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин, А.А. Сеидкулиева [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биомедицинская химия. – 2022. – Т. 68, № 4. – С. 297-301.
35. Состояние антиоксидантной системы в организме подростков с нейроэндокринным ожирением / В.В. Давыдов, А.В. Бабичев, А. Хамдаллах [и др.].

– Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник медицинского института "РЕАВИЗ". – 2018. – № 1. – С. 148-152.

36. Структура, функции гликопротеина-R и его значение для рациональной фармакотерапии / Е.Н. Якушева, А.В. Щулькин, Н.М. Попова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. – Т. 12, № 2. – С. 3-11.

37. Уровень карбонилирования белков плазмы и лейкоцитов периферической крови пациентов с различной длительностью болезни Альцгеймера / Д.С. Петров, М.Г. Енгальчева, Н.В. Короткова [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Вестник неврологии, психиатрии и нейрохирургии. – 2021. – № 3. – С. 235-243.

38. Ушкалова, В.Н. Контроль перекисного окисления липидов / В.Н. Ушкалова, Н.В. Иоанидис. – Новосибирск: Изд-во Новосиб. ун-та, 1993. – 181 с. – Текст (визуальный) : непосредственный

39. Фомина, М.А. Окислительная модификация белков тканей при изменении синтеза оксида азота / М.А. Фомина, Ю.В. Абаленихина. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2018. – 192 с. – Текст (визуальный) : непосредственный.

40. Функциональная активность гликопротеина-R в гематоэнцефалическом барьере на фоне ишемии-реперфузии головного мозга / И.В. Черных, А.В. Щулькин, Е.Н. Якушева [и др.]. – Текст (визуальный) : непосредственный // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2019. – Т. 105, № 5. – С. 657-664.

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

42. Эндотелиальная дисфункция у пациентов на программном гемодиализе / Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, А.А. Егоров [и др.]. – Текст (визуальный) :

непосредственный // Наука молодых (Eruditio Juvenium). – 2019. – Т. 7, № 1. – С. 79-85. doi:10.23888/НМЖ20197179-85.

43. Якушева, Е.Н. Локализация, модели функционирования и физиологические функции гликопротеина-Р / Е.Н. Якушева, Д.Н. Титов, С.К. Правкин. – Текст (визуальный) : непосредственный // Успехи физиологических наук. – 2017. – Т. 48, № 4. – С. 70-87.

44. Якушева, Е.Н. Структура и функционирование белка множественной лекарственной устойчивости / Е.Н. Якушева, Д.С. Титов. – Текст (визуальный) : непосредственный // Биохимия. – 2018. – Т. 83, № 8. – С. 1148-1172.

45. 17 β -estradiol regulates the expression of antioxidant enzymes in myocardial cells by increasing Nrf2 translocation / J. Yu, Y. Zhao, B. Li [et al.]. – Text : visual // J Biochem Mol Toxicol. – 2012. – Vol. 26, N 7. – P. 264-269. doi: 10.1002/jbt.21417.

46. 2-acetylaminofluorene up-regulates rat mdr1b expression through generating reactive oxygen species that activate NF-kappa B pathway / L. Deng, Y.C. Lin-Lee, F.X. Claret [et al.]. – Text : visual // J Biol Chem. – 2001. – Vol. 276, N 1. – P. 413–420.

47. 2-Oxo-histidine-containing dipeptides are functional oxidation products / H. Ihara, Y. Kakihana, A. Yamakage [et al.]. – Text : visual // J Biol Chem. – 2019. – Vol. 294, N 4. – P. 1279-1289. doi: 10.1074/jbc.RA118.006111. Epub 2018 Nov 30. PMID: 30504220. PMCID: PMC6349118.

48. 3-Bromopyruvate and buthionine sulfoximine effectively kill anoikis-resistant hepatocellular carcinoma cells / M. Lee, A. Jo, S. Lee [et al.]. – Text : visual // PLoS One. – 2017. – Vol. 12, N 3. – P. e0174271. doi: 10.1371/journal.pone.0174271.

49. A comprehensive analysis of ontogeny of renal drug transporters: mRNA analyses, quantitative proteomics, and localization / K.W.K. Cheung, B.D. van Groen, E. Spaans [et al.]. – Text : visual // Clin Pharmacol Ther. – 2019. – Vol. 106, N 5. – P. 1083-1092.

50. A new generation of arachidonic acid analogues as potential neurological agent targeting cytosolic phospholipase A2 / C. Ng, S. Kannan, Y. Chen [et al.]. – Text : visual // *Sci Rep.* – 2017. – Vol. 7, N 1. – P. 13683.
51. A role for constitutive androstane receptor in the regulation of human intestinal MDR1 expression / O. Burk, K.A. Arnolda, A. Geickb [et al.]. – Text : visual // *Biol Chem.* – 2005. – Vol. 386, N 6. – P. 503–513.
52. A single active catalytic site is sufficient to promote transport in P-glycoprotein / O. Barsony, G. Szaloki, D. Türk [et al.]. – Text : visual // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6, N 1. – P. 24810.
53. A Small Molecule Inhibits Deregulated NRF2 Transcriptional Activity in Cancer / M.J. Bollong, H. Yun, L. Sherwood [et al.]. – Text : visual // *ACS Chem Biol.* – 2015. – Vol. 10, N 10. – P. 2193-2198.
54. A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* / S. Boschi-Muller, S. Azza, S. Sanglier-Cianferani [et al.]. – Text : visual // *J Biol Chem.* – 2000. – Vol. 275, N 46. – P. 35908-35913.
55. A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (*mdr1*) gene / M.E. Goldsmith, M.J. Madden, C.S. Morrow [et al.]. – Text : visual // *J Biol Chem.* – 1993. – Vol. 268, N 8. – P. 5856–5860.
56. ABC transporter expression profiling after ischemic reperfusion injury in mouse kidney / M. Huls, J. van den Heuvel, H. Dijkman [et al.]. – Text : visual // *Kidney Int.* – 2006. – Vol. 69, N 12. – P. 2186–2193.
57. Activated pregnenolone X-receptor is a target for ketoconazole and its analogs / H. Wang, H. Huang, H. Li [et al.]. – Text : visual // *Clin Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13, N 8. – P. 2488–2495.
58. Activity and mechanism of flavokawain A in inhibiting permeability-glycoprotein expression in paclitaxel resistance of lung cancer / J. Li, L. Zheng, M. Yan [et al.]. – Text : visual // *Oncol Lett.* – 2020. – Vol. 19, N 1. – P. 379–387.

59. Advances in understanding the Role of P-gp in doxorubicin resistance: Molecular Pathways, therapeutic strategies, and prospects / S. Mirzaei, M.H. Gholami, F. Hashemi [et al.]. – Text : visual // *Drug Discov Today*. – 2022. – Vol. 27, N 2. - P. 436–455.
60. Age-associated neurodegeneration and oxidative damage to lipids, proteins and DNA / Z. Radak, Z. Zhao, S. Goto [et al.]. – Text : visual // *Mol Aspects Med*. – 2011. – Vol. 32, N 4-6. – P. 305-315. doi: 10.1016/j.mam.2011.10.010. Epub 2011 Oct 15. PMID: 22020115.
61. Aldehyde reactivity with 2-thiobarbituric acid and TBARS in freeze-dried beef during accelerated storage / Q. Sun, C. Faustman, A. Senecal [et al.]. – Text : visual // *Meat Sci*. – 2001. – Vol. 57, N 1. – P. 55–60.
62. Ambudkar, S.V. Drug-stimulatable ATPase activity in crude membranes of human MDR1-transfected mammalian cells / S.V. Ambudkar. – Text : visual // *Methods Enzymol*. – 1998. – Vol. 292. – P. 504-514.
63. An ester derivative of tenacigenin B from *Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn reversed paclitaxel-induced MDR in vitro and in vivo by inhibiting both P-gp and MRP2 / Z.L. Wu, Y. Chen, Z. Qu [et al.]. – Text : visual // *Ethnopharmacol*. – 2022. – Vol. 294. – P. 115353. doi: 10.1016/j.jep.2022.115353.
64. An updated patent review on P-glycoprotein inhibitors (2011-2018) / M. Leopoldo, P. Nardulli, M. Contino [et al.]. – Text : visual // *Expert Opin Ther Pat*. – 2019. – Vol. 29, N 6. – P. 455-461. doi: 10.1080/13543776.2019.1618273. Epub 2019 May 17. PMID: 31079547.
65. Anderson, M.E. Transport and direct utilization of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis / M.E. Anderson, A. Meister. – Text : visual // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1983. – Vol. 80, N 3. – P. 707-711. doi: 10.1073/pnas.80.3.707. PMID: 6572362; PMCID: PMC393448.
66. Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications / A. Raghunath, K. Sundarraj, R. Nagarajan [et al.]. – Text : visual // *Redox*

Biol. – 2018. – Vol. 17. – P. 297-314. doi: 10.1016/j.redox.2018.05.002. Epub 2018 May 7. PMID: 29775961; PMCID: PMC6007815.

67. Arana, M.R. ATP-binding Cassette Exporters: Structure and Mechanism with a Focus on P-glycoprotein and MRP1 / M.R. Arana, G.A. Altenberg. – Text : visual // *Curr Med Chem.* – 2019. – Vol. 26, N 7. – P. 1062-1078. doi: 10.2174/0929867324666171012105143.

68. Ayala, A. The utilization of 5-hydroxyl-2-amino valeric acid as a specific marker of oxidized arginine and proline residues in proteins / A. Ayala, R.G. Cutler. – Text : visual // *Free Radic Biol Med.* – 1996. – Vol. 21, N 1. – P. 65-80. doi: 10.1016/0891-5849(95)02220-1. PMID: 8791094.

69. Ayee, M.A.A. Membrane modulatory effects of omega-3 fatty acids: Analysis of molecular level interactions / M.A.A. Ayee, B.C. Bunker, J.L. De Groot. – Text : visual // *Curr Top Membr.* – 2020. – Vol. 86. – P. 57-81. doi: 10.1016/bs.ctm.2020.08.001. PMID: 33837698.

70. Azzaria, M. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the MDR1 gene abolish its ability to confer multidrug resistance / M. Azzaria, E. Schurr, P. Gros. – Text : visual // *Mol Cell Biol.* – 1989. – Vol. 9, N 12. – P. 5289–5297.

71. Bak, S. Subdividing Stress Groups into Eustress and Distress Groups Using Laterality Index Calculated from Brain Hemodynamic Response / S. Bak, J. Shin, J. Jeong. – Text : visual // *Biosensors (Basel).* – 2022. – Vol. 12, N 1. – P. 33. doi: 10.3390/bios12010033. PMID: 35049661; PMCID: PMC8773747.

72. Bentz, J. Case Study 8: Status of the Structural Mass Action Kinetic Model of P-gp-Mediated Transport Through Confluent Cell Monolayers / J. Bentz, H. Ellens. – Text : visual // *Methods Mol Biol.* – 2021. – Vol. 2342. – P. 737-763. doi: 10.1007/978-1-0716-1554-6_27. PMID: 34272715.

73. Bhuyan, K.C. Regulation of hydrogen peroxide in eye humors. Effect of 3-amino-1H-1,2,4-triazole on catalase and glutathione peroxidase of rabbit eye / K.C.

Bhuyan, D.K. Bhuyan. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta*. – 1977. – Vol. 497, N 3. – P. 641-651.

74. Bienertova-Vasku, J. Eustress and Distress: Neither Good Nor Bad, but Rather the Same? / J. Bienertova-Vasku, P. Lenart, M. Scherlinger. – Text : visual // *Bioessays*. – 2020. – Vol. 42, N 7. – P. e1900238. doi: 10.1002/bies.201900238. PMID: 32302008.

75. Bone Marrow Cell Therapy on 1,2-Dimethylhydrazine (DMH)-Induced Colon Cancer in Rats / M.F. El-Khadragy, B.N. Nabil, B.N. Hassan [et al.]. – Text : visual // *Cell Physiol Biochem*. – 2018. – Vol. 45, N 3. – P. 1072-1083. doi: 10.1159/000487349. Epub 2018 Feb 7. PMID: 29439258.

76. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford. – Text : visual // *Anal Biochem*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.

77. Brigelius-Flohé, R. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors / R. Brigelius-Flohé, L. Flohé. – Text : visual // *Antioxid Redox Signal*. – 2011. – Vol. 15, N 8. – P. 2335-2381.

78. Bukowski, K. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy / K. Bukowski, M. Kciuk, R. Kontek. – Text : visual // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 21, N 9. – P. 3233. doi: 10.3390/ijms21093233. PMID: 32370233; PMCID: PMC7247559.

79. Callaghan, R. Inhibition of the multidrug resistance P-glycoprotein: time for a change of strategy? / R. Callaghan, F. Luk, M. Bebawy. – Text : visual // *Drug Metab Dispos*. – 2014. – Vol. 42, N 4. – P. 623-631. doi: 10.1124/dmd.113.056176. Epub 2014 Feb 3. PMID: 24492893. PMCID: PMC3965902.

80. Cansler, S.M. Connecting endoplasmic reticulum and oxidative stress to retinal degeneration, TBI, and traumatic optic neuropathy / S.M. Cansler, N.K. Evanson. – Text : visual // *J Neurosci Res*. – 2020. – Vol. 98, N 3. – P. 571-574. doi: 10.1002/jnr.24543. Epub 2019 Oct 23. PMID: 31642095.

81. Cardiolipin and mitochondrial function in health and disease / G. Paradies, V. Paradies, F.M. Ruggiero [et al.]. – Text : visual // *Antioxid Redox Signal.* – 2014. – Vol. 20, N 12. – P. 1925-1953.
82. Carrier, I. Investigating the role of the invariant carboxylate residues E552 and E1197 in the catalytic activity of Abcb1a (mouse Mdr3) / I. Carrier, P. Gros. – Text : visual // *FEBS J.* – 2008. – Vol. 275, N 13. – P. 3312–3324.
83. Catalá, A. Lipid peroxidation modifies the picture of membranes from the “Fluid mosaic model” to the “Lipid whisker model” / A. Catalá. – Text : visual // *Biochimie.* – 2012. – Vol. 94, N 1. – P. 101-109.
84. Catalytic cycle of ATP hydrolysis by P-glycoprotein: evidence for formation of the E.S reaction intermediate with ATP-gamma-S, a nonhydrolyzable analogue of ATP / Z. Sauna, I. Kim, K. Nandigama [et al.]. – Text : visual // *Biochemistry.* – 2007. – Vol. 46, N 48. – P. 13787–13799.
85. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues / F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada [et al.]. – Text : visual // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1987. – Vol. 84, N 21. – P. 7735–7738.
86. Chan, L.M. The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability / L.M. Chan, S. Lowes, B.H. Hirst // *Eur J Pharm Sci.* – 2004. – Vol. 21, N 1. – P. 25-51.
87. Characterization of PXR mediated P-glycoprotein regulation in intestinal LS174T cells / B.P. Kota, V.H. Tran, J. Allen [et al.]. – Text : visual // *Pharmacol Res.* – 2010. – Vol. 62, N 5. – P. 426-431.
88. Chemical molecular-based approach to overcome multidrug resistance in cancer by targeting P-glycoprotein (P-gp) / H. Zhang, H. Xu, C.R. Ashby Jr [et al.]. – Text : visual // *Med Res Rev.* – 2021. – Vol. 41, N 1. – P. 525-555. doi: 10.1002/med.21739. PMID: 33047304.
89. Chen, Q. Involvement of AP-1 and NF- κ B in the up-regulation of P-gp in vinblastine resistant Caco-2 cells / Q. Chen, Y. Bian, S. Zeng. – Text : visual // *Drug Metab Pharmacokinet.* – 2014. – Vol. 29, N 2. – P. 223-226.

90. Christie, W.W. Oxidation of polyunsaturated fatty acids to produce lipid mediators / W.W. Christie, J.L. Harwood. – Text : visual // *Essays Biochem.* – 2020. – Vol. 64, N 3. – P. 401-421. doi: 10.1042/EBC20190082. PMID: 32618335. PMCID: PMC7517362.
91. CINPA1 is an inhibitor of constitutive androstane receptor that does not activate pregnane X receptor / M.T. Cherian, W. Lin, J. Wu [et al.]. – Text : visual // *Mol Pharmacol.* – 2015. – Vol. 87, N 5. – P. 878-889.
92. Clinical and prognostic significance of HIF-1 α overexpression in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis / J. Zhou, S. Huang, L. Wang [et al.]. – Text : visual // *World J Surg Oncol.* – 2017. – Vol. 15, N 1. – P. 104. doi: 10.1186/s12957-017-1163-y. PMID: 28521842; PMCID: PMC5437521.
93. Clinical significance and in vitro cellular regulation of hypoxia mimicry on HIF-1 α and downstream genes in canine appendicular osteosarcoma / C. Gola, S. Iussich, S. Noury [et al.]. – Text : visual // *Vet J.* – 2020. – Vol. 264. – P. 105538. doi: 10.1016/j.tvjl.2020.105538. Epub 2020 Sep 9. PMID: 33012439.
94. Cobbaut, M. Function and Regulation of Protein Kinase D in Oxidative Stress: A Tale of Isoforms / M. Cobbaut, J. Van Lint. – Text : visual // *Oxid Med Cell Longev.* – 2018. – Vol. 2018. – P. 2138502. doi: 10.1155/2018/2138502. PMID: 29854077. PMCID: PMC5944262.
95. Coenzyme Q biosynthesis inhibition induces HIF-1 α stabilization and metabolic switch toward glycolysis / I. Liparulo, C. Bergamini, M. Bortolus [et al.]. – Text : visual // *FEBS J.* – 2021. – Vol. 288, N 6. – P. 1956-1974. doi: 10.1111/febs.15561. Epub 2020 Sep 20. PMID: 32898935.
96. Computational Insights into Allosteric Conformational Modulation of P-Glycoprotein by Substrate and Inhibitor Binding / J. Xing, S. Huang, Y. Heng [et al.]. – Text : visual // *Molecules.* – 2020. – Vol. 25, N 24. – P. 6006. doi: 10.3390/molecules25246006. PMID: 33353070; PMCID: PMC7766389.
97. Cordis, G.A. High-performance liquid chromatographic peak identification of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of lipid peroxidation aldehydes by photodiode

array detection / G.A. Cordis, D.K. Das, W. Riedel. – Text : visual // *J Chromatogr.* – 1998. – Vol. 798, N 1-2. – P. 117-123. doi: 10.1016/s0021-9673(97)01161-8.

98. Corkey, B.E. Banting lecture 2011: hyperinsulinemia: cause or consequence? / B.E. Corkey. – Text : visual // *Diabetes.* – 2012. – Vol. 61, N 1. – P. 4-13.

99. Cornwell, M.M. Molecular biology of P-glycoprotein / M.M. Cornwell. – Text : visual // *Cancer Treat Res.* – 1991. – Vol. 57. – P. 37–56.

100. Cornwell, M.M. SP1 activates the MDR1 promoter through one of two distinct G-rich regions that modulate promoter activity / M.M. Cornwell, D.E. Smith. – Text : visual // *J Biol Chem.* – 1993. – Vol. 268, N 26. – P. 19505-19511.

101. Cornwell, M.M. The human multidrug resistance gene: sequences upstream and downstream of the initiation site influence transcription / M.M. Cornwell. – Text : visual // *Cell Growth Differ.* – 1990. – Vol. 1, N 12. – P. 607-615.

102. Correction: Cepharanthine hydrochloride reverses the mdrl (P-glycoprotein)-mediated esophageal squamous cell carcinoma cell cisplatin resistance through JNK and p53 signals / P. Zhou, R. Zhang, Y. Wang [et al.]. – Text : visual // *Oncotarget.* – 2021. – Vol. 12, N 1. – P. 61-62. doi: 10.18632/oncotarget.27638. Erratum for: *Oncotarget.* 2017 Nov 27;8(67):111144-111160. PMID: 33456714; PMCID: PMC7800775.

103. Cryo-EM analysis of the conformational landscape of human P-glycoprotein (ABCB1) during its catalytic cycle / G.A. Frank, S. Shukla, P. Rao [et al.]. – Text : visual // *Mol Pharmacol.* – 2016. – Vol. 90, N 1. – P. 35-41.

104. Cullen, K.V. Verapamil-stimulated glutathione transport by the multidrug resistance-associated protein (MRP1) in leukaemia cells / K.V. Cullen, R.A. Davey, M.W. Davey. – Text : visual // *Biochem Pharmacol.* – 2001. – Vol. 62, N 4. – P. 417-424. doi: 10.1016/s0006-2952(01)00681-5. PMID: 11448450.

105. Cyclo-oxygenase-1 and -2 differently contribute to prostaglandin E2 synthesis and lipid peroxidation after in vivo activation of N-methyl-D aspartate receptors

in rat hippocampus / O. Pepicelli, E. Fedele, M. Berardi [et al.]. – Text : visual // *J Neurochem.* – 2005. – Vol. 93, N 6. – P. 1561-1567.

106. Cytoprotection of lipoic acid against toxicity induced by saxitoxin in hippocampal cell line HT-22 through in silico modeling and in vitro assays / P. Ramos, M. Schmitz, S. Gama [et al.]. – Text : visual // *Toxicology.* – 2018. – Vol. 393. – P. 171-184. doi: 10.1016/j.tox.2017.11.004. Epub 2017 Nov 8. PMID: 29128272.

107. Davi, G. Lipid peroxidation in diabetes mellitus / G. Davi, A. Falco, C. Patrono. – Text : visual // *Antioxid Redox Signal.* – 2005. – Vol. 7, N 1-2. – P. 256–268.

108. Davies, S.S. Lipid peroxidation generates biologically active phospholipids including oxidatively N-modified phospholipids / S.S. Davies, L. Guo. – Text : visual // *Chem Phys Lipids.* – 2014. – Vol. 181. – P. 1-33.

109. Davis, M.L. Establishment of *Listeria monocytogenes* in the Gastrointestinal Tract / M.L. Davis, S.C. Ricke, J.R. Donaldson. – Text : visual // *Microorganisms.* – 2019. – Vol. 7, N 3. – P. 75.

110. Dean, M. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily / M. Dean, A. Rzhetsky, R. Allikmets. – Text : visual // *Genome Res.* – 2001. – Vol. 11, N 7. – P. 1156-1166.

111. Decreased Na⁺/K⁺-ATPase Activity and Altered Susceptibility to Peroxidation and Lipid Composition in the Erythrocytes of Metabolic Syndrome Patients with Coronary Artery Disease / G. Namazi, P. Asa, N. Sarrafzadegan [et al.]. – Text : visual // *Ann Nutr Metab.* – 2019. – Vol. 74, N 2. – P. 140-148. doi: 10.1159/000497065. Epub 2019 Feb 7. Erratum in: *Ann Nutr Metab.* 2019;74(3):264. PMID: 30731468.

112. Del Rio, D. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress / D. Del Rio, A.J. Stewart, N. Pellegrini. – Text : visual // *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* – 2005. – Vol. 15, N 4. – P. 316-328.

113. Detection of Reactive Oxygen Species in Human Neutrophils Under Various Conditions of Exposure to Galectin / L.C. Rodrigues, D.G. Cerri, C.M. Marzocchi-Machado [et al.]. – Text : visual // *Methods Mol Biol.* – 2022. – Vol. 2442. – P. 549-564. doi: 10.1007/978-1-0716-2055-7_29. PMID: 35320545.

114. Development of small blood volume assays for the measurement of oxidative stress markers in mammals / E. Langille, V. Lemieux, D. Garant [et al.]. – Text : visual // *PLoS One*. – 2018. – Vol. 13, N 12. – P. e0209802. doi: 10.1371/journal.pone.0209802.

115. Development, validation and biomedical applications of stable-isotope dilution GC-MS and GC-MS/MS techniques for circulating malondialdehyde (MDA) after pentafluorobenzyl bromide derivatization: MDA as a biomarker of oxidative stress and its relation to 15(S)-8-iso-prostaglandin F₂ α and nitric oxide (NO) / D. Tsikas, S. Rothmann, J.Y. Schneider [et al.]. – Text : visual // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. – 2016. – Vol. 1019. – P. 95-111. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.10.009.

116. Different Influences of trans Fatty Acids on the Phospholipase A2 and Arachidonic Acid Metabolic Pathway in Hepatocytes / Q. Zou, M. Wei, N. Zhang [et al.]. – Text : visual // *J Agric Food Chem*. – 2021. – Vol. 69, N 14. – P. 4120-4133. doi: 10.1021/acs.jafc.1c01097. PMID: 33819034.

117. Differential expression of P-glycoprotein genes in primary rat hepatocyte culture / C.H. Lee, G. Bradley, J.T. Zhang [et al.]. – Text : visual // *J Cell Physiol*. – 1993. – Vol. 157, N 2. – P. 392-402. doi: 10.1002/jcp.1041570223. PMID: 7901227.

118. Dillard, C.J. Lipid peroxidation products in biological tissues / C.J. Dillard, A.L. Tappel. – Text : visual // *Free Radic Biol Med*. – 1989. – Vol. 7, N 2. – P. 193-196. doi: 10.1016/0891-5849(89)90014-2. PMID: 2680786.

119. Distribution and functional activity of P-glycoprotein and multidrug resistance-associated proteins in human brain microvascular endothelial cells in hippocampal sclerosis / H. Kubota, H. Ishihara, T. Langmann [et al.]. – Text : visual // *Epilepsy Res*. – 2006. – Vol. 68, N 3. – P. 213-228.

120. Distribution of gefitinib to the brain is limited by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2)- mediated active efflux / S. Agarwal, R. Sane, J.L. Gallardo [et al.]. – Text : visual // *J Pharmacol Exp Ther*. – 2010. – Vol. 334, N 1. – P. 147-155.

121. DNA elements recognizing NF-Y and Sp1 regulate the human multidrug-resistance gene promoter / R. Sundseth, G. MacDonald, J. Ting [et al.]. – Text : visual // *Mol Pharmacol.* – 1997. – Vol. 51, N 6. – P. 963-971.
122. Dolni, D. Targeting the Y/CCAAT box in cancer: YB-1 (YBX1) or NF-Y? / D. Dolni, R. Mantovani. – Text : visual // *Cell Death Differ.* – 2013. – Vol. 20, N 5. – P. 676-685.
123. Downregulation of peripheral PTGS2/ COX-2 in response to valproate treatment in patients with epilepsy / C. Rawat, R. Kutum, S. Kukal [et al.]. – Text : visual // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10, N 1. – P. 2546.
124. Draper, H.H. A review of recent studies on the metabolism of exogenous and endogenous malondialdehyde / H.H. Draper, M. Hadley. – Text : visual // *Xenobiotica.* – 1990. – Vol. 20, N 9. – P. 901-907.
125. Dynamic regulation of P-glycoprotein in human brain capillaries / J. Avemary, J.D. Salvamoser, A. Peraud [et al.]. – Text : visual // *Mol Pharm.* – 2013. – Vol.10, N 9. – P. 3333-3341. doi: 10.1021/mp4001102. PMID: 23924183.
126. Effect of Azithromycin on Venetoclax Pharmacokinetics in Healthy Volunteers: Implications for Dosing Venetoclax with P-gp Inhibitors / S.K. Agarwal, B. Tong, O.F. Bueno [et al.]. – Text : visual // *Adv Ther.* – 2018. – Vol. 35, N 11. – P. 2015-2023. doi: 10.1007/s12325-018-0793-y.
127. Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress / J.V. der Paal, E.C. Neyts, C.C.W. Verlackt [et al.]. – Text : visual // *Chem Sci.* – 2016. – Vol. 7, N 1. – P. 489-498. doi: 10.1039/c5sc02311d.
128. Effect of UVC Irradiation on the Oxidation of Histidine in Monoclonal Antibodies / Y. Miyahara, K. Shintani, K. Hayashihara-Kakuhou [et al.]. – Text : visual // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10, N 1. – P. 6333. doi: 10.1038/s41598-020-63078-5. PMID: 32286391. PMCID: PMC7156388.
129. Effects of buthionine sulfoximine treatment on cellular glutathione levels and cytotoxicities of cisplatin, carboplatin and radiation in human stomach and ovarian

cancer cell lines / K.S. Lee, H.K. Kim, H.S. Moon [et al.]. – Text : visual // *Korean J Intern Med.* – 1992. – Vol. 7, N 2. – P. 111-117. doi: 10.3904/kjim.1992.7.2.111.

130. Efficiency of the four proteasome subtypes to degrade ubiquitinated or oxidized proteins / J. Abi Habib, E. De Plaen, V. Stroobant [et al.]. – Text : visual // *Sci Rep.* – 2020. – Vol. 10, N 1. – P. 15765. doi: 10.1038/s41598-020-71550-5. PMID: 32978409. PMCID: PMC7519072.

131. Ellman, G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman. – Text : visual // *Arch Biochem Biophys.* – 1959. – Vol. 82, N 1. – P. 70-77.

132. Elucidating the 'Jekyll and Hyde' nature of PXR: the case for discovering antagonists or allosteric antagonists / A. Biswas, S. Mani, M.R. Redinbo [et al.]. – Text : visual // *Pharm Res.* – 2009. – Vol. 26, N 8. – P. 1807-1815.

133. Endoplasmic reticulum resident proteins of normal human dermal fibroblasts are the major targets for oxidative stress induced by hydrogen peroxide / D. van der Vlies, E.H.W. Pap, J.A. Post [et al.]. – Text : visual // *Biochem J.* – 2002. – Vol. 366, N 3. – P. 825-830.

134. Epigenetic regulation of MDR1 gene through post-translational histone modifications in prostate cancer / R. Henrique, A. Oliveira, V. Costa [et al.]. – Text : visual // *BMC Genomics.* – 2013. – Vol. 14. – P. 898.

135. Erythrocyte membrane fluidity as a marker of diabetic retinopathy in type 1 diabetes mellitus / G. Bianchetti, L. Viti, A. Scupola [et al.]. – Text : visual // *Eur J Clin Invest.* – 2021. – Vol. 1, N 5. – P. e13455. doi: 10.1111/eci.13455. PMID: 33210748.

136. Erythropoietin and Nrf2: key factors in the neuroprotection provided by apo-lactoferrin / E.T. Zakharova, A.V. Sokolov, N.N. Pavlichenko [et al.]. – Text : visual // *Biometals.* – 2018. – Vol. 31, N 3. – P. 425-443. doi: 10.1007/s10534-018-0111-9. Epub 2018 May 10. PMID: 29748743.

137. Esterbauer, H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes / H. Esterbauer, R.J. Schaur, H. Zollner. – Text : visual // *Free Radical Biology and Medicine.* – 1991. – Vol. 11, N 1. – P. 81-128.

138. Evaluation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) activity and the levels of homocysteine and malondialdehyde (MDA) in the serum of women with preeclampsia / S. Mazloomi, S. Alimohammadi, I. Khodadadi [et al.]. – Text : visual // Clin Exp Hypertens. – 2020. – Vol. 42, N 7. – P. 590-594. doi: 10.1080/10641963.2020.1739700.

139. Evaluation of oxidative stress in placenta of fetal cardiac dysfunction rat model and antioxidant defenses of maternal vitamin C supplementation with the impacts on P-glycoprotein / Y. Li, J. Fang, K. Zhou [et al.]. – Text : visual // J Obstet Gynaecol Res. – 2014. – Vol. 40, N 6. – P. 1632-1642. doi: 10.1111/jog.12389. PMID: 24888926.

140. Excess glutamate secreted from astrocytes drives upregulation of P-glycoprotein in endothelial cells in amyotrophic lateral sclerosis / L.A. Mohamed LA, S.S. Markandaiah, S. Bonanno [et al.]. – Text : visual // Exp Neurol. – 2019. – Vol. 316. – P. 27-38. doi: 10.1016/j.expneurol.2019.04.002. PMID: 30974102. PMCID: PMC6506236.

141. Exposure to malondialdehyde induces an early redox unbalance preceding membrane toxicity in human erythrocytes / L. Tesoriere, D. D'Arpa, D. Butera [et al.]. – Text : visual // Free Radic Res. – 2002. – Vol. 36, N 1. – P. 89-97.

142. Expression and Clinical Significance of HKII and HIF-1 α in Grade Groups of Prostate Cancer / X. Sun, Q. Huang, F. Peng [et al.]. – Text : visual // Front Genet. – 2021. – Vol. 12. – P. 680928. doi: 10.3389/fgene.2021.680928. PMID: 34220956; PMCID: PMC8248182.

143. Expression and potential roles of pregnane X receptor in endometrial cancer / H. Masuyama, Y. Hiramatsu, J. Kodama [et al.]. – Text : visual // J Clin Endocrinol Metab. – 2003. – Vol. 88, N 9. – P. 4446-4454.

144. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues / A.T. Fojo, K. Ueda, D.J. Slamon [et al.]. – Text : visual // Proc Natl Acad Sci USA. – 1987. – Vol. 84, N 1. – P. 265-269.

145. Expression of aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator enhances cisplatin resistance by upregulating MDR1 ex-pression in cancer cells / Y.Y. Chan, S.

Kalpana, W.C. Chang [et al.]. – Text : visual // *Mol Pharmacol.* – 2013. – Vol. 84, N 4. – P. 591-602.

146. Expression of members of the multidrug resistance protein family in human term placenta / M.V. St-Pierre, M.A. Serrano, R.I. Macias [et al.]. – Text : visual // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* – 2000. – Vol. 279, N 4. – P. 1495-1503.

147. Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in human normal and tumor tissues / C. Cordon-Cardo, J.P. O'Brien, J. Boccia [et al.]. – Text : visual // *J Histochem Cytochem.* – 1990. – Vol. 38, N 9. – P. 1277-1287.

148. Expression polymorphism of the blood-brain barrier component P-glycoprotein (MDR1) in relation to Parkinson's disease / T. Furuno, M.T. Landi, M. Ceroni [et al.]. – Text : visual // *Pharmacogenetics.* – 2002. – Vol. 12, N 7. – P. 529-534.

149. Feeney, M.B. Tyrosine modifications in aging / M.B. Feeney, C. Schöneich. – Text : visual // *Antioxid Redox Signal.* – 2012. – Vol. 17, N 11. – P. 1571-1579.

150. Ferrandiz-Huertas, C. Rab4 interacts with the human P-glycoprotein and modulates its surface expression in multidrug resistant K562 cells / C. Ferrandiz-Huertas, A. Fernandez-Carvajal, A. Ferrer-Montiel. – Text : visual // *Int J Cancer.* – 2010. – Vol. 128, N 1. – P. 192-205.

151. Ferreira, R.J. Molecular docking characterizes substrate-binding sites and efflux modulation mechanisms within P-glycoprotein / R.J. Ferreira, M.J. Ferreira, D.J. dos Santos. – Text : visual // *J Chem Inf Model.* – 2013. – Vol. 53, N 7. – P. 1747-1760. doi: 10.1021/ci400195v. Epub 2013 Jul 10. PMID: 23802684.

152. Finkel, T. Signal transduction by reactive oxygen species / T. Finkel. – Text : visual // *J Cell Biol.* – 2011. – Vol. 194, N 1. – P. 7-15.

153. Flavonoids modulate multidrug resistance through wnt signaling in P-glycoprotein overexpressing cell lines / S. Mohana, M. Ganesan, N. Rajendra Prasad [et al.]. – Text : visual // *BMC Cancer.* – 2018. – Vol. 18. – P. 1168.

154. Forman, H.J. Measuring Oxidants and Oxidative Stress in Biological Systems [Internet] / H.J. Forman, L.J. Berliner, N.L. Parinandi. Ed. – Text : electronic. – Cham (CH): Springer, 2020. – Chapter 1. – P. 48-56.

155. Forman, H.J. Signaling functions of reactive oxygen species / H.J. Forman. – Text : visual // *Biochemistry*. – 2010. – Vol. 49, N 5. – P. 835-842.
156. Forman, H.J. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy / H.J. Forman, H. Zhang. – Text : visual // *Nat Rev Drug Discov*. – 2021. – Vol. 20, N 9. – P. 689-709. doi: 10.1038/s41573-021-00233-1. Epub 2021 Jun 30. Erratum in: *Nat Rev Drug Discov*. 2021 Aug;20(8):652. PMID: 34194012; PMCID: PMC8243062.
157. Formation of protein cross-links by singlet oxygen-mediated disulfide oxidation / S. Jiang, L. Carroll, M. Mariotti [et al.]. – Text : visual // *Redox Biol*. – 2021. – Vol. 41. – P. 101874. doi: 10.1016/j.redox.2021.101874. Epub 2021 Jan 23. PMID: 33601275. PMCID: PMC7900768.
158. Fredericks, S. The pharmacogenetics of immunosuppression for organ transplantation: a route to individualization of drug administration / S. Fredericks, D.W. Holt, I.A. MacPhee. – Text : visual // *Am J Pharmacogenomics*. – 2003. – Vol. 3, N 5. – P. 291-301. doi: 10.2165/00129785-200303050-00001. PMID: 14575518.
159. Fromm, M.F. Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers / M.F. Fromm. – Text : visual // *Trends Pharmacol. Sci*. – 2004. – Vol. 25, N 8. – P. 423-429. doi: 10.1016/j.tips.2004.06.002.
160. García-Santamarina, S. Reversible cysteine oxidation in hydrogen peroxide sensing and signal transduction / S. García-Santamarina, S. Boronat, E. Hidalgo. – Text : visual // *Biochemistry*. – 2014. – Vol. 53, N 16. – P. 2560-2580.
161. Geick, A. Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin / A. Geick, M. Eichelbaum, O. Burk. – Text : visual // *J Biol Chem*. – 2001. – Vol. 276, N 18. – P. 14581-14587.
162. Gene expression of CYP3A4, ABC-transporters (MDR1 and MRP1-MRP5) and hPXR in three different human colon carcinoma cell lines / A. Pfrunder, H. Gutmann, C. Beglinger [et al.]. – Text : visual // *J Pharm Pharmacol*. – 2003. – Vol. 55, N 1. – P. 59-66.

163. Giulivi, C. Tyrosine oxidation products: analysis and biological relevance / C. Giulivi, N.J. Traaseth, K.J. Davies. – Text : visual // *Amino Acids*. – 2003. – Vol. 25, N 3–4. – P. 227–232.
164. Glutamine residues in Q-loops of multidrug resistance protein MRP1 contribute to ATP binding via interaction with metal cofactor / R. Yang, Y.-X. Hou, C.A. Campbell [et al.]. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta*. – 2011. – Vol. 1808, N 7. – P. 1790–1796.
165. Glutathione depletion upregulates P-glycoprotein expression at the blood-brain barrier in rats / J. Wu, H. Ji, Y. Wang [et al.]. – Text : visual // *J Pharm Pharmacol*. – 2009. – Vol. 61, N 6. – P. 819-824. doi: 10.1211/jpp/61.06.0016.
166. Glutathione oxidation and PTPase inhibition by hydrogen peroxide in Caco-2 cell monolayer/ R.K. Rao, L. Li, R.D. Baker [et al.]. – Text : visual // *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. – 2000. – Vol. 279, N 2. – P. G332-340.
167. Golgi Stress Response, Hydrogen Sulfide Metabolism, and Intracellular Calcium Homeostasis / Y. Zhang, Y. Wang, E. Read [et al.]. – Text : visual // *Antioxid Redox Signal*. – 2020. – Vol. 32, N 9. – P. 583-601. doi: 10.1089/ars.2019.7824. Epub 2020 Jan 20. PMID: 31870162.
168. Gottesman, M.M. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters / M.M. Gottesman, T. Fojo, S.E. Bates – Text : visual // *Nat Rev Cancer*. – 2002. – Vol. 2, N 1. – P. 48-58. doi: 10.1038/nrc706. PMID: 11902585.
169. Grant, C.M. Regulation of translation by H₂O₂ / C.M. Grant – Text : visual // *Antioxid. Redox Signal*. – 2011. - Vol. 15, N 1. – P. 191-203.
170. Gromnicova, R. Transcriptional control of the multi-drug transporter ABCB1 by transcription factor Sp3 in different human tissues / R. Gromnicova, I. Romero, D. Male. – Text : visual // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, N 10. – P. e48189.
171. Gut microbiota regulation of P-glycoprotein in the intestinal epithelium in maintenance of homeostasis / S.E. Foley, C. Tuohy, M. Dunford [et al.]. – Text : visual // *Microbiome*. – 2021. – Vol. 9, N 1. – P. 183. doi: 10.1186/s40168-021-01137-3.

172. Halliwell, B. *Free Radicals in Biology and Medicine* / B. Halliwell, John M.C. Gutteridge. – Fifth Edition. – 2015. – 905p. – Text : visual.
173. Halliwell, B. *Measuring RS and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?* / B. Halliwell, M. Whiteman. – Text : visual // *Br J Pharmacol.* – 2004. – Vol. 142, N 2. – P. 231-255.
174. Hamada, H. *Characterization of the ATPase activity of the Mr 170,000 to 180,000 membrane glycoprotein (P-glycoprotein) associated with multidrug resistance in K562/ADM cells* / H. Hamada, T. Tsuruo. – Text : visual // *Cancer Res.* – 1988. – Vol. 48, N 17. – P. 4926–4932.
175. Hamanaka, R.B. *Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling* / R.B. Hamanaka, N.S. Chandel. – Text : visual // *Curr Opin Cell Biol.* – 2009. – Vol. 21, N 6. – P. 894-899.
176. He, F. *NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond* / F. He, X. Ru, T. Wen. – Text : visual // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, N 13. – P. 4777. doi: 10.3390/ijms21134777. PMID: 32640524. PMCID: PMC7369905.
177. *HIF-1 α inhibits mitochondria-mediated apoptosis and improves the survival of human adipose-derived stem cells in ischemic microenvironments* / J. Wang, H. Wu, Y. Zhou [et al.]. – Text : visual // *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* – 2021. – Vol. 74, N 8. – P. 1908-1918. doi: 10.1016/j.bjps.2020.11.041
178. Higgins, C.F. *The ATP switch model for ABC transporters* / C.F. Higgins, K.J. Linton. – Text : visual // *Nat Struct Mol Biol.* – 2004. – Vol. 11, N 10. – P. 918-926.
179. *High-performanceliquid chromatography analysis of the thiobarbituric acid adducts of malonaldehyde and trans,trans-muconaldehyde* / L.W. Yu, L. Latriano, S. Duncan [et al.]. – Text : visual // *Anal Biochem.* – 1986. – Vol. 156, N 2. – P. 326-333. doi: 10.1016/0003-2697(86)90261-7.
180. Hilgers, A.R. *Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa* / A.R. Hilgers, R.A. Conradi, P.S. Burton. – Text : visual // *Parm Res.* – 1990. – Vol. 7, N 9. – P. 902-910.

181. Hirota, K. HIF- α Prolyl Hydroxylase Inhibitors and Their Implications for Biomedicine: A Comprehensive Review / K. Hirota. – Text : visual // *Biomedicines*. – 2021. – Vol. 9, N 5. – P. 468. doi: 10.3390/biomedicines9050468. PMID: 33923349. PMCID: PMC8146675.
182. Hoffman, W.H. Tryptophan, kynurenine pathway, and diabetic ketoacidosis in type 1 diabetes / W.H. Hoffman, S.A. Whelan, N. Lee. – Text : visual // *PLoS One*. – 2021. – Vol. 16, N 7. – P. e0254116. doi: 10.1371/journal.pone.0254116. PMID: 34280211. PMCID: PMC8289002.
183. Homology Modeling of the Human P-glycoprotein (ABCB1) and Insights into Ligand Binding through Molecular Docking Studies / L. Mora Lagares, N. Minovski, A.Y. Caballero Alfonso [et al.]. – Text : visual // *Int J Mol Sci*. – 2020. – Vol. 21, N 11. – P. 4058. doi: 10.3390/ijms21114058. PMID: 32517082. PMCID: PMC7312539.
184. Hrd1 suppresses Nrf2-mediated cellular protection during liver cirrhosis / T. Wu, F. Zhao, B. Gao [et al.]. – Text : visual // *Genes Dev*. – 2014. – Vol. 28, N 7. – P. 708-722, doi:10.1101/gad.238246.114.
185. Hughes, J. Inhibition of P-glycoprotein-mediated efflux of digoxin and its metabolites by macrolide antibiotics / J. Hughes. – Text : visual // *J Pharmacol Sci*. – 2010. – Vol. 113, N 4. – P. 315-324. doi: 10.1254/jphs.10109fp. PMID: 20724802.
186. Human pregnane X receptor and resistance to chemotherapy in prostate cancer / Y. Chen, Y. Tang, M.-T. Wang [et al.]. – Text : visual // *Cancer Res*. – 2007. – Vol. 67, N 21. – P. 10361-10367.
187. Human–mouse chimeras with normal expression and function reveal that major domain swapping is tolerated by P- Glycoprotein (ABCB1) / K.M. Pluchino, M.D. Hall, J.K. Moen [et al.]. – Text : visual // *Biochemistry*. – 2016. – Vol. 55, N 7. – P. 1010-1023.
188. Hussein, A.S. Inhibition of glutathione synthesis of *Ascaris suum* by buthionine sulfoximine / A.S. Hussein, R.D. Walter. – Text : visual // *Parasitol Res*. – 1996. – Vol. 82, N 4. – P. 372-374. doi: 10.1007/s004360050129. PMID: 8740556.

189. Hydrogen peroxide – production, fate and role in redox signaling of tumor cells / C. Lennicke, J. Rahn, R. Lichtenfels [et al.]. – Text : visual // *Cell Commun Signal*. – 2015. – Vol. 13. – P. 39. doi: 10.1186/s12964-015-0118-6.
190. Identification and characterization of three DNA-binding proteins on the promoter of the human MDR1 gene in drug-sensitive and -resistant cells / M. Ogura, T. Takatori, Y. Sugimoto [et al.]. – Text : visual // *Jpn J Cancer Res*. – 1991. – Vol. 82, N 10. – P. 1151-1159.
191. Identification of 5' and 3' sequences involved in the regulation of transcription of the human *mdr1* gene in vivo / M.J. Madden, C.S. Morrow, M. Nakagawa [et al.]. – Text : visual // *J Biol Chem*. – 1993. – Vol. 268, N 11. – P. 8290-8297.
192. Identification of constitutive androstane receptor and glucocorticoid receptor binding sites in the CYP2C19 promoter / Y. Chen, S.S. Ferguson, M. Negishi [et al.]. – Text : visual // *Mol Pharmacol*. – 2003. – Vol. 64, N 2. – P. 316-324.
193. In silico model for P-glycoprotein substrate prediction: insights from molecular dynamics and in vitro studies / R. Prajapati, U. Singh, A. Patil [et al.]. – Text : visual // *J Comput Aided Mol Des*. – 2013. – Vol. 27, N 4. – P. 347-363.
194. Increased AP-1 activity in drug resistant human breast cancer MCF-7 cells / P.J. Daschner, H.P. Ciolino, C.A. Plouzek [et al.]. – Text : visual // *Breast Cancer Res Treat*. – 1999. – Vol. 53, N 3. – P. 229-240.
195. Induction of P-glycoprotein expression and activity by prolactin in female rat liver / L.I. Ceré, M.G. Sedlmeier, M. Semeniuk [et al.]. – Text : visual // *Life Sci*. – 2021. – Vol. 287. – P. 119936. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119936. PMID: 34506838.
196. Induction of procollagen type I gene expression and synthesis in human hepatic stellate cells by 4-hydroxy-2,3-nonenal and other 4-hydroxy-2,3-alkenals is related to their molecular structure / M. Parola, M. Pinzani, A. Casini [et al.]. – Text : visual // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1996. – Vol. 222, N 2. – P. 261-264.
197. Inhibition of P-Glycoprotein and multidrug resistance-associated protein 2 regulates the hepatobiliary excretion and plasma exposure of thienorphine and its

glucuronide conjugate / L. Kong, G. Shen, Z. Wang [et al.]. – Text : visual // *Front Pharmacol.* – 2016. – Vol. 7. – P. 242.

198. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells / C. Chen, J. Chin, K. Ueda [et al.]. – Text : visual // *Cell. Vol.* – 1986. – Vol. 47, N 3. – P. 381–389.

199. Interplay between structure and fluidity of model lipid membranes under oxidative attack / W.Y. Tai, Y.C. Yang, H.J. Lin [et al.]. – Text : visual // *J Phys Chem B.* – 2010. – Vol. 114, N 47. – P. 15642-15649. doi: 10.1021/jp1014719. Epub 2010 Nov 5. PMID: 21053974.

200. Intestinal P Glycoprotein acts as a natural defense mechanism against *Listeria monocytogenes* / B.L. Neudeck, J.M. Loeb, N.G. Faith [et al.]. – Text : visual // *Infect Immun.* – 2004. – Vol. 72, N 7. – P. 3849-3854.

201. Intracellular Mutual Amplification of Oxidative Stress and Inhibition Multidrug Resistance for Enhanced Sonodynamic/Chemodynamic/Chemo Therapy / S. Guan, X. Liu, C. Li [et al.]. – Text : visual // *Small.* – 2022. – Vol. 18, N 13. – P. e2107160. doi: 10.1002/sml.202107160. Epub 2022 Feb 11. PMID: 35146899.

202. Intractable epilepsy and the P-glycoprotein hypothesis / G.X. Wang, D.W. Wang, Y. Liu [et al.]. – Text : visual // *Int J Neurosci.* – 2016. – Vol. 126, N 5. – P. 385-392. doi: 10.3109/00207454.2015.1038710.

203. Involvement of hypoxia-inducible factor-1 alpha in the upregulation of P-glycoprotein in refractory epilepsy / G. Wang, G. Xie, L. Han [et al.]. – Text : visual // *Neuroreport.* – 2019. – Vol. 30, N 17. – P. 1191-1196. doi: 10.1097/WNR.0000000000001345.

204. Involvement of the “occluded nucleotide conformation” of P-glycoprotein in the catalytic pathway / G. Tomblin, A. Muharemagic, L.B. White [et al.]. – Text : visual // *Biochemistry.* – 2005. – Vol. 44, N 38. – P. 12879-12886.

205. Inward- and outward-facing X-ray crystal structures of homodimeric P-glycoprotein CmABCB1 / A. Kodan, T. Yamaguchi, T. Nakatsu [et al.]. – Text : visual // *Nat Commun.* – 2019. – Vol. 10, N 1. – P. 88.

206. Is P-Glycoprotein Functionally Expressed in the Limiting Membrane of Endolysosomes? / B. Gericke, I. Wienböcker, G. Brandes [et al.]. – Text : visual // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, N 9. – P. 1556. doi: 10.3390/cells11091556. PMID: 35563868; PMCID: PMC9102269.
207. Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells / I.B. Roninson, J.E. Chin, K.G. Choi [et al.]. – Text : visual // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1986. – Vol. 83, N 12. – P. 4538-4542.
208. Jagodinsky, J. Characterizing the binding interactions between P-glycoprotein and eight known cardiovascular transport substrates / J. Jagodinsky, U. Akgun. – Text : visual // *Pharmacol Res Perspect*. – 2015. – Vol. 3, N 2. – P. e00114.
209. Jain, S. Interspecies comparison of putative ligand binding sites of human, rat and mouse P-glycoprotein / S. Jain, M. Grandits, G.F. Ecker. – Text : visual // *Eur J Pharm Sci*. – 2018. – Vol. 122. – P. 134-143.
210. Jatropane diterpenoids from *Euphorbia sororia* as potent modulators against P-glycoprotein-based multidrug resistance / R. Hu, J. Gao, R. Rozimamat [et al.]. – Text : visual // *Eur J Med Chem*. – 2018. – Vol. 146. – P. 157-170.
211. Jin, S. Transcriptional regulation of the *MDR1* gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y / S. Jin, K.W. Scotto. – Text : visual // *Mol Cell Biol*. – 1998. – Vol. 18, N 7. – P. 4377-4384.
212. Jones, D.P. Redefining oxidative stress / D.P. Jones. – Text : visual // *Antioxid Redox Signal*. – 2006. – Vol. 8, N 9-10. – P. 1865-79.
213. Karthika, C. P-Glycoprotein Efflux Transporters and Its Resistance Its Inhibitors and Therapeutic Aspects. / C. Karthika, R. Sureshkumar. – Text : visual // *Creatinine - A Comprehensive Update*. – 2020. – P. 1-12
214. Kaur, H. Detection of hydroxyl radicals by aromatic hydroxylation / H. Kaur, B. Halliwell. – Text : visual // *Methods Enzymology*. – 1994. – Vol. 233. – P. 67-82. doi: 10.1016/S0076-6879(94)33009-3.
215. Ke, Q. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) / Q. Ke, M. Costa. – Text : visual // *Mol Pharmacol*. – 2006. – Vol. 70, N 5. – P. 1469-1480. doi: 10.1124/mol.106.027029.

216. Kemp, P.J. Enzyme-linked acute oxygen sensing in airway and arterial chemoreceptors--invited article / J.P. Kemp, C. Peers. – Text : visual // *Adv Exp Med Biol.* – 2009. – Vol. 648. – P. 39-48.

217. Kim, I. Relationship between drugs and functional activity of various mammalian P-glycoproteins (ABCB1)/ I. Kim, C. Booth-Genthe, S. Ambudkar. – Text : visual // *Mini-Rev. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 8, N 3. – P. 193-200.

218. Kim, Y. Molecular structure of human P-glycoprotein in the ATP-bound, outward-facing conformation / Y. Kim, J. Chen. – Text : visual // *Science.* – 2018. – Vol. 359, N 6378. – P. 915-919.

219. Kinetic model of polyunsaturated fatty acids oxidation in micelles / E.M. Pliss, M.E. Soloviev, D.V. Loshadkin [et al.]. – Text : visual // *Chem Phys Lipids.* – 2021. – Vol. 237. – P. 105089. doi: 10.1016/j.chemphyslip.2021.105089. PMID: 33965418.

220. Kitamata, M. The roles of the diversity of amphipathic lipids in shaping membranes by membrane-shaping proteins / M. Kitamata, T. Inaba, S. Suetsugu. – Text : visual // *Biochem Soc Trans.* – 2020. – Vol. 48, N 3. – P. 837-851. doi: 10.1042/BST20190376. PMID: 32597479.

221. Klepsch, F. Ligand and structure-based classification models for prediction of P-glycoprotein inhibitors / F. Klepsch, P. Vasanthanathan, G.F. Ecker. – Text : visual // *J Chem Inf Model.* – 2014. – Vol. 54, N 1. – P. 218-229.

222. Krejsa, C.M. Impact of oxidative stress on signal transduction control by phosphotyrosine phosphatases / C.M. Krejsa, G.L. Schieven. – Text : visual // *Environ Health Perspect.* – 1998. – Vol. 106 (Suppl 5). – P. 1179-1184. doi: 10.1289/ehp.98106s51179. PMID: 9788895. PMCID: PMC1533353.

223. Kusuhara, H. The role of P-glycoprotein in the liver / H. Kusuhara, H. Suzuki, Y. Sugiyama. – Text : visual // *Nihon Rinsho.* – 1997. – Vol. 55, N 5. – P. 1069-1076.

224. Lanjewar, S. Loss of Placental P-Glycoprotein May Be a Common Pathophysiologic Pathway for First Trimester Spontaneous Miscarriages / S. Lanjewar,

R. Jayakumar, C.A. Axiotis. – Text : visual // *Pediatr Dev Pathol.* – 2019. – Vol. 22, N 5. – P. 456-460. doi: 10.1177/1093526619852874. Epub 2019 May 24. PMID: 31126216.

225. Lavrentyev, E.N. P-glycoprotein mediates cellular host-defense response against *Listeria monocytogenes* invasion in HeLa cells / E.N. Lavrentyev, J.M. Swanson, B.L. Neudeck. – Text : visual // *Faseb J.* – 2010. – Vol. 24. – P. 1b109.

226. Lee, S. Thioredoxin and thioredoxin target proteins: from molecular mechanisms to functional significance / S. Lee, S.M. Kim, R.T. Lee. – Text : visual // *Antioxid Redox Signal.* – 2013. – Vol. 18, N 10. – P. 1165-1207.

227. Leung, L. Introduction to Drug Transporters. *Drug Metabolism Handbook: Concepts and Applications* / L. Leung, A. Oganessian. – NJ, USA: Wiley: Hoboken, 2009. – P. 89-126.

228. Li, J. Refined structures of mouse P-glycoprotein / J. Li, K.F. Jaimes, S.G. Aller. – Text : visual // *Protein Sci.* – 2014. – Vol. 23, N 1. – P. 34-46.

229. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine / A. Sparreboom, J. van Asperen, U. Mayer [et al.]. – Text : visual // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1997. – Vol. 94, N5. – P. 2031-2035.

230. Linnet, K. A review on the impact of P-glycoprotein on the penetration of drugs into the brain. Focus on psychotropic drugs / K. Linnet, T.B. Ejsing. – Text : visual // *Eur Neuropsychopharmacol.* 2008. – Vol. 18, N 3. – P. 157-169. doi: 10.1016/j.euroneuro.2007.06.003. Epub 2007 Aug 1. PMID: 17683917.

231. Liochev, S.I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging / S.I. Liochev. – Text : visual // *Free Radic Biol Med.* – 2013. – Vol. 60. – P. 1-4. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.011. Epub 2013 Feb 19. PMID: 23434764.

232. Liu, X. ABC Family Transporters / X. Liu. – Text : visual // *Adv Exp Med Biol.* – 2019. – Vol. 1141. – P. 13-100. doi: 10.1007/978-981-13-7647-4_2. PMID: 31571164.

233. Liu, X. Drug Transporters in Drug Disposition, Effects and Toxicity / X. Liu, G. Pan. – Text : visual // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2019. – Springer Nature Singapore Pte Ltd. – Vol. 1141. – P. 78-86.
234. Loscher, W. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases / W. Loscher, H. Potschka. – Text : visual // *Prog Neurobiol*. – 2005. – Vol. 76, N 1. – P. 22-76.
235. Lu, S. The evolution of the concept of stress and the framework of the stress system / S. Lu, F. Wei, G. Li. – Text : visual // *Cell Stress*. – 2021. – Vol. 5, N 6. – P. 76-85. doi: 10.15698/cst2021.06.250. PMID: 34124582; PMCID: PMC8166217.
236. Maher, J.J. Malondialdehyde stimulates collagen production by hepatic lipocytes only upon activation in primary culture / J. J. Maher, C. Tzagarakis, A. Gimenez. – Text : visual // *Alcohol Alcohol*. – 1994. – Vol. 29, N 5. – P. 605-610.
237. Malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts are not formed on cardiac ryanodine receptor (RyR2) and sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA2) in diabetes / C.J. Moore, C.H. Shao, R. Nagai [et al.]. – Text : visual // *Mol Cell Biochem*. – 2013. – Vol. 376, N 1-2. – P. 121-135. doi: 10.1007/s11010-013-1558-1.
238. Malondialdehyde, a product of lipid peroxidation, is mutagenic in human cells / L.J. Niedernhofer, J.S. Daniels, C.A. Rouzer [et al.]. – Text : visual // *J Biol Chem*. – 2003. – Vol. 278, N 33. – P. 31426-31433.
239. Mapping of Photochemically-Derived Dityrosine across Fe-Bound N-Acetylated α -Synuclein / A.M. Curry, R.D. Fernández, T.D. Pagani [et al.]. – Text : visual // *Life (Basel)*. – 2020. – Vol. 10, N 8. – P. 124. doi: 10.3390/life10080124. PMID: 32726960; PMCID: PMC7459884.
240. Martínez-Reyes, I. The H(+)-ATP synthase: a gate to ROS-mediated cell death or cell survival / I. Martínez-Reyes, J.M. Cuezva. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta*. – 2014. – Vol. 1837, N 7. – P. 1099-1112.
241. Matsuoka, K. The crystal structure of the CmABCB1 G132V mutant, which favors the outward-facing state, reveals the mechanism of the pivotal joint between TM1

and TM3 / K. Matsuoka, T. Nakatsu, H. Kato. – Text : visual // *Protein Sci.* – 2021. – Vol. 30, N 5. – P. 1064-1071. doi: 10.1002/pro.4058.

242. Mechanism of action of human P-glycoprotein ATPase activity. Photochemical cleavage during a catalytic transition state using orthovanadate reveals cross-talk between the two ATP sites / C.A. Hrycyna, M. Ramachandra, S.V. Ambudkar [et al.]. – Text : visual // *J Biol Chem.* – 1998. – Vol. 273, N 27. – P. 16631-16634.

243. Mechanism of drug extrusion by brain endothelial cells via lysosomal drug trapping and disposal by neutrophils / A. Noack, B. Gericke, M. von Köckritz-Blickwede [et al.]. – Text : visual // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2018. – Vol. 115, N 41. – P. 9590-9599.

244. Mensah-Osman, E. Ecteinascidin-743 is a potent inhibitor of P450 3A4 enzyme and accumulates cytoplasmic PXR to inhibit transcription of P450 3A4 and MDR1: implications for the enhancement of cytotoxicity to chemotherapeutic agents in osteosarcoma / E. Mensah-Osman // *ASCO annual meeting.* – 2005. – P. 45-52.

245. MicroRNA-145 post-transcriptionally regulates the expression and function of P-glycoprotein in intestinal epithelial cells / K. Ikemura, M. Yamamoto, S. Miyazaki [et al.]. – Text : visual // *Mol Pharmacol.* – 2013. – Vol. 83, N 2. – P. 399-405.

246. MicroRNA-146a-5p Downregulates the Expression of P-Glycoprotein in Rats with Lithium-Pilocarpine-Induced Status Epilepticus / X. Deng, Y. Shao, Y. Xie [et al.]. – Text : visual // *Biol Pharm Bull.* – 2019 . – Vol. 42, N 5. –P. 744-750. doi: 10.1248/bpb.b18-00937. PMID: 31061316.

247. MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2 / S.Y. Chan, Y.Y. Zhang, C. Hemann [et al.]. – Text : visual // *Cell Metab.* – 2009. – Vol. 10, N 4. – P. 73-84. doi: 10.1016/j.cmet.2009.08.015

248. Mihara, M. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication, and vitamin E deficiency / M. Mihara, M. Uchiyama, K. Fukuzawa. – Text : visual // *Biochem Med.* – 1980. – Vol. 23, N 3. – P. 302-311. doi: 10.1016/0006-2944(80)90040-x.

249. miR-137 restoration sensitizes multidrug-resistant MCF-7/ADM cells to anticancer agents by targeting YB-1 / X. Zhu, Y. Li, H. Shen [et al.]. – Text : visual // *Acta Biochim. Biophys Sin.* – 2013. – Vol. 45, N 2. – P. 80-86.
250. miR200c attenuates P-gp-mediated MDR and metastasis by targeting JNK2/c-jun signaling pathway in colorectal cancer / H. Sui, G. Cai, S. Pan [et al.]. – Text : visual // *Mol Cancer Ther.* – 2014. – Vol. 13, N 12. – P. 3137-3151.
251. MiR-302a/b/c/d cooperatively sensitizes breast cancer cells to adriamycin via suppressing P-glycoprotein(P-gp) by targeting MAP/ERK kinase kinase 1 (MEKK1) / L. Zhao, Y. Wang, L. Jiang [et al.]. – Text : visual // *J Exp Clin Cancer Res.* – 2016. – Vol. 35. – P. 25.
252. Mishra, O.P. Cellular mechanisms of hypoxic injury in the developing brain / O.P. Mishra, M. Delivoria-Papadopoulos. – Text : visual // *Brain Res Bull.* – 1999. – Vol. 48, N 3. – P. 233-238.
253. Misra, H.P. Reaction of copper-zinc superoxide dismutase with diethyldithiocarbamate / H.P. Mirsa. – Text : visual // *J Biol Chem.* – 1979. – Vol. 254, N 22. – P. 11623-11628.
254. Mitochondrial expression and activity of P-glycoprotein under oxidative stress in outer blood-retinal barrier / Yu. Zhang, Ju. Li, W. Yang [et al.]. – Text : visual // *Int. J. Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 10, N 7. – P. 1055-1063.
255. Mitochondrial expression and activity of P-glycoprotein under oxidative stress in outer blood-retinal barrier / Y.H. Zhang, J. Li, W.Z. Yang [et al.]. – Text : visual // *Int J Ophthalmol.* – 2017. – Vol. 10, N 7. – P. 1055-1063. doi: 10.18240/ijo.2017.07.06. PMID: 28730106. PMCID: PMC5514265.
256. MOAP-1-mediated dissociation of p62/SQSTM1 bodies releases Keap1 and suppresses Nrf2 signaling / C.T. Tan, H.C. Chang, Q. Zhou [et al.]. – Text : visual // *EMBO Rep.* – 2021. – Vol. 22, N 1. – P. e50854. doi: 10.15252/embr.202050854. Epub 2021 Jan 4. PMID: 33393215. PMCID: PMC7788458.

257. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53 / K.V. Chin, K. Ueda, I. Pastan, M.M. Gottesman. – Text : visual // *Science*. – 1992. – Vol. 255, N 5043. – P. 459-462.
258. Modulation of Wnt/ β -catenin signaling promotes blood-brain barrier phenotype in cultured brain endothelial cells / M. Laksitorini, V. Yathindranath, W. Xiong [et al.]. – Text : visual // *Sci Rep*. – 2019. – Vol. 9, N 1. – P. 19718.
259. Molecular symmetry in mitochondrial cardiolipins / M. Schlame, M. Ren, Y. Xu [et al.]. – Text : visual // *Chem Phys Lipids*. – 2005. – Vol. 138, N 1-2. – P. 38-49.
260. Mora Lagares, L. Multiclass Classifier for P-Glycoprotein Substrates, Inhibitors, and Non-Active Compounds / L. Mora Lagares, N. Minovski, M. Novič. – Text : visual // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, N 10. – P. 2006. doi: 10.3390/molecules24102006. PMID: 31130601; PMCID: PMC6571636.
261. Murray, I.A. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe / I.A. Murray, A.D. Patterson, G.H. Perdew. – Text : visual // *Nat Rev Cancer*. – 2014. – Vol. 14, N 12. – P. 801-814.
262. Musson, R.E.A. Effects of arsenite and UVA-1 radiation on calcineurin signaling / R.E.A. Musson, L.H.F. Mullenders, N.P.M. Smit. – Text : visual // *Mutat Res*. – 2012. – Vol. 735, N 1-2. – P. 32-38.
263. Na⁺/K⁺-ATPase level and products of lipid peroxidation in live cells treated with therapeutic lithium for different periods in time (1, 7, and 28 days); studies of Jurkat and HEK293 cells / M. Vosahlikova, L. Roubalova, H. Ujcikova [et al.]. – Text : visual // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. – 2019. – Vol. 392, N 7. – P. 785-799. doi: 10.1007/s00210-019-01631-4. Epub 2019 Feb 21. PMID: 30790031.
264. Narayan, M. The Formation of Native Disulfide Bonds: Treading a Fine Line in Protein Folding / M. Narayan. – Text : visual // *Protein J*. – 2021. – Vol. 40, N 2. – P. 134-139. doi: 10.1007/s10930-021-09976-7. Epub 2021 Mar 25. PMID: 33765253.
265. New insight into P-glycoprotein as a drug target / A. Breier, L. Gibalova, M. Seres [et al.]. – Text : visual // *Anticancer Agents Med Chem*. – 2013. – Vol. 13, N 1. – P. 159-170.

266. New insights in the in vitro characterisation and molecular modelling of the P-glycoprotein inhibitory promiscuity / G. Bocci, A. Moreau, P. Vayer [et al.]. – Text : visual // *Eur J Pharm Sci.* – 2018. – Vol. 121. – P. 85-94.
267. Nguyen, T.-T.-L. Pharmaceutical Formulations with P-Glycoprotein Inhibitory Effect as Promising Approaches for Enhancing Oral Drug Absorption and Bioavailability / T.-T.-L. Nguyen, V.-A. Duong, H.-J. Maeng. – Text : visual // *Pharmaceutics.* – 2021. – Vol. 13, N 7. – P. 1103.
268. Nifurtimox is effective against neural tumor cells and is synergistic with Buthionine Sulfoximine / M. Du, L. Zhang, K.A. Scorsone [et al.]. – Text : visual // *Sci Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 27458. doi: 10.1038/srep27458.
269. Niki, E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material / E. Niki. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – Vol. 1840, N 2. – P. 809-817.
270. Nitric oxide differentially regulates renal ATP-binding cassette transporters during endotoxemia / S. Heemskerk, A. van Koppen, L. van den Broek [et al.]. – Text : visual // *Pflugers Arch.* – 2007. – Vol. 454, N 2. – P. 321-334.
271. Novel curcumin derivatives as P-glycoprotein inhibitors: Molecular modeling, synthesis and sensitization of multidrug resistant cells to doxorubicin / M. Sagnou, F.N. Novikov, E.S. Ivanova [et al.]. – Text : visual // *Eur J Med Chem.* – 2020. – Vol. 198. – P. 112331. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112331.
272. Novel features in the structure of P-glycoprotein (ABCB1) in the post-hydrolytic state as determined at 7.9 Å resolution / N. Thonghin, R.F. Collins, A. Barbieri [et al.]. – Text : visual // *BMC Struct Biol.* – 2018. – Vol. 18, N 1. – P. 17.
273. Nrf2 overexpression protects against paraquat-induced A549 cell injury primarily by upregulating P-glycoprotein and reducing intracellular paraquat accumulation / B. Wu, H.-X. Li, J. Lian [et al.]. – Text : visual // *Exp Ther Med.* – 2019. – Vol. 17, N 2. – P. 1240-1247. doi: 10.3892/etm.2018.7044.
274. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation / A.V. Ulasov, A.A. Rosenkranz, G.P. Georgiev [et al.]. – Text : visual // *Life Sci.* – 2022. – Vol. 291. –

P.120111. doi: 10.1016/j.lfs.2021.120111. Epub 2021 Oct 31. PMID: 34732330. PMCID: PMC8557391.

275. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress / I. Bellezza, I. Giambanco, A. Minelli [et al.]. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* – 2018. – Vol. 1865, N 5. – P. 721-733.

276. Nuclear receptor mediated induction of cytochrome P450 3A4 by anticancer drugs: a key role for the pregnane X receptor / S. Harmsen, I. Meijerman, J.H. Beijnen. – Text : visual // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2009. – Vol. 64, N 1. – P. 35-43. doi: 10.1007/s00280-008-0842-3.

277. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects / A. di Masi, E. De Marinis, P. Ascenzi [et al.]. – Text : visual // *Mol Aspects Med.* – 2009. – Vol. 30, N 5. – P. 297-343.

278. Opioid-induced respiratory depression: ABCB1 transporter pharmacogenetics / S. Sadhasivam, V. Chidambaran, X. Zhang [et al.]. – Text : visual // *Pharmacogenomics J.* – 2015. – Vol. 15, N 2. – P. 119-126.

279. Optimizing Targeted Inhibitors of P-Glycoprotein Using Computational and Structure-Guided Approaches / J.G. Wise, A.K. Nanayakkara, M. Aljowni [et al.]. – Text : visual // *J Med Chem.* – 2019. – Vol. 62, N 23. – P. 10645-10663. doi: 10.1021/acs.jmedchem.9b00966. PMID: 31702922. PMCID: PMC7031812.

280. Osthole shows the potential to overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human myelogenous leukemia K562/ADM cells by inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway / H. Wang, X. Jia, J. Chen, J. [et al.]. – Text : visual // *Oncol Rep.* – 2016. – Vol. 35, N 6. – P. 3659-3668.

281. Oxidation of Met1606 in von Willebrand factor is a risk factor for thrombotic and septic complications in chronic renal failure / V. De Filippis, S. Lancellotti, F. Maset [et al.]. – Text : visual // *Biochem J.* – 2012. – Vol. 442, N 2. – P. 423-432.

282. Oxidative damage to proteins and lipids of CNS myelin produced by in vitro generated reactive oxygen species / E.R. Bongarzone, J.M. Pasquini, E.F. Soto [et al.]. –

Text : visual // J Neurosci Res. – 1995. – Vol. 41, N 2. – P. 213-221. doi: 10.1002/jnr.490410209. PMID: 7650757.

283. Oxidative post-translational modification of tryptophan residues in cardiac mitochondrial proteins / S.W. Taylor, E. Fahy, J. Murray [et al.]. – Text : visual // J Biol Chem. – 2003. – Vol. 278, N 22. – P. 19587-19590.

284. Oxidative stress and its role in cancer / M.D. Jelic, A.D. Mandic, S.M. Maricic [et al.]. – Text : visual // J Cancer Res Ther. – 2021. – Vol. 17, N 1. – P. 22-28. doi: 10.4103/jcrt.JCRT_862_16. PMID: 33723127.

285. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status / A.M. Pisoschi, A. Pop, F. Iordache [et al.]. – Text : visual // Eur J Med Chem. – 2021. – Vol. 209. – P. 112891. doi: 10.1016/j.ejmech.2020.112891. Epub 2020 Sep 30. PMID: 33032084.

286. Oxidative Stress Promotes Doxorubicin-Induced Pgp and BCRP Expression in Colon Cancer Cells Under Hypoxic Conditions / M.L. Pinzón-Daza, Y. Cuellar-Saenz, F. Nualart [et al.]. – Text : visual // J Cell Biochem. – 2017. – Vol. 118, N 7. – P. 1868-1878. doi: 10.1002/jcb.25890. Epub 2017 Mar 28. PMID: 28106284.

287. Oxidative stress-induced activation of Abl and Src kinases rapidly induces P-glycoprotein internalization via phosphorylation of caveolin-1 on tyrosine-14, decreasing cortisol efflux at the blood–brain barrier / Y. Hoshi, Y. Uchida, M. Tachikawa [et al.]. – Text : visual // J. Cerebral Blood Flow Metabolism. – 2019. – Vol. 40, N 2. – P. 420-436.

288. Oxidized alpha1-antitrypsin stimulates the release of monocyte chemoattractant protein-1 from lung epithelial cells: potential role in emphysema / Z. Li, S. Alam, J. Wang [et al.]. – Text : visual // Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. – 2009. – Vol. 297, N 2. – P. 388-400. doi: 10.1152/ajplung.90373.2008. Epub 2009 Jun 12. PMID: 19525388. PMCID: PMC2742802.

289. p53-dependent regulation of MDR1 gene expression causes selective resistance to chemotherapeutic agents / J.V. Thottassery, G.P. Zambetti, K. Arimori [et al.]. – Text : visual // Proc Natl Acad Sci USA. – 1997. – Vol. 94, N 20. – P. 11037-11042.

290. p62 links autophagy and Nrf2 signaling / T. Jiang, B. Harder, M. Rojo de la Vega [et al.]. – Text : visual // *Free Radic Biol Med.* – 2015. – Vol. 88 (Pt B). – P. 199-204. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.06.014.
291. Peroxide-dependent sulfenylation of the EGFR catalytic site enhances kinase activity / C.E. Paulsen, T.H. Truong, F.J. Garcia [et al.]. – Text : visual // *Nat Chem Biol.* – 2011. – Vol. 8, N 1. – P. 57-64.
292. Peyer's patch myeloid cells infection by *Listeria* signals through gp38+ stromal cells and locks intestinal villus invasion / O. Disson, C. Bleriot, J.M. Jacob [et al.]. – Text : visual // *J Exp Med.* – 2018. – Vol. 215, N 11. – P. 2936-2954.
293. P-glycoprotein Activity Correlates With Treatment Response in 2 Leukemia Child Patients / M.J. Muñoz-Pérez, S. Casco, M.D.C. Garza-González [et al.]. – Text : visual // *J. Pediatr Hematol Oncol.* – 2018. – Vol. 40, N 8. – P. 490–494.
294. P-glycoprotein and bilirubin disposition / J.F. Watchko, M.J. Daood, B. Mahmood [et al.]. – Text : visual // *J Perinatol.* – 2001. – Vol. 21 (Suppl 1). – P. 43-47; discussion S59-62. doi: 10.1038/sj.jp.7210633. PMID: 11803416.
295. P-glycoprotein expression in immortalised rat brain endothelial cells: comparisons following exogenously applied hydrogen peroxide and after hypoxia-reoxygenation / S.J. Robertson, K.D. Kania, S.B. Hladky [et al.]. – Text : visual // *J. Neurochem.* – 2009. – Vol. 111, N 1. – P. 132-141.
296. P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells: evidence for regulation by transient oxidative stress / R.A. Felix, M.A. Barrand. – Text : visual // *J. Neurochem.* – 2002. – Vol. 80, N 1. – P. 64-72.
297. P-glycoprotein inhibitors and their screening: a perspective from bioavailability enhancement / M.V.S. Varma, Y. Ashokraj, C.S. Dey [et al.]. – Text : visual // *Pharmacol Res.* – 2003. – Vol. 48, N 4. – P. 347-359.
298. P-glycoprotein is stably inhibited by vanadate-induced trapping of nucleotide at a single catalytic site / I. Urbatsch, B. Sankaran, J. Weber [et al.]. – Text : visual // *J Biol Chem.* – 1995. – Vol. 270, N 33. – P. 19383-19390.

299. P-glycoprotein mediates postoperative peritoneal adhesion formation by enhancing phosphorylation of the chloride channel-3 / L. Deng, Q. Li, G. Lin [et al.]. – Text : visual // *Theranostics*. – 2016. – Vol. 6, N 2. – P. 204-218.
300. P-Glycoprotein Overexpression Is Associated With Cisplatin Resistance in Human Osteosarcoma / C. He, Z. Sun, R.M. Hoffman [et al.]. – Text : visual // *Anticancer Res*. – 2019. – Vol. 39, N 4. – P. 1711-1718.
301. P-glycoprotein: a role in the export of amyloid- β in Alzheimer's disease? / A.B. Chai, G.K.F. Leung, R. Callaghan [et al.]. – Text : visual // *FEBS J*. – 2020. – Vol. 287, N 4. – P. 612-625. doi: 10.1111/febs.15148. PMID: 31750987.
302. P-glycoprotein: new insights into structure, physiological function, regulation and alterations in disease / I. Juvale, A. Hamid, K. Halim [et al.]. – Text : visual // *Heliyon*. – 2022. – N 8. – P. e09777.
303. P-gp is involved in the intestinal absorption and biliary excretion of afatinib in vitro and in rats / Y. Zhang, C. Wang, Z. Liu [et al.]. – Text : visual // *Pharmacol Rep*. – 2018. – Vol. 70, N 2. – P. 243-250.
304. Physiological expression and function of the MDR1 transporter in cytotoxic T lymphocytes / M.L. Chen, A. Sun, W. Cao [et al.]. – Text : visual // *J Exp Med*. – 2020. – Vol. 217, N 5. – P. e20191388.
305. Pilocarpine-induced convulsive activity is limited by multidrug transporters at the rodent blood-brain barrier / K. Romermann, J. Bankstahl, W. Loscher [et al.]. – Text : visual // *J Pharmacol Exp Ther*. – 2015. – Vol. 353, N 2. – P. 351-359.
306. Placental P-glycoprotein deficiency enhances susceptibility to chemically induced birth defects in mice / G.R. Lankas, L.D. Wise, M.E. Cartwright [et al.]. – Text : visual // *Reprod Toxicol*. – 1998. – Vol. 12, N 4. – P. 457-463.
307. Poole, L.B. Discovering mechanisms of signaling-mediated cysteine oxidation / L.B. Poole, K.J. Nelson. – Text : visual // *Curr Opin Chem Biol*. – 2008. – Vol. 12, N 1. – P. 18-24.
308. Poongavanam, V. Fingerprint-based in silico models for the prediction of P-glycoprotein substrates and inhibitors / V. Poongavanam, N. Haider, G.F. Ecker. – Text :

visual // *Bioorg Med Chem.* – 2012. – Vol. 20, N 18. – P. 5388-5395. doi: 10.1016/j.bmc.2012.03.045.

309. Potential Regulation Mechanisms of P-gp in the Blood-Brain Barrier in Hypoxia / Y. Ding, R. Wang, J. Zhang [et al.]. – Text : visual // *Curr Pharm Des.* – 2019. – Vol. 25, N 10. – P. 1041-1051. doi: 10.2174/1381612825666190610140153.

310. Potschka, H. Modulating P-glycoprotein regulation: future perspectives for pharmaco-resistant epilepsies? / H. Potschka. – Text : visual // *Epilepsia.* – 2010. – Vol. 51, N 8. – P. 1333-1347.

311. Prajapati, R. Translocation mechanism of P-glycoprotein and conformational changes occurring at drug-binding site: insights from multi-targeted molecular dynamics / R. Prajapati, A.T. Sangamwar. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta.* – 2014. – Vol. 1838, N 11. – P. 2882-2898.

312. Preclinical Pharmacokinetics of Triptolide: A Potential Antitumor Drug / W. Song, M. Liu, J. Wu [et al.]. – Text : visual // *Curr Drug Metab.* – 2019. – Vol. 20, N 2. – P. 147-154. doi: 10.2174/1389200219666180816141506. PMID: 30112986.

313. Prevention of Oxidative Stress by α -Ketoglutarate via Activation of CAR Signaling and Modulation of the Expression of Key Antioxidant-Associated Targets in Vivo and in Vitro / L. He, J. Wu, W. Tang [et al.]. – Text : visual // *J Agric Food Chem.* – 2018. – Vol. 66, N 43. – P. 11273-11283. doi: 10.1021/acs.jafc.8b04470.

314. Protein kinase C and oxidative stress in an animal model of mania / A.V. Steckert, S.S. Valvassori, F. Mina [et al.]. – Text : visual // *Curr Neurovasc Res.* – 2012. – Vol. 9, N 1. – P. 47-57. doi: 10.2174/156720212799297056. PMID: 22272765.

315. Pugh, B.F. Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex / B.F. Pugh, R. Tjian. – Text : visual // *Genes Dev.* – 1991. – Vol. 5, N 11. – P. 1935-1945.

316. PXR-mediated induction of P-glycoprotein by anticancer drugs in a human colon adenocarcinoma-derived cell line / S. Harmsen, I. Meijerman, C.L. Febus [et al.]. – Text : visual // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2010. – Vol. 66, N 4. – P. 765-771. doi: 10.1007/s00280-009-1221-4.

317. PXR-mediated P-glycoprotein induction by small molecule tyrosine kinase inhibitors / S. Harmsen, I. Meijerman, R.F. Maas-Bakker [et al.]. – Text : visual // *Eur J Pharm Sci.* – 2013. – Vol. 48, N 4-5. – P. 644-649.

318. Quantitative Analysis of in Vivo Methionine Oxidation of the Human Proteome / J.Q. Bettinger, K.A. Welle, J.R. Hryhorenko [et al.]. – Text : visual // *J Proteome Res.* – 2020. – Vol. 19, N 2. – P. 624-633. doi: 10.1021/acs.jproteome.9b00505. Epub 2020 Jan 7. PMID: 31801345. PMCID: PMC7077757.

319. Ray, P.D. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling / P.D. Ray, B.-W. Huang, Y. Tsuji. – Text : visual // *Cell Signal.* – 2012. – Vol. 24, N 5. – P. 981-990.

320. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation / D. Gérard-Monnier, I. Erdelmeier, K. Régnard [et al.]. – Text : visual // *Chem Res Toxicol.* – 1998. – Vol. 11, N 10. – P. 1176-1183.

321. Reactive oxygen species participate in *mdr1b* mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures / C. Ziemann, A. Bürkle, G.F. Kahl [et al.]. – Text : visual // *Carcinogenesis.* – 1999. – Vol. 20, N 3. – P. 407-414.

322. Recent advances in cell membrane camouflage-based biosensing application / X. Yu, L. Sha, Q. Liu [et al.]. – Text : visual // *Biosens Bioelectron.* – 2021. – Vol. 194. – P. 113623. doi: 10.1016/j.bios.2021.113623. Epub 2021 Sep 11. PMID: 34530371.

323. Reddie, K.G. Expanding the functional diversity of proteins through cysteine oxidation / K.G. Reddie, K.S. Carroll. – Text : visual // *Current Opinion in Chemical Biology.* – 2008. – Vol. 12, N 6. – P. 746-754.

324. Redox Control of Multidrug Resistance and Its Possible Modulation by Antioxidants / A. Cort, T. Ozben, L. Saso [et al.]. – Text : visual // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – P. 4251912.

325. Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H₂O₂ mediated cell signaling / S.-H. Cho, C.-H. Lee, Y. Ahn [et al.]. – Text : visual // FEBS Lett. – 2004. – Vol. 560, N 1-3. – P. 7-13.

326. Redoxins and Redox-dependent Changes under Development of Cancer Drug Resistance / E.V. Kalinina, A.A. Hasan, A. Alsaïdi [et al.]. – Text : visual // Free Radical Biology and Medicine. – 2020. – Vol. 159. – P. 55-56. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.10.149.

327. Regulation of P-glycoprotein by miR-27a-3p at the Brain Endothelial Barrier / S. Hammad, A. Mabondzo, R. Hamoudi [et al.]. – Text : visual // J Pharm Sci. – 2022. – Vol. 111, N 5. – P. 1470-1479. doi: 10.1016/j.xphs.2021.10.021. Epub 2021 Oct 23. PMID: 34695419.

328. Renal tubular P-glycoprotein expression is reduced in plasma cell disorders / C. Heybeli, M.A. Oktan, H.U. Arda [et al.]. – Text : visual // Kidney Res Clin Pract. – 2019. – Vol. 38, N 2. – P. 186-195. doi: 10.23876/j.krcp.18.0134. PMID: 30970392; PMCID: PMC6577216.

329. Requena, J.R. Recent advances in the analysis of oxidized proteins / J.R. Requena, R.L. Levine, E.R. Stadtman. – Text : visual // Amino Acids. – 2003. – Vol. 25, N 3-4. – P. 221-226. doi: 10.1007/s00726-003-0012-1. Epub 2003 Jul 29. PMID: 14661085.

330. Response of antioxidant defense to oxidative stress induced by H₂O₂ and NO in anammox bacteria / H. Wang, Y. Yan, L. Zhang [et al.]. – Text : visual // Chemosphere. – 2021. – Vol. 282. – P. 131008. doi: 10.1016/j.chemosphere.2021.131008.

331. Resveratrol increases anti-proliferative activity of bestatin through downregulating P-glycoprotein expression via inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway in K562/ADR cells / L. Wang, C. Wang, Y. Jia [et al.]. – Text : visual // J Cell Biochem. – 2016. – Vol. 117, N 5. – P. 1233-1239.

332. Resveratrol reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of U2OS/ADR cells by suppressing the activation of the NF- κ B and p38 MAPK signaling

pathways / R. Zhang, M. Lu, Z. Zhang [et al.]. – Text : visual // *Oncol Lett.* – 2016. – Vol. 12, N 5. – P. 4147-4154.

333. Reversal of P-gp and BCRP-mediated MDR by tariquidar derivatives / X.-Q. Li, L. Wang, Y. Lei [et al.]. – Text : visual // *Eur J Med Chem.* – 2015. – Vol. 101. – P. 560-572.

334. Reversible dimers of the atypical antipsychotic quetiapine inhibit P-glycoprotein-mediated efflux in vitro with increased binding affinity and in situ at the blood-brain barrier / D. Emmert, C.R. Campos, D. Ward [et al.]. – Text : visual // *ACS Chem Neurosci.* – 2014. – Vol. 5, N 4. – P. 305-317.

335. Review on the role of glutathione on oxidative stress and infertility / O. Adeoye, J. Olawumi, A. Opeyemi [et al.]. – Text : visual // *JBRA Assist Reprod.* – 2018. – Vol. 22, N 1. – P. 61-66.

336. Ribophorin II potentiates P-glycoprotein- and ABCG2-mediated multidrug resistance via activating ERK pathway in gastric cancer / H. Zhang, H. Jiang, H. Zhang [et al.]. – Text : visual // *Int J Biol Macromol.* – 2019. – Vol. 128. – P. 574-582.

337. Rifampin and digoxin induction of MDR1 expression and function in human intestinal (T84) epithelial cells / I.S. Haslam, K. Jones, T. Coleman [et al.]. – Text : visual // *Br J Pharmacol.* – 2008. – Vol. 154, N 1. – P. 246-255. doi: 10.1038/bjp.2008.69. Epub 2008 Mar 10. PMID: 18332862. PMCID: PMC2438975.

338. Role of Caco-2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption / P. Shah, V. Jogani, T. Bagchi [et al.]. – Text : visual // *Biotechnology Prog.* – 2006. – Vol. 22, N 1. – P. 186-198. doi: 10.1021/bp050208u.

339. Role of peroxisomes as a source of reactive oxygen species (ROS) signaling molecules / L.M. Sandalio, M. Rodríguez-Serrano, M.C. Romero-Puertas [et al.]. – Text : visual // *Subcell Biochem.* – 2013 – Vol. 69. – P. 231-255. doi: 10.1007/978-94-007-6889-5_13. PMID: 23821152.

340. Roles of oxidative stress in activation of Kupffer and Ito cells in liver fibrogenesis / H. Tsukamoto, R.A. Rippe, O.J. Niemela [et al.]. – Text : visual // *Gastroenterol Hepatol.* – 1995. – Vol. 10 (Suppl. 1). – P. 50-53.

341. Sankaran, B. Inhibition of P-glycoprotein ATPase activity by beryllium fluoride / B. Sankaran, S. Bhagat, A.E. Senior. – Text : visual // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36, N 22. – P. 6847-6853.
342. Schinkel, A. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview / A. Schinkel, J.W. Jonker. – Text : visual // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2003. – Vol. 55, N 1. – P. 3-29.
343. Schinkel, A.H. The physiological function of drug-transporting P-glycoproteins / A.H. Schinkel. – Text : visual // *Semin Cancer Biol*. – 1997. – Vol. 8, N 3. – P. 161-170. doi: 10.1006/scbi.1997.0068. PMID: 9441946.
344. Schofield, C.J. Signalling hypoxia by HIF hydroxylases / C.J. Schofield, P.J. Ratcliffe. – Text : visual // *Biochem Biophys Res Commun*. – 2005. – Vol. 338, N 1. – P. 617-626. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.111.
345. Scotto, K.W. Transcription of the multidrug resistance gene MDR1: a therapeutic target / K.W. Scotto, R.A. Johnson. – Text : visual // *Mol Interv*. – 2001. – Vol. 1, N 2. – P. 117-125. PMID: 14993331.
346. Scotto, K.W. Transcriptional regulation of ABC drug transporters / K.W. Scotto. – Text : visual // *Oncogene*. – 2003. – Vol. 22, N 47. – P. 7496-7511.
347. Seebacher, N.A. Glucose modulation induces reactive oxygen species and increases P-glycoprotein-mediated multidrug resistance to chemotherapeutics / N.A. Seebacher, D.R. Richardson, P.J. Jansson. – Text : visual // *Br. J. Pharmacol.* - 2015. - Vol. 172, N 10. - P. 2557-2572
348. Seizure-induced up-regulation of P-glycoprotein at the blood-brain barrier through glutamate and cyclooxygenase-2 signaling / B. Bauer, A.M. Hartz, A. Pekcec [et al.]. – Text : visual // *Mol Pharmacol*. – 2008. – Vol. 73, N 5. – P. 1444-1453.
349. Selective activation of oxidized PTP1B by the thioredoxin system modulates PDGF- β receptor tyrosine kinase signaling / M. Dagnell, J. Frijhoff, I. Pader [et al.]. – Text : visual // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2013. – Vol. 110, N 33. – P. 13398-13403.

350. Semenza, G.L. HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism / G.L. Semenza. – Text : visual // *Curr Opin Genet Dev.* – 2010. – Vol. 20, N 1. – P. 51-56. doi: 10.1016/j.gde.2009.10.009.

351. Semenza, G.L. Hypoxia-inducible factor 1: regulator of mitochondrial metabolism and mediator of ischemic preconditioning / G.L. Semenza. – Text : visual // *Biochim Biophys Acta.* – 2011. – Vol. 1813, N 7. – P. 1263-1268. doi:10.1016/j.bbamcr.2010.08.006

352. Separation, detection, and quantification of hydroperoxides formed at side-chain and backbone sites on amino acids, peptides, and proteins / P.E. Morgan, D.I. Pattison, C.L. Hawkins [et al.]. – Text : visual // *Free Radic Biol. Med.* – 2008. – Vol. 45, N 9. – P. 1279-1289.

353. Share conserved walker A cysteines 431 and 1074 in human P-glycoprotein are accessible to thiol-specific agents in the apo and ADP-vanadate trapped conformations / H.M. Sim, J. Bhatnagar, E.E. Chufan [et al.]. – Text : visual // *Biochemistry.* – 2013. – Vol. 52, N 41. – P. 7327-7338. <https://doi.org/10.1021/bi4007786>.

354. Sharom, F.J. Complex interplay between the P-glycoprotein multidrug efflux pump and the membrane: its role in modulating protein function / F.J. Sharom. – Text : visual // *Front Oncol.* – 2014. – Vol. 4. – P. 41.

355. Shitara, Y. Transporters as a determinant of drug clearance and tissue distribution / Y. Shitara, T. Horie, Y. Sugiyama. – Text : visual // *Eur J Pharm Sci.* – 2006. – Vol. 27, N 5. – P. 425-446.

356. Sies, H. Introductory Remarks / H. Sies. – Text : visual // *Oxidative Stress.* – London: Academic Press, 1985. – P. 1-8.

357. Sies, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development / H. Sies. – Text : visual // *Current Opinion in Toxicology.* – 2018. – Vol. 7. – P. 122-126.

358. Sies, H. Oxidative stress: damage to intact cells and organs / H. Sies, E. Cadenas. – Text : visual // *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* – 1985. – Vol. 311, N 1152. – P. 617-631.

359. Sies, H. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents / H. Sies, D.P. Jones. – Text : visual // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2020. – Vol. 21, N 7. – P. 363-383. doi: 10.1038/s41580-020-0230-3. Epub 2020 Mar 30. PMID: 32231263.

360. Skotland, T. Need for more focus on lipid species in studies of biological and model membranes / T. Skotland, K. Sandvig. – Text : visual // *Prog Lipid Res.* – 2022. – Vol. 86. – P. 101160. doi: 10.1016/j.plipres.2022.101160.

361. Smirnoff, N. Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants / N. Smirnoff, D. Arnaud. – Text : visual // *New Phytol.* – 2019. – Vol. 221, N 3. – P. 1197-1214.

362. Sp1 and Sp3 transcription factors mediate malondialdehyde-induced collagen alpha 1(I) gene expression in cultured hepatic stellate cells / I. García-Ruiz, P. de la Torre, T. Díaz [et al.]. – Text : visual // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277, N 34. – P. 30551-30558. doi: 10.1074/jbc.M203368200.

363. Spickett, C.M. Modification of proteins by reactive lipid oxidation products and biochemical effects of lipoxidation / C.M. Spickett, A.R. Pitt. – Text : visual // *Essays Biochem.* – 2020. – Vol. 64, N 1. – P. 19-31.

364. Spiteller, G. Peroxyl radicals: inductors of neurodegenerative and other inflammatory diseases. Their origin and how they transform cholesterol, phospholipids, plasmalogens, polyunsaturated fatty acids, sugars, and proteins into deleterious products / G. Spiteller. – Text : visual // *Free Radic Biol Med.* – 2006. – Vol. 41, N 3. – P. 362-387.

365. SPOP mutations promote p62/SQSTM1-dependent autophagy and Nrf2 activation in prostate cancer / Q. Shi, X. Jin, P. Zhang [et al.]. – Text : visual // *Cell Death Differ.* – 2022. – Vol. 29, N 6. – P. 1228-1239. doi: 10.1038/s41418-021-00913-w. Epub 2022 Jan 6. PMID: 34987184. PMCID: PMC9177840.

366. Sri Iswari, R. Malondialdehyde (MDA) Production in Atherosclerosis Supplemented with Steamed Tomato / R. Sri Iswari, M. Dafip, E. Purwantoyo. – Text : visual // Pak J Biol Sci. – 2021. – Vol. 24, N 3. – P. 319-325. doi: 10.3923/pjbs.2021.319.325.

367. Stimulation of collagen gene expression by ascorbic acid in cultured human fibroblasts. A role for lipid peroxidation? / M. Chojkier, K. Houglum, J. Solis-Herruzo [et al.]. – Text : visual // J Biol Chem. – 1989. – Vol. 264, N 28. – P. 16957-16962.

368. Stimulation of lipid peroxidation or 4-hydroxynonenal treatment increases procollagen alpha 1 (I) gene expression in human liver fat-storing cells / M. Parola, M. Pinzani, A. Casini [et al.]. – Text : visual // Biochem Biophys Res Commun. – 1993. – Vol. 194, N 3. – P. 1044-1050.

369. Stockinger, S. Novel functions of type I interferons revealed by infection studies with *Listeria monocytogenes* / S. Stockinger, T. Decker. – Text : visual // Immunobiology. – 2008. – Vol. 213, N 9-10. – P. 889-897.

370. Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors / S. Mollazadeh, A. Sahebkar, F. Hadizadeh [et al.]. – Text : visual // Life Sci. – 2018. – Vol. 214. – P. 118-123.

371. Structural basis for gating mechanisms of a eukaryotic P-glycoprotein homolog / A. Kodan, T. Yamaguchi, T. Nakatsu [et al.] – Text : visual // Proc. Natl. Acad. Sci. – 2014. – Vol. 111, N 11. – P. 4049-4054.

372. Structural model of ATP-binding protein associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport / S.C. Hyde, P. Emsley, M.J. Hartshorn [et al.]. – Text : visual // Nature. – 1990. – Vol. 346, N 6282. – P. 362-365.

373. Structure of P-Glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding / S. Aller, J. Yu, A. Ward [et al.]. – Text : visual // Science. – 2009. – Vol. 323, N 5922. – P. 1718-1722.

374. Structure-activity relationship and mechanism of flavonoids on the inhibitory activity of P-glycoprotein (P-gp)-mediated transport of rhodamine123 and daunorubicin in P-gp overexpressed human mouth epidermal carcinoma (KB/MDR) cells

/ Y. Fang, F. Liang, M. Xia [et al.]. – Text : visual // *Food Chem Toxicol.* – 2021. – Vol. 155. – P. 112381. doi: 10.1016/j.fct.2021.112381.

375. Structure–activity relationship: analyses of p-glycoprotein substrates and inhibitors / R.B. Wang, C.L. Kuo, L.L. Lien [et al.]. – Text : visual // *J Clin Pharm Ther.* – 2003. – Vol. 28, N 3. – P. 203-228.

376. Structure–activity relationships, ligand efficiency, and lipophilic efficiency profiles of benzophenone-type inhibitors of the multidrug transporter P-glycoprotein / I. Jabeen, K. Pleban, U. Rinner [et al.]. – Text : visual // *J Med Chem.* – 2012. – Vol. 55, N 7. – P. 3261-3273.

377. Structure-Function Relationships in the Human P-Glycoprotein (ABCB1): Insights from Molecular Dynamics Simulations / L. Mora Lagares, Y. Pérez-Castillo, N. Minovski [et al.]. – Text : visual // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 23, N 1. – P. 362. doi: 10.3390/ijms23010362. PMID: 35008783. PMCID: PMC8745603.

378. Structures of the multidrug transporter P-glycoprotein reveal asymmetric ATP binding and the mechanism of polyspecificity / L. Esser, F. Zhou, K. Pluchino [et al.]. – Text : visual // *J. Biol. Chem.* – 2017. – Vol. 292, N 2. – P. 446-461.

379. Sueyoshi, T. Phenobarbital response elements of cytochrome P450 genes and nuclear receptors / T. Sueyoshi, M. Negishi. – Text : visual // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2001. – Vol. 41. – P. 123-143.

380. Synold, T.W. The orphan nuclear receptor SXR coordinately regulates drug metabolism and efflux / T.W. Synold, I. Dussault, B.M. Forman. – Text : visual // *Nat Med.* – 2001. – Vol. 7, N 5. – P. 584-590.

381. Synthesis and biological evaluation of 2,5-disubstituted furan derivatives as P-glycoprotein inhibitors for doxorubicin resistance in MCF-7/ADR cell / Y.-S. Li, D.-S. Zhao, X.-Y. Liu [et al.]. – Text : visual // *Eur J Med Chem.* – 2018. – Vol. 151. – P. 546-556.

382. Synthesis and biological evaluation of bifendate derivatives bearing 6, 7-dihydro-dibenzo [c, e] azepine scaffold as potential P-glycoprotein and tumor metastasis

inhibitors / X. Gu, Y. Jiang, Y. Qu [et al.]. – Text : visual // *Eur J Med Chem.* – 2018. – Vol. 145. – P. 379-388.

383. Tamarit, J. Identification of the major oxidatively damaged proteins in *Escherichia coli* cells exposed to oxidative stress / J. Tamarit, E. Cabisco, J. Ros. – Text : visual // *J Biol Chem.* – 1998. – Vol. 273, N 5. – P. 3027-3032.

384. Tanner, S.M. Altered generation of induced regulatory T cells in the FVB.mdr1a^{-/-} mouse model of colitis / S.M. Tanner, E.M. Staley, R.G. Lorenz. – Text : visual // *Mucosal Immunol.* – 2013. – Vol. 6, N 2. –P. 309-323.

385. Taylor, C.T. The effect of HIF on metabolism and immunity / C.T. Taylor, C.C. Scholz. – Text : visual // *Nat Rev Nephrol.* – 2022. – Vol. 18, N 9. – P. 573-587. doi: 10.1038/s41581-022-00587-8. Epub 2022 Jun 20. PMID: 35726016. PMCID: PMC9208707.

386. TGF- β 1 regulation of multidrug resistance P-glycoprotein in the developing male blood-brain barrier / S. Baello, M. Iqbal, E. Bloise [et al.]. – Text : visual // *Endocrinology.* – 2014. – Vol. 155, N 2. – P. 475-484.

387. The biological buffer bicarbonate/CO₂ potentiates H₂O₂-mediated inactivation of protein tyrosine phosphatases / H. Zhou, H. Singh, Z.D. Parsons [et al.]. – Text : visual // *J Am Chem Soc.* – 2011. – Vol. 133, N 40. – P. 15803-15805.

388. The Caco-2 cell monolayer: Usefulness and limitations / H. Sun, E.C. Chow, S. Liu [et al.]. – Text : visual // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* – 2008. – Vol. 4, N 4. – P. 395-411. doi: 10.1517/17425255.4.4.395.

389. The cell membrane as a biosensor of oxidative stress induced by radiation exposure: a multiparameter investigation / M. Benderitter, L. Vincent-Genod, J.P. Pouget [et al.]. – Text : visual // *Radiat Res.* – 2003. – Vol. 159, N 4. – P. 471-483. doi: 10.1667/0033-7587(2003)159[0471:tcmaab]2.0.co;2. PMID: 12643792.

390. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies / C.A. Juan, J.M. Pérez de la Lastra, F.J. Plou [et al.]. – Text : visual // *Int J*

Mol Sci. – 2021. – Vol. 22, N 9. – P. 4642. doi: 10.3390/ijms22094642. PMID: 33924958; PMCID: PMC8125527.

391. The Effect of Verapamil, a P-gp Inhibitor, on the Pharmacokinetics, Safety, and Tolerability of Omadacycline in Healthy Adults: A Phase I, Open-Label, Single-Sequence Study / T.L. Hunt, E. Tzanis, S. Bai [et al.]. – Text : visual // Eur J Drug Metab Pharmacokinet. – 2021. – Vol. 46, N 1. – P. 85-92. doi: 10.1007/s13318-020-00651-3. PMID: 33180250. PMCID: PMC7811981.

392. The Expression and Role of Hypoxia-induced Factor-1 α in Human Tenon's Capsule Fibroblasts under Hypoxia / X. Qin, K. Wu, C. Zuo [et al.]. – Text : visual // Curr Eye Res. – 2021. – Vol. 46, N 3. – P. 417-425. doi: 10.1080/02713683.2020.1805470. Epub 2020 Sep 16. PMID: 32767899.

393. The HIF-1 α antisense long non-coding RNA drives a positive feedback loop of HIF-1 α mediated transactivation and glycolysis / F. Zheng, J. Chen, X. Zhang [et al.]. – Text : visual // Nat Commun. – 2021. – Vol. 12, N 1. – P. 1341. doi: 10.1038/s41467-021-21535-3. PMID: 33637716. PMCID: PMC7910558.

394. The human multidrug resistance (mdr1) gene. cDNA cloning and transcription initiation / K. Ueda, D.P. Clark, C.J. Chen [et al.]. – Text : visual // J Biol Chem. – 1987. – Vol. 262, N 2. – P. 505-508.

395. The human orphan receptor PXR messenger RNA is expressed in both normal and neoplastic breast tissue / H. Dotzlaw, E. Leygue, P. Watson [et al.]. – Text : visual // Clin Cancer Res. – 1999. – Vol. 5, N 8. – P. 2103-2107.

396. The human P-glycoprotein transporter enhances the type I interferon response to *Listeria monocytogenes* infection / N. Sigal, M. Kaplan Zeevi, S. Weinstein [et al.]. – Text : visual // Infect Immun. – 2015. – Vol. 83, N 6. – P. 2358-2368.

397. The peroxisome counteracts oxidative stresses by suppressing catalase import via Pex14 phosphorylation / K. Okumoto, M. El Shermely, M. Natsui [et al.]. – Text : visual // Elife. – 2020. – Vol. 9. – P. e55896. doi: 10.7554/eLife.55896. PMID: 32831175. PMCID: PMC7498260.

398. The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs / J.D. Wessler, L.T. Grip, J.Mendell [et al.]. – Text : visual // *J Am Coll Cardiol.* – 2013. – Vol. 61, N 25. – P. 2495-2502.

399. The prognosis outcome of oral squamous cell carcinoma using HIF-2 α / E. Lim, C.C. Kuo, H.F. Tu [et al.]. – Text : visual // *J Chin Med Assoc.* – 2017. – Vol. 80, N 10. – P. 651-656. doi: 10.1016/j.jcma.2017.06.005. Epub 2017 Jul 6. PMID: 28690120.

400. The role of inter-segmental differences in P-glycoprotein expression and activity along the rat small intestine in causing the double-peak phenomenon of substrate plasma concentration / S. Wada, T. Kano, S. Mita [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Pharmacokinet.* – 2013. – Vol. 28, N 2. – P. 98-103.

401. The role of the Golgi apparatus in oxidative stress: is this organelle less significant than mitochondria? / Z. Jiang, Z. Hu, L. Zeng [et al.]. – Text : visual // *Free Radic Biol Med.* – 2011. – Vol. 50, N 8. – P. 907-917. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.011. Epub 2011 Jan 15. PMID: 21241794.

402. The Selection and Validation of Reference Genes for mRNA and microRNA Expression Studies in Human Liver Slices Using RT-qPCR / T. Zárbynický, P. Matoušková, M. Ambrož [et al.]. – Text : visual // *Genes (Basel).* – 2019. – Vol. 10, N 10. – P. 763. doi: 10.3390/genes10100763. PMID: 31569378; PMCID: PMC6826422.

403. The Structure and Functions of P-Glycoprotein / Y. Li, H. Yuan, K. Yang [et al.]. – Text : visual // *Current Medicinal Chemistry.* – 2010. – Vol. 17, N 8. – P. 786-800.

404. The temporal relationship between ABCB1 promoter hypomethylation, ABCB1 expression and acquisition of drug resistance / K. Reed, S. Hembruff, J. Sprowl, A. Parissenti. – Text : visual // *Pharmacogenomics J.* – 2010. – Vol. 10, N 6. – P. 489-504.

405. The Ubiquitin E3 Ligase TRIM21 Promotes Hepatocarcinogenesis by Suppressing the p62-Keap1-Nrf2 Antioxidant Pathway / F. Wang, Y. Zhang, J. Shen [et al.]. – Text : visual // *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* – 2021. – Vol. 11, N 5. – P. 1369-

1385. doi: 10.1016/j.jcmgh.2021.01.007. Epub 2021 Jan 19. PMID: 33482392. PMCID: PMC8024979.

406. The Universal Protein Resource (UniProt). – Text : electronic. – URL: <http://www.uniprot.org/uniprot/P08183> (дата обращения: 20.09.2022)

407. The xenobiotic transporter MDR1 enforces T cell homeostasis in the presence of intestinal bile acids / W. Cao, H. Kayama, M.L. Chen [et al.]. – Text : visual // *Immunity*. – 2020. – Vol. 52, N 3. – P. 571.

408. The xenobiotic-sensing nuclear receptors pregnane X receptor, constitutive androstane receptor, and orphan nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha in the regulation of human steroid-/bile acid-sulfotransferase / I. Echchgadda, C.S. Song, T. Oh [et al.]. – Text : visual // *Mol Endocrinol*. – 2007. – Vol. 21, N 9. – P. 2099-2111. doi: 10.1210/me.2007-0002. Epub 2007 Jun 26. PMID: 17595319.

409. Time-dependent stabilization of hypoxia inducible factor-1 α by different intracellular sources of reactive oxygen species / M. Calvani, G. Comito, E. Giannoni [et al.]. – Text : visual // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, N 10. – P. e38388.

410. Tinnikov, A.A. A novel cell lysis approach reveals that caspase-2 rapidly translocates from the nucleus to the cytoplasm in response to apoptotic stimuli / A.A. Tinnikov, H.H. Samuels. – Text : visual // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8, N 4. – P. e61085.

411. TM2, a novel semi-synthetic taxoid, exerts anti-MDR activity in NSCLC by inhibiting P-gp function and stabilizing microtubule polymerization / L. Jia, X. Gao, Y. Fang [et al.]. – Text : visual // *Apoptosis*. – 2022. – Vol. 27, N 11-12. – P. 1015-1030 doi: 10.1007/s10495-022-01767-4. PMID: 36107354.

412. TNF- α modulates P-glycoprotein expression and contributes to cellular proliferation via extracellular vesicles / T.S. Berguetti, L.S.P. Quintaes, T. Hancio [et al.]. – Text : visual // *Cells*. – 2019. – Vol. 8, N 5. – P. 500.

413. Tocilizumab attenuates acute lung and kidney injuries and improves survival in a rat model of sepsis via down-regulation of NF- κ B/JNK: a possible role of P-glycoprotein / Y.F. Ibrahim, R.A. Moussa, A.M.A. Bayoumi [et al.]. – Text : visual //

Inflammopharmacology. – 2020. – Vol. 28, N 1. – P. 215-230. doi: 10.1007/s10787-019-00628-y. PMID: 31440860.

414. Tolosa, L. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay / L. Tolosa, M.T. Donato, M.J. Gómez-Lechón. – Text : visual // *Methods Mol Biol.* – 2015. – Vol. 1250. – P. 333-348.

415. Transcriptional regulation of CYP2C9 gene. Role of glucocorticoid receptor and constitutive androstane receptor / S. Gerbal-Chaloin, M. Daujat, J.M. Pascussi [et al.]. – Text : visual // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277, N 1. – P. 209-217.

416. Transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene by the constitutive androstane receptor / B. Goodwin, E. Hodgson, D.J. D'Costa [et al.]. – Text : visual // *Mol Pharmacol.* – 2002. – Vol. 62, N 2. – P. 359-365.

417. Transferrin receptor-involved HIF-1 signaling pathway in cervical cancer / X. Xu, T. Liu, J. Wu [et al.]. – Text : visual // *Cancer Gene Ther.* – 2019. – Vol. 26, N 11-12. – P. 356-365. doi: 10.1038/s41417-019-0078-x. Epub 2019 Jan 17. PMID: 30651591.

418. Transport characteristics of fexofenadine in the Caco-2 cell model / N. Petri, C. Tannergren, D. Rungstad [et al.]. – Text : visual // *Pharmac Res.* – 2004. – Vol. 21, N 8. – P. 1398-1404. doi: 10.1023/B:PHAM.0000036913.90332.b1.

419. Trostchansky, A. Oxidative pathways of arachidonic acid as targets for regulation of platelet activation / A. Trostchansky, R. Moore-Carrasco, E. Fuentes. – Text : visual // *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* – 2019. – Vol. 145. – P. 106382. doi: 10.1016/j.prostaglandins.2019.106382. Epub 2019 Oct 18. PMID: 31634570.

420. Tsikas, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges / D. Tsikas. – Text : visual // *Anal Biochem.* – 2017. – Vol. 524. – P. 13-30. doi: 10.1016/j.ab.2016.10.021.

421. Tsikas, D. Pentafluorobenzyl bromide-A versatile derivatization agent in chromatography and mass spectrometry: I. Analysis of inorganic anions and

organophosphates / D. Tsikas. – Text : visual // *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* – 2017. – Vol. 1043. – P. 187-201. doi: 10.1016/j.jchromb.2016.08.015.

422. Tsukamoto, H. Oxidative stress, antioxidants, and alcoholic liver fibrogenesis / H. Tsukamoto. – Text : visual // *Alcohol.* – 1993. – Vol. 10, N 6. – P. 465-467.

423. Tyrosine kinase signal modulation: a matter of H₂O₂ membrane permeability? / M. Bertolotti, S. Bestetti, J.M. García-Manteiga [et al.]. – Text : visual // *Antioxid Redox Signal.* – 2013. – Vol. 19, N 13. – P. 1447-1451.

424. Tzamelis, I. Role reversal: new insights from new ligands for the xenobiotic receptor CAR / I. Tzamelis, D.D. Moore. – Text : visual // *Trends Endocrinol Metab.* – 2001. – Vol. 12, N 1. – P. 7-10.

425. Ueda, K. Isolation and sequence of the promoter region of the human multidrug-resistance (P-glycoprotein) gene / K. Ueda, I. Pastan, M.M. Gottesman. – Text : visual // *J Biol Chem.* – 1987. – Vol. 262, N 36. – P. 17432-17436.

426. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players / S.S. Ali, H. Ahsan, M.K. Zia [et al.]. – Text : visual // *J Food Biochem.* – 2020. – Vol. 44, N 3. – P. e13145. doi: 10.1111/jfbc.13145. PMID: 31960481.

427. Up-regulation of P-glycoprotein expression by glutathione depletion-induced oxidative stress in rat brain microvessel endothelial cells / H. Hong, Y. Lu, Z. Ji [et al.]. – Text : visual // *J Neurochem.* – 2006. – Vol. 98, N 5. – P. 1465-1473. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03993.x.

428. Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions / R. Elsbey, D.D. Surry, V.N. Smith [et al.]. – Text : visual // *Xenobiotica.* – 2008. – Vol. 38, N 7-8. – P. 1140-1164, doi: 10.1080/00498250802050880.

429. van Groenigen, M. Identification of a functional initiator sequence in the human MDR1 promoter / M. van Groenigen, L.J. Valentijn, F. Baas // *Biochim Biophys Acta.* – 1993. – Vol. 1172, N 1-2. – P. 138-146.

430. Verification of P-Glycoprotein Function at the Dermal Barrier in Diffusion Cells and Dynamic "Skin-On-A-Chip" Microfluidic Device / Á. Bajza, D. Kocsis, O. Berezvai [et al.]. – Text : visual // *Pharmaceutics*. – 2020. – Vol. 12, N 9. – P. 804. doi: 10.3390/pharmaceutics12090804.

431. Vilar, S. In Silico Prediction of P-glycoprotein Binding: Insights from Molecular Docking Studies / S. Vilar, E. Sobarzo-Sánchez, E. Uriarte. – Text : visual // *Curr Med Chem*. – 2019. – Vol. 26, N 10. – P. 1746-1760. doi: 10.2174/0929867325666171129121924. PMID: 29189117.

432. Waghray, D. Inhibit or evade multidrug resistance P-glycoprotein in cancer treatment / D. Waghray, Q. Zhang. – Text : visual // *J Med Chem*. – 2018. – Vol. 61, N 12. – P. 5108-5121.

433. Wang, C. Involvement of p38 MAPK in the drug resistance of refractory epilepsy through the regulation multidrug resistance-associated protein 1 / C. Wang, Z. Hong, Y. Chen. – Text : visual // *Neurochem Res*. – 2015. – Vol. 40, N 7. – P. 1546-1553.

434. Weber, D. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions / D. Weber, M.J. Davies, T. Grune. – Text : visual // *Redox Biol*. – 2015. – Vol. 5. – P. 367-380.

435. Wexler, P. *Encyclopedia of Toxicology* / P. Wexler. – Third Edition. – 2014. – P. 20-39. – Text : visual.

436. What kinds of substrates show P-glycoprotein-dependent intestinal absorption? Comparison of verapamil with vinblastine / T. Ogihara, M. Kamiya, M. Ozawa [et al.]. – Text : visual // *Drug Metab Pharmacokinet*. – 2006. – Vol. 21, N 3. 238-244.

437. Winczura, A. Damage of DNA and proteins by major lipid peroxidation products in genome stability / A. Winczura, D. Zdzalik, B. Tudek. – Text : visual // *Free Radic Res*. – 2012. – Vol. 46, N 4. – P. 442-459. doi: 10.3109/10715762.2012.658516. Epub 2012 Feb 22. PMID: 22257221.

438. Wong, R.P. In vitro antimalarial activity and drug interactions of fenofibric acid / R.P. Wong, T.M. Davis – Text : visual // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2012. – Vol. 56, N 6. – P. 2814-2818.

439. Xanthonones as P-glycoprotein modulators and their impact on drug bioavailability / V. Silva, E. Gil-Martins, B Silva [et al.]. – Text : visual // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* – 2021. – Vol. 17, N 4. – P. 441-482. doi: 10.1080/17425255.2021.1861247

440. Xenobiotic transporters and kidney injury / B. George, D. You, M.S. Joy [et al.]. – Text : visual // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2017. – Vol. 116. – P. 73-91.

441. YAN, a novel microtubule inhibitor, inhibits P-gp and MRP1 function and induces mitotic slippage followed by apoptosis in multidrug-resistant A549/Taxol cells / M. Gao, T. Liu, J. Li [et al.]. – Text : visual // *Toxicol In Vitro.* – 2020. – Vol. 69. – P. 104971. doi: 10.1016/j.tiv.2020.104971.

442. Yano, K. Advances in Studies of P-Glycoprotein and Its Expression Regulators / K. Yano, T. Tomono, T. Ogihara. – Text : visual // *Biol Pharm Bull.* – 2018. – Vol. 41, N 1. – P. 11-19. doi: 10.1248/bpb.b17-00725. PMID: 29311472.

443. Yoon, D.S. Cellular localization of NRF2 determines the self-renewal and osteogenic differentiation potential of human MSCs via the P53–SIRT1 axis / D.S. Yoon, Y. Choi, J.W. Lee. – Text : visual // *Cell Death Dis.* – 2016. – Vol. 7, N 2. – P. e2093. doi: 10.1038/cddis.2016.3.

444. You, D. Epigenetic Regulation of Multidrug Resistance Protein 1 and Breast Cancer Resistance Protein Transporters by Histone Deacetylase Inhibition / D. You, J.R. Richardson, L.M. Aleksunes. – Text : visual // *Drug Metab Dispos.* – 2020. – Vol. 48, N 6. – P. 459–480. doi: 10.1124/dmd.119.089953.

445. Zhang, D. Effects of HIF-1 α on diabetic retinopathy angiogenesis and VEGF expression / D. Zhang, F.L. Lv, G.H. Wang. – Text : visual // *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* – 2018. – Vol. 22, N 16. – P. 5071-5076. doi: 10.26355/eurrev_201808_15699. PMID: 30178824.

446. Zorov, D.B. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release / D.B. Zorov, M. Juhaszova, S.J. Sollott. – Text : visual // *Physiological Rev.* – 2014. – Vol. 94, N 3. – P. 909–950.