

УДК 577.122:615.357

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ БЕЛКА-ТРАНСПОРТЁРА Р-ГЛИКОПРОТЕИНА ПОД ДЕЙСТВИЕМ ОКСИДА АЗОТА

© 2022 А.В. Шулькин*, Ю.В. Абаленихина, Е.А. Судакова,
П.Ю. Мыльников, Е.Н. Якушева

Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова,
390026 Рязань, Россия; электронная почта: alekseishulkin@rambler.ru

Поступила в редакцию 01.02.2022

После доработки 21.03.2022

Принята к публикации 22.03.2022

В исследовании на клетках линии Сасо-2 изучены механизмы регуляции белка-транспортёра Р-гликопротеина (Pgp) под действием оксида азота (NO). В качестве донора NO использовали S-нитрозоглутатион (GSNO), который добавляли к клеткам в концентрациях 1, 10, 50, 100 и 500 мкМ и инкубировали в течение 3, 24 или 72 ч. Относительное количество Pgp анализировали методом вестерн-блот, активность – по транспорту его субстрата фексофенадина. В ходе исследования было показано, что кратковременное воздействие GSNO в течение 3 ч в концентрации 500 мкМ вызывало в клетках линии Сасо-2 повышение уровня пероксинитрита, что снижало активность, но не относительное количество Pgp. Увеличение длительности экспозиции до 24 ч повышало уровень и активность Pgp при концентрации GSNO 10 и 50 мкМ, увеличивало относительное количество без роста активности при концентрации 100 мкМ и снижало содержание белка-транспортёра при концентрации 500 мкМ. При длительности воздействия 72 ч GSNO в концентрации 10 мкМ повышал относительное количество и активность Pgp, а в концентрациях 100 и 500 мкМ снижал содержание белка-транспортёра. С помощью применения специфических ингибиторов было показано, что повышение относительного количества Pgp при воздействии низких концентраций GSNO реализовалось через NO-цГМФ-сигнальный путь, а при повышении концентрации GSNO, развитии нитрозативного стресса – через Nrf2 и конститутивный андростановый рецептор.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Р-гликопротеин, ABCB1-белок, оксид азота, гуанилатциклаза, клеточная линия Сасо-2.

DOI: 10.31857/S0320972522040054, EDN: AQKXME

ВВЕДЕНИЕ

Р-гликопротеин (Pgp, ABCB1, MDR1) – АТФ-зависимый белок-транспортёр, относящийся к суперсемейству ABC-транспортёров и

Принятые сокращения: клетки линии Сасо-2 – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид; АЕМ1 – ингибитор транскрипционного фактора Nrf2 (N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин); CAR – конститутивный андростановый рецептор; CINPA1 – ингибитор CAR (5-[(диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5Н-добензо[b,f]азепин-3-ил)этиловый эфир карбаминовой кислоты); GSNO – S-нитрозоглутатион; NO – оксид азота (II); NOx – метаболиты оксида азота; Nrf2 – транскрипционный фактор, NF-E2-related factor 2; ODQ – ингибитор растворимой гуанилатциклазы (1Н-[1,2,4]оксадиазоло-[4,3-а]хинокса-лин-1-он); Papp – коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient); Pgp – Р-глико-протеин; PXR – прегнан Х рецептор; SNAP – S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин.

* Адресат для корреспонденции.

обеспечивающий выведение субстратов из клеток во внеклеточное пространство и биологические жидкости. Pgp экспрессируется на апикальной поверхности энтероцитов кишечника, билиарной поверхности гепатоцитов, поверхности почечного эпителия, обращенной в просвет канальцев, эндотелии гистогематических барьеров, а также в опухолевых клетках [1]. Учитывая указанную локализацию, принято считать, что основными функциями данного белка-транспортёра являются: участие в фармакокинетике (всасывании, распределении и выведении) лекарственных веществ и развитии резистентности опухолей к химиотерапии [2].

Активность Pgp может изменяться под воздействием различных факторов и веществ. При этом индукторы (рифампицин, карбамазепин) повышают активность белка-транспортёра [3], а ингибиторы (кетоконазол, верапамил) её снижают [4].

Pgp обладает низкой субстратной специфичностью, то есть его субстратами является широ-

кий спектр лекарственных веществ: противоопухолевые препараты, новые пероральные антикоагулянты, сердечные гликозиды, блокаторы кальциевых каналов и т.д. [5]. Изменение активности Pgp может повлиять на эффективность и безопасность терапии данными веществами.

NO (оксид азота II) — сигнальная молекула, обладающая разнообразными физиологическими эффектами. В многочисленных исследованиях было показано, что NO играет важную роль в межклеточных коммуникациях, регуляции сосудистого тонуса, синаптической пластичности, в развитии воспаления и повреждении клеток [6].

Данные научной литературы показывают, что NO также может влиять и на активность Pgp. На изолированных мембранах клеток, содержащих Pgp, донор NO пропиламин-пропиламина ноноат (propylamine propylamine nonoate, PPNO) в концентрациях 0,02–200 мкМ при длительности воздействия 30 мин снижал АТФазную активность Pgp. На клетках рака яичника NCI/ADR-RES, обладающих множественной лекарственной устойчивостью, PPNO в концентрациях 50, 100 и 200 мкМ и экспозиции 1 ч вызывал увеличение накопления в клетках субстрата Pgp адриамицина (Adriamycin), что свидетельствует об ингибировании белка-транспортёра [7]. Аналогичные результаты были получены и с другим донором NO — [O₂-(2,4-динитрофенил)-1-(4-этоксикарбонил)-пиперазин-1ил]-диазен-1-иум-1-2-диолат (JS-K) [8].

На клетках аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2 было показано, что донор NO S-нитрозо-N-ацетилпеницилламин (SNAP) в концентрациях 0,1–5 мМ с длительностью воздействия 6 ч снижал накопление циклоспорина А (субстрата Pgp) не менее чем на 30% ($p = 0,05$), что свидетельствует о повышении активности белка-транспортёра. При концентрации SNAP 1 мМ также отмечалось и повышение количества Pgp, оценённое методом вестерн-блот [9].

На клеточной линии GPNT, представляющей собой иммортализованную линию эндотелиальных клеток головного мозга крысы, было выявлено, что донор NO SNAP в концентрации 1 мМ повышал уровни мРНК генов *mdr1a* и *mdr1b*, кодирующих Pgp у грызунов, а также количество самого белка через 24 ч воздействия [10].

В исследовании на клетках линии Caco-2 было выявлено, что нитропруссид натрия — донор NO, в концентрациях 0,1 или 2 ммоль/литр при краткосрочном воздействии (4 ч) снижал активность и количество Pgp, а 24-часовая экспозиция, напротив, повышала активность и ко-

личество белка-транспортёра. В данном исследовании также было высказано предположение, что повышение активности Pgp (количество при этом не оценивалось) связано с влиянием NO на протеинкиназу С (PKC), фосфоинозитид-3-киназу/протеинкиназу В (PI3K/Akt), митоген-активируемую протеинкиназу p38 (p38 MAPK) [11].

Таким образом, на данный момент полученные результаты о влиянии NO на количество и активность Pgp носят противоречивый характер и механизм данного влияния не установлен, что и послужило целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека Caco-2 (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37 °С, в атмосфере 5% CO₂ в инкубаторе WS-189C («World Science», Корея), в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), с добавлением L-глутамин (4 мМ), 15% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 Ед./мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (все составляющие производства «Sigma-Aldrich», Германия) соответственно. Клетки культивировали в течение 21 сут., поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, гиперэкспрессирующие Pgp [12].

В качестве донора NO использовали S-нитрозоглутатион (GSNO, «Sigma Aldrich»), который добавляли к клеткам до получения конечной концентрации 1, 10, 50, 100 и 500 мкМ и инкубировали в течение 3, 24 или 72 ч ($n = 3$ для каждой концентрации и временной точки). К контрольным клеткам в эквивалентном объёме прибавляли воду для инъекций (растворитель GSNO).

При оценке механизма индукции Pgp под действием GSNO в питательную среду за 30 мин до добавления донора NO вносили: ингибитор растворимой гуанилатциклазы — 1Н-[1,2,4]оксадиазоло-[4,3-а]хиноксалин-1-он (ODQ, «Sigma Aldrich») в концентрации 10 мкМ [13], ингибитор ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (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 [14], ингибитор прегнан X рецептора (PXR) — кетоконазол, 10 мкМ («Sigma Aldrich») [15], ингибитор конс-

титутивного андростанового рецептора (CAR) – 5-[(диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-дибензо[b,f]азепин-3-ил]этиловый эфир карбаминной кислоты (CINPA 1, «TOCRIS», Великобритания) в концентрации 10 мкМ [16]. GSNO использовался в концентрациях, которые вызывали повышение относительного количества Pgp.

Для исследования цитотоксичности GSNO клетки высевали в 96-луночный планшет («Corning», США); для изучения влияния GSNO на относительное количество Pgp, концентрацию метаболитов оксида азота (суммарная концентрация нитратов и нитритов, NOx), пероксинитрита и битирозина клетки культивировали в 6-луночных планшетах («Corning»), а для оценки действия донора NO на активность Pgp – в специальной трансвелл-системе (12 mm Transwell® with 0,4 µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile, «Corning») [17].

Цитотоксический тест (МТТ-тест). Клетки засевали в 96-луночный планшет из расчета 10⁴ клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут., затем добавляли питательную среду с GSNO. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0,5%-ного раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромида (МТТ) и инкубировали в течение 2 ч, затем раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1%-ного раствора диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия) [18]. Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на спектрофотометре для планшетов Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США).

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

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

где ОП – оптическая плотность.

Получение тотальных клеточных лизатов. После окончания экспозиции с GSNO клетки снимали с лунок 6-луночных планшетов раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich»), трижды промывали раствором фосфатного буфера («BioRad», США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo («Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ: 2 мМ (4-(2-аминоэтил)бензенсульфонил флуорида гидрохлорида (AEBSF), 0,3 мкМ апротинина, 130 мкМ бестатина, 1 мМ ЭДТА, 14 мкМ транс-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4гуанидино)бутана (E-64), 1 мкМ лейпептина, («Sigma-Aldrich») в течение 30 мин при +4 °С и постоянном перемешивании из расчета 10⁷ клеток на 100 мкл буфера. Полу-

ченный лизат центрифугировали при 5000 g (СМ-50, «Eppendorf», Германия). Супернатант использовали для выполнения биохимических анализов.

Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, «Thermo Fisher Scientific») [19].

Определение относительного количества Pgp в клетках линии Caco-2 проводили методом вестерн-блот. 20 мкг белков супернатанта подвергали электрофорезу с использованием 7,5%-ного TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США) в буферной системе Laemmli («BioRad»). Образцы смешивали с буфером Laemmli («Bio-Rad»), содержащим 50 мМ β-меркаптоэтанола («Bio-Rad») в соотношении 1 : 3, инкубировали 10 мин при температуре 70 °С. Гели прогоняли при 100 В в течение 90 мин.

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

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

Детекцию белка Pgp проводили с использованием первичных мышинных моноклональных антител (P-Glycoprotein Antibody MA5-13854, «Invitrogen», США) в разведении 1 : 200 в блокирующем растворе Casein blocker («Bio-Rad») в течение 2 ч при 37 °С. Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием вторичных кроличьих антител (Rabbit-anti-Mouse IgG (H + L) Secondary Antibody, HRP, «Invitrogen») в разведении 1 : 4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре. Хемилюминесценцию фиксировали с помощью ChemiDocXRS+ («Bio-Rad»). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad»).

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

Содержание Pgp оценивали относительно уровня белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 («Invitrogen»), разведение 1 : 1000, вторичные антитела – вторичные кроличьи антитела к первичным антителам GAPDH – Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP («Invitrogen»), разведение 1 : 4000).

Определение концентрации битирозина. Образование битирозина регистрировали по интенсивности флуоресценции в фосфатном буфере (рН 7,4) при длине волны возбуждения (λ_{Ext}) 325 нм и длине волны испускания (λ_{Em}) 415 нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-6000 («Shimadzu Corporation», Япония) [20].

Определение концентрации пероксинитрита. Уровень пероксинитрита анализировали по интенсивности светопоглощения при 302 нм (СФ 2000, «ОКБ Спектр», Россия). Концентрацию рассчитывали с использованием молярного коэффициента $1670 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ [21].

Определение уровня метаболитов оксида азота (суммарная концентрация нитратов и нитритов NO_x) проводили спектрофотометрическим методом по окраске в реакции диазотирования нитритом сульфаниламида, входящего в состав реактива Грисса («Нева Реактив», Россия). Интенсивность окраски определяли в видимой области спектра на микропланшетном анализаторе Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США) при длине волны 540 нм [22].

Концентрацию битирозина, пероксинитрита и NO_x выражали в нмоль на мг белка.

Оценка активности Pgp. Активность Pgp оценивали по транспорту субстрата белка-транспортёра H1-гистаминолитика – фексофенадина («Sigma-Aldrich») через монослой клеток линии Caco-2 в специальных трансвелл-системах [23].

Трансвелл-система представлена двумя камерами: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры является полупроницаемой мембраной, на которую высевали клетки линии Caco-2 с плотностью $10^5/\text{см}^2$ и культивировали в течение 21 сут.

Целостность клеточного монослоя оценивали по величине трансэпителиального сопротивления, которое определяли с помощью вольтметра Millicell ERS-2 («Millipore», США). При его значении выше $500 \text{ мОм} \times \text{см}^2$ к клеткам добавляли тестируемые концентрации GSNO в питательной среде. После окончания инкубации питательную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich») с 25 mM Heps («Sigma-Aldrich») и 1% диметилсульфоксида. Затем добавляли субстрат Pgp – фексофенадин, в базолатеральную камеру в концентрации 150 мкМ [24]. Через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из апикальной камеры-реципиента для определения концентрации субстрата (b – a -транспорт, обусловленный работой транспортёра).

Транспорт фексофенадина рассчитывали по формуле, предложенной Elsbj et al. [25]:

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

где P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости (apparent permeability coefficient, см/с), dQ/dt – изменение количества субстрата в камере реципиента за время инкубации (мкМ \times мл/с), A – площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе (см^2), C_0 – начальная концентрация субстрата в камере-доноре (мкМ).

Концентрации фексофенадина в транспортной среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием при длине волны 220 нм. Исследование выполняли на хроматографе «Стайер» («Аквилон», Россия) по оригинальной методике [26]. 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 \times 4,6) («Phenomenex», США) с зернением 4 мкм. Температура разделения – 45 °С. Скорость потока – 1 мл/мин. Состав подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила, 267,4 мл деионизированной воды, 6,33 мл ледяной уксусной кислоты, с добавлением триэтиламина до рН 6,7 (все составляющие производства «PanReac AppliChem», Испания). Время удерживания фексофенадина в данных условиях составляло 12,8 мин. Количественное определение проводили методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составлял 1,2–57,4 мкМ.

Статистический анализ. Полученные результаты анализировали с помощью программ «StatSoft Statistica 13.0» и Microsoft Excel. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$). Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена–Кейлса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Развитие нитрозативного стресса под действием GSNO в клетках линии Caco-2. Уровень метаболитов оксида азота возрастал при всех концентрациях GSNO (1–500 мкМ) и всех сроках эксперимента, максимально – при концентрации 500 мкМ: на 51,8% ($p = 0,0002$) при инкубации

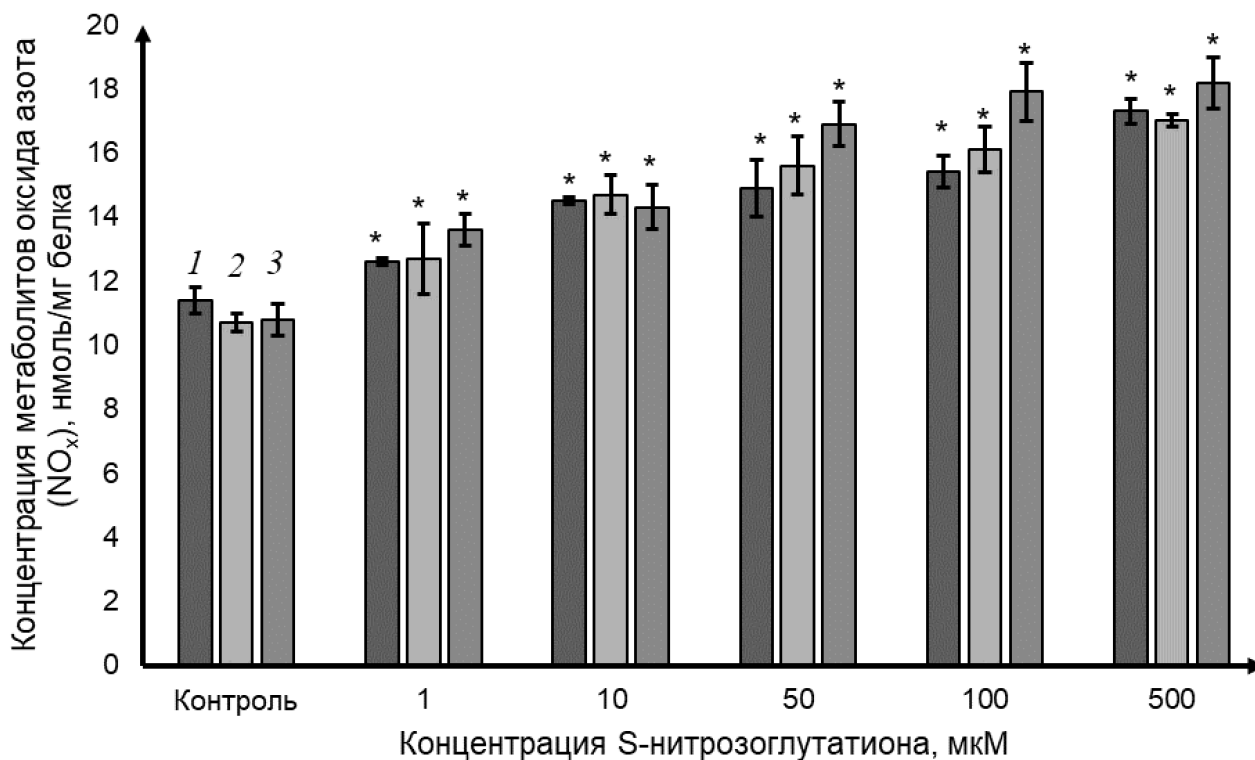


Рис. 1. Изменение концентрации метаболитов оксида азота (NO_x , $M \pm SD$, $n = 3$) при воздействии S-нитроглютамина в течение 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч. Определение метаболитов оксида азота проводили в лизате клеток линии Сасо-2 фотометрическим методом. * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

3 ч; на 58,9% ($p = 0,0002$) при инкубации 24 ч и на 68,5% ($p = 0,0002$) при инкубации 72 ч (рис. 1).

Выраженность нитрозативного стресса оценивали по уровню битирозина и пероксинитрита (рис. 2). Концентрация битирозина не изменялась при воздействии GSNO в концентрациях 1–500 мкМ в течение 3 ч, а также при концентрации 1 мкМ и длительности экспозиции 24 и 72 ч по сравнению с контролем.

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

При длительности эксперимента 3 и 24 ч и концентрации GSNO 100 мкМ содержание пероксинитрита увеличивалось на 68,1% ($p = 0,001$) и 92,6% ($p = 0,0002$) по сравнению с контролем, а

при концентрации 500 мкМ – на 34,0% ($p = 0,01$) и 53,6% ($p = 0,001$) соответственно.

При увеличении длительности экспозиции до 72 ч содержание пероксинитрита возрастало при концентрациях GSNO 1–500 мкМ, максимально – на 84,4% ($p = 0,0002$) при концентрации 500 мкМ (рис. 2, б).

Цитотоксическое действие GSNO оценивалось по результатам МТТ-теста. В контрольной группе жизнеспособность клеток составила 100%. GSNO в концентрациях 1–500 мкМ и длительности инкубации 3 ч достоверно не влиял на жизнеспособность клеток. Данный показатель составил в среднем $102,4 \pm 5,6\%$. При воздействии GSNO в концентрациях 1–50 мкМ и длительности экспозиции 24 ч жизнеспособность клеток также не изменялась, а при концентрациях 100 и 500 мкМ – снижалась до $79,9 \pm 6,7\%$ ($p = 0,02$) и $78,8 \pm 7,2\%$ ($p = 0,03$) соответственно. Увеличение длительности экспозиции до 72 ч приводило к снижению жизнеспособности клеток до $68,4 \pm 11,4\%$ ($p = 0,0004$), $69,5 \pm 6,1\%$ ($p = 0,0004$) и $50,9 \pm 7,5\%$ ($p = 0,0003$) при концентрации GSNO 50, 100 и 500 мкМ соответственно и не влияло на данный показатель при концентрациях GSNO 1–10 мкМ (рис. 3).

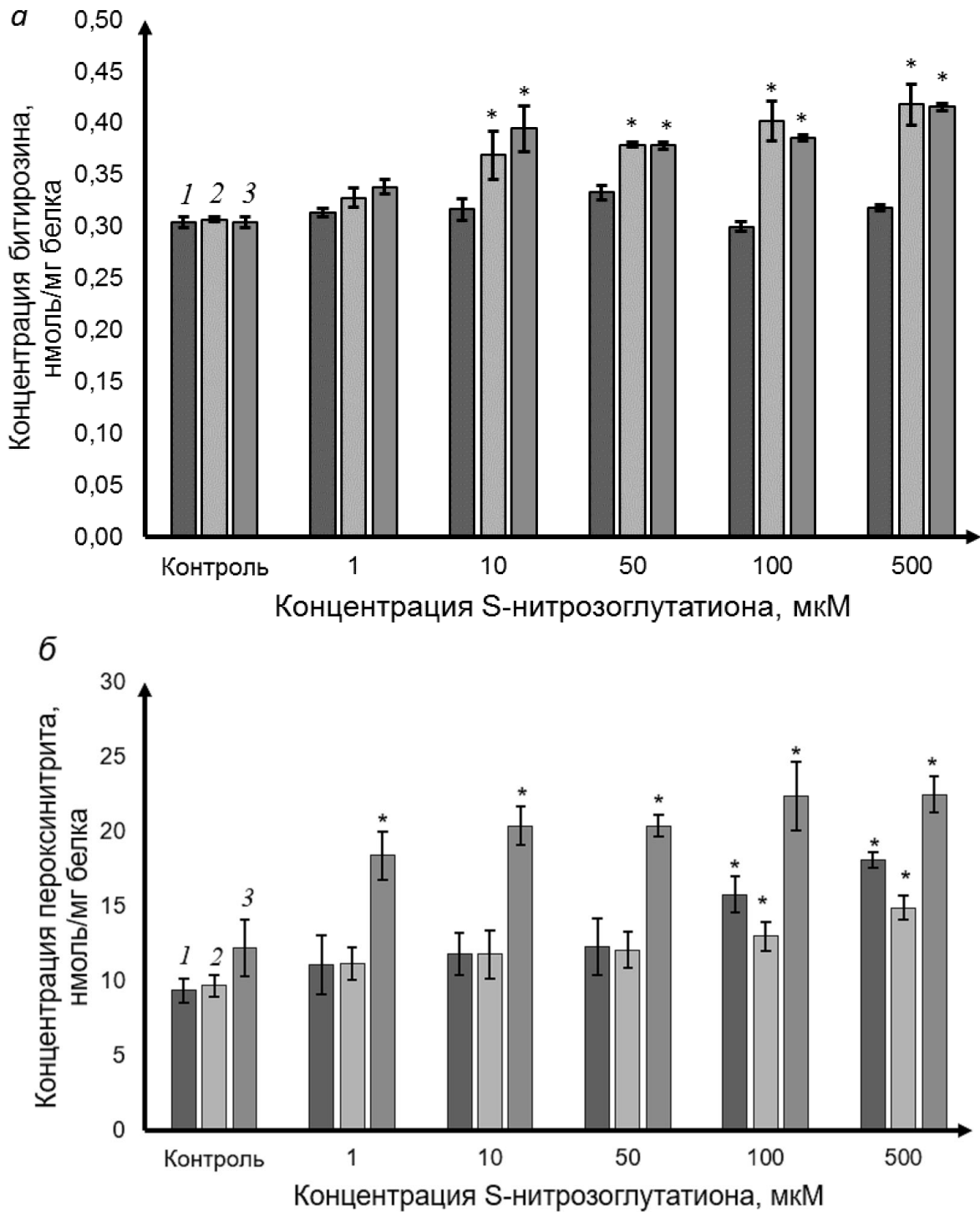


Рис. 2. Изменение показателей нитрозативного стресса: *а* – битиروزина ($M \pm SD$, $n = 3$), *б* – пероксинитрита ($M \pm SD$, $n = 3$) при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч. Определение битиروزина проводили в лизате клеток линии Сасо-2 флуориметрическим методом. Определение пероксинитрита проводили в лизате клеток линии Сасо-2 фотометрическим методом. * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что GSNO является донором NO, причём концентрации 100 и 500 мкМ с длительностью экспозиции 24 ч и 50, 100,

500 мкМ с длительностью воздействия 72 ч вызывают развитие нитрозативного стресса и являются токсичными для клеток линии Сасо-2.

Влияние GSNO на относительное количество Pgp в клетках линии Сасо-2. При воздействии GSNO во всех изученных концентрациях на клетки линии Сасо-2 в течение 3 ч относительное количество Pgp достоверно по сравнению с контролем не изменялось (рис. 4, а).

При увеличении длительности эксперимента до 24 ч относительное количество Pgp увеличивалось при концентрациях GSNO 10, 50 и 100 мкМ на 46,2% ($p = 0,01$), 38,1% ($p = 0,02$) и 25,8% ($p = 0,045$) соответственно по сравнению с контролем. При повышении концентрации GSNO до 500 мкМ отмечалось снижение уровня Pgp на 54,9% ($p = 0,002$) (рис. 4, б).

При длительности воздействия 72 ч GSNO в концентрации 10 мкМ повышал относительное количество Pgp на 23,1% ($p = 0,0002$), в концентрациях 1 и 50 мкМ – не влиял на его уровень, а в концентрациях 100 и 500 мкМ – вызывал его снижение на 37,0% ($p = 0,0002$) и 47,1% ($p = 0,0002$) соответственно (рис. 4, в).

Влияние GSNO на активность Pgp в клетках линии Сасо-2. Активность Pgp оценивали по транспорту его маркёрного субстрата через мембрану клеток Сасо-2.

GSNO при воздействии в течение 3 ч в концентрациях 1–100 мкМ достоверно не влиял на активность Pgp, а в концентрации 500 мкМ – вызывал её уменьшение, о чем свидетельствует снижение коэффициента кажущейся проницаемости Pgp *b–a* фексофенадина на 30,4% ($p = 0,05$) по сравнению с контролем.

При длительности эксперимента 24 ч GSNO в концентрациях 10 и 50 мкМ повышал коэффициент кажущейся проницаемости Pgp *b–a* фексофенадина на 429,4% ($p = 0,0009$) и 266,9% ($p = 0,02$) соответственно по сравнению с показателями контроля (таблица). Данные результаты свидетельствуют о повышении активности Pgp. Увеличение концентрации GSNO до 100 и 500 мкМ приводило к нормализации коэффициента кажущейся проницаемости Pgp *b–a* фексофенадина (он достоверно не отличался от значений контроля) (таблица).

Инкубация клеток линии Сасо-2 с GSNO в течение 72 ч приводила к повышению коэффициента кажущейся проницаемости Pgp *b–a* фексофенадина при концентрации донора оксида азота 10 мкМ на 138,9% ($p = 0,014$) по сравнению со значением контроля, а в остальных концентрациях достоверного эффекта не оказывала.

Изучение механизмов повышения относительного количества Pgp под действием GSNO. Для изучения механизмов повышения содержания Pgp под действием GSNO выполнены эксперименты с ингибитором растворимой гуанилатциклазы – ODQ, ингибитором транскрипционного фактора Nrf2 – AEM1, с ингибиторами транскрипционных факторов PXR – кетоконазолом и CAR – CINPA1, стимулирующих экспрессию гена *MDR1*, кодирующего Pgp.

Ингибитор растворимой гуанилатциклазы ODQ при совместном инкубировании с

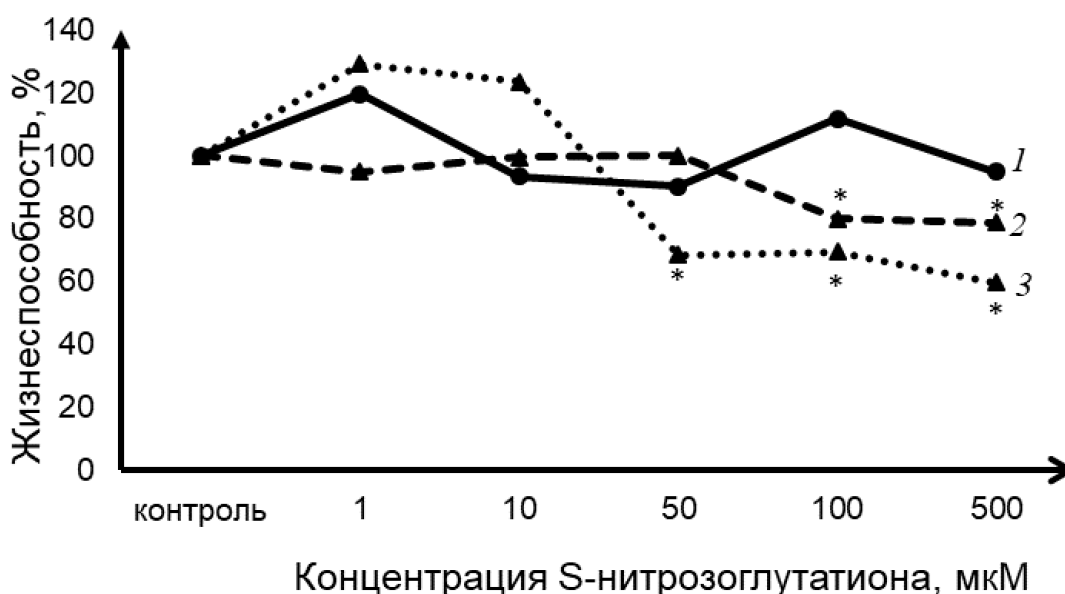


Рис. 3. Жизнеспособность клеток линии Сасо-2 (%) в зависимости от концентрации S-нитрозоглутатиона при инкубации 3 (1), 24 (2) и 72 (3) ч. Определение жизнеспособности клеток проводили по МТТ-тесту ($n = 3$). * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

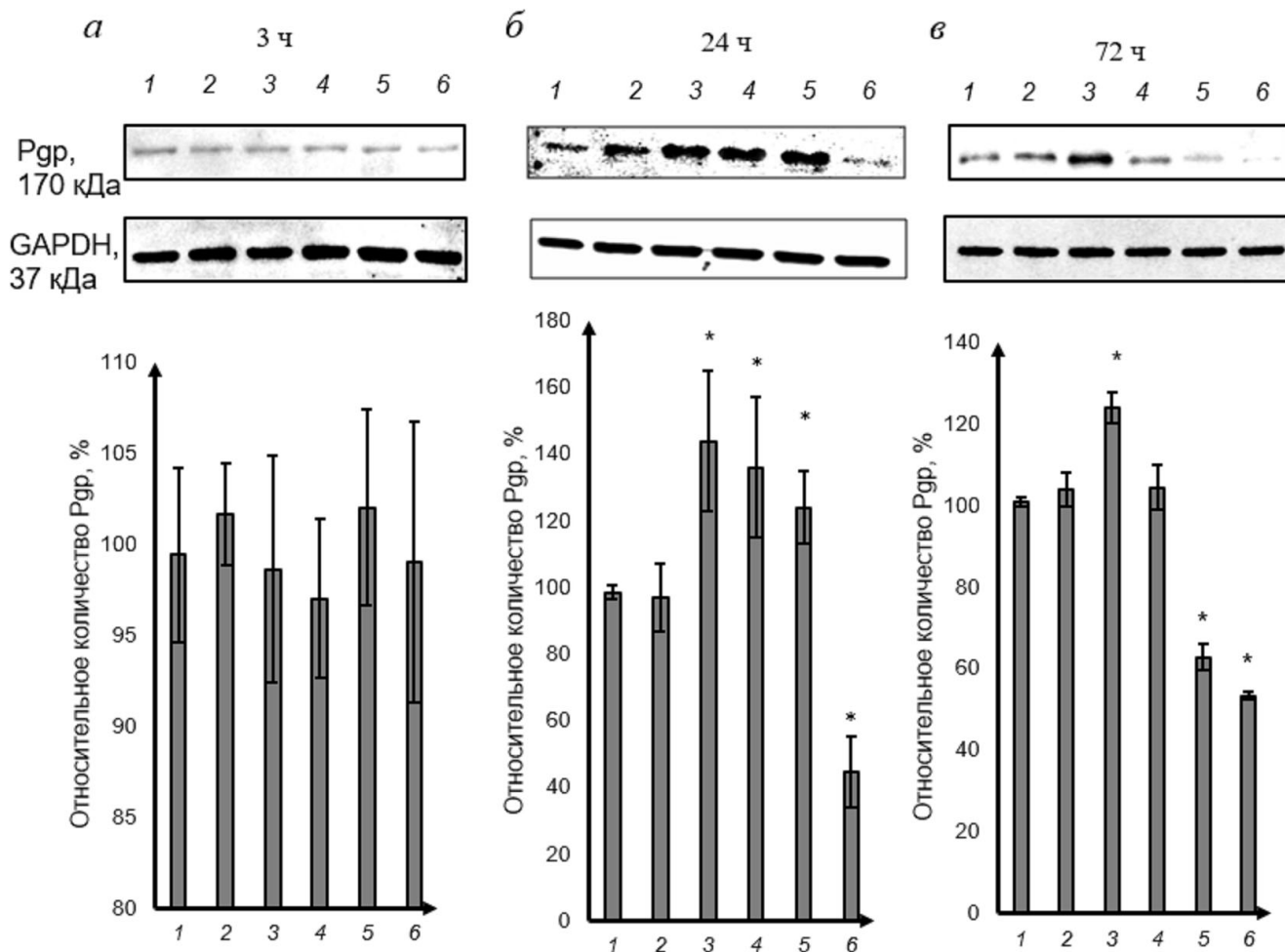


Рис. 4. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 3 (а), 24 (б) и 72 (в) ч ($M \pm SD$, $n = 3$). Относительное количество Pgp определяли методом вестерн-блот с последующим денситометрическим анализом с помощью программного обеспечения ImageLab. 1 – контроль, 2–6 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 1, 10, 50, 100 и 500 мкМ; * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

GSNO в течение 24 ч предотвращал повышение относительного количества Pgp при концентрации донора NO 10–50 мкМ и не оказывал влияния при концентрации GSNO 100 мкМ (рис. 5, а), относительное количество Pgp превышало показатели контроля на 24,9% ($p = 0,03$).

При длительности эксперимента 72 ч ODQ также предотвращал повышение уровня Pgp при концентрации GSNO 10 мкМ, данный показатель не отличался от значений контроля (рис. 5, б).

Ингибитор Nrf2 – AEM1, не оказывал влияния на уровень Pgp при воздействии GSNO в концентрации 10 мкМ и экспозиции 24 ч (рис. 6, а) и 72 ч (рис. 6, б), относительное количество Pgp превышало показатели контроля на 41,5% ($p = 0,001$) и 19,5% ($p = 0,0004$) соответственно.

В то же время AEM1 предотвращал повышение относительного количества Pgp при воздействии GSNO в концентрациях 50 и 100 мкМ и длительности инкубации 24 ч (рис. 6, а).

Кетоконазол – ингибитор PXR, не предотвращал повышения относительного количества Pgp под действием GSNO во всех концентрациях и длительности инкубации 24 ч (рис. 7, а) и 72 ч (рис. 7, б). Так, относительное количество Pgp при воздействии GSNO в концентрации 10, 50 и 100 мкМ при инкубации 24 ч возрастало на 17,5% ($p = 0,02$), 22,9% ($p = 0,009$) и 25,6% ($p = 0,008$) соответственно относительно значений контроля и на 22,9% – при инкубации 72 ч и концентрации GSNO 10 мкМ ($p = 0,03$).

CINPA1 – ингибитор CAR, не влиял на изменение относительного количества Pgp при воздействии GSNO в концентрациях 50–100 мкМ в течение 24 ч, которое превышало

Влияние GSNO на активность Pgr (Parr $b-a$, $\times 10^{-6}$ см/с фексофенадина) в клетках линии Сасо-2 ($M \pm SD$, $n = 3$)

Серии эксперимента	Parr $b-a$, $\times 10^{-6}$ см/с фексофенадина		
	3 ч	24 ч	72 ч
Контроль	1,25 \pm 0,12	1,09 \pm 0,08	1,18 \pm 0,66
1 мкМ GSNO	0,98 \pm 0,27	1,77 \pm 0,38	1,07 \pm 0,13
10 мкМ GSNO	1,19 \pm 2,24	5,77 \pm 0,69*	2,82 \pm 0,91*
50 мкМ GSNO	1,27 \pm 0,23	4,00 \pm 0,21*	2,24 \pm 0,48
100 мкМ GSNO	0,98 \pm 0,15	2,43 \pm 1,64	1,50 \pm 0,20
500 мкМ GSNO	0,87 \pm 0,22*	2,55 \pm 1,53	1,30 \pm 0,19

Примечание: * $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем (критерий Ньюмена–Кейлса).

значения контроля на 23,6% ($p = 0,03$) и на 25,4% ($p = 0,03$) соответственно (рис. 8, а). При концентрации GSNO 10 мкМ и экспозиции 24 и 72 ч CINPA1 предотвращал повышение уровня Pgr (рис. 8, а и б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе настоящего исследования оценивалось влияние NO на функционирование белка-транспортёра Pgr. В качестве источника NO использовали GSNO, который представляет собой S-нитрозированное производное глутатиона и считается важным медиатором последующих

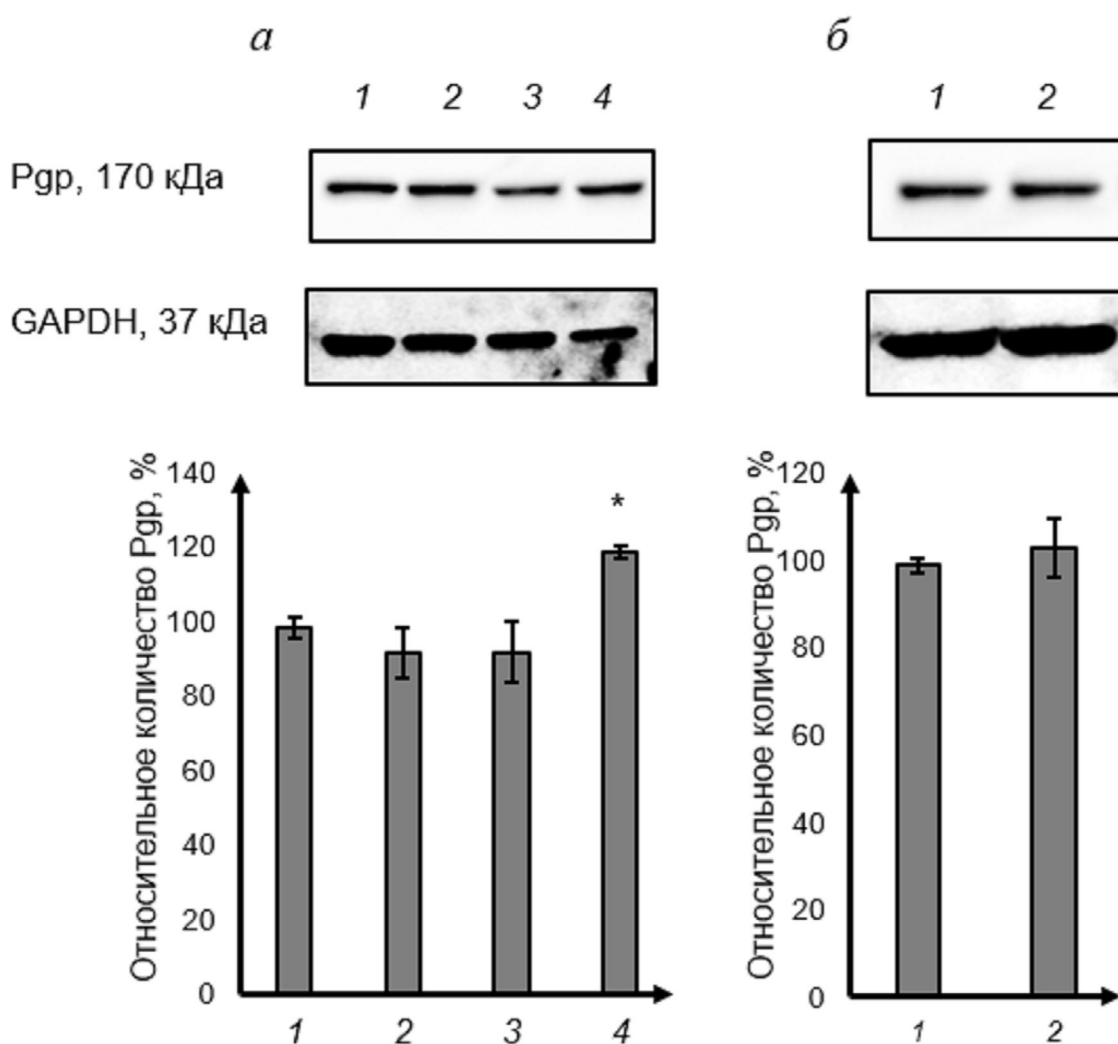


Рис. 5. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитроэглутатиона в сочетании с ингибированием растворимой гуанилатциклазы (ODQ, 10 мкМ) в течение 24 (а) и 72 (б) ч. Относительное количество Pgr определяли методом вестерн-блот с последующим денситометрическим анализом с использованием программного обеспечения ImageLab. 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2, 3 и 4 – S-нитроэглутатион в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ соответственно в сочетании с ODQ в концентрации 10 мкМ; * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

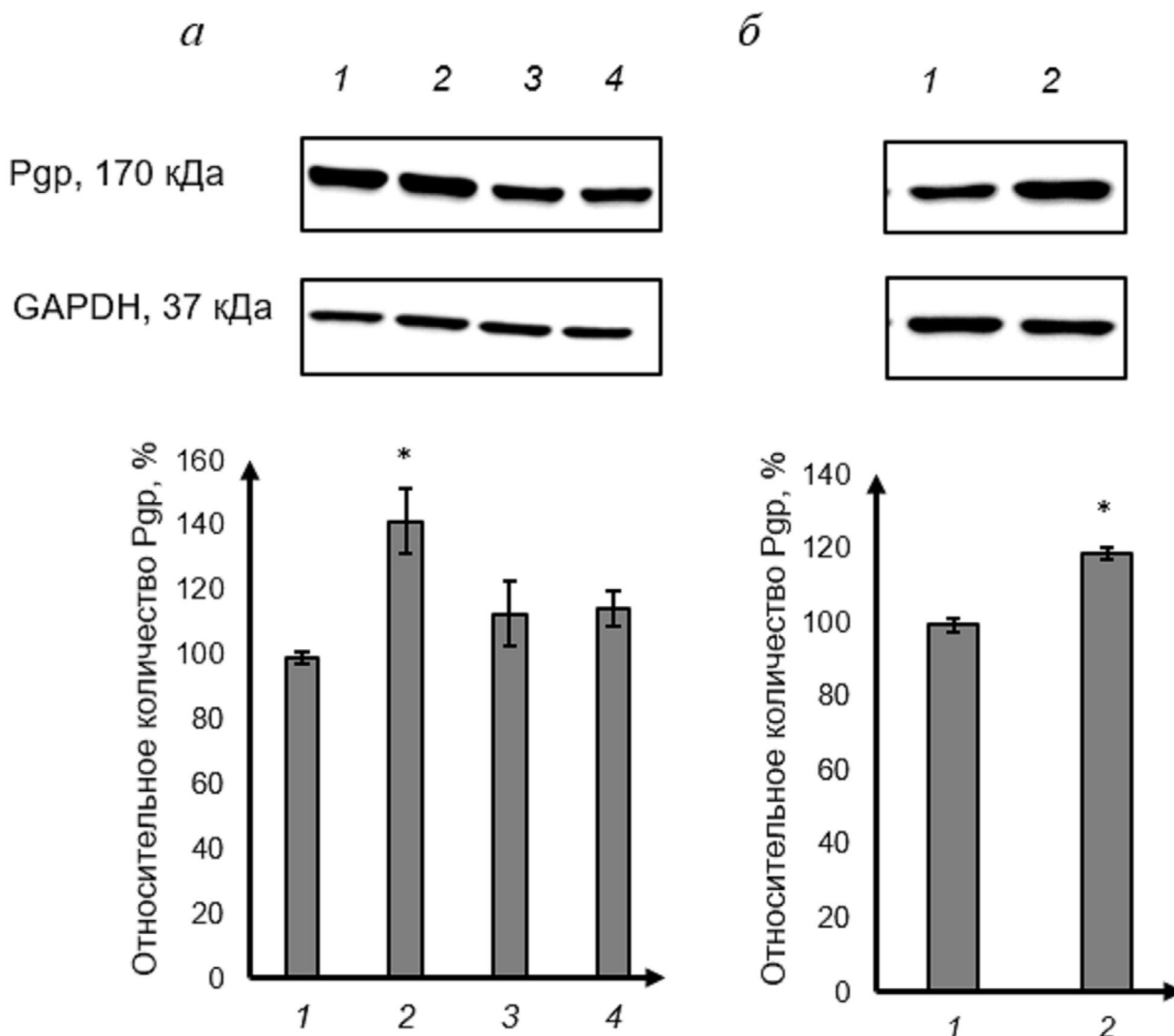


Рис. 6. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием транскрипционного фактора Nrf2 (АЕМ1, 5 мкМ) в течение 24 (а) и 72 (б) ч. Относительное количество Рgp определяли методом вестерн-блот с последующим денситометрическим анализом с использованием программного обеспечения ImageLab. 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2, 3 и 4 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ соответственно в сочетании с АЕМ1 в концентрации 5 мкМ; * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

сигнальных эффектов оксида азота [27]. Сам GSNO напрямую в клетки не проникает, однако его добавление в культуральную среду вызывает повышение внутриклеточных уровней S-нитрозотиолов. Предполагается, что GSNO разлагается во внеклеточном пространстве с высвобождением NO, который затем может диффундировать через клеточную мембрану и нитрозилировать белки-мишени [28].

Кроме того, описан NO-независимый механизм проникновения GSNO внутрь клеток. При этом нитрозогруппа от GSNO переносится на другую тиолсодержащую аминокислоту – цис-

теин. Образующийся в ходе данной реакции S-нитрозо-1-цистеин проникает внутрь клеток через систему транспортера аминокислот [29]. S-нитрозо-1-цистеин внутри клеток может либо нитрозировать глутатион с образованием GSNO, либо непосредственно взаимодействовать с сульфгидрильными группами белков и запускать сигнальные каскады.

Нами было показано, что добавление GSNO к клеткам линии Сасо-2 вызывает повышение содержания метаболитов оксида азота в лизате клеток, что свидетельствует об адекватности используемой модели.

Концентрации GSNO 1–10 мкМ оказались безопасными для клеток, в то время как 100 и 500 мкМ при длительности экспозиции 24 ч и 50, 100, 500 мкМ при экспозиции 72 ч снижали выживаемость клеток, определяемую в ходе МТТ-теста.

Токсическое действие GSNO может быть связано с образованием пероксинитрита в результате реакции между оксидом азота и супероксидным анион-радикалом ($O_2^{\cdot-}$), что было показано в данном исследовании. Пероксинитрит, взаимодействуя с биомакромолекулами, может вызывать их повреждение и развитие нитрозативного стресса [30], что подтверждалось увеличением уровня битирозина. В условиях действия

активных форм азота (АФА) нитрозилирование тирозина представляет собой наиболее специфичную окислительную модификацию. Нитротирозин частично диссоциирует до фенолята, но основное его количество конденсируется до 3,3-дитирозина (битирозина) [31]. Доказано, что образование битирозина превалирует над нитротирозином при длительном воздействии и/или более высоким уровне АФА, что позволяет рассматривать его в качестве маркера нитрозативного стресса [32].

Относительное количество и активность Pgp под действием донора NO изменялись следующим образом. При воздействии GSNO на клетки линии Сасо-2 в течение 3 ч относительное

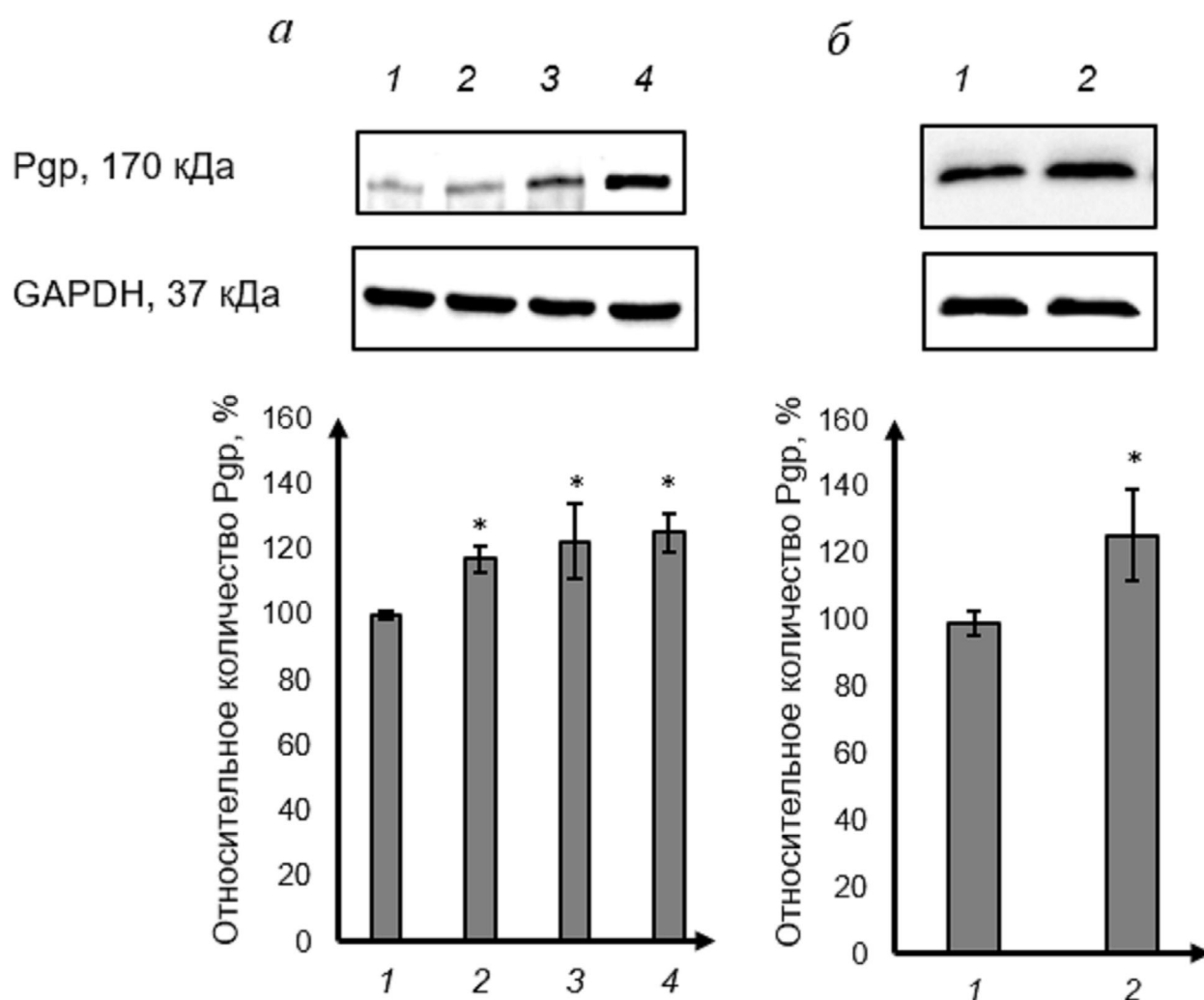


Рис. 7. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием прегнан Х рецептора (кетоконазол, 10 мкМ) в течение 24 (а) и 72 (б) ч. Относительное количество Pgp определяли методом вестерн-блот с последующим денситометрическим анализом с использованием программного обеспечения ImageLab. 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2, 3 и 4 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ соответственно в сочетании с кетоконазолом в концентрации 10 мкМ; * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

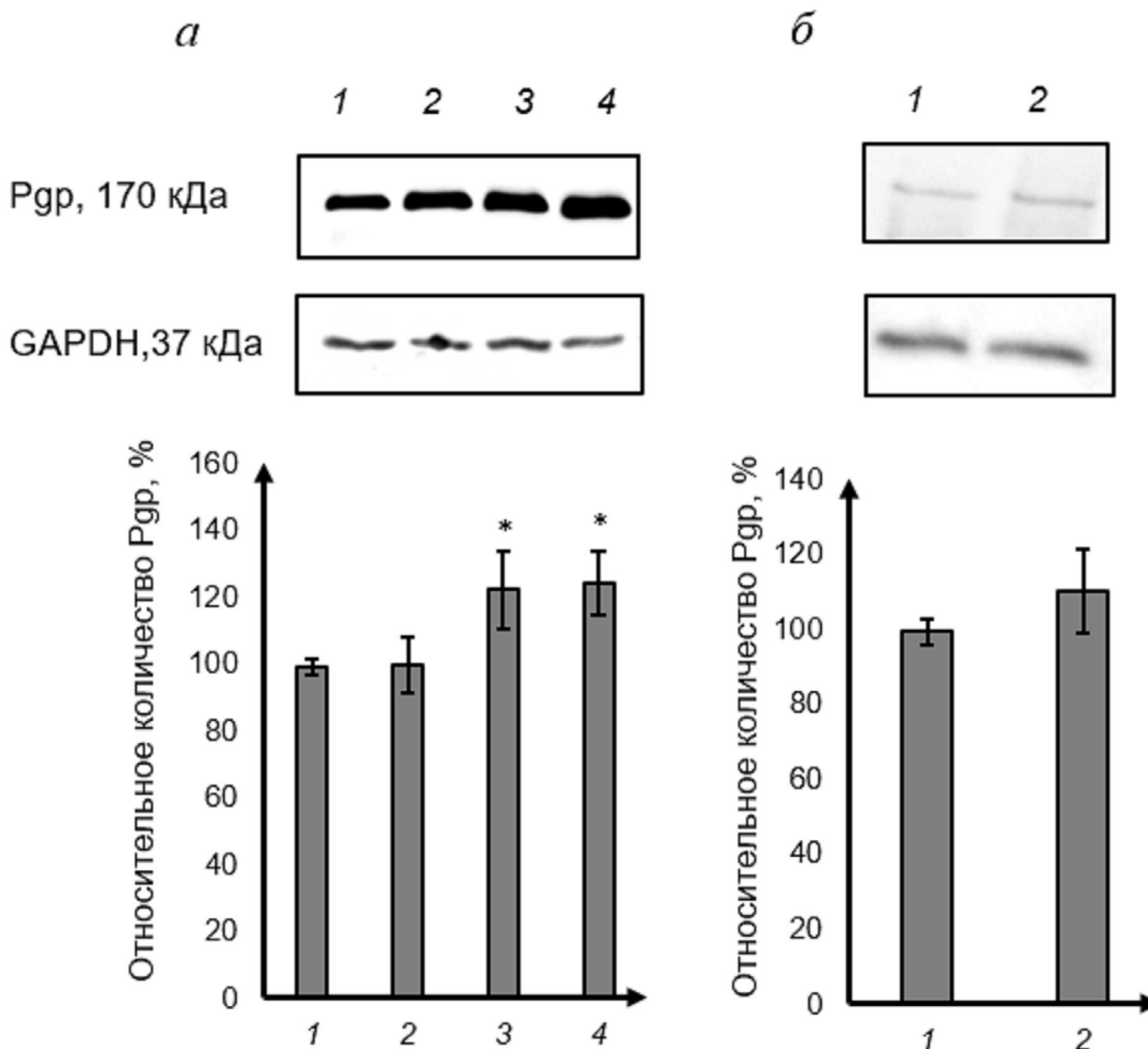


Рис. 8. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в сочетании с ингибированием конститутивного андростанового рецептора (CINPA1, 10 мкМ) в течение 24 (а) и 72 (б) ч. Относительное количество Рgp определяли методом вестерн-блот с последующим денситометрическим анализом с использованием программного обеспечения ImageLab. 1 – контроль (без добавления тестируемых веществ), 2, 3 и 4 – S-нитрозоглутатион в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ соответственно в сочетании с CINPA1 в концентрации 10 мкМ; * $p < 0,05$ (достоверное отличие от контроля)

количество Рgp достоверно не изменялось, однако в то же время отмечалось снижение его активности. Полученные результаты согласуются с данными литературы, в которых установлено, что NO может снижать АТФазную активность Рgp [7], что, в свою очередь, приводит к снижению транспортной функции данного белка.

При повышении длительности эксперимента до 24 ч относительное количество и активность Рgp увеличивались при концентрациях GSNO 10 и 50 мкМ, при концентрации 100 мкМ рос уровень белка-транспортёра, но активность не изменялась, а при повышении концентрации

GSNO до 500 мкМ отмечалось снижение содержания Рgp.

При длительности воздействия 72 ч GSNO в концентрации 10 мкМ повышал относительное количество и активность Рgp, а в концентрациях 100 и 500 мкМ он вызывал снижение уровня белка-транспортёра. Уменьшение относительного количества Рgp наблюдалось при максимальных концентрациях GSNO и совпадало с максимальной степенью выраженности нитрозативного стресса, поэтому можно предположить, что снижение уровня белка-транспортёра связано с повреждением его молекулы. Сниже-

ние относительного количества Pgp, в свою очередь, приводило к уменьшению его активности. Помимо этого, активность Pgp может снижаться в результате нитрозилирования его молекулы по тиоловым группам в остатках цистеина. Указанные реакции обычно протекают при повышении концентрации NO выше физиологических [33]. По данным литературы, молекула Pgp богата SH-группами [34].

На заключительном этапе исследования были изучены механизмы повышения относительного количества и активности Pgp под действием NO.

На настоящий момент описаны следующие механизмы регуляции функционирования Pgp: изменение экспрессии гена *MDR1*, кодирующего белок-транспортёр, посредством влияния на его промотор; полиморфизм гена *MDR1*; увеличение дозы гена – амплификация участка генома, содержащего ген *MDR1*; стабилизация мРНК гена *MDR1*; влияние микроРНК на экспрессию Pgp; передача Pgp между клетками; изменение активности синтезированного белка-транспортёра; влияние на гидролиз АТФ; изменение свойств цитоплазматических мембран. При этом основную роль играет регуляция экспрессии гена *MDR1* [35].

В ходе настоящего исследования с помощью специфических ингибиторов был изучен вклад NO-цГМФ-сигнального пути, транскрипционных факторов Nrf2, PXR и CAR в повышение относительного количества Pgp под действием GSNO.

Ингибиторы использовались в дозах, в которых они, согласно данным литературы, проявляли свою активность в аналогичных экспериментах [13–16].

NO-цГМФ-сигнальный путь является основным механизмом реализации физиологических эффектов NO. NO активирует растворимую гуанилатциклазу, которая превращает ГТФ в цГМФ. цГМФ, в свою очередь, активирует нижестоящие элементы сигнального пути, включая протеинкиназу G (PKG I и II), цГМФ-управляемые катионные каналы и фосфодиэстеразы, регулируемые цГМФ. Данный физиологический путь реализуется при низких, наномолярных концентрациях NO [36]. В качестве ингибитора NO-цГМФ-сигнального пути применялся специфический блокатор растворимой гуанилатциклазы – ODQ. Показано, что ODQ окисляет молекулу гема в гуанилатциклазе без влияния на каталитический домен, тем самым снижая её активность [37].

В ходе исследования было установлено, что ODQ при совместном инкубировании с GSNO (концентрации 10–50 мкМ при экспозиции 24 ч

и концентрация 10 мкМ при экспозиции 72 ч) предотвращал повышение относительного количества Pgp.

Nrf2 – редокс-чувствительный транскрипционный фактор. Его экспрессия повышается при развитии окислительного и нитрозативного стресса и направлена на защиту клетки от воздействия свободных радикалов [38]. В условиях нормы данный транскрипционный фактор находится в комплексе с белком-репрессором Keap 1 (их связывание регулируется рядом протеинкиназ), который, с одной стороны, способствует убиквитированию и протеосомальной деградации Nrf2 (необходимым условием для этого процесса является наличие двух остатков цистеина в молекуле Keap 1), а с другой – предотвращает его проникновение из цитоплазмы в ядро. После активации комплекс Keap 1–Nrf2 диссоциирует, и Nrf2 транслоцируется в ядро, где связывается с антиоксидантными элементами (antioxidant-response elements, ARE) и активирует транскрипцию защитных ферментов [39].

Ранее нами было показано, что Nrf2 принимает участие в повышении активности и количества Pgp при развитии окислительного стресса [40].

Для ингибирования Nrf2 применялся АЕМ1, блокирующий взаимодействие Nrf2 с ARE и подавляющий экспрессию генов, контролируемых данным транскрипционным фактором [14].

Нами показано, что АЕМ1 предотвращал повышение относительного количества Pgp при воздействии GSNO в концентрации 50 и 100 мкМ и длительности инкубации 24 ч.

PXR (ядерный рецептор подсемейство 1, группа I, член 2) и CAR (ядерный рецептор подсемейство 1, группа I, член 3) – члены суперсемейства ядерных рецепторов, которое в основном включает факторы транскрипции [41, 42].

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

Показано, что накопление продуктов окислительного и нитрозативного стресса приводит к повышению количества PXR [43, 44] и CAR [45].

Ингибирование PXR и CAR осуществляли с помощью кетоконазола и CINPA1 соответственно. Кетоконазол (противогрибковый препарат группы азолов) связывается с областью AF-2 лиганд-связывающего домена PXR и таким образом подавляет его активацию [46]. CINPA1 блокирует лиганд связывающий до-

мен CAR, а также подавляет его взаимодействие с коактиваторами [16].

В настоящей работе CINPA1 предотвращал повышение уровня Pgp при концентрации GSNO 10 мкМ и экспозиции 24 и 72 ч, а кетоконазол — не влиял на действие GSNO.

Полученные данные свидетельствуют о том, что GSNO в низких концентрациях повышает относительное количество Pgp через NO-цГМФ-сигнальный путь, при развитии нитрозативного стресса — через Nrf2, при накоплении продуктов нитрозативного стресса — через транскрипционный фактор (CAR).

Таким образом, нами показано, что кратковременное воздействие донора NO GSNO в течение 3 ч в концентрации 500 мкМ вызывает повышение в клетках линии Caco-2 метаболитов оксида азота и пероксинитрита, что приводит к снижению активности, но не содержания Pgp. Увеличение длительности экспозиции до 24 ч приводит к увеличению относительного количества и активности Pgp при концентрации GSNO 10 и 50 мкМ, повышению содержания без увеличения активности транспортера в концентрации 100 мкМ и снижению относительного количества изучаемого белка при 500 мкМ. При длительности воздействия 72 ч GSNO в концентрации 10 мкМ повышает содержание и активность Pgp, а в концентрациях 100 и 500 мкМ он вызывает

снижение относительного количества белка-транспортера.

При этом повышении относительного количества Pgp при воздействии низких концентраций GSNO реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь, а при увеличении концентрации GSNO, развитии и прогрессировании нитрозативного стресса — через Nrf2 и конститутивный андростановый рецептор.

Полученные данные объясняют разнонаправленные и потому противоречивые результаты предшествующих исследований других авторов и раскрывают механизмы регуляции Pgp под действием NO.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских учёных — кандидатов наук МК-1856.2020.7.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fojo, A. T., Ueda, K., Slamon, D. J., Poplack, D. G., Gottesman, M. M., et al. (1987) Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 265-269.
2. Borst, P., and Schinkel, A. H. (2013) P-glycoprotein ABCB1: A major player in drug handling by mammals, *Clin. Invest.*, **123**, 4131-4133.
3. Brueck, S., Bruckmueller, H., Wegner, D., Busch, D., Martin, P., et al. (2019) Transcriptional and post-transcriptional regulation of duodenal P-glycoprotein and MRP2 in healthy human subjects after chronic treatment with rifampin and carbamazepine, *Mol. Pharm.*, **16**, 3823-3830, doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b00458.
4. Mollazadeh, S., Sahebkar, A., Hadizadeh, F., Behravan, J., and Arabzadeh, S. (2018) Structural and functional aspects of P-glycoprotein and its inhibitors, *Life Sci.*, **214**, 118-123, doi: 10.1016/j.lfs.2018.10.048.
5. Wessler, J. D., Grip, L. T., Mendell, J., and Giugliano, R. P. (2013) The P-glycoprotein transport system and cardiovascular drugs, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **61**, 2495-2502, doi: 10.1016/j.jacc.2013.02.058.
6. Socco, S., Bovee, R. C., Palczewski, M. B., Hickok, J. R., and Thomas, D. D. (2017) Epigenetics: The third pillar of nitric oxide signaling, *Pharmacol. Res.*, **121**, 52-58, doi: 10.1016/j.phrs.2017.04.011.
7. Sinha, B. K., Bortner, C. D., Mason, R. P., and Cannon, R. E., (2018) Nitric oxide reverses drug resistance by inhibiting ATPase activity of p-glycoprotein in human multi-drug resistant cancer cells, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.*, **1862**, 2806-2814, doi: 10.1016/j.bbagen.2018.08.021.
8. Sinha, B. K., Perera, L., and Cannon, R. E. (2019) Reversal of drug resistance by JS-K and nitric oxide in ABCB1- and ABCG2-expressing multi-drug resistant human tumor cells, *Biomed. Pharmacother.*, **120**, 109468, doi: 10.1016/j.biopha.2019.109468.
9. Dixit, S. G., Zingarelli, B., Buckley, D. J., Buckley, A. R., and Pauletti, G. M. (2005) Nitric oxide mediates increased P-glycoprotein activity in interferon- γ -stimulated human intestinal cells, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **288**, 533-540, doi: 10.1152/ajpgi.00248.2004.
10. Robertson, S. J., Mokgokong, R., Kania, K. D., Guedj, A. S., Hladky, S. B., et al. (2011) Nitric oxide contributes to hypoxia-reoxygenation-induced P-glycoprotein expression in rat brain endothelial cells, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **31**, 1103-1111, doi: 10.1007/s10571-011-9711-4.
11. Duan, R., Hu, N., Liu, H. Y., Li, J., Guo, H., et al. (2012) Biphasic regulation of P-glycoprotein function and expression by NO donors in Caco-2 cells, *Acta Pharmacol. Sin.*, **33**, 767-774, doi: 10.1038/aps.2012.25.
12. Hilgers, A. R., Conradi, R. A., and Burton, P. S. (1990) Caco-2 cell monolayers as a model for drug transport across the intestinal mucosa, *Pharm. Res.*, **7**, 902-910, doi: 10.1023/A:1015937605100.
13. Hwang, T. L., Wu, C. C., and Teng, C. M. (1998) Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea, *Br. J. Pharmacol.*, **125**, 1158-1163, doi: 10.1038/sj.bjp.0702181.
14. Bollong, M. J., Yun, H., Sherwood, L., Woods, A. K., Lairson, L. L., et al. (2015) A small molecule inhibits

- deregulated NRF2 transcriptional activity in cancer, *ACS Chem. Biol.*, **10**, 2193-2198.
15. Kota, B. P., Tran, V. H., Allen, J., Bebawy, M., and Roufogalis, B. D. (2010) Characterization of PXR mediated P-glycoprotein regulation in intestinal LS174T cells, *Pharm. Res.*, **62**, 426-431, doi: 10.1016/j.phrs.2010.07.001.
 16. Cherian, M. T., Lin, W., Wu, J., and Chen, T. (2015) CINPA1 is an inhibitor of constitutive androstane receptor that does not activate pregnane X receptor, *Mol. Pharmacol.*, **87**, 878-889, doi: 10.1124/mol.115.097782.
 17. Якушева Е. Н., Шулькин А. В., Черных И. В., Попова Н. М., Котлярова А. А., и др. (2019) Метод анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-P *in vitro*, *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, **17**, 71-78, doi: 10.17816/RCF17171-78.
 18. Tolosa, L., Donato, M. T., and Gómez-Lechón, M. J. (2015) General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay, *Methods Mol. Biol.*, **1250**, 333-348, doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_26.
 19. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **7**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
 20. Amado, R., Aeschbach, R., and Neukom, H. (1984) Dityrosine: *in vitro* production and characterization, *Methods Enzymol.*, **107**, 377-388.
 21. Лобышева И. И., Сереженков В. А., Ванин А. Ф. (1999) Взаимодействие динитрозильных тиолсодержащих комплексов железа с пероксинитритом и перекисью водорода *in vitro*, *Биохимия*, **64**, 194-200.
 22. Метельская В. А., Гуманова Н. Г. (2005) Скрининг – метод определения уровня метаболитов оксида азота сыворотке человека, *Клиническая лабораторная диагностика*, **6**, 15-18.
 23. Bronsky, E. A., Falliers, C. J., Kaiser, H. B., Ahlbrandt, R., and Mason, J. M. (1998) Effectiveness and safety of fexofenadine, a new non-sedating H1-receptor antagonist in the treatment of fall allergies, *Allergy Asthma Proc.*, **19**, 135-141, doi: 10.2500/108854198778604112.
 24. Petri, N., Tannergren, C., Rungstad, D., and Lennernäs, H. (2004) Transport characteristics of fexofenadine in the Caco-2 cell model, *Pharm. Res.*, **21**, 1398-1404, doi: 10.1023/B:PHAM.0000036913.90332.b1.
 25. Elsby, R., Surry, D. D., Smith, V. N., and Gray, A. J. (2008) 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, *Xenobiotica*, **38**, 1140-1164, doi: 10.1080/00498250802050880.
 26. Ерохина П. Д., Абаленихина Ю. В., Шулькин А. В., Черных И. В., Попова Н. М., и др. (2020) Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-P *in vitro*, *Росс. Мед. Биол. Вестник им. Акад. И.П. Павлова*, **28**, 135-142, doi: 10.23888/PAVLOVJ2020282135-142.
 27. Broniowska, K. A., Diers, A. R., and Hogg, N. (2013) S-Nitrosoglutathione, *Biochim. Biophys. Acta*, **1830**, 3173-3181, doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.004.
 28. Ramachandran, N., Root, P., Jiang, X.-M., Hogg, P. J., and Mutus, B. (2001) Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9539-9544, doi: 10.1073/pnas.171180998.
 29. Zhang, Y., and Hogg, N. (2004) The mechanism of transmembrane S-nitrosothiol transport, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7891-7896, doi: 10.1073/pnas.0401167101.
 30. Abalenikhina, Yu. V., Kosmachevskaya, O. V., and Topunov, A. F. (2020) Peroxynitrite: Toxic agent and signaling molecule (review), *Appl. Biochem. Microbiol.*, **56**, 611-623, doi: 10.1134/S0003683820060022.
 31. Ferrer-Sueta, G., Campolo, N., Trujillo, M., Bartesaghi, S., Carballeda, S., et al. (2018) Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration, *Chem. Rev.*, **118**, 1338-1408, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00568.
 32. Boer, T. R., Palomino, R. I., and Mascharak, P. K. (2019) Peroxynitrite-mediated dimerization of 3-nitrotyrosine: Unique chemistry along the spectrum of peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine, *Med One*, **4**, e190003, doi: 10.20900/mo.20190003.
 33. Heinrich, T. A., da Silva, R. S., Miranda, K. M., Switzer, C. H., Wink, D. A., et al. (2013) Biological nitric oxide signalling: chemistry and terminology, *Br. J. Pharmacol.*, **169**, 1417-1429, doi: 10.1111/bph.12217.
 34. Sim, H. M., Bhatnagar, J., Chufan, E. E., Kapoor, K., and Ambudkar, S. V. (2013) 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, *Biochemistry*, **52**, 7327-7338, doi: 10.1021/bi4007786.
 35. Якушева Е. Н., Черных И. В., Шулькин А. В., Попова Н. М. (2014) Гликопротеин-P: структура, физиологическая роль и молекулярные механизмы модуляции функциональной активности, *Успехи Физиол. Наук*, **45**, 89-98.
 36. Gantner, B. N., LaFond, K. M., and Bonini, M. G. (2020) Nitric oxide in cellular adaptation and disease, *Redox Biol.*, **34**, 101550, doi: 10.1016/j.redox.2020.101550.
 37. Zhao, Y., Brandish, P. E., Di Valentin, M., Schelvis, J. P., Babcock, G. T., et al. (2000) Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ, *Biochemistry*, **39**, 10848-10854, doi: 10.1021/bi9929296.
 38. Moldogazieva, N. T., Mokhosoev, I. M., Feldman, N. B., and Lutsenko, S. V. (2018) ROS and RNS signalling: adaptive redox switches through oxidative/nitrosative protein modifications, *Free Radic. Res.*, **52**, 507-543, doi: 10.1080/10715762.2018.1457217.
 39. Wen, Zh., Liu, W., Li, X., Chen, W., Liu, J., et al. (2019) A protective role of the NRF2-Keap1 pathway in maintaining intestinal barrier function, *Oxid. Med. Cell Longev.*, **2019**, e1759149, doi: 10.1155/2019/1759149.
 40. Shchul'kin, A. V., Abalenikhina, Y. V., Erokhina, P.D., Chernykh, I. V., and Yakusheva, E. N. (2021) The role of P-glycoprotein in decreasing cell membranes permeability during oxidative stress, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 197-206, doi: 10.1134/S0006297921020085.
 41. Inouye, Y. (2016) Structure and function of the nuclear receptor constitutive androstane receptor, *Yakugaku Zasshi*, **136**, 297-308, doi: 10.1248/yakushi.15-00215.
 42. Yan, J., and Xie, W. (2016) A brief history of the discovery of PXR and CAR as xenobiotic receptors, *Acta Pharm. Sin. B*, **6**, 450-452, doi: 10.1016/j.apsb.2016.06.011.
 43. Абаленихина Ю. В., Судакова Е. А., Слепнев А. А., Сеидкулиева А. А., Ерохина П. Д., и др. (2022) Функционирование прегнан X рецептора в условиях окислительного стресса, *Биол. Мембр.*, **39**, 1-9, doi: 10.31857/S0233475522010030.
 44. Abalenikhina, Y. V., Sudakova, E. A., Seidkulieva, A. A., Shchul'kin, A. V., and Yakusheva, E. N. (2021) Functioning of pregnan X receptor under conditions of nitrosative stress, *Biomed. Khim.*, **67**, 394-401, doi: 10.18097/PBMC20216705394.
 45. Shchul'kin, A. V., Abalenikhina, Y. V., Seidkulieva, A. A., Ryabkov, A. N., and Yakusheva, E. N. (2021) Induction of constitutive androstane receptor during the development of oxidative stress, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **171**, 615-618, doi: 10.1007/s10517-021-05280-7.
 46. Wang, H., Huang, H., Li, H., Teotico, D. G., Sinz, M., et al. (2007) Activated pregnenolone X-receptor is a target for ketoconazole and its analogs, *Clin. Cancer Res.*, **13**, 2488-2495, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1592.

**MECHANISMS OF REGULATION OF THE FUNCTIONING
OF THE P-GLYCOPROTEIN TRANSPORTER PROTEIN
UNDER THE ACTION OF NITRIC OXIDE**

A. V. Shchulkin*, Yu. V. Abalenikhina, E. A. Sudakova, P. Yu. Mylnikov, and E. N. Yakusheva

Ryazan State Medical University, 390026 Ryazan, Russia; e-mail: alekseychulkin@rambler.ru

In a study on Caco-2 cells, the mechanisms of regulation of the transport protein P-glycoprotein (Pgp) under the action of nitric oxide (NO) were studied. The NO donor was S-nitrosoglutathione (GSNO), which was added to cells at concentrations of 1; 10; 50; 100 and 500 μM and incubated for 3, 24, or 72 h. The amount of Pgp was analyzed by Western blot, activity was determined by the transport of its substrate fexofenadine. The study showed that a short-term exposure to GSNO for 3 hours at a concentration of 500 μM caused an increase in the concentration of peroxynitrite in Caco-2 cells, which reduced the activity, but not the amount of Pgp. An increase in the duration of exposure to 24 h increased the amount and activity of Pgp at GSNO concentrations of 10 and 50 μM , increased the amount without increasing activity at a concentration of 100 μM , and decreased the amount of the transporter protein at 500 μM . At an exposure duration of 72 h, GSNO at a concentration of 10 μM increased the amount and activity of Pgp, while at a concentration of 100 and 500 μM , it decreased the amount of the transporter protein. At the same time, using specific inhibitors, it was shown that an increase in the amount of Pgp under the influence of low concentrations of GSNO was realized through the NO-cGMP signaling pathway, and with an increase in the concentration of GSNO, the development of nitrosative stress, through Nrf2 and the constitutive androstane receptor.

Keywords: P-glycoprotein, ABCB1-protein, nitric oxide, guanylate cyclase, Caco-2 cell line