

*На правах рукописи*

Сучкова Ольга Николаевна

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

1.5.4. Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук

Рязань – 2025

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

**Научный руководитель:**

доктор медицинских наук, доцент **Абаленихина Юлия Владимировна**

**Официальные оппоненты:**

**Синицкий Антон Иванович**, доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой биохимии имени Р.И. Лифшица, ведущий научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории

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

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «\_\_»\_\_\_\_\_2025 г. в \_\_ на заседании диссертационного совета 21.2.060.02, созданного на базе ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России по адресу: 390026 г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9

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

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_»\_\_\_\_\_2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
кандидат медицинских наук, доцент

Короткова Н.В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования

Полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1 (*англ.: organic anion transporting polypeptide 1B1*, OATP1B1) – инфлюксный транспортер, экспрессирующийся преимущественно в печени и относящийся к суперсемейству переносчиков растворенных веществ SLC (Abe T., 2000).

Среди всех печеночных транспортеров OATP1B1 (*SLCO1B1*) отличается высокой клинической значимостью, так как участвует в транспорте широкого спектра эндогенных соединений (желчные кислоты, тиреоидные гормоны, стероидные сульфаты, конъюгаты глюкуронида, пептиды (Banerjee N. et al., 2012, Cui Y. et al., 2001, Chatuphonprasert W. et al., 2001)) и лекарственных препаратов (статины (Liu M. et al., 2020, Hirano M. et al., 2004, Kitamura S. et al., 2008), босентан (Treiber A. et al., 2007), валсартан (Yamashiro W., et al. 2006) и олмесартан (Yamada A. et al., 2007)). Установлено, что изменение активности (дисфункция) OATP1B1, например при генетическом дефекте, может приводить к гипербилирубинемии, а также к изменению трансмембранного транспорта лекарственных веществ-субстратов и развитию нежелательных лекарственных реакций. Данный факт подчеркивает важность проведения исследований, посвященных оценке функционирования OATP1B1 в различных условиях, и необходимость поиска его ингибиторов/активаторов.

Биохимические механизмы регуляции OATP1B1 активно изучаются (Mori D. et al, 2019, Svoboda M. et al, 2011). Например, показано, что некоторые препараты, такие как гемфиброзил, циклоспорин А, рифампицин, кларитромицин, эритромицин снижают активность транспортера за счет взаимодействия с его молекулой (Tuerkova A. et al, 2022, Treiber A. et al, 2007). Описана также транскрипционная, посттранскрипционная и посттрансляционная регуляции OATP1B1 (Alam K. et al, 2018).

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

системы, а также проявляет антиоксидантную и противовоспалительную активность (Lundberg J.O. et al, 2022, Шумаев К.Б. и др., 2021, Kumar G. et al, 2020, Hummel S.G. et al, 2006, Sharma J. et al, 2007). Основные свои эффекты оксид азота реализует через NO-pГЦ-цГМФ-сигнальный путь (Koesling D. et al, 2016). В то же время, в высоких концентрациях NO способен участвовать в образовании активных форм азота, вследствие чего изменяется редокс-статус клетки. Одним из защитных механизмов в условиях изменения уровня активных форм кислорода/азота является ядерный фактор эритроидного происхождения (англ.: *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*, Nrf2) (Lee D.S., 2022) за счет активации антиоксидантных систем.

NO обладает высокой реакционной способностью, поэтому быстро окисляется во внутриклеточной среде (Goshi E., 2019), что ограничивает его действие как модулятора сигнальных путей. По этой причине для повышения уровня оксида азота в клетке применяются различные его доноры, например S-нитрозоглутатион (SNOG) (Broniowska A.K., 2013). По сравнению с другими донорами NO (органическими нитратами и нитритами, металлическими нитрозильными комплексами и т.д.) (Yang Y., 2021, Miller M., 2007), SNOG является эндогенной молекулой, не вызывает развитие феномена толерантности и обладает низкой токсичностью (Li W. et al, 2022, Burov O.N. et al, 2022). S-нитрозоглутатион инициирует основные сигнальные каскады NO, в частности NO-pГЦ-цГМФ-сигнальный путь (Абаленихина Ю.В. и др., 2022). Роль NO в регуляции OATP1B1 на данный момент еще не исследована. С другой стороны, S-нитрозоглутатион не может свободно проникать через клеточную мембрану. Установлено, что во внеклеточной среде S-нитрозоглутатион метаболизируется с образованием глутатиона и оксида азота (II), который, в свою очередь, способен диффундировать внутрь клетки (Ramachandran N. et al, 2011). Кроме этого, доказано, что ключевой механизм проникновения S-нитрозоглутатиона в клетку связан с переносом нитрозогруппы от S-нитрозоглутатиона к другим аминокислотам, содержащим тиольные группы. Глутатион и образовавшиеся S-нитрозотиолы поступают в клетку посредством специализированных

транспортных систем (Broniowska A.K., 2013).

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

### **Степень разработанности проблемы**

OATP1B1 был идентифицирован в печени тремя независимыми научными группами в 1999 г (Abe T. et al, 2000), поэтому механизмы его функционирования и регуляции, роль в физиологических и биохимических процессах только начинают активно изучаться. Установлено, что транспортер переносит через цитоплазматическую мембрану ряд эндогенных веществ и ксенобиотиков (Murray M. et al, 2017).

Показано, что различные факторы транскрипции регулируют экспрессию OATP1B1/*SLCO1B1*. Промотор *SLCO1B1* трансактивировался гепатическим ядерным фактором (англ.: *hepatocyte nuclear factors*, HNFs) 1α (Jung D. et al, 2001) и 4α (Kamiyama Y. et al, 2007), печеночным рецептором X подтип альфа (англ.: *liver X receptor*, LXRα) (Meyer zu Schwabedissen H.E. et al, 2010), а лиганд ретиноевой кислоты подавлял экспрессию мРНК *SLCO1B1* в гепатоцитах человека (Le Vee M. et al, 2013). Описана роль гликозилирования, фосфорилирования и убиквитинирования в регуляции OATP1B1 (Alam K. et al, 2018). Так же на количество белка-транспортера оказывают влияние половые гормоны. Тестостерон увеличивал уровень белка-транспортера OATP1B1, действуя через фарнезоидный X рецептор (англ.: *farnesoid X receptor*, FXR), прегнан X рецептор (англ.: *pregnane X receptor*, PXR) и LXRα; эстрадиол увеличивал количество белка-транспортера OATP1B1, действуя через конститутивный андростановый рецептор (англ.: *constitutive androstane receptor*, CAR); а прогестерон снижал содержание белка-транспортера OATP1B1 (Shchulkin A.V et al, 2023). На клетках линии аденокарциномы ободочной кишки человека (англ.: *Cancer coli*; Caco-2) было доказано регуляторное действие NO на

рецепторы CAR (Абаленихина Ю.В. и др. 2022), PXR (Сеидкулиева А.А., 2023) и эффлюксный белок-транспортер Р-гликопротеин посредством NO-рГЦ-цГМФ-сигнального механизма (Абаленихина Ю.В. и др. 2022, Судакова Е.А, 2022). Однако роль NO в регуляции OATP1B1 на данный момент не установлена и участие данного транспортера в трансмембранном переносе S-нитрозоглутатиона не описано, что и послужило целью настоящего исследования.

### **Цель исследования**

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

### **Задачи исследования**

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

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

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

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

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

### **Научная новизна**

В ходе выполнения работы впервые:

- оценена роль полипептида, транспортирующего органические анионы,

1B1 в переносе S-нитрозоглутатиона через клеточную мембрану. Получено, что донор NO не переносится изучаемым белком-транспортером;

- установлено участие полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 в транспорте глутатиона;

- доказано, что S-нитрозоглутатион в концентрациях 10-50 мкМ увеличивает относительное количество и активность полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 и способствует повышению экспрессии гена *SLCO1B1*;

- показано, что NO-pГЦ-сигнальный путь, ядерный фактор эритроидного происхождения Nrf2, печеночный X рецептор (LXR $\alpha$ ) вносят существенный вклад в регуляцию полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 при воздействии S-нитрозоглутатиона на клетки линии HepG2.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

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

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

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

## Методология и методы исследования

Эксперимент диссертационной работы был выполнен *in vitro* на трех клеточных линиях: гепатоцеллюлярная карцинома человека (англ.: *hepatocellular carcinoma*, HepG2); клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека (англ.: *human embryonic kidney* 293; HEK293); клеточная линия, трансфицированная геном, кодирующим OATP1B1 (HEK293-SLCO1B1). В качестве донора оксида азота (II) был использован S-нитрозоглутатион в диапазоне концентраций 1-100 мкМ при экспозиции 3, 24 и 72 ч. Уровень NO детектировали с помощью флуоресцентных зондов DAF FM, выраженность нитрозативного стресса – по уровню 3-нитротирозина (детектировали методом вестерн-блот) и битирозина (детектировали флуориметрией).

Функционирование митохондрий оценивали по реакции с флуоресцентными зондами MitoTracker Red. Цитотоксические концентрации S-нитрозоглутатиона определяли по результатам МТТ-теста (фотометрический метод анализа). Оценка выраженности апоптоза была проведена при анализе изменения относительного количества антиапоптотического белка Bcl2 и проапоптотического белка Fas, определяемых методом вестерн-блот.

Оценку относительного количества полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 выполняли методом вестерн-блот. Внутриклеточную концентрацию аторвастатина, характеризующую активность OATP1B1, определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией. Количественную оценку ампликонов гена *SLCO1B1* анализировали с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Значение OATP1B1 в трансмембранном переносе S-нитрозоглутатиона оценивали с помощью сравнения проникновения донора оксида азота в клетки HEK293 и HEK293-SLCO1B1. Концентрацию S-нитрозоглутатиона анализировали методом ВЭЖХ-МС/МС.

Роль NO-pГЦ-сигнального пути, транскрипционного фактора Nrf2, рецептора LXR $\alpha$  в регуляции OATP1B1 под действием S-нитрозоглутатиона анализировали с помощью специфических ингибиторов данных



транскрипционных факторов.

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

### **Положения, выносимые на защиту**

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

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

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

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

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Высокая степень достоверности полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментальных данных, полученных с использованием адекватных и современных методов исследования (полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, флуоресцентные зонды, вестерн-блот, высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией) с последующей систематизацией и статистической обработкой.

Ключевые положения диссертации были изложены, обсуждены и включены в материалы конференций: Ежегодной научной конференции, посвященной Десятилетию науки и технологий и 80-летию Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова (Рязань, 2023); IX

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

### **Внедрение результатов работы в практику**

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

### **Личный вклад автора**

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

### **Сведения о публикациях по теме диссертации**

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

## Структура и объем диссертации

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

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материалы и методы исследования

Работа выполнена *in vitro* на культурах клеток HepG2 (англ.: *human hepatocellular carcinoma cell line*), HEK293 (англ.: *human embryonic kidney*), HEK293-SLCO1B1. Клетки культивировали в среде ДМЕМ с глюкозой 4500 мг/л с добавлением 4 mM L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (все компоненты производства Панэко, Россия) и 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Biowest, France) в инкубаторе при 5% CO<sub>2</sub> и температуре 37°C. SNOG растворяли в питательной среде до концентраций 1, 5, 10, 50, 100 мкМ и инкубировали с клетками в течение 3, 24 и 72 ч.

В ходе работы выполнены следующие группы экспериментов:

**I группа. Изучение влияния SNOG на функционирование митохондрий и жизнеспособность клеток линии HepG2:** *Серия 1* – контрольная группа – интактные клетки; *Серия 2* – клетки, культивируемые с SNOG.

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста (Kumar P. et al, 2018). Детекцию проводили на планшетном фотометре Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США) при длине волны 530 нм.

Функционирование митохондрий определяли с помощью красителя MitoTracker Red. Количественную оценку степени флуоресценции проводили с помощью спектрофлуориметра (Shimadzu RF-6000, Япония) при  $\lambda_{ext}=579$  нм,  $\lambda_{em}=599$  нм и пересчитывали на количество клеток (счетчик и анализатор жизнеспособности клеток «Countess 3 Automated Cell Counter», США). Результаты

выражали в ед. фл./  $10^6$  клеток.

## **II группа. Оценка уровня оксида азота, показателей нитрозативного стресса и апоптоза под действием SNOG в клетках линии HepG2:**

*Серия 1* – контрольная группа – интактные клетки; *Серия 2* – клетки, культивируемые с SNOG.

Уровень оксида азота (II) определяли с помощью флуоресцентных зондов DAF FM (Invitrogen, США) (Balcerczyk A. et al, 2005). *Микроскопирование клеток и ядер* осуществлялось на инвертированном микроскопе («Olympus», Япония). Уровень оксида азота в клетках анализировали на спектрофлуориметре RF-6000 (Shimadzu, Япония) по интенсивности флуоресценции  $\lambda_{ext}=495$  нм,  $\lambda_{em}=515$  нм.

Уровень битирозина оценивали флуориметрически  $\lambda_{ext}=325$  нм и  $\lambda_{em}=415$  нм на спектрофлуориметре RF-6000 (Shimadzu, Япония) (Amadò R., 1984).

Уровень 3-нитротирозина, Bcl2, Fas в тотальном клеточном лизате, полученном с помощью буфера Ripa, определяли методом вестерн-блот с использованием первичных антител 3-Nitrotyrosine, Bcl2, Fas (Affinity, Китай), в разведении 1:200 и вторичных антител Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP (Invitrogen, США) в разведении 1:4000. Уровень белков нормировали на содержание GAPDH (GAPDH, Affinity, Китай).

Определение уровня белка в полученных лизатах проводили по методу Бредфорда с помощью Coomassie Plus (Bradford) AssayKit (Thermo Fisher Scientific, США). Светопоглощение измеряли при длине волны 595 нм на спектрофотометре Smart Spec 3000 (Bio Rad, США).

## **III группа. Оценка влияния SNOG на относительное количество Nrf2 и выявление участия растворимой гуанилатциклазы в его регуляции:**

*Серия 1* – контрольная группа – интактные клетки; *Серия 2* – клетки, культивируемые с SNOG; *Серия 3* – клетки, культивируемые в питательной среде с ODQ (10 мкМ), через 30 мин после инкубации добавляли в питательную среду SNOG.

Уровень **Nrf2** определяли методом вестерн-блот. Ядерную фракцию выделяли с помощью набора Protein Extraction Kit (Cytoplasmic Nuclear), (Bio-Rad, США). Использовали первичные антитела Nrf2 (Affinity, Китай) в разведении

1:200 и вторичные антитела Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP (Invitrogen, США) в разведении 1:4000. Количество Nrf2 нормировали на уровень ламинина B1 (Laminin B1, Affinity, Китай).

#### **IV группа. Оценка субстратной специфичности OATP1B1 к SNOG:**

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

После окончания инкубации клетки лизировали трехкратным циклом «заморозка-разморозка» и определяли концентрацию SNOG и глутатиона методом ВЭЖХ-МС/МС (Ultimate 3000 TSQ Fortis, Thermo Fisher Scientific, США). Осаждение белков в биологическом образце осуществляли реакцией с метанолом (v1:v1). Хроматографическое разделение проводили на колонке C18 UCT Selectra (C18 4,6 мм × 100 мм, 3 мкм, 100 Å). Параметры программы градиента подвижной фазы: 0,1%-ный раствор муравьиной кислоты А, % / Метанол В, %: 0-0,01 мин – 60% / 40%; 0,01-2,5 мин 40% / 60%; 2,5-6,0 мин – 1% / 99%; 6,0-10,0 мин – 60% / 40%. *Скорость потока* составила 400 мкл/мин. *Температура колонки* - 35°C. *Объем аликвоты* экстрагированных образцов 10 мкл. *Режим мониторинга* селективных реакций для количественного анализа: для SNOG - масса/заряд 337.1→307.1; для глутатиона - масса/заряд 308.1→179.1. *Результаты* выражали в пмоль/мг.

**V группа. Оценка влияния SNOG на относительное количество, активность OATP1B1 и экспрессию гена SLCO1B1:** *Серия 1* – контрольная группа – интактные клетки; *Серия 2* – клетки, культивируемые с SNOG.

Относительное количество OATP1B1 определяли методом вестерн-блот в тотальном лизате клеток с помощью первичных антител OATP2, Polyclonal Antibody (Invitrogen, США) и вторичных антител Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP (Invitrogen, США).

Экспрессию гена SLCO1B1 анализировали методом ПЦР в режиме реального времени. Общую РНК выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen,

Германия). Обратная транскрипция и ПЦР выполнялась с использованием набора «БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue» (Биолабмикс, Россия). Использовались следующие праймеры («Евроген», Россия): SLCO1B1 - прямой 5'-GGTGAATGCCCAAGAGATGAG-3'; обратный 5'-GGAAACCCAGTGCAAGTGATT-3'. GAPDH - прямой 5'-GTCCCTCTGACTTCAACAGCG-3'; обратный 5'-ACCACCTGTTGCTGTAGCCAA-3'.

Активность OATP1B1 после воздействия SNOG оценивали по нарастанию концентрации его субстрата – аторвастатина в клетках линии HepG2. После инкубации транспортную среду заменяли на среду, содержащую тестируемые вещества и субстрат OATP1B1 – аторвастатин в концентрации 1 мкМ и выполняли инкубацию 5 мин. Затем клетки лизировали тройной «заморозкой-разморозкой» при -80°C. В лизатах клеток анализировали концентрацию аторвастатина методом ВЭЖХ МС/МС, которую пересчитывали на уровень белка и выражали в пмоль/мг/мин (Ерохина П.Д. и др., 2020, Сучкова О.Н. и др., 2024).

**VI группа. Оценка цитотоксичности ODQ, AEM1, TFCA на клетки HepG2 и их влияния на количество OATP1B1:** *Серия 1 – контрольная группа 1* – интактные клетки; *Серия 2 – контрольная группа 2* – клетки, культивируемые в питательной среде с добавлением ДМСО в количестве 0,01% (растворитель); *Серия 3, 4 и 5* – культивирование клеток (3, 24, 72 ч) в питательной среде с добавлением ODQ, 10 мкМ (Hwang T.L., 2008), или с добавлением AEM1, 5 мкМ (Bollong M.J. et al, 2015), или с добавлением TFCA, 30 мкМ (Sim W.C. et al, 2015).

**VII группа. Выявление механизмов регуляции S-нитрозоглутатиона на функционирование белка-транспортера OATP1B1:** *Серия 1 – контрольная группа 1* – интактные клетки; *Серия 2, 3 и 4* – культивирование клеток (24 и 72 ч) в питательной среде с добавлением ODQ (10 мкМ), или AEM1 (5 мкМ), или TFCA (30 мкМ), затем через 30 мин добавляли SNOG в концентрациях 1-100 мкМ.

Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения StatSoft Statistica 13.0, Microsoft Excel и GraphPad Prism 8. Полученные результаты оценивали тестом ANOVA. Для сравнения с контролем применяли post-hoc Даннетта, для попарного сравнения всех серий – post-hoc Тьюки. Результаты

представлены в таблицах и на рисунках в виде среднего арифметического значения (M) и стандартного отклонения (SD), статистика относительно контроля – \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Оценка влияния SNOG на биохимические показатели клеток линии HerG2

SNOG в концентрациях 1-100 мкМ при инкубации 3 ч статистически значимо не влиял на жизнеспособность клеток HerG2 и функционирование их митохондрий, а при экспозиции 24 и 72 ч в концентрации 100 мкМ вызывал снижение показателей на 30,5% и 52,4% ( $p < 0,0001$ ) соответственно (Рисунок 1, 2).

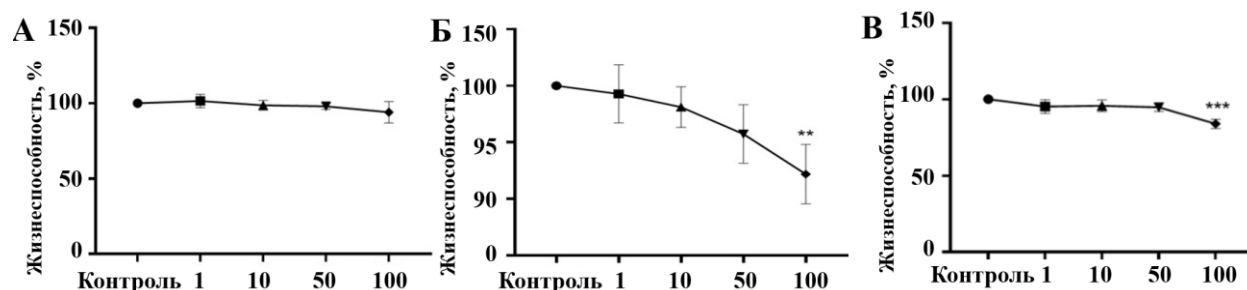


Рисунок 1 – Цитотоксичность SNOG на клетки линии HerG2, время воздействия 3 ч (А), 24 ч (Б) и 72 ч (В)

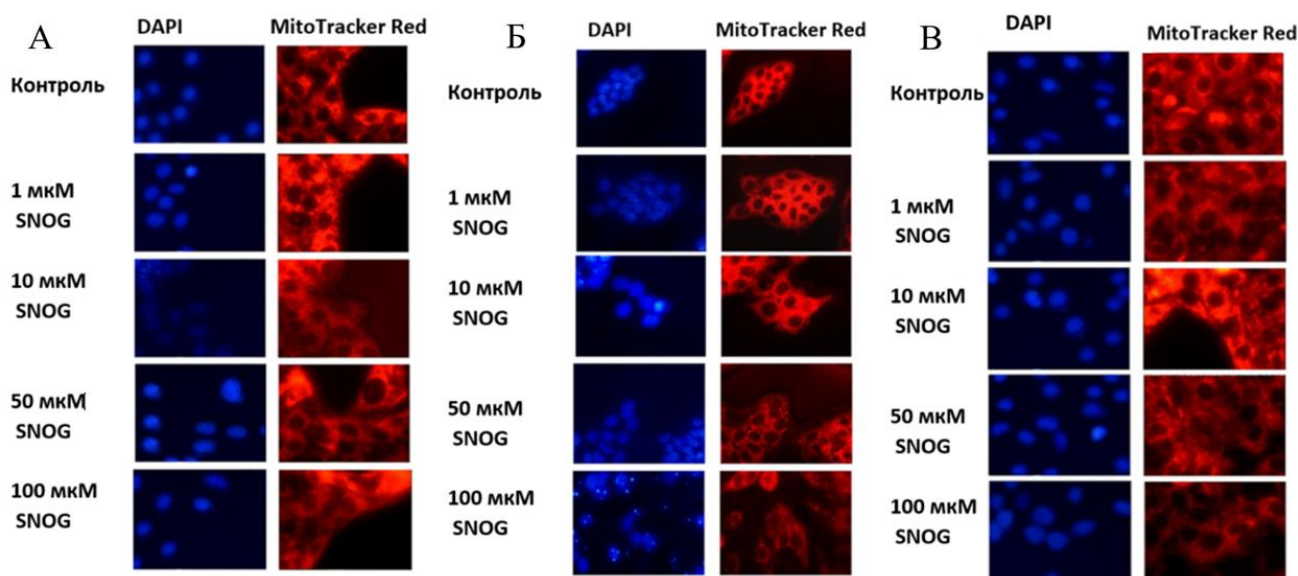


Рисунок 2 – Оценка функционирования митохондрий клеток линии HerG2 при воздействии SNOG 3 ч (А), 24 ч (Б) и 72 ч (В), ув  $\times 400$

При воздействии SNOG в концентрациях 1, 10, 50 мкМ в течение 3 ч уровень Bcl2 возрастал, а Fas увеличивался при SNOG 100 мкМ. Воздействие в течении 24

и 72 ч приводило к снижению уровня Bcl2 и повышению Fas при концентрациях SNOG 10-100 мкМ и 1-100 мкМ соответственно (Рисунок 3).

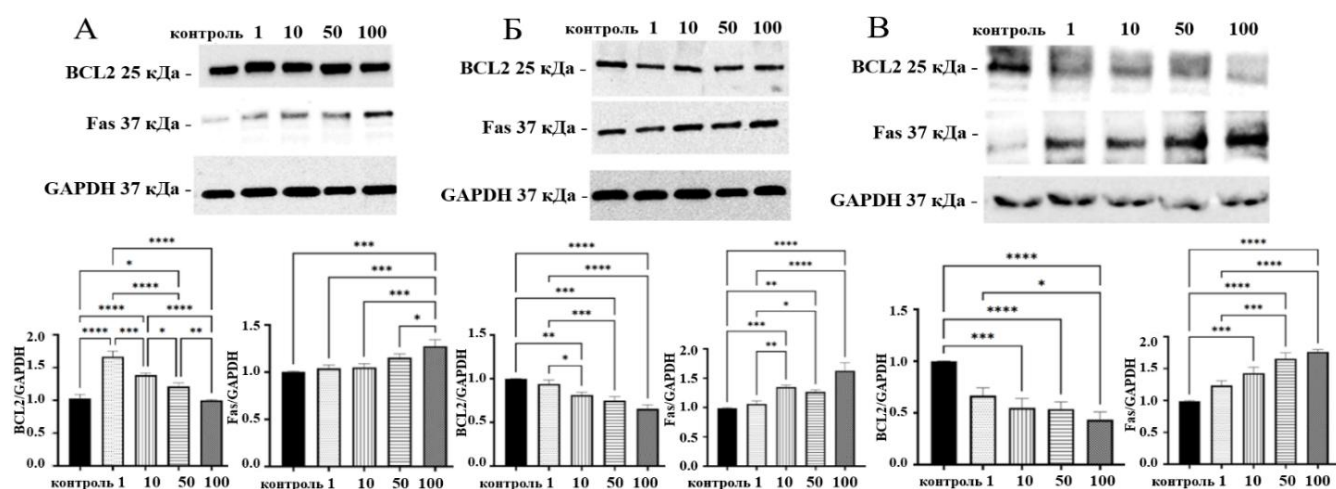


Рисунок 3 – Результаты вестерн-блот анализа содержания Bcl2 и Fas в клетках линии H9G2 после обработки SNOG в течение 3 ч (А), 24 ч (Б) и 72 ч (В)

Воздействие SNOG в течение 3 ч (10-100 мкМ), 24 и 72 ч (1-100 мкМ) на клетки линии H9G2 приводило к увеличению уровня NO (Рисунок 4).

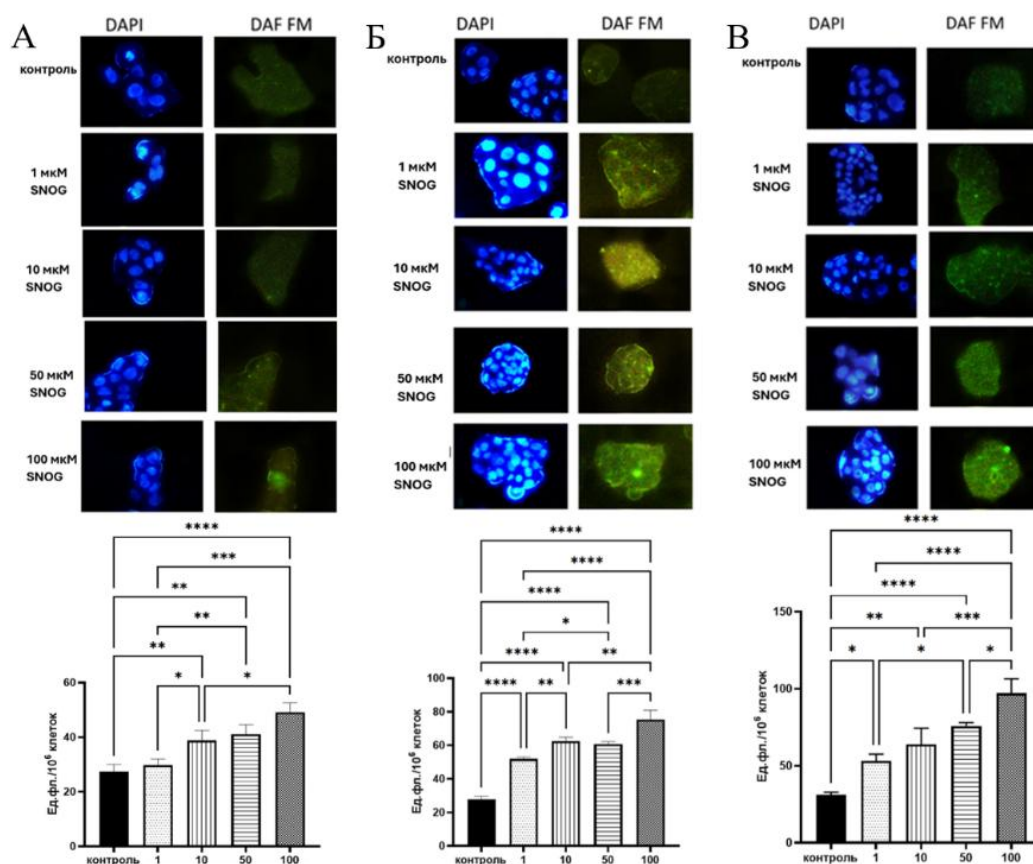


Рисунок 4 – Результаты анализа уровня NO в клетках линии H9G2 после обработки S-нитрозоглутатином в течение 3 ч (А), 24 ч (Б) и 72 ч (В), ув ×400



Увеличение концентрации NO инициировало процесс нитрозилирования. При воздействии SNOG в концентрациях 1, 10, 50 и 100 мкМ и экспозиции 3 и 24 ч относительное количество 3-нитротирозина увеличивалось.

При инкубации 72 ч и концентрации SNOG 1, 10, 50 мкМ наблюдалось снижение уровня 3-нитротирозина, а при концентрации SNOG 100 мкМ уровень 3-нитротирозина возрастал. При сроке воздействия SNOG 3 ч уровень битирозина в клетках линии HepG2 не изменялся. При воздействии SNOG в течение 24 ч в концентрациях 1-50 мкМ уровень битирозина оставался неизменным, а при 100 мкМ увеличивался. При длительности экспозиции 72 ч SNOG в концентрациях 1-100 мкМ увеличивал уровень битирозина в клетках линии HepG2 (Рисунок 5).

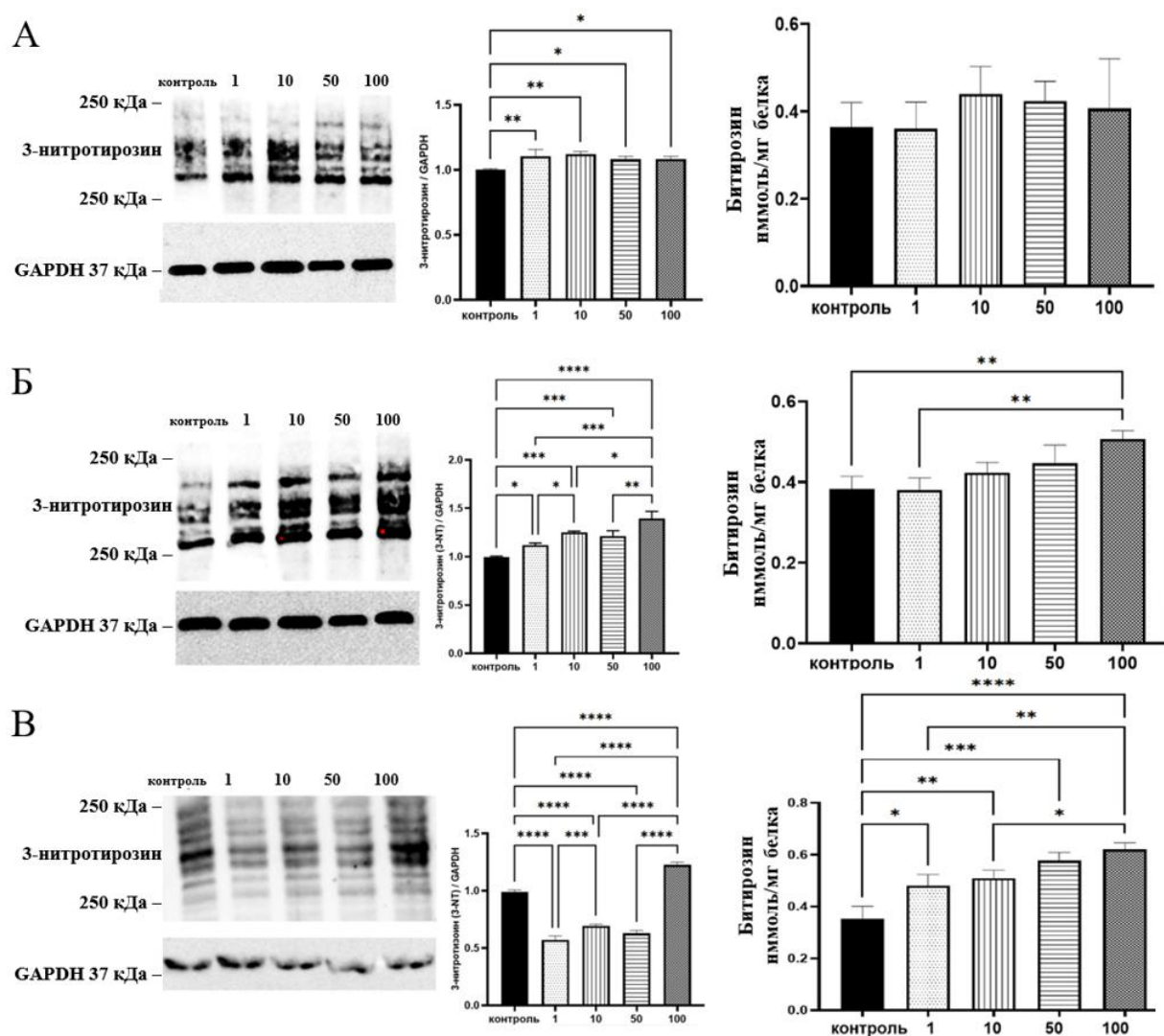


Рисунок 5 – Результаты вестерн-блот анализа содержания 3-нитротирозина и флуоресцентный анализ концентрации битирозина в клетках линии HepG2 после обработки SNOG в течение 3 ч (А), 24 ч (Б) и 72 ч (В)

Уровень небелковых SH-групп не изменялся при воздействии SNOG во всех концентрациях в течение 3 ч, а при длительности экспозиции 24 и 72 ч в концентрации 100 мкМ снижался по сравнению с контролем (Рисунок 6).

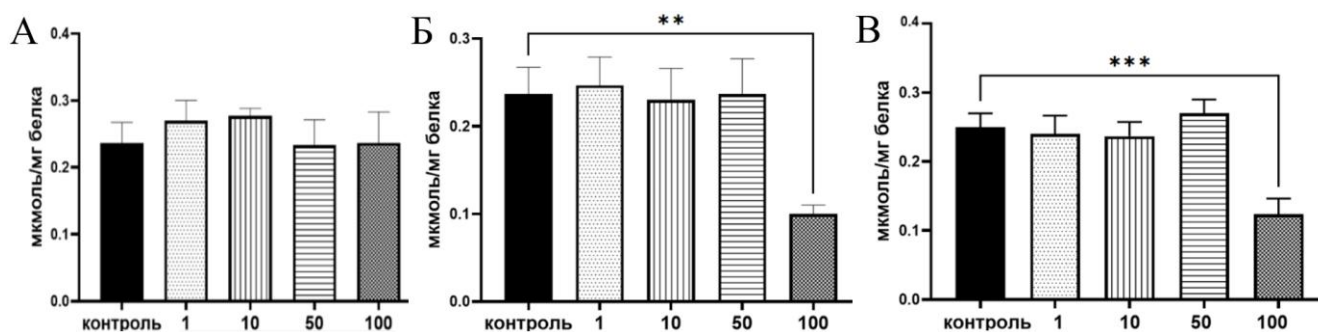


Рисунок 6 – Изменение уровня небелковых SH-групп в клетках линии HepG2 после обработки SNOG в течение 3 ч (А), 24 ч (Б) и 72 ч (В)

Уровень Nrf2 возрастал в ядре клеток при действии SNOG в течение 3 ч (1-100 мкМ), при длительности экспозиции 24 и 72 ч (1-50 мкМ). При воздействии высоких концентраций SNOG (100 мкМ) уровень Nrf2 достоверно не изменялся, что связано с повреждением клеток и снижением их жизнеспособности. При блокировке сигнального пути NO-рГЦ активация Nrf2 SNOG в концентрациях 1-100 мкМ и экспозиции 24 и 72 ч не наблюдалась (Рисунок 7).

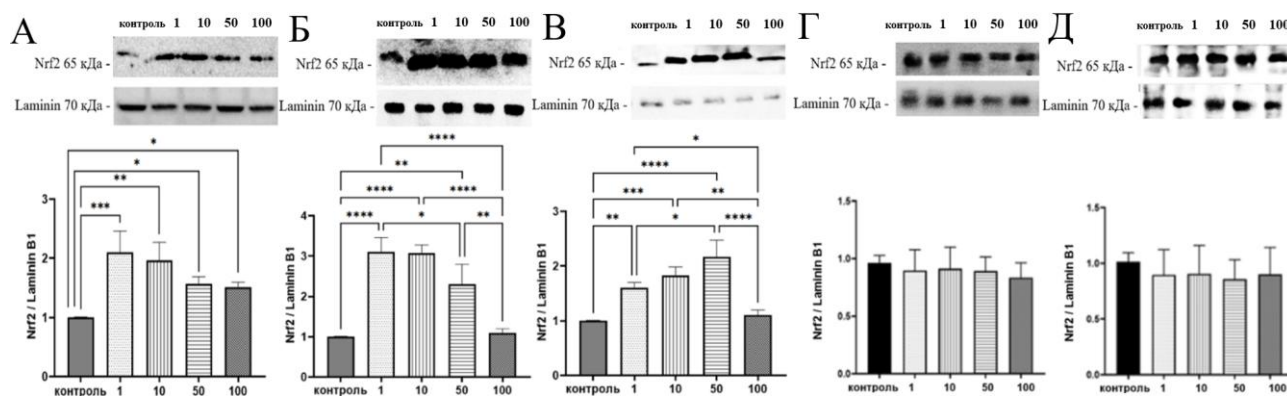


Рисунок 7 – Результаты вестерн-блот анализа содержания Nrf2 в ядре клеток HepG2 после обработки SNOG изолировано в течение 3 ч (А), 24 ч (Б) и 72 ч (В) и в присутствии ингибитора NO-рГЦ-сигнального пути ODQ 24 ч (Г) и 72 ч (Д)

### Оценка принадлежности SNOG к субстратам OATP1B1

Для оценки участия OATP1B1 в переносе SNOG использовали клетки HEK293 и HEK293-SLCO1B1. SNOG не был обнаружен в лизатах HEK293 и HEK293-SLCO1B1 при добавлении в концентрациях 1 мкМ или 10 мкМ. Таким

образом, SNOG не является субстратом OATP1B1. После применения SNOG в концентрации 10 мкМ уровень глутатиона в HEK293-SLCO1B1 через 5 и 15 мин был выше, чем в HEK293, а через 30 мин наоборот (Рисунок 8).

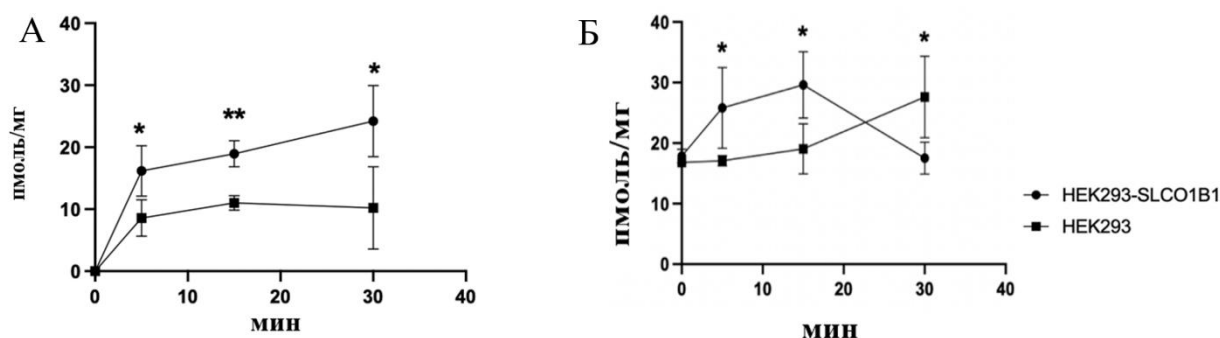


Рисунок 8 – Внутриклеточное содержание аторвастатина (А) и глутатиона (Б) в клетках линии HEK293 и HEK293-SLCO1B1

*Влияние SNOG на относительное количество и активность OATP1B1, экспрессию гена SLCO1B1*

SNOG в изучаемых дозах 1-100 мкМ при 3-часовом воздействии не оказывал статистически значимого эффекта на количество OATP1B1. В то же время при длительности воздействия 24 и 72 ч в концентрациях 10-100 мкМ донор NO вызывал повышение уровня транспортера (Рисунок 9).

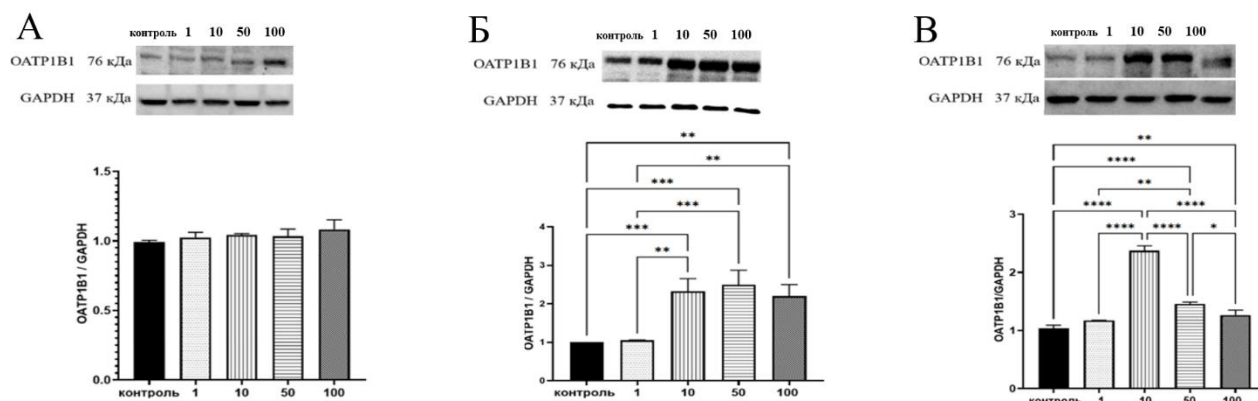


Рисунок 9 – Результаты вестерн-блот анализа содержания OATP1B1 в клетках линии HepG2 после обработки SNOG в течение 3 ч (А), 24 ч (Б) и 72 ч (В)

SNOG во всех концентрациях и при продолжительности эксперимента в 3 ч не влиял на активность OATP1B1, а при длительности воздействия 24 ч и в концентрациях 10-100 мкМ, и при экспозиции 72 ч и концентрации 50 мкМ донор NO вызывал повышение проникновения аторвастатина в клетках HepG2, что свидетельствует о повышении активности транспортера (Таблица 1).

Таблица 1 – Изменение внутриклеточной концентрации (пмоль/мг/мин,  $M \pm SD$ ,  $n=3$ ) аторвастатина при воздействии SNOG

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

SNOG (1-100 мкМ) при воздействии 3 ч не влиял на экспрессию гена *SLCO1B1*, кодирующего OATP1B1, а в концентрациях 10-100 мкМ и при экспозиции 24 и 72 ч вызывал ее повышение (Рисунок 10).

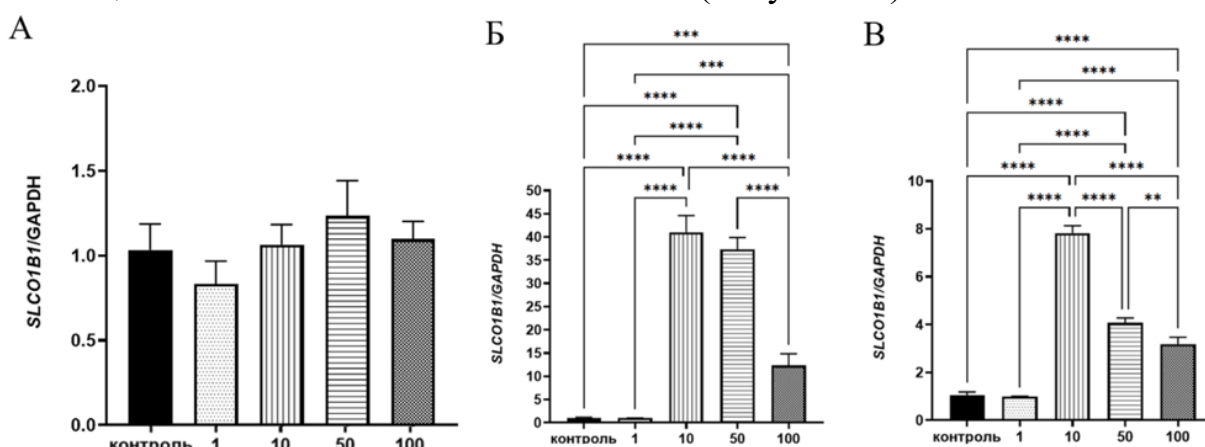


Рисунок 10 – Экспрессия гена *SLCO1B1* в клетках линии HepG2 после обработки SNOG в течение 3 ч (А), 24 ч (Б) и 72 ч (В)

### Изучение механизмов индукции OATP1B1 под действием SNOG

Для изучения механизмов индукции OATP1B1 под действием SNOG применяли специфические ингибиторы сигнальных путей. Ингибиторы ODQ, AEM1, TFCA при самостоятельном воздействии в течение 3, 24 и 72 ч не оказывали влияния на относительное количество OATP1B1. Ингибитор NO-зависимой гуанилатциклазы (NO-рГЦ) – ODQ предотвращал индуцирующее действие SNOG во всех концентрациях и всех сроках воздействия. Ингибитор Nrf2 – AEM1 предотвращал индуцирующее действие SNOG в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ и длительности воздействия 24 и 72 ч. Ингибитор LXRα – TFCA не влиял на индуцирующее действие SNOG во всех концентрациях при длительности воздействия 24 ч, но предотвращал индуцирующее действие донора NO в концентрации 100 мкМ и

экспозиции 72 ч. Полученные результаты свидетельствуют о том, что S-нитрозоглутатион реализует регуляторное действие на OATP1B1 преимущественно посредством NO-pГЦ, Nrf2 и в меньшей степени посредством LXR $\alpha$  (Рисунок 11).

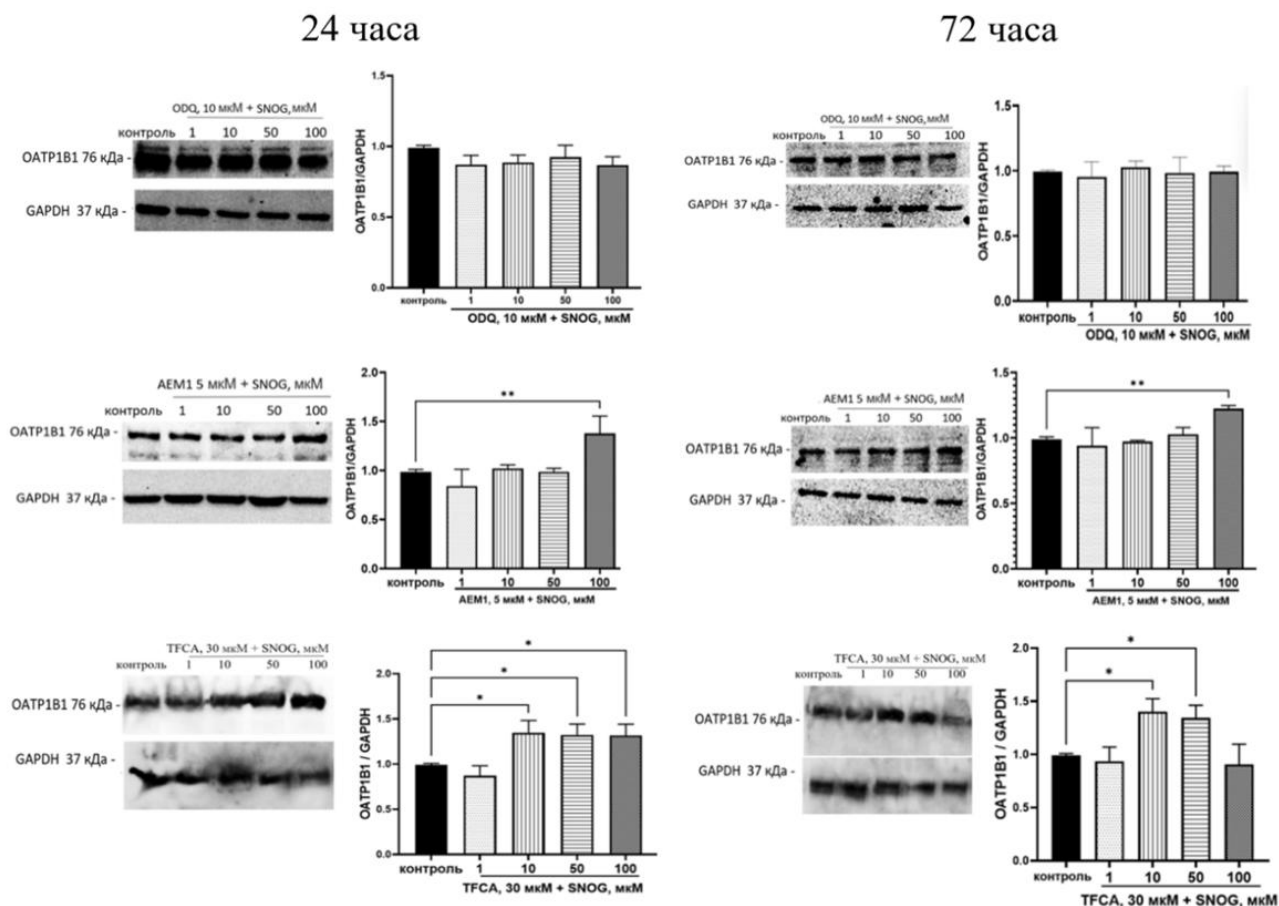


Рисунок 11 – Результаты вестерн-блот анализа содержания OATP1B1 в клетках линии HepG2 после обработки ODQ, AEM1 и TFCA в сочетании с SNOG

Таким образом, SNOG вне клеток подвергается метаболизму до NO и глутатиона, который далее транспортируется в клетку при участии OATP1B1. Концентрация SNOG 100 мкМ оказывала токсическое действие, что выражалось в нарушении гомеостаза между Bcl2 и Fas в сторону проапоптотического фактора, накоплении продуктов нитрозилирования и сопровождалось снижением жизнеспособности клеток линии HepG2.

В свою очередь NO проявляет регуляторное действие – активирует NO-pГЦ-сигнальный механизм и транскрипционный фактор Nrf2, которые способствуют экспрессии гена *SLCO1B1* и дальнейшей активации функционирования OATP1B1.

Кроме этого, в условиях воздействия донора NO – SNOG регуляция OATP1B1 осуществлялась с помощью LXR $\alpha$ .

## ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

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

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

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

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Влияние ингибитора гуанилатциклазы ODQ на NO-зависимую индукцию белка транспортера OATP1B1 / **О.Н. Сучкова**, Ф.Т. Гаджиева, Ю.В. Абаленихина [и др.] – Текст: непосредственный // Материалы ежегодной научной конференции, посвященной Десятилетию науки и технологий и 80-летию Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова. – Рязань, 2023. – С. 124-126.

2. Роль NO-ЦГМФ сигнального пути во влиянии S-нитрозоглутатиона на количество полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 (OATP1B1) в клетках линии HEPG2 / **О.Н. Сучкова**, Е.Д. Рокунов, П.Д. Ананьева [и др.] – Текст: непосредственный // Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста: сборник докладов IX Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов. – Рязань, 2023. – С. 127-128.

3. Влияние S-нитрозоглутатиона на относительное количество полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 (OATP1B1) в клетках линии HEPG2 / **О.Н. Сучкова**, Е.Д. Рокунов, П.Д. Ананьева [и др.] – Текст: непосредственный // Достижения современной фармакологической науки: сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых, посвященной 100-летию со дня рождения профессора А.А. Никулина и 80-летию Рязанского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова – Рязань, 2023. – С. 53-55.

4. Метод количественной оценки полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 (OATP1B1) вестерн-блот в гомогенатах тканей и лизатах клеток: рационализаторское предложение №1462 от 20.12.2023 / А.А. Слепнев, **О.Н. Сучкова**, П.Д. Ананьева [и др.] – Текст: непосредственный.

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

6. S-нитрозоглутатион как индуктор нитрозативного стресса и апоптоза / **О.Н. Сучкова**, Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин [и др.] – Текст: непосредственный // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2024. – Т. 27, № 9. – С. 50-56.

7. Изменение относительного количества белка-транспортера OATP1B1 при воздействии S-нитрозоглутатиона *in vitro* / **О.Н. Сучкова**, Ю.В. Абаленихина, А.В. Шулькин [и др.] – Текст:



непосредственный // **Прикладные информационные аспекты медицины.** – 2024. – Т. 27, № 3. – С. 44-50.

8. Участие NO-ГЦ-сигнального пути и NRF-2 в индукции количества белка-транспортера OATP1B1 при кратковременном воздействии S-нитрозоглутатиона / **О.Н. Сучкова**, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин [и др.] – Текст: непосредственный // Альманах молодой науки. – 2024. – Т. 1, №52. – С. 83-84.

9. Экспрессия гена SLCO1B1 под действием S-нитрозоглутатиона в клетках линии HEPG2 / **О.Н. Сучкова**, Ф.Т. Гаджиева, П.Д. Кочанова [и др.] – Текст: непосредственный // Медицина и фармация. Прошлое, настоящее, будущее: сборник научных материалов V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. - Орехово-Зуево, 2024. – С. 142.

10. Роль NRF2 во влиянии S-нитрозоглутатиона на количество полипептида, транспортирующего органические анионы (OATP1B1) / Ф.Т. Гаджиева, **О.Н. Сучкова**, Кочанова П.Д. [и др.] – Текст: непосредственный // Актуальные проблемы биомедицины – 2024: материалы XXX Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием. - Санкт-Петербург, 2024. – С. 144-145.

11. Роль LXRA рецептора в регуляции белка-транспортера OATP1B1 при воздействии S-нитрозоглутатиона / Ф.Т. Гаджиева, **О.Н. Сучкова**, Ю.В. Абаленихина [и др.] – Текст: непосредственный // Биохимия человека: материалы всероссийской конференции с международным участием — М.: Е-нот, 2024. – С. 420.

12. Molecular mechanisms of regulation of the OATP1B1 transporter protein in HEPG2 cells under the action of S-nitrosoglutathione / **O.N. Suchkova**, Yu.V. Abalenikhina, A.V. Shchulkin, E.N. Yakusheva – Text visual // Системный подход в медицине и образовании: материалы конференции с международным участием, посвященной Научной школе выдающегося физиолога академика П.К. Анохина. - Москва, 2024. – С. 199.

13. Влияние S-нитрозоглутатиона на активацию Nrf2 в клетках линии HepG2 / Е.В. Костюкова, **О.Н. Сучкова**, Ф.Т. Гаджиева [и др.] – Текст: непосредственный // Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста: сборник докладов X Всероссийской научной конференции с международным участием молодых специалистов, аспирантов, ординаторов, посвященной 175-летию со дня рождения академика И.П. Павлова и 120-летию со дня получения им Нобелевской премии. – Рязань, 2024. - С. 13-14.

14. Влияние S-нитрозоглутатиона на функционирование митохондрий клеток линии HepG2 / П.Д. Кочанова, **О.Н. Сучкова**, Е.В. Костюкова [и др.] – Текст: непосредственный // Биохимия человека: материалы всероссийской конференции с международным участием. - М.: Е-нот, 2024. – С. 382.

15. Патент № 2823925 С1 Российская Федерация, МПК C12N 5/07 (2010.01). Способ повышения количества полипептида, транспортирующего органические анионы 1B1 (OATP1B1): № 2024100677: заявл. 12.01.2024; опубл. 30.07.2024 / Е.Н. Якушева, **О.Н. Сучкова**, Ю.В. Абаленихина [и др.]; заявитель ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

16. S-Nitrosoglutathione Is Not a Substrate of OATP1B1, but Stimulates Its Expression and Activity / Y.V. Abalenikhina, A.V. Shchulkin, **O.N. Suchkova** [et al.] – Text visual // **Biomolecules.** – 2025. – Vol.15, No 3. – P. 428-444.

17. Индуцирующее влияние S-нитрозоглутатиона на экспрессию и активность полипептида, транспортирующего органические анионы, 1B1 (OATP1B1) в клетках линии HepG2 / **О.Н. Сучкова**, Ю.В. Абаленихина, А.В. Щулькин [и др.] – Текст: непосредственный // **Биомедицинская химия.** – 2025. – Т.70, № 1. – С. 29-36.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

рГЦ – растворимая гуанилатциклаза  
HepG2 – клетки гепатокарциномы  
LXR $\alpha$  – печеночный рецептор X подтип  $\alpha$   
NO – оксид азота (II)

Nrf2 – эритроидный ядерный фактор  
OATP1B1 – полипептид, транспортирующий органические анионы, 1B1  
SNOG – S-нитрозоглутатион