

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

На правах рукописи

СЕИДКУЛИЕВА Адамиана Аманмамедовна

**ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА И S-НИТРОЗОГЛУТАТИОНА НА
ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ ПРЕГНАН X РЕЦЕПТОРА И
КОНСТИТУТИВНОГО АНДРОСТАНОВОГО РЕЦЕПТОРА**

1.5.4. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Щулькин Алексей Владимирович

Рязань – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Прегнан X рецептор	15
1.1.1. Структура прегнан X рецептора	15
1.1.2. Функции прегнан X рецептора	17
1.1.3. Механизмы регуляции прегнан X рецептора	20
1.1.4. Лиганды прегнан X рецептора.....	25
1.2. Конститутивный андростановый рецептор	27
1.2.1. Структура конститутивного андростанового рецептора	27
1.2.2. Функции конститутивного андростанового рецептора.....	29
1.2.3. Механизмы регуляции конститутивного андростанового рецептора	31
1.2.4. Лиганды конститутивного андростанового рецептора	33
1.3. Сигнальная роль пероксида водорода и оксида азота (II)	34
1.3.1. Сигнальная роль пероксида водорода.....	34
1.3.2. Сигнальная роль оксида азота (II).....	37
1.3.3. Влияние пероксида водорода и доноров NO на прегнан X рецептор и конститутивный андростановый рецептор	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	41
2.1. Объект исследования	41
2.2. Культивирование клеток	41
2.3. Дизайн исследования	41
2.3.1. Влияние пероксида водорода на прегнан X рецептор и конститутивный андростановый рецептор	41
2.3.2. Влияние S-нитрозоглутатиона на прегнан X рецептор и конститутивный андростановый рецептор	43
2.4. Цитотоксический тест (МТТ-тест).....	44
2.5. Получение тотальных клеточных лизатов для биохимических исследований	44
2.6. Получение тотальных клеточных лизатов для вестерн-блота.....	45

2.7. Оценка выраженности окислительного стресса	45
2.8. Оценка выраженности нитрозативного стресса.....	46
2.9. Определение относительного количества прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора	47
2.10. Определение внутриклеточной локализации прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора	48
2.11. Статистический анализ.....	49
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	50
3.1. Влияние пероксида водорода на биохимические изменения в клетках линии Сасо-2.....	50
3.2. Влияние пероксида водорода на относительное количество и внутриклеточную локализацию прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора.....	56
3.3. Влияние малонового диальдегида на относительное количество прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора	63
3.4. Оценка роли Nrf2 в индукции прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора под действием пероксида водорода.....	66
3.5. Оценка роли прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора в защите клеток от окислительного стресса	68
3.6. Влияние S-нитрозоглутатиона на биохимические изменения в клетках линии Сасо-2.....	70
3.7. Влияние S-нитрозоглутатиона на относительное количество и внутриклеточную локализацию прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора.....	78
3.8. Влияние битирозина на относительное количество прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора	84
3.9. Оценка роли NO-цГМФ-сигнального пути в индукции прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора под действием S-нитрозоглутатиона.....	88

3.10. Оценка роли прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора в защите клеток от нитрозативного стресса.....	91
ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	102
ВЫВОДЫ.....	103
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	105
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ.....	106
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	107
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Прегнан X рецептор (PXR, *англ.: pregnane X receptor*) и конститутивный андростановый рецептор (CAR, *англ.: constitutive androstane receptor*) являются членами суперсемейства ядерных рецепторов – лиганд-активируемых факторов транскрипции клеток. Взаимодействуя с соответствующими лигандами, коактиваторами и корепрессорами они контролируют защиту организма от ксенобиотиков, дифференцировку клеток, поддержание гомеостаза и метаболические процессы [42, 53, 72, 155, 257, 270].

В частности, было показано, что PXR и CAR регулируют экспрессию ферментов I (изоферментов цитохрома P450 CYP3A и CYP2B) и II фазы биотрансформации (УДФ-глюкуронозилтрансферазы 1A1 (КФ 2.4.1.17.), сульфотрансферазы (КФ 2.8.2.1.)), переносчиков лекарственных средств (MDR1, MRP2) [233], а CAR, кроме того, подавляет экспрессию ферментов углеводного и липидного обменов [226, 233, 246, 247].

PXR и CAR локализируются, преимущественно, в печени и кишечнике [257]. Классическим индуктором PXR является рифампицин, CAR – фенobarбитал [42, 79].

Окислительный стресс (ОС) – патологический процесс, возникающий вследствие гиперпродукции активных форм кислорода (АФК) с одной стороны и недостаточной емкости антиоксидантной системы защиты с другой [27, 28, 199]. Развитие ОС вызывает повреждение биомакромолекул (белков, жиров, углеводов и нуклеиновых кислот) и, как следствие, нарушение нормального функционирования клеток, вплоть до их гибели путем некроза или апоптоза [169, 199, 217].

Кроме того, было показано, что АФК могут выполнять и регуляторную роль, запуская внутриклеточные сигнальные каскады, например, Nrf2/Keap1/ARE. Ядерный фактор эритроидного происхождения-2 (Nrf2, *англ.: nuclear factor*

erythroid 2-related factor 2) в физиологических условиях находится в неактивной форме в цитозоле за счет связывания с белком Keap1, что способствует его быстрой деградации [271].

При развитии ОС АФК способствуют диссоциации Nrf2 и Keap1 путем окисления ключевых остатков цистеина (Cys273, Cys288 и Cys151), регулирующих активность Keap1, или путем активации таких киназ, как протеинкиназа С (ПКС), митоген-активируемые протеинкиназы (MAPKs, (КФ 2.7.11.)), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3Ks, *англ.: phosphoinositide 3-kinases* (КФ 2.7.1.137.)), которые фосфорилируют Nrf2 [132, 258]. Далее диссоциированный Nrf2 транслоцируется в ядро и связывается с элементами антиоксидантного ответа (ARE, *англ.: antioxidant response elements*), запуская транскрипцию генов, кодирующих антиоксидантные ферменты, а также ферменты, метаболизирующие ксенобиотики, в том числе NAD(P)H-хиноноксидоредуктазу, глутатионтрансферазу (КФ 2.5.1.18.), УДФ-глюкуронилтрансферазу (КФ 2.4.1.17.), CYP2A5 [132, 258].

Оксид азота (II) (NO) – эндогенная сигнальная молекула, которая реализует свои основные физиологические функции (участие в вазодилатации, синаптической передаче сигнала, нейрогенезе и т.д.) через активацию растворимой гуанилатциклазы (pГЦ (КФ 4.6.1.2.)) с образованием цГМФ [163].

С другой стороны, при взаимодействии АФК с NO образуются активные формы азота (АФА), например, пероксинитрит, который самостоятельно участвует в многочисленных сигнальных каскадах, а также вызывает повреждение биомолекул [10, 23, 24].

Поскольку в результате развития окислительного и нитрозативного стресса (НС) накапливаются продукты повреждения эндогенных молекул, которые являются токсичными для клеток, можно предположить, что в защите клеток от их воздействия могут принимать участие PXR и CAR. Многогранная регуляторная роль NO, АФК и АФА также дает возможность предположить, что в их сигнальных каскадах также могут участвовать данные рецепторы.

Изучение влияния пероксида водорода (H_2O_2) и NO на функционирование PXR и CAR, а также выявление механизмов данного влияния является актуальной проблемой биохимии, решение которой позволит расширить представление о молекулярных механизмах регуляции данных рецепторов, разработать подходы к направленной модуляции их активности и оценить их роль в защите клеток от окислительного и нитрозативного стресса.

Степень разработанности проблемы

В многочисленных исследованиях была установлена важная роль PXR [236] и CAR [82] не только в защите клеток от воздействия ксенобиотиков, но и в регуляции метаболических процессов [63, 82]. При этом в единичных работах оценивалось влияние ОС и NO на функционирование данных рецепторов.

В опытах *in vivo*, проведенных на крысах-альбиносах, было показано, что препарат бромукназол приводил к гиперпродукции АФК, что сопровождалось повышением экспрессии PXR и его целевого гена *CYP3A1* и снижением экспрессии CAR и его целевого гена *CYP2B1* [63].

Кратковременное воздействие этил-трет-бутилового эфира (ЭТБЭ), вводимого крысам энтерально, активировало ядерные рецепторы CAR и PXR в печени, что приводило к заметному увеличению образования 8-ОН-дезоксигуанозина (8-ОНdG, *англ.: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine*, маркер ОС и канцерогенеза) [154].

Пероральное введение крысам наночастиц меди в дозе 400 мг/кг приводило к развитию ОС, о чем свидетельствовало повышение уровней малонового диальдегида (МДА), NO и индуцибельной синтазы NO (iNOS (КФ 1.14.13.39.)). В то же время наблюдалось снижение уровня экспрессии мРНК PXR и CAR [94].

На кафедре фармакологии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России в течение многих лет выполняются исследования по оценке принадлежности лекарственных веществ к субстратам, индукторам и ингибиторам АТФ-зависимых белков-транспортеров суперсемейства ABC [13]. Учитывая, что PXR и CAR являются

регуляторами экспрессии генов многих ABC-транспортёров, данное исследование является логичным продолжением научного направления кафедры.

Цель исследования

Изучить влияние пероксида водорода и S-нитрозоглутатиона на относительное количество и внутриклеточную локализацию прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора, проанализировать роль в этом процессе продуктов окислительного, нитрозативного стресса, транскрипционного фактора Nrf2 и NO-цГМФ сигнального пути, а также оценить роль данных рецепторов в защите клеток от окислительного и нитрозативного стресса.

Задачи исследования

1. Изучить влияние пероксида водорода на относительное количество и внутриклеточную локализацию прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора.
2. Изучить роль продукта окислительного стресса – малонового диальдегида и транскрипционного фактора Nrf2 в механизмах влияния пероксида водорода на относительное количество прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора.
3. Изучить влияние S-нитрозоглутатиона на относительное количество и внутриклеточную локализацию прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора.
4. Изучить роль продукта нитрозативного стресса – битирозина и NO-цГМФ сигнального пути в механизме влияния S-нитрозоглутатиона на относительное количество прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора.
5. Изучить роль прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора в защите клеток при окислительном и нитрозативном стрессе.

Научная новизна

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

1. Установлено разнонаправленное действие пероксида водорода на уровень прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора в зависимости от концентрации и длительности воздействия. Индукция рецепторов не приводит к их транслокации в ядро.

2. Показано, что повышение относительного количества прегнан X рецептора под действием пероксида водорода опосредовано воздействием малонового диальдегида, а индукция конститутивного андростанового рецептора – транскрипционным фактором Nrf2.

3. Выявлено разнонаправленное действие S-нитрозоглутатиона на уровень прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора в зависимости от концентрации донора оксида азота (II) и длительности воздействия. Индукция рецепторов не приводит к их транслокации в ядро.

4. Установлено, что индукция прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора при воздействии S-нитрозоглутатиона опосредуется воздействием продукта нитрозативного стресса – битирозина. Уменьшение количества прегнан X рецептора и повышение уровня конститутивного андростанового рецептора при низких концентрациях донора оксида азота (II) опосредуется NO-цГМФ-сигнальным путем.

5. Доказано, что прегнан X рецептор и конститутивный андростановый рецептор не играют защитной роли при развитии окислительного и нитрозативного стресса, а, наоборот, повышают чувствительность клеток к данным процессам.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе исследования, проведенного на клетках линии Caco-2, установлены механизмы разнонаправленного влияния H_2O_2 и S-нитрозоглутатиона (GSNO) на относительное количество PXR и CAR.

В частности, показано, что повышение относительного количества PXR под действием H_2O_2 опосредовано воздействием МДА, а увеличение уровня CAR – транскрипционным фактором Nrf2. Индукция PXR и CAR при воздействии GSNO опосредуется воздействием продукта нитрозативного стресса (НС) – битирозина. Уменьшение количества PXR и повышение уровня CAR при низких концентрациях донора NO реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь.

Результаты работы имеют важное практическое значение. Выявленные новые механизмы регуляции PXR и CAR могут являться мишенями для направленной модуляции данных рецепторов, что важно для повышения эффективности терапии ряда заболеваний, в частности, онкологической патологии.

Методология и методы исследования

Работа выполнена *in vitro* с использованием клеточной линии аденокарциномы ободочной кишки человека (линии Caco-2).

H_2O_2 использовали в качестве индуктора ОС, GSNO – в качестве донора NO.

Выраженность ОС определяли по уровню продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков, НС – по содержанию метаболитов NO, пероксинитрита и битирозина. Цитотоксическое действие изучаемых агентов анализировали по результатам МТТ-теста. Относительное количество PXR и CAR анализировали методом вестерн-блот, их внутриклеточную локализацию – с помощью иммуноцитохимии.

Роль транскрипционного фактора Nrf2 и цГМФ-сигнального пути в регуляции PXR и CAR была изучена с помощью применения их специфических ингибиторов.

Полученные результаты анализировались с помощью программ «Statsoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и GraphPad Prism 8.

Положения, выносимые на защиту

1. Пероксид водорода (10-100 мкМ) при длительности воздействия 24 ч повышает уровень PXR, а при экспозиции 72 ч (50 и 100 мкМ) снижает уровень рецептора. Относительное количество CAR при воздействии H₂O₂ в течение 72 ч может как увеличиваться (при концентрациях 5-50 мкМ), так и снижаться (100 мкМ). Повышение количества изучаемых рецепторов не сопровождается их транслокацией в ядро.

2. Повышение относительного количества PXR под действием H₂O₂ при 24-часовом воздействии опосредовано накоплением МДА, а индукции CAR под действием H₂O₂ при длительности экспозиции 72 ч – транскрипционным фактором Nrf2.

3. Донор NO GSNO при длительности воздействия 3 ч (1-500 мкМ) и 72 ч (10-500 мкМ) снижает, а при 24 ч (1-50 мкМ) повышает относительное количество PXR. При длительности эксперимента 72 ч GSNO в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ увеличивает, а в концентрациях 100 и 500 мкМ снижает содержание CAR. Повышение уровня изучаемых рецепторов не сопровождается их транслокацией в ядро.

4. Индукция PXR и CAR при воздействии GSNO опосредуется влиянием продукта нитрозативного стресса – битирозина. Уменьшение количества PXR при экспозиции 3 и 72 ч и повышение уровня CAR при 72-часовом воздействии донора NO в концентрации 1 мкМ опосредуются NO-цГМФ-сигнальным путем.

5. PXR и CAR повышают чувствительность клеток к окислительному и нитрозативному стрессу.

Степень достоверности

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

и статистической обработкой.

Апробация результатов

Основные положения диссертации представлены, обсуждены и опубликованы в материалах XXIV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2021); III Всероссийской конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Естественнонаучные основы медико-биологических знаний» (Рязань, 2021); XXVII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2021» (Санкт-Петербург, 2021); X Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2021); VIII Всероссийской научной конференции молодых специалистов, аспирантов, ординаторов «Инновационные технологии в медицине: взгляд молодого специалиста» (Рязань, 2022); XXVIII Всероссийской конференции молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2022» (Санкт-Петербург, 2022); XXV Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2022); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Биохимические научные чтения памяти академика РАН Е.А. Строева» (Рязань, 2022); XXVI Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2023); Всероссийской конференции с международным участием «Алмазовский молодежный медицинский форум-2023» (Санкт-Петербург, 2023); LXXXIV Ежегодной итоговой научно-практической конференции студентов и молодых учёных с международным участием «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2023» (Санкт-Петербург, 2023).

Апробация работы состоялась 22 июня 2023 года на заседании кафедр ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России: фармакологии; биологической химии с

курсом клинической лабораторной диагностики ФДПО; фармацевтической химии; фармацевтической технологии; биологии; управления и экономики фармации.

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

Внедрение результатов исследования в практику

Основные результаты диссертационной работы успешно внедрены и используются в учебном процессе при обучении студентов и клинических ординаторов на кафедрах биологической химии и фармакологии, а также в работе центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России.

Личный вклад автора

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

Сведения о публикациях по теме диссертации

По результатам диссертационной работы опубликовано 17 печатных работ: 5 статей в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России и входящих в базы данных Web of Science и Scopus; 12 тезисов докладов в материалах российских и международных конференций; получен 1 патент РФ на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 142 страницах и включает в себя следующие разделы: введение, глава 1 – обзор литературы, глава 2 – материалы и методы исследования, глава 3 – результаты исследования, обсуждение, заключение, выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений, список литературы.

Диссертация иллюстрирована 51 рисунком и 2 таблицами. Список литературы представлен 272 источниками, включая 30 источников отечественной и 242 – зарубежной литературы.

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность д.м.н., доценту Абаленихиной Ю.В. за всестороннюю помощь на всех этапах исследования, при подготовке и публикации печатных работ.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Прегнан X рецептор

1.1.1. Структура прегнан X рецептора

Прегнан X рецептор (NR1I2, ядерный рецептор подсемейства 1 группы I член 2) относится к подсемейству ядерных рецепторов 1I, которое включает еще два других рецептора: конститутивный андростановый рецептор (NR1I3, CAR, *англ.: constitutive androstane receptor*) и рецептор витамина Д (NR1I1, VDR, *англ.: vitamin D receptor*) [66].

Впервые NR1I2 был клонирован в 1998 году и назван рецептором прегнана X (PXR, *англ.: pregnane X receptor*) или рецептором, активируемым прегнаном (PAR), в связи с возможностью его активации эндогенными прегнановыми 21-углеродными стероидами. Кроме того, PXR известен как рецептор стероидов и ксенобиотиков (SXR, *англ.: steroid and xenobiotic receptor*) [246, 266].

Основная изоформа PXR человека (hPXR) состоит из 434 аминокислот и имеет массу 50 кДа. PXR экспрессируется, преимущественно, в печени, тонком кишечнике, толстой кишке, желчном пузыре и, в меньшей степени, в почках, легких, желудке, моноцитах периферической крови, надпочечниках, костном мозге, некоторых отделах головного мозга, тканях репродуктивных органов, молочной железе [4, 186, 191].

Вопрос о локализации PXR в клетке в его неактивной форме до сих пор остается открытым. Согласно Squires и др. (2004), цитозольная локализация PXR преобладает над ядерной в печени мыши, а его связывание с лигандом прегненолоном-16-карбонитрилом (PCN) приводит к ядерной транслокации комплекса лиганд-PXR [227].

В ходе исследований, проведенных японскими учеными в 2017 году на клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2, была установлена преимущественно ядерная локализация PXR [123]. В то же время в 3D-

культуре этих клеток была определена цитозольная локализация PXR, способного транслоцироваться в ядро после инкубации с рифампицином [123, 208].

hPXR кодируется геном *NR1I2*, который локализуется на третьей хромосоме в локусе 3q12-q13.3 и состоит из 10 экзонов [25, 58, 226] (Рисунок 1).

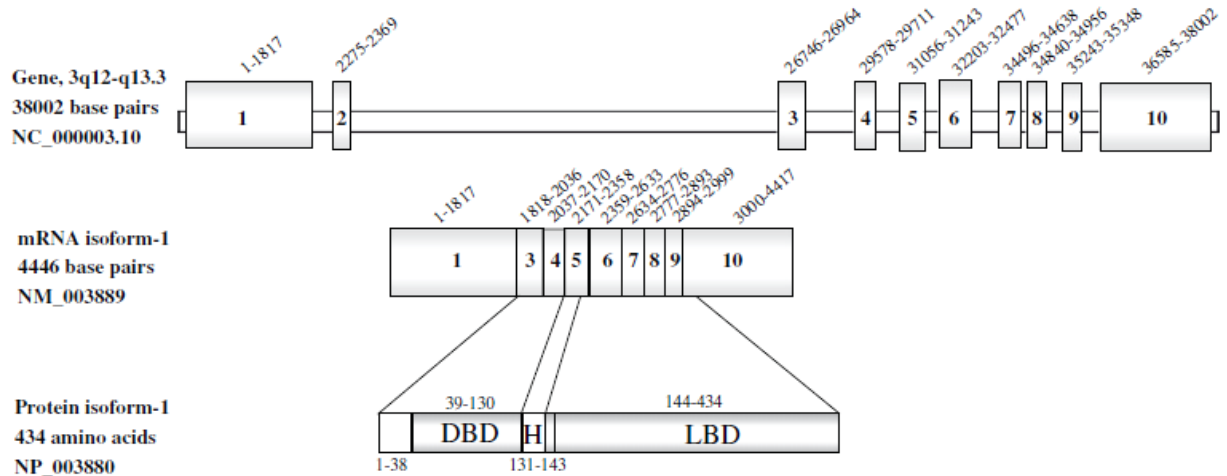


Рисунок 1 – Структура гена, мРНК и белка PXR (Цит. по: di Masi A., 2009) [164]

hPXR имеет классическое строение ядерных рецепторов и состоит из N-концевого, ДНК-связывающего (DBD, *англ.: DNA binding domain*), лиганд-связывающего (LBD, *англ.: ligand binding domain*), С-концевого доменов и шарнирного участка (Рисунок 2) [25, 40, 42, 49, 65, 160].

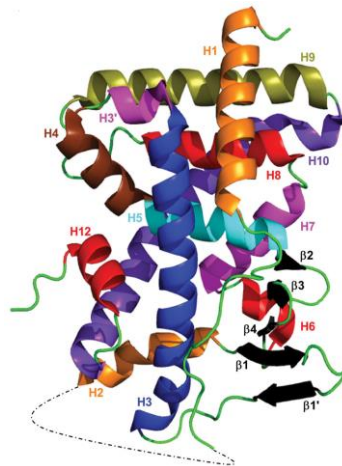


Рисунок 2 – Структура PXR (Цит. по: Buchman D. C., 2018) [65]

Примечание – H1, H2, H3, H3', H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H12 – α -спирали PXR; β 1, β 1', β 2, β 3, β 4 – β -листы, формирующие пятицепочечный β -слой.

N-концевой домен содержит домен транскрипционной активаторной функции 1 (AF-1, *англ.: activation function 1*), отвечающий за слабую транскрипционную активность, не зависящую от лиганда [121, 160].

LBD hPXR состоит из двенадцати α -спиралей и пятицепочечного β -слоя, который отсутствует в структуре других ядерных рецепторов (ЯР), что придает LBD hPXR большую гибкость и способствует связыванию с широким спектром лигандов [93, 246].

LBD состоит в значительной степени из неполярных аминокислот, образуя таким образом гидрофобную и незаряженную полость [93].

LBD взаимодействует с ретиноидным X рецептором- α (RXR α , *англ.: retinoid X receptor α*), увеличивая сродство и связывание коактиваторов (например, коактиваторов стероидных рецепторов SRC-1 и SRC-3, *англ.: steroid receptor coactivator*), которое происходит за счет активной конформации спирали α AF-2 [58, 93, 231]. Эти коактиваторы содержат три мотива LXXLL (L=Leu, X=любая другая аминокислота), которые также принимают α -спиральные конформации и взаимодействуют с PXR по принципу «charge clamp» («зажима для зарядки») [93, 231].

DBD участвует в димеризации PXR и связывании со специфическими последовательностями ДНК [58]. DBD состоит из 70 аминокислотных остатков, формирующих два «цинковых пальца», каждый из которых содержит четыре остатка цистеина [25, 58].

1.1.2. Функции прегнан X рецептора

PXR является лиганд-зависимым фактором транскрипции, который регулирует экспрессию генов ферментов I (изоферментов цитохрома P450, например CYP3A4) и II (например, сульфотрансферазы (КФ 2.8.2.1.), глюкуронилтрансферазы (КФ 2.4.1.17.)) фаз биотрансформации [4, 25, 58, 243], переносчиков лекарственных веществ (например, ген белка множественной лекарственной устойчивости 1 – MDR1, *англ.: multidrug resistance protein 1*), других

АТФ-связывающих кассетных транспортеров (например, *ABCC2*), транспортеров органических анионов (например, органического анион-транспортирующего полипептидного белка 2 *OATP2*, англ.: *organic anion transporting polypeptides*) и катионов (транспортера органических катионов *OCT1*, англ.: *organic cation transporter 1*) [53, 226, 257, 270].

Известно, что активация PXR в гепатоцитах способна усиливать регенерацию печени и даже приводить к гепатомегалии [186].

Стимуляция PXR индуцирует пролиферацию клеток рака молочной железы [53, 122]. Кроме того, было показано, что сверхэкспрессия PXR в этих клетках приводит к повышению промоторной активности и уровня белка множественной лекарственной устойчивости MRP1 и BCRP (*ABCG2*, белок устойчивости рака молочной железы), которые отвечают за выведение ксенобиотиков из клеток в межклеточное пространство, и к снижению эффективности таких химиотерапевтических препаратов, как тамоксифен, цисплатин и паклитаксел [224].

Установлена связь между опухолевым супрессором p53 и PXR, а также их роль в развитии и лечении онкологии [95]. p53, известный как «хранитель генома», в активном состоянии контролирует клеточный цикл, предупреждая злокачественные новообразования. Кроме того, он способен ингибировать PXR и, следовательно, замедлять метаболизм лекарственных веществ, что, в свою очередь, приводит к усилению химиотерапевтического эффекта [192].

Активация PXR может существенно влиять на устойчивость опухолевых клеток к химиотерапии, поскольку при этом происходит усиление экспрессии целевых генов [126], участвующих в метаболизме лекарственных веществ и их эффлюксном транспорте, что снижает эффективность проводимой терапии. Так, повышенная экспрессия PXR вызывает устойчивость к антинеопластическому препарату иринотекану при метастатическом колоректальном раке за счет активного метаболита этого препарата SN-38 (7-этил-10-гидроксикампотедин) , который сам по себе является агонистом PXR [68, 126, 218].

Активированный PXR способен усиливать основные проявления новообразований: рост клеток, инвазию и метастазирование – посредством активации экспрессии гена фактора роста фибробластов 19 *FGF19* (англ.: *fibroblast growth factor 19*) в клетках рака толстой кишки [181].

Экспрессия гена PXR *NR1I2* вместе с его целевым геном *CYP3A5* усиливается при терапии протоковой аденокарциномы поджелудочной железы паклитакселом, агонистом PXR и субстратом *CYP3A5*, что в свою очередь вызывает устойчивость к химиотерапии данным препаратом [68, 80].

Одним из факторов, способствующих росту и размножению опухолевых клеток, является ангиогенез, медиаторами которого служат эндотелиальный фактор роста сосудов (VEGF, англ.: *vascular endothelial growth factor*) и оксид азота II (NO). Активация VEGF приводит к повышению активности ядерного фактора каппа В (NF-κB) с дальнейшим увеличением уровня NO-синтазы и, соответственно, NO [53, 213]. NO стимулирует образование новых кровеносных сосудов, необходимых раковым клеткам для роста. Активация PXR приводит к ингибированию NF-κB, что способствует снижению уровня NO [53]. В частности, при добавлении к клеткам аденокарциномы толстой кишки человека Сасо-2 агониста PXR рифаксимина наблюдается снижение уровня VEGF, NO, наряду с ингибированием α субъединицы фактора, индуцируемого гипоксией-1 (HIF-1α, англ.: *hypoxia inducible factor-1 α*) и NF-κB, что указывает на возможную обратную зависимость между PXR и ангиогенезом [68, 213].

Известно, что помимо усиления экспрессии белков, участвующих в метаболизме лекарственных веществ, PXR также регулирует другие физиологические процессы, такие как метаболизм глюкозы и липидов [66, 131, 166, 248]. Установлено, что PXR подавляет экспрессию генов ферментов глюконеогенеза глюкозо-6-фосфатазы (G6Pase, англ.: *glucose 6-phosphatase* (КФ 3.1.3.9.)) и фосфоенолпируваткарбоксикиназы (ФЕПКК (КФ 4.1.1.32.)) [68, 183]. Активация PXR вызывает печеночный стеатоз, характеризующийся подавлением β-окисления и индукцией липогенеза [179, 182, 247, 248].

1.1.3. Механизмы регуляции прегнан X рецептора

Активность PXR регулируется лигандами, другими ядерными рецепторами, кофакторами, а также эпигенетическими и посттрансляционными модификациями.

1. Активация лигандами

ДНК-связывающая активность PXR регулируется широким спектром эндобиотических соединений, включая стероидные гормоны (эстроген) и желчные кислоты (лиохолевая кислота) [53]. В настоящее время наиболее изученным механизмом активации PXR является «прямая активация».

В отсутствие лигандов активность PXR регулируется корепрессорами (например, корепрессор ядерного рецептора 1 – NCoR1 и корепрессор ядерного рецептора 2 – NCoR2, *англ.: nuclear receptor co-repressor*), которые подавляют транскрипцию PXR посредством гистоновых деацетилаз (HDACs, *англ.: histone deacetylases* (КФ 3.5.1.)) [226].

После связывания с лигандом PXR транслоцируется в ядро, где гетеродимеризуется с RXR α , образуя комплекс PXR-RXR α . Далее этот комплекс коммутирует с элементами ксенобиотического (XREs, *англ.: xenobiotic response elements*) и/или гормонального ответа (HREs, *англ.: hormone response elements*), изменяет статус корепрессоров и коактиваторов (например, коактиваторов стероидных рецепторов SRC-1 и SRC-3), которые реструктурируют хроматин посредством гистоновой ацетилтрансферазы (НАТ, *англ.: histone acetyltransferase* (КФ 2.3.1.48.)) [58, 226, 231]. Впоследствии активированный комплекс PXR-RXR α регулирует экспрессию целевых генов [25].

Описание установленных лигандов PXR представлено ниже в разделе 1.1.4.

2. Транскрипционная регуляция гена NR1I2

Первые исследования, направленные на изучение молекулярных механизмов регуляции NR1I2, позволили предположить о возможном взаимодействии между глюкокортикоидным рецептором (GR, *англ.: glucocorticoid receptor*) и PXR. Так, лиганд GR дексаметазон усиливал транскрипцию NR1I2, которая частично ингибировалась антагонистом GR – мифепристоном [255].

Также была описана двойственная регуляция экспрессии PXR глюкокортикоидами: 1) опосредованная GR трансактивация промотора *NR1I2*; 2) стабилизация мРНК PXR через её 3'-нетранслируемую область (3'-НТО), что, вероятно, связано с GR-опосредованным снижением экспрессии miR-18a-5p [239].

В результате скрининга библиотеки малых интерферирующих РНК (siRNA) в качестве транскрипционного регулятора *NR1I2* был идентифицирован N-концевой ацетилтрансферазный комплекс, а именно, его каталитическая субъединица N- α -ацетилтрансфераза 10 (NAA10, англ.: *N-alpha-acetyltransferase 10*). Подавление экспрессии NAA10 приводило к уменьшению количества мРНК PXR и снижению активности промотора [214]. Было также предположено, что NAA10 может образовывать регуляторный комплекс с другими транскрипционными факторами, например, с ядерным фактором гепатоцитов 4 α (HNF4 α , англ.: *hepatocyte nuclear factor*) [124, 214]. Экспрессия PXR может снижаться при ингибировании ядерного фактора гепатоцитов 1 α (HNF1 α) и 4 α (HNF4 α) в клеточных линиях гепатокарциномы человека HepaRG и Huh7 [35, 241].

Медиатор сайленсинга рецепторов ретиноидов и тиреоидных гормонов (SMRT, англ.: *silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor*) - ядерный белок, который взаимодействует с регуляторами транскрипции, включая ядерные рецепторы, посредством двух доменов, связывающихся с рецепторами, ID-1 и ID-2 (англ.: *(NR)-interacting domains*), которые содержат расширенные корепрессорные мотивы [202]. Рифампицин, мощный агонист PXR, нарушал взаимодействие PXR-SMRT в диапазоне от микромолярной до миллимолярной концентрации *in vitro* в дрожжевой двугибридной системе, что позволяет предположить, что SMRT преимущественно взаимодействует с несвязанным PXR. Было установлено, что комплекс PXR-SMRT подавлял транскрипционную активность PXR [202, 207].

В клеточных линиях нейробластомы человека остров CpG, расположенный вокруг экзона 3 *NR1I2*, проявляет промоторную активность, а его метилирующий статус находится в обратной зависимости от экспрессии PXR [81, 149].

Известно, что метилирование ДНК в CpG-богатой последовательности промотора PXR повышено в клеточных линиях с низкой экспрессией PXR. Более того, более низкий уровень метилирования промотора PXR наблюдался в тканях колоректального рака по сравнению с прилегающими нормальными тканями слизистой оболочки, что свидетельствует о повышении уровня мРНК PXR в процессе канцерогенеза [81, 125].

3. Посттранскрипционная регуляция

МикроРНК – это класс коротких (длиной около 22 пар нуклеотидов (п.н.)), эволюционно консервативных некодирующих молекул РНК. Как посттранскрипционные регуляторы, микроРНК в первую очередь связываются с микроРНК-ответными элементами (MRE, *англ.: microRNA response elements*) в 3'-НТО транскриптов мРНК, что приводит к распаду мРНК или ингибированию трансляции. МикроРНК распознают и связывают мРНК целевых генов в их специфической последовательности [31].

Выявлено, что 3'-НТО играет репрессивную роль в экспрессии PXR, о чем говорит более низкая активность репортерного вектора, несущего 3'-НТО PXR, по сравнению с соответствующей контрольной плазмидой в клетках HepG2 [239].

В настоящее время известны следующие микроРНК, принимающие участие в регуляции PXR: miR-18a-5p [161, 239], miR-140-3p [152], miR-30c-1-3p [260], miR-877-5p [159], miR-148a [176].

Исследования продемонстрировали опосредованное miR-18a-5p снижение уровня мРНК и белка PXR, а также снижение уровня мРНК основной мишени PXR CYP3A4 и его каталитической активности, в то время как ингибитор miR-18a-5p усиливал экспрессию мРНК и белка PXR в клетках колоректальной аденокарциномы человека LS180 [161].

Согласно исследованиям *in silico* PXR является предполагаемой мишенью для miR-140-3p. Трансфекция miR-140-3p приводит к снижению уровня PXR в клетках гепатоцеллюлярной карциномы МНСС97-Н и HepG2. Эксперименты *in vitro* и *in vivo* показали, что miR-140-3p ослабляет PXR-ускоренный клиренс

противоопухолевого препарата сорафениба в клетках гепатоцеллюлярной карциномы и усиливает его химиотерапевтический эффект [152].

Сверхэкспрессия miR-877-5p приводит к снижению уровня мРНК PXR и самого белка в клетках HeraRG, в то время как антагомир miR-877-5p приводит к увеличению экспрессии мРНК PXR, но не изменяет уровня белка PXR [159].

Помимо прямого влияния, микроРНК могут изменять экспрессию PXR, воздействуя на его регуляторы, примером которых является HNF4 α . Известно, что miR-34a и miR-449a блокируют трансляцию HNF4 α через 3'-НТО, что сопровождается снижением экспрессии мРНК PXR [116]. miR-34a способствует разрушению мРНК RXR α посредством связывания с родственным микроРНК-ответным элементом, расположенным в кодирующей области мРНК RXR α . Сверхэкспрессия miR-34a приводит к заметному снижению индуцированной рифампицином транскрипционной активности CYP3A4, что позволяет предположить, что miR-34a может влиять на индуцибельную экспрессию генов-мишеней PXR [211].

4. Посттрансляционная регуляция

а. Фосфорилирование

Фосфорилирование в большинстве случаев приводит к ингибированию PXR. Обработка гепатоцитов крысы и человека активатором протеинкиназы А (ПКА (КФ 2.7.11.1.)) приводит к ингибированию целевых генов PXR – *Cyp3A1* (крысиный ортолог человеческого *CYP3A4*) и *CYP3A4*, что можно объяснить фосфорилированием PXR под действием ПКА. Но, в то же время, аналогичная обработка гепатоцитов мыши приводит к увеличению уровня мРНК *Cyp3a11* (мышинный ортолог человеческого *CYP3A4*), что указывает на видовую специфичность PXR [88, 143].

Инкубирование клеток HepG2 с флавоноидами приводит к увеличению экспрессии CYP через модуляцию активности циклинзависимой киназы 5 (CDK5, англ.: *cyclin-dependent kinase 5* (КФ 2.7.11.)). Известно, что PXR является субстратом CDK5. Исходя из этого, можно предположить, что CDK5 может модулировать активность PXR фосфорилированием [98].

Имеются сведения о том, что PXR также является субстратом других киназ: протеинкиназы С (ПКС (КФ 2.7.11.13.)) [89], рибосомальной S6 киназы (p70S6K) 70 кДа, киназы гликогенсинтазы-3 (GSK3, *англ.: glycogen synthase kinase 3* (КФ 2.7.11.26.)) и казеинкиназы 2 (СК2, *англ.: casein kinase 2* (КФ 2.7.11.1.)) [143], митоген-активируемой протеинкиназы (МАРК, *англ.: mitogen-activated protein kinase* (КФ 2.7.11.)) [256].

Известно также, что фосфорилирование серина S221 в LBD PXR затрудняет активационную способность PXR и усиливает ассоциацию PXR с NCoR. В свою очередь фосфорилирование треонина T135, находящегося в шарнирном участке между LBD и DBD, прерывает белок-белковое взаимодействие между PXR и SMRT, но не оказывает значительного влияния на ассоциацию с NCoR [175].

б. Убиквитирование и SUMOилирование

АТФ/убиквитин (Ub)-26S-протеасомная система (Ub/26S) способствует внутриклеточному распаду белков. Основными компонентами данной системы являются E1-активирующий фермент (КФ 6.2.1.45.), E2-конъюгирующий фермент (КФ 6.3.2.19.), E3-лигазы (КФ 2.3.2.27.), убиквитин, протеасома, субстратный белок. Фермент E3-лигаза (убиквитинлигаза) связывает убиквитин с определенным белком, который распознается Ub/26S, что приводит к дальнейшему распаду этого белка [47, 193]. Аналогичный эффект E3-лигаза проявляет и по отношению к PXR [196].

Процесс SUMOилирования является обратимым. Он возможен при участии ферментов системы Ub/26S, а также некоторых видов изопептидаз SENP1 (*от англ.: sentrin-specific protease 1*) для деконъюгации SUMO из белков-мишеней. В отличие от убиквитирования, направленного на распад белков, SUMOилирование играет роль регуляторного механизма, влияющего на транскрипционную активность, белок-белковые взаимодействия, передачу внутриклеточных сигналов, апоптоз [105, 254].

SUMOилирование PXR повышает уровень эндогенной экспрессии некоторых целевых генов PXR, которые включают *CYP3A4*, *CYP2C9*, *MDR1* и *UGT1A* (ген УДФ-глюкуронозилтрансферазы 1A1 (КФ 2.4.1.17.)), только в

присутствии рифампицина. SUMOилирование PXR не влияет на ДНК-связывающую активность этого рецептора, однако, приводит к усилению взаимодействия PXR с коактиватором SRC-1 и корепрессором NCoR1 [254].

с. Ацетилирование

Влияние ацетилирования на функционирование PXR малоизучено. E1A-ассоциированный белок p300 способен ацетилировать лизин 109 (Lys109) PXR как основной сайт ацетилирования, подавляя транскрипционную активность PXR из-за снижения способности димеризоваться с RXR α и связывать ДНК [36, 37].

Известно, что данная модификация может регулироваться сиртуином 1 (SIRT1) [37]. SIRT1 частично принимает участие в деацетилировании PXR, что приводит к активации липогенных функций PXR [36].

Было показано, что PXR ассоциируется с корепрессорным комплексом HDAC-SMRT и транскрипционно репрессируется после ацетилирования и SUMOилирования. Репрессивный эффект не связан с комплексом HDAC-SMRT, но напрямую зависит от SUMO-модификации и ацетилирования [34].

1.1.4. Лиганды прегнан X рецептора

Помимо лигандов-эндобиотиков, таких как желчные кислоты и их предшественники, прогестерон, прегненолон, 17-гидроксипрегненолон, холестерин и его метаболиты и литохолевая кислота, в настоящее время описан ряд ксенобиотических лигандов PXR (Таблица 1) [5, 218, 226, 272].

Таблица 1 – Лиганды прегнан X рецептора [5, 218, 226, 272]

Индукторы PXR		Ингибиторы PXR	
Название	Фармакологическая группа	Название	Фармакологическая группа
Бумекаин	Местные анестетики	Камптотецин	Противоопухолевые средства
Дексаметазон	Глюкокортикостероиды	Кетоконазол	Противогрибковые средства
Иринотекан	Противоопухолевые средства	Клотримазол	Противогрибковые средства
Прогестерон	Стероидные половые гормоны	Метформин	Пероральные сахароснижающие средства (бигуаниды)
Рифампицин	Антибиотики	Тамоксифен	Противоопухолевые средства
Рифаксимин	Антибиотики	Флуконазол	Противогрибковые средства
Троглитазон	Пероральные сахароснижающие средства	Энилконазол	Противогрибковые средства

Структурные особенности лигандов PXR определяются природой лиганд-связывающего кармана (LBP) PXR: LBP PXR является большим и высокогидрофобным, при этом остатки Ser247, Gln285, His407 и Arg410 участвуют в связывании лиганда в LBP благодаря образованию прочных водородных связей. Остатки Ser247 и Gln285 участвуют в направлении связывания лиганда, а боковые звенья His407 и Arg410 обладают гибкостью, необходимой для связывания лигандов различных размеров [145].

Таким образом, PXR – ядерный рецептор, лигандами которого является широкий спектр эндо- и ксенобиотиков, принимающий участие в защите клеток от

токсических веществ и некоторых метаболических процессах, механизмы регуляции которого активно изучаются в настоящее время. Оценка функционирования PXR на фоне повышения продукции свободных радикалов и под действием NO существенно расширит имеющиеся представления о его механизмах регуляции и биологической роли.

1.2. Конститутивный андростановый рецептор

1.2.1. Структура конститутивного андростанового рецептора

Конститутивный андростановый рецептор (CAR, NR1I3) человека (hCAR) и мыши (mCAR) впервые были клонированы в лаборатории Дэвида Мура в 1994 году и названы MB67 [268]. Физиологическая роль CAR была определена вскоре после открытия в 1998 году. Именно тогда он был признан основным регулятором экспрессии *CYP2B6* [79, 177, 268].

CAR экспрессируется преимущественно в печени и кишечнике, но низкий уровень базальной экспрессии также обнаруживается в тканях мозга, сердца, надпочечников, яичек, простаты и почек [79, 229, 244].

В нормальных физиологических условиях CAR, как правило, находится в цитоплазме клетки в комплексе с белком теплового шока (HSP, *англ.: heat shock proteins*) 90 и белком цитоплазматического удержания CAR (CCRP, *англ.: cytoplasmic accumulation of the nuclear receptor CAR*) [25]. Было показано, что белок теплового шока 70 HSP70 стабилизирует этот комплекс в неактивном состоянии [251]. Сверхэкспрессия CCRP в клетках печени человека способствует накоплению CAR в цитозоле, что подчеркивает роль CCRP в механизме ядерной транслокации CAR [251]. Несмотря на это, CAR также может быть локализован в ядре и конститутивно активен в иммортализованных клеточных линиях [4, 73, 115].

Для транслокации CAR содержит сигнальные области белка: сигнал ядерной локализации (NLS, *англ.: nuclear localization signal*) и сигнал ядерного экспорта (NES, *англ.: nuclear export signal*) [79, 190].

CAR человека (hCAR) кодируется геном *NR1I3*, который расположен на хромосоме 1 в локусе 1q23. Ген *NR1I3* состоит из 8545 п.н. и включает 9 экзонов, разделенных 8 интронными областями [44, 138, 158, 250]. DBD hCAR кодируется экзонами 2 и 3; шарнирная область – экзоном 4; LBD – экзонами 4-8 и частью экзона 9 [164]. Высококонсервативный DBD содержит особые структуры, которые могут распознавать и связываться со специфическими промоторными областями в генах-мишенях, а именно, элементами ксенобиотического ответа, такими как фенобарбитал-чувствительный энхансерный модуль (PBREM) и энхансерный модуль, чувствительный к ксенобиотикам (XREM) в промоторе *CYP2B6* [164, 190] (Рисунок 3).

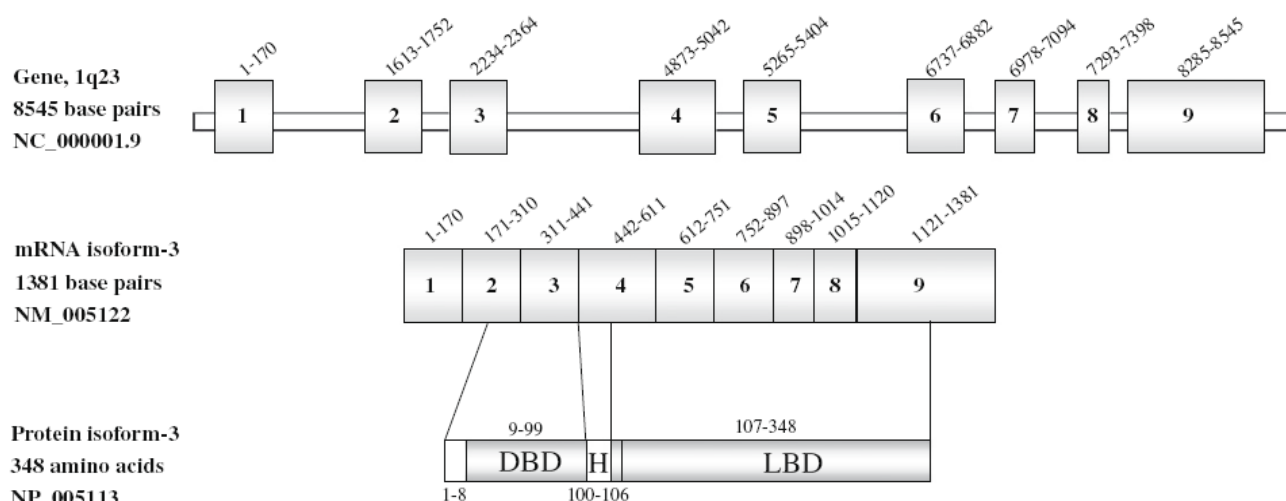


Рисунок 3 – Структура гена, мРНК и белка CAR (Цит. по: di Masi A., 2009) [164]

hCAR состоит из 348 аминокислотных остатков, а его молекулярная масса составляет 39 кДа [40, 49, 79, 190]. LBD hCAR состоит из 250 аминокислотных остатков, большинство из которых являются гидрофобными. LBD hCAR обычно содержит 12 α -спиралей, которые расположены тремя антипараллельными слоями. Гидрофобный лиганд-связывающий карман LBP формируется из $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ спиралей LBD [164, 190] (Рисунок 4).

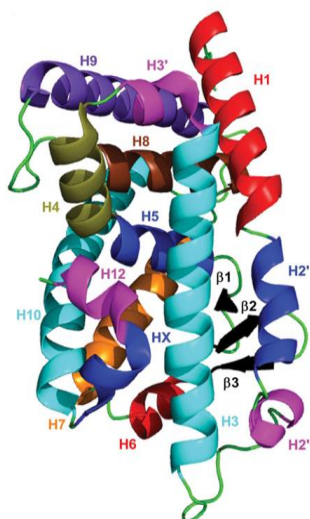


Рисунок 4 – Структура CAR (Цит. по: Buchman D. C., 2018) [65]

Примечание – H1, H2, H2', H2'', H3, H3', H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H12 – α -спирали CAR; β 1, β 2, β 3 – β -листы.

Высокая конститутивная активность CAR обусловлена стабилизацией спирали α 12 в активном положении, что обеспечивается тремя механизмами. Во-первых, дополнительная спираль X в LBD способствует переходу короткой спирали α 12 в активное положение [33]. Во-вторых, остатки Phe161, Asn165, Phe234 и Tyr326 экранируют лиганд-связывающий карман (LBP), предотвращая, в большинстве случаев, прямое взаимодействие между агонистом и α 12, но обеспечивают дальнейшую стабилизацию α 12 [33]. В-третьих, участок димеризации CAR/RXR α (состоящий из спиралей α 7, α 10 и α 11) больше, чем у других ядерных рецепторов, и связывание RXR α , по-видимому, стабилизирует LBD CAR в активной конформации [109, 244].

1.2.2. Функции конститутивного андростанового рецептора

Как и PXR, CAR участвует в регуляции экспрессии генов ферментов I и II фаз биотрансформации (CYP2C, CYP3A, сульфотрансферазы (КФ 2.8.2.1.), глюкуронозилтрансферазы (КФ 2.4.1.17.), глутатион-S-трансферазы (КФ 2.5.1.18.)), генов белков-переносчиков лекарственных веществ (например, ген

белка OATP2), в регуляции углеводного и липидного обменов, клеточной пролиферации, а также обмене билирубина и гема [4, 25, 69, 110, 125, 118, 165, 230].

Активация CAR повышает чувствительность клеток к инсулину, уменьшает стеатоз печени, а также приводит к снижению уровня триглицеридов в организме человека [38, 209, 240].

CAR может влиять на биосинтез липидов через нижележащие гены-мишени. Инсулин-индуцированный ген-1 (*Insig-1*) кодирует соответствующий трансмембранный белок INSIG1, который является сенсором холестерина и локализуется в эндоплазматическом ретикулуме. INSIG1 подавляет протеолитическую активацию белков, связывающих регуляторный элемент стеролов (SREBPs, *англ.: sterol regulatory element-binding proteins*), при их высокой концентрации [82]. CAR связывается с элементом DR4 на промоторе *Insig-1*, индуцируя его экспрессию, и, предотвращая, таким образом, транслокацию SREBP1 в ядро для индукции липогенных генов [82].

Активация CAR фенобарбиталом приводит к ингибированию ферментов глюконеогенеза, таких как ФЕПКК (КФ 4.1.1.32.) и G6Pase (КФ 3.1.3.9.) [130], и окислительных ферментов, таких как карнитинпальмитоилтрансфераза 1 (CPT1, *англ.: carnitine palmitoyltransferase* (КФ 2.3.1.21.)) и еноил-КоА изомераза (ECI, *англ.: enoyl-CoA-Δ isomerase* (КФ 5.3.3.8.)), что говорит о важной роли CAR в регуляции энергетического обмена в ответ на воздействие лекарственных веществ – лигандов данного рецептора [77, 130]. Известно также, что CAR-опосредованная репрессия генов ферментов глюконеогенеза происходит через систему сигналов, которая включает ингибирование FOXO1 и конкуренцию с другими транскрипционными факторами, такими как HNF4α, за специфическое связывание мотивов ДНК [206].

Активация CAR усиливает экспрессию фосфоглюконатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.44.), являющейся скоростью-лимитирующим ферментом в пентозофосфатном пути [38]. Кроме того, активация CAR может привести к усилению пролиферации гепатоцитов [187].

CAR может регулировать распад билирубина и реабсорбцию гема, индуцируя УДФ-глюкуронозилтрансферазу (КФ 2.4.1.17.) и мембранные транспортеры, которые способствуют их элиминации [118]. Активация CAR фенобарбиталом предотвращает индукцию CYP4A, основной микросомальной пероксидазы липидов, повышает экспрессию супероксиддисмутазы-3 (СОД (КФ 1.15.1.1.)), и таким образом может принимать участие в защите клеток от окислительного стресса [234].

1.2.3. Механизмы регуляции конститутивного андростанового рецептора

1. Активация лигандами

Как и все ядерные рецепторы, CAR может быть активирован прямым (лиганд-зависимым) и непрямым (лиганд-независимым) способом.

Независимо от механизма активация CAR заключается в том, что под воздействием лигандов происходит дефосфорилирование CAR и диссоциация его цитоплазматических комплексов с HSP90 и CCRP [114]. Далее CAR транслоцируется в ядро, где гетеродимеризуется с RXR α , образуя комплекс CAR/RXR α [44, 79].

Дальнейшему взаимодействию CAR/RXR α с регуляторными последовательностями способствуют коактиваторы, например, белок 1, взаимодействующий с глутаматным рецептором (GRIP1, англ.: *glutamate receptor-interacting protein 1*); коактиватор γ -рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PGC1 α , англ.: *peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator*); SRC1 [39, 153].

2. Транскрипционная регуляция CAR

Одним из первых охарактеризованных элементов ответа CAR был PBREM в гене *Cyp2b10* мыши [242]. Соответствующие элементы ДНК были обнаружены в генах *CYP2B1/2* крысы и *CYP2B6* человека [245].

Подобно другим ядерным рецепторам, CAR взаимодействует с коактиваторами из семейства SRC (SRC1, SRC2/GRIP1/TIF2 и

SRC3/pCIP/ACTR/AIB1/RAC-3/TRAM-1) и PGC1 α [39]. PGC-1 α обеспечивает лиганд-независимую транскрипционную активацию CAR, которая может быть усилена RXR α [39]. Все члены семейства SRC усиливают транскрипционную активность CAR, в то время как влияние SRC3 является преобладающим при активации CAR в печени [206, 228].

Активация GR физиологическими концентрациями глюкокортикоидов приводит к увеличению экспрессии CAR. Субмикромольные концентрации дексаметазона увеличивают экспрессию CAR [85]. Максимальная индукция достигается через 6-12 часов воздействия 100 нМ дексаметазона и значительно снижается под действием антагониста GR мифепристона. Кетоконазол и миконазол, два противогрибковых препарата, также ингибируют экспрессию мРНК CAR посредством их антагонистического влияния на GR [134].

Активная транскрипция генов также может быть связана с перестройкой структуры хроматина после ацетилирования гистонов, что обеспечивает более широкий доступ к ДНК-связывающим белкам. Ацетилирование гистона 4 (H4) в проксимальной области промотора CAR человека стимулируется агонистом GR дексаметазоном и ингибируется липополисахаридом (ЛПС) и интерлейкином-1 (ИЛ-1) [120].

Метилирование ДНК, происходящее на промоторе гена, обычно репрессирует транскрипцию гена. В опытах *in vitro* на клеточной линии HepG2 было показано, что берберин, изохинолиновый алкалоид, ингибирует экспрессию CAR и его генов-мишеней CYP2B6 и CYP3A4. При этом, берберин повышает уровень метилирования ДНК во всем геноме [51]. Метилирование промотора CAR пока не описано.

3. Посттрансляционная регуляция

Посттрансляционная регуляция CAR малоизучена. Известно, что активность CAR человека регулируется протеасомным комплексом. Ингибирование протеасомного комплекса приводит к внутриклеточному накоплению убиквитинированного CAR и снижению его транскрипционной активности [188]. Показано, что ингибитор протеасом MG-132 (карбобензоксид-лейцин-лейцин-

лейциналь) препятствует взаимодействию между CAR и коактиваторами SRC1 и GRP1 (основной рецептор фосфоинозитидов, *англ.: general receptor for phosphoinositides*) [188].

Фосфорилирование Thr38 DBD CAR, осуществляемое внеклеточной регулируемой протеинкиназой $\frac{1}{2}$ p (ERK $\frac{1}{2}$, *англ.: extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*) и ПКС (КФ 2.7.11.13.), кроме того, может влиять на процесс ядерной транслокации CAR [83]. Фосфорилирование CAR приводит к удержанию белка в неактивном состоянии в цитоплазме [167], в то время как дефосфорилирование протеинфосфатазой 1 (PP1, *англ.: protein phosphatase* (КФ 3.1.3.16.)) и протеинфосфатазой 2А (PP2А (КФ 3.1.3.16.)) усиливает ядерную транслокацию активного CAR [225, 269].

1.2.4. Лиганды конститутивного андростанового рецептора

На данный момент идентифицировано достаточно большое количество лигандов CAR, основные представители которых представлены в Таблице 2.

Таблица 2 – Лиганды конститутивного андростанового рецептора [71, 77, 90, 109]

Индукторы CAR		Ингибиторы CAR	
Название	Фармакологическая группа	Название	Фармакологическая группа
Ацетаминофен	Нестероидные противовоспалительные средства	Андростанол	Стероидные половые гормоны
Аторвастатин	Гиполипидемические средства	Бензодиазепин	-
Карбамазепин	Противоэпилептические средства	Клотримазол	Противогрибковые средства

Клофибрат	Гиполипидемические средства	Камптотецин	Противоопухолевые средства
Нефазодон	Антидепрессанты	Кетоконазол	Противогрибковые средства
Никардипин	Антигипертензивные средства	Меклизин	Антигистаминные средства
Орфенадрин	Миорелаксанты	Метформин	Пероральные сахароснижающие средства
Фенитоин	Противоэпилептические средства	Эстрадиол	Стероидные половые гормоны
СИТСО	-	СINPA1	-

Таким образом, CAR, как и PXR, относится к ядерным рецепторам, лигандами которого является широкий спектр эндо- и ксенобиотиков, принимает участие в защите клеток от токсических веществ и некоторых метаболических процессах, механизмы регуляции которого активно изучаются в настоящее время. Оценка функционирования CAR на фоне повышения продукции свободных радикалов и под действием NO существенно расширит имеющиеся представления о его механизмах регуляции и биологической роли.

1.3. Сигнальная роль пероксида водорода и оксида азота (II)

1.3.1. Сигнальная роль пероксида водорода

Пероксид водорода (H_2O_2) – это нерадикальная активная форма кислорода (АФК), образующаяся в результате многих патологических процессов.

Основными ферментами, принимающими участие в образовании молекул H_2O_2 из высокотоксичных радикальных АФК, являются флавинзависимые

оксидазы, ацил-коэнзим-А-оксидаза (КФ 1.3.3.6.) в пероксисомах, СОД (КФ 1.15.1.1.) [29, 144, 171]. Ферменты каталаза (КФ 1.11.1.6.), глутатионпероксидаза (GPx, *англ.: glutathione peroxidase* (КФ 1.11.1.9.)) и пероксиредоксин (Prx, *англ.: peroxiredoxin* (КФ 1.11.1.15.)), в свою очередь, нейтрализуют молекулы H_2O_2 [17, 29, 48]. H_2O_2 – достаточно стабильное соединение, период его полужизни составляет 10-100 с [30].

В зависимости от типа клеток, концентрации H_2O_2 , динамики его образования и скорости выведения данная АФК может выступать в качестве сигнальной молекулы и играть важную роль в регуляции экспрессии множества генов или приводить к развитию окислительного стресса и повреждению клеточных компонентов [7, 17, 22, 54, 102, 170].

Так, известно, что в опытах *in vitro* ОС низкого уровня, вызванный путем добавления H_2O_2 или альдегидов в культуральную среду, способен стимулировать пролиферацию фибробластов, полученных из почки золотистого хомячка (клеточная линия ВНК 21) [67]. Снижение уровня АФК может замедлить пролиферацию; например, сверхэкспрессия каталазы в гладкомышечных клетках аорты крыс снижает уровень H_2O_2 и замедляет их пролиферацию [168]. Некоторые АФК способствуют дифференцировке стволовых клеток, хотя слишком сильное окислительное влияние замедляет данный процесс [259]. Было показано, что АФК регулируют сборку и разборку филаментозного актина, что влияет на рост, изменение формы и миграцию клеток [201].

Благодаря своим физико-химическим свойствам H_2O_2 может служить в качестве мессенджера для передачи окислительно-восстановительного сигнала от места его генерации к месту-мишени [99, 112]. Окислительно-восстановительная регуляция может происходить посредством контроля активности отдельного фермента или на транскрипционном уровне. Известно, что H_2O_2 модулирует активность следующих транскрипционных факторов в клетках млекопитающих: активирующий белок-1 (AP-1, *англ.: activating protein-1*); Nrf2; белок, связывающий элемент ответа цАМФ (CREB, *англ.: cAMP response element-binding protein*); фактор теплового шока 1 (HSF1, *англ.: heat shock factor 1*); HIF-1 α ; ген-

супрессор опухолевого роста *TP53* (англ.: *tumor protein p53*); NF-κB [11, 16, 18, 19]; сигнальный путь NOTCH; фактор транскрипции SP1 (англ.: *specificity protein 1*) [112].

Одним из основных из них является сигнальный путь Keap1-Nrf2-ARE, который играет важную роль в поддержании клеточного окислительно-восстановительного баланса и метаболизма, а также вызывает адаптивный ответ на окислительный стресс. Этот путь состоит из трех основных клеточных компонентов: Kelch-подобного ECH-ассоциированного /белка 1 (Keap1, англ.: *Kelch-like ECH-associated protein 1*), Nrf2 и элементов антиоксидантного ответа (ARE) [100, 106, 129, 133, 235]. В нормальных физиологических условиях Keap1, который является ингибитором Nrf2 (INrf2), связан с Nrf2 (большая часть которого находится в цитоплазме) и белком куллин-3 (Cul3) E3-убиквитин-лигазой [262]. При этом стимулируется убиквитинирование Nrf2, что способствует расщеплению Nrf2 26S протеасомой [262].

Однако в условиях ОС АФК способствуют диссоциации Nrf2 и Keap1 путем окисления ключевых остатков цистеина (Cys273, Cys288, и Cys151), регулирующих активность Keap1, или путем активации таких киназ, как ПКС, митоген-активируемые протеинкиназы (MAPKs), фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3Ks, англ.: *phosphoinositide 3-kinases*), которые фосфорилируют Nrf2 [132, 258]. Далее диссоциированный Nrf2 транслоцируется в ядро, где димеризуется с белками семейства bZIP (факторы транскрипции типа лейциновой молнии) – малыми белками Maf (Maf-F, Maf-G и Maf-K, англ.: *musculoaponeurotic fibrosarcoma*), и затем связывается с ARE генов антиоксидантных ферментов и ферментов II фазы биотрансформации: глутатионсинтетазы (GSS, англ.: *glutathione synthetase* (КФ 6.3.2.3.)), глутатион-дисульфидредуктазы (GSR, англ.: *glutathione-disulfide reductase* (КФ 1.8.1.7.)), тиоредоксина (Trx, англ.: *thioredoxin* (КФ 1.8.4.8.)), тиоредоксиндисульфидредуктазы (TRR, англ.: *thioredoxin-disulfide reductase* ((КФ 1.8.1.9.)) и Prx (КФ 1.11.1.15.)), и активирует их экспрессию [18, 19, 26, 27, 133].

С другой стороны, высокие концентрации H_2O_2 могут приводить к развитию ОС, повреждению биомакромолекул (белков, жиров, углеводов, нуклеиновых кислот) и, как следствие, гибели клеток [22].

1.3.2. Сигнальная роль оксида азота (II)

NO (оксид азота II) – это многофункциональная молекула, которая участвует в многочисленных сигнальных каскадах [2, 23, 24].

Основное количество NO продуцируется индуцибельной (iNOS, *англ.: inducible NO-synthase*), нейрональной (nNOS, *англ.: neuronal NO-synthase*) или эндотелиальной синтазой NO (eNOS, *англ.: endothelial NO-synthase*) [24, 139]. Субстратом этих ферментов является аминокислота L-аргинин [24]. Для синтеза NO необходимы молекулярный кислород O_2 , флавинадениндинуклеотид (ФАД), флавинмононуклеотид (ФМН), Ca^{2+} , кальмодулин, (6R)-5,6,7,8-тетрагидро-L-биоптерин (BH_4) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФН) в качестве кофакторов [23, 24, 157].

Превращение L-аргинина в L-цитруллин с образованием NO происходит в два этапа: на первом этапе происходит гидроксилирование L-аргинина до NG-гидрокси-L-аргинина, который является промежуточным метаболитом [1, 2, 52, 59, 127], а на втором этапе происходит окисление NG-гидрокси-L-аргинина путем связывания с O_2 и НАДФН₂, в результате чего образуется NO. Оба этапа катализируются комплексом гемового железа, присутствующего в ферменте [237]. Необходимый O_2 может поступать из дыхательной цепи в митохондриях, пероксисом, НАДФН-оксидазы (КФ 1.6.3.1.), ксантинооксидазы (КО (КФ 1.1.3.22.)), цитохрома P450 и/или циклооксигеназы (ЦОГ (КФ 1.14.99.1.)) [9, 18, 19, 23, 24, 70, 163].

Основные физиологические функции NO реализует через активацию растворимой гуанилатциклазы (pГЦ) в наномолярных (нМ) или пикомолярных (пМ) концентрациях [10]. NO поддерживает нейротрансмиссию в центральной нервной системе, участвует в защитных системах организма и в вазодилатации,

которая обеспечивает приток крови к таким тканям, как мозг, печень, легкие, почки и сердце в ответ на локальные изменения окружающей среды [9, 16, 23, 163].

NO также может модифицировать белки путем нитрозилирования, изменяя их активность [163].

Известно, что NO может индуцировать процессы S-глутатионилирования и S-нитрозилирования белков, содержащих тиоловые группы, несмотря на то, что сам по себе NO является слабым окислителем тиолов [57]. При этом образуются S-глутатионилированные (PSSG) и S-нитрозилированные (PSNO) белки [46].

Исследования *in vitro* показали, что такие белки, как папаин, креатинфосфокиназа (КФ 2.7.3.2.) или глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (КФ 1.2.1.12.), подвержены как S-нитрозилированию, так и S-глутатионилированию под действием донора NO GSNO, тогда как алкогольдегидрогеназа (КФ 1.1.1.1.), бычий сывороточный альбумин и актин подвергаются только S-нитрозилированию [46, 220].

С другой стороны, повышенное образование NO может приводить к образованию АФА.

Гиперпродукция NO может быть связана с ишемией-реперфузией, нейродегенеративными и хроническими воспалительными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит и воспалительные заболевания кишечника [6, 8, 140, 223].

К АФА относятся пероксинитрит (ONOO^-), диоксид азота (NO_2), оксид азота III (N_2O_3), нитроксил (HNO), пероксинитрозная кислота (ONOOH), пероксинитрат (O_2NOO^-), пероксинитриновая кислота (O_2NOOH), катион нитрозония (NO^+), нитрат (NO_3^-), нитрит (NO_2^-) и нитроксил-анион (NO^-) [6, 16, 23, 43, 173]. Они участвуют в неспецифической защите организма в ходе иммунного ответа, и так же, как и NO, могут выступать в качестве вторичных мессенджеров [43]. В то же время, АФА в высоких концентрациях приводят к увеличению количества токсичных молекул, способных повреждать клеточные компоненты и вызывать развитие НС [24, 139].

Взаимодействие NO с O^{2-} в клетках приводит к образованию пероксинитрита ($ONOO^-$) [9, 20, 23, 56], который может спонтанно распадаться до NO_2^\bullet и гидроксильного радикала ($^\bullet OH$) [174]. $ONOO^-$ является более сильным окислителем, чем O^{2-} или NO. Он является цитотоксичным веществом, способным окислять липиды, белки, липопротеины низкой плотности, аминокислоты и ДНК [16, 24, 189].

Значение $ONOO^-$ как биологического оксиданта обусловлено его высокой диффузией через клеточные мембраны. $ONOO^-$ образуется в местах воспаления и, как было показано, участвует в развитии различных нейродегенеративных расстройств и некоторых заболеваний почек. В результате взаимодействия $ONOO^-$ с аминокислотами образуется нитротирозин, уровень которого в тканях ассоциирован с возрастом [104, 140].

$ONOO^-$ может вызвать клеточный стресс-ответ, приводящий к активации сигнальных путей, например, тирозинкиназа-зависимый сигнальный путь, пути MAPKs и фосфоинозитол-3'-киназы (КФ 2.7.1.) [29, 57, 136].

1.3.3. Влияние пероксида водорода и доноров NO на прегнан X рецептор и конститутивный андростановый рецептор

Влияние H_2O_2 и доноров NO на функционирование PXR и CAR остается малоизученным.

В опытах *in vivo*, проведенных на крысах-альбиносах, показано, что препарат бромукназол приводит к гиперпродукции АФК, что сопровождается повышением экспрессии PXR и его целевого гена *CYP3A1* и снижением экспрессии CAR и его целевого гена *CYP2B1* [63].

Активация PXR таншиноном II – веществом, полученным из корня шалфея красного – приводит к повышению жизнеспособности клеток линии HUVES при моделировании ОС H_2O_2 [236], что может быть связано с индукцией глутатион-S-трансферазы (GST, *англ.: glutathione S-transferase* (КФ 2.5.1.18.)) и

глутатионпероксидазы (GPx, *англ.: glutathione peroxidase* (КФ 1.11.1.9)), обусловленной активацией PXR [185].

Известно, что кратковременное воздействие негенотоксичного химического вещества этил-трет-бутилового эфира (ЭТБЭ), вводимого крысам энтерально, активирует ядерные рецепторы CAR и PXR в печени, что приводит к заметному увеличению образования 8-OHdG (маркер ОС и канцерогенеза), апоптозу и остановке клеточного цикла вследствие развития ОС, активации метаболизма жирных кислот в митохондриях и пролиферации пероксисом в гепатоцитах [154].

Активация PXR его индуктором рифампицином вызывает повышение уровня CYP3A4, что приводит к усилению токсичности таких препаратов, как ацетаминофен, и развитию ОС [212]. Кроме того, в опытах *in vitro* ингибирование экспрессии PXR малыми интерферирующими РНК (миРНК) способствует снижению продуцирования АФК [210].

Пероральное введение крысам наночастиц меди в дозе 400 мг/кг приводит к развитию ОС и НС, о чем свидетельствует повышение уровней МДА, NO и индуцибельной синтазы оксида азота II (iNOS). В то же время, наблюдается снижение уровня экспрессии мРНК PXR и CAR [94].

Внутрибрюшинное введение мышам липополисахарида в различных дозах (0,1-5,0 мг/кг) приводит к развитию ОС и значительно снижает уровень экспрессии мРНК PXR [3, 14, 137].

Таким образом, имеющиеся на данный момент сведения о влиянии H₂O₂ (окислительного стресса) и доноров NO на функционирование PXR и CAR носят противоречивый характер, а механизмы реализации их действия не установлены. Учитываю важную регуляторную роль АФК и NO в развитии широкого спектра патологических состояний, целесообразно дальнейшее изучение данной проблемы.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в течение 21 суток, поскольку при данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, экспрессирующие PXR и CAR [261].

2.2. Культивирование клеток

Клетки культивировали при 37°C и 5% содержании CO₂ в инкубаторе WS-189C («World Science», Корея) в Дульбекко модифицированной среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) («Sigma-Aldrich», Германия), с добавлением L-глутамина (4 мМ) («Sigma-Aldrich», Германия), 15% эмбриональной бычьей сыворотки («Sigma-Aldrich», Германия), 100 ЕД/мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина («Sigma-Aldrich», Германия) соответственно [261].

Для оценки цитотоксичности H₂O₂ и GSNO и проведения иммуноцитохимических исследований клетки засеивали в 96-луночные планшеты («Corning», США); для изучения влияния тестируемых веществ на количество PXR, CAR и концентрацию продуктов окислительного и нитрозативного стресса – в 6-луночные планшеты («Corning», США). На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения.

2.3. Дизайн исследования

2.3.1. Влияние пероксида водорода на прегнан X рецептор и конститутивный андростановый рецептор

В исследовании были сформированы следующие экспериментальные серии:

1) контрольная серия – клетки инкубировали с питательной средой с

добавлением воды для инъекций (растворитель для H_2O_2) без добавления тестируемых веществ;

2) оценка влияния H_2O_2 на количество PXR и CAR и показатели ОС. H_2O_2 добавляли в культуральную среду в конечных концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50 и 100 мкМ и инкубировали в течение 3, 24 и 72 ч ($n=3$ для каждой концентрации и временной точки) [15]. При инкубации в течение 72 ч смену питательной среды проводили каждые 24 ч;

3) исследование влияния МДА (продукта перекисного окисления липидов) на количество PXR и CAR. К клеткам линии Caco-2 добавляли культуральную среду с МДА («Sigma-Aldrich», Германия) в концентрациях 10, 100 и 150 мкМ и инкубировали в течение 24 и 72 ч;

4) изучение роли транскрипционного фактора Nrf2 во влиянии H_2O_2 на количество PXR и CAR. В питательную среду за 30 мин до добавления H_2O_2 вносили ингибитор Nrf2 – N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин (AEM1, «Sigma-Aldrich», Германия) в концентрации 5 мкМ [32]. По окончании инкубации определяли относительное количество PXR и CAR. H_2O_2 использовался в концентрациях и длительности экспозиции, которые вызывали изменение относительного количества PXR и CAR;

5) оценка роли PXR и CAR в защите клеток от ОС. В питательную среду за 30 мин до добавления H_2O_2 вносили ингибитор PXR кетоконазол в концентрации 10 мкМ («Sigma-Aldrich», Германия) [74] или ингибитор CAR 5-[(Диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5H-дибензо[b,f]азепин-3-ил]этиловый эфир карбаминовой кислоты (CINPA 1, «TOCRIS», Великобритания) в концентрации 10 мкМ [78]. H_2O_2 использовался в концентрациях и сроках экспозиции, которые вызывали повышение относительного количества изучаемых рецепторов. После окончания инкубации анализировали выживаемость клеток с помощью МТТ-теста.

2.3.2. Влияние S-нитрозоглутатиона на прегнан X рецептор и конститутивный андростановый рецептор

В качестве донора NO использовали GSNO («Sigma-Aldrich», Германия) [64].

В ходе эксперимента по оценке влияния GSNO и продуктов HC на PXR и CAR были сформированы следующие серии:

1) контрольная серия (n=3) – клетки инкубировали с питательной средой с добавлением воды для инъекций (растворитель для GSNO) без добавления тестируемых веществ;

2) оценка влияния донора NO GSNO на количество PXR и CAR. GSNO добавляли в культуральную среду в конечных концентрациях 1, 10, 50, 100 и 500 мкМ и инкубировали 3, 24 и 72 ч (n=3 для каждой концентрации и временной точки);

3) исследование влияния битирозина (HC) на относительное количество PXR и CAR. К клеткам линии Caco-2 добавляли культуральную среду с битирозином («Cambridge Isotope Laboratories», Франция) в концентрациях 0,2; 0,4; 1 и 1,5 мМ и инкубировали 24 ч;

4) изучение роли NO-цГМФ сигнального пути во влиянии S-нитрозоглутатиона на количество PXR и CAR. В питательную среду за 30 мин до добавления GSNO вносили ингибитор pГЦ 1H-[1,2,4]оксадиазоло-[4,3-a]хиноксалин-1-ОН (ODQ, «Sigma-Aldrich», Германия) в концентрации 10 мкМ [111]. По окончании инкубации определяли относительное количество PXR и CAR. GSNO использовался в концентрациях, которые вызывали изменение относительного количества PXR и CAR;

5) оценка роли PXR и CAR в защите клеток от HC. В культуральную среду за 30 мин до добавления GSNO вносили ингибитор PXR кетоконазол в концентрации 10 мкМ [74] или ингибитор CAR CINPA 1 в концентрации 10 мкМ [78]. GSNO использовался в концентрациях и сроках экспозиции, которые вызывали повышение относительного количества изучаемых рецепторов. После окончания инкубации анализировали выживаемость клеток с помощью МТТ-теста.

2.4. Цитотоксический тест (МТТ-тест)

Выживаемость клеток оценивалась по результатам МТТ-теста.

Клетки засеивали в 96-луночный планшет из расчета 10^4 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 суток. Затем добавляли питательную среду с исследуемыми веществами. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0,5% раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия (МТТ, «ПанЭко», Россия) и инкубировали в течение 2 ч, после этого раствор МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1% раствора диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия) [253]. Светопоглощение измеряли через 10 минут при 530 нм на спектрофотометре для планшетов StatFax 2100 («Awareness Technology», США).

Жизнеспособность клеток Сасо-2 рассчитывали по формуле:

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

где ОП – оптическая плотность.

2.5. Получение тотальных клеточных лизатов для биохимических исследований

Клетки засеивали в 6-луночные планшеты из расчета 10^5 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 суток, затем добавляли питательную среду с тестируемыми веществами. После окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин – ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия).

Клетки из расчета 1×10^6 промывали изотоническим солевым раствором («Медпро», Россия) и лизировали в 150 мкл ледяного буфера (50 мМ, рН 7,4 трис-НСl, 150 мМ КСl, 0,5% тритон X-100, смесь ингибиторов протеиназ (аминоэтилбензенсульфонилфторида гидрохлорид (АЕBSF) 2 мМ, апротинин 0,3 мкМ, бестатин 130 мкМ, ЭДТА 1мМ, эпоксисукциниллейцинуанидинобутиламид (Е-64) 14 мкМ, лейпептин 1 мкМ, «Sigma-Aldrich», Германия), встряхивали на

шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g (СМ-50, «Eppendorf», Германия). Цитоплазматическую (экстраядерную) фракцию переносили в отдельные пробирки и использовали для определения концентрации продуктов окислительного и нитрозативного стрессов [252].

2.6. Получение тотальных клеточных лизатов для вестерн-блота

Клетки культивировали в 6-луночных планшетах. После окончания экспозиции с тестируемыми веществами клетки снимали с поверхности лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия), трижды промывали раствором фосфатного буфера («Bio-Rad», США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo («Thermo Fisher Scientific», США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ: 2 мМ (4-(2-аминоэтил)бензенсульфонилфторида гидрохлорида (AEBSF)), 0,3 мкМ апротинина, 130 мкМ бестатина, 1мМ ЭДТА, 14 мкМ транс-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4гуанидино)бутана (E-64), 1 мкМ лейпептина («Sigma-Aldrich», Германия) в течение 30 минут при +4⁰С и постоянном перемешивании из расчета 10⁷ клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 13 000 об/мин в течение 10 мин (центрифуга Avanti JXN-30; Beckman Coulter). Супернатант использовали для выполнения анализа методом вестерн-блот.

2.7. Оценка выраженности окислительного стресса

В лизате клеток с помощью коммерческих наборов определяли концентрацию продуктов ПОЛ («Elabscience», Китай, «Агат-Мед», Россия) и уровень карбонильных производных белков («Sigma-Aldrich», Германия).

Метод определения продуктов ПОЛ – МДА и 4-гидрокси-олефинов (4-гидрокси-2-ноненаля и 4-гидрокси-2-гексеналя) основан на их взаимодействии с 1-метил-2-фенилиндолом с образованием стабильного хромофора, который имеет максимум поглощения при 586 нм [197]. Полученные результаты выражали в

мкмоль/мг белка. Анализ выполняли на спектрофотометре для планшетов StatFax 2100 («Awareness Technology», США).

Для оценки проникновения продукта ПОЛ – МДА внутрь клеток в серии с исследованием влияния МДА на уровень PXR и CAR, анализировали его концентрацию в лизате клеток с помощью коммерческого набора («Агат-Мед», Россия). Метод определения МДА основан на способности продукта ПОЛ образовывать с тиобарбитуровой кислотой окрашенный комплекс, экстрагируемый бутанолом [151].

Метод определения карбонильных производных белков основан на их взаимодействии с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые имеют максимум поглощения при 375 нм. Концентрацию карбонильных производных белков рассчитывали исходя из коэффициента молярной экстинкции $\epsilon_{375} = 22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [264]. Результаты выражали в нмоль/мг белка.

Полученные показатели пересчитывали на количество белка, которое анализировали по методу Бредфорда с помощью Coomassie Plus (Bradford) AssayKit («Thermo Fisher Scientific», США) [62]. Анализ выполняли на спектрофотометре для планшетов StatFax 2100 («Awareness Technology», США).

2.8. Оценка выраженности нитрозативного стресса

В лизате клеток оценивали концентрацию метаболитов оксида азота, уровень пероксинитрита и битирозина.

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) [12]. Интенсивность окраски определяли в видимой области спектра на микропланшетном анализаторе StatFax 2100 («Awareness Technology», США) при длине волны 540 нм. Полученные результаты рассчитывали с помощью калибровочного графика (в качестве стандарта

использовался нитрит натрия, «Химмед», Россия) и выражали в нмоль/мг белка [12].

Образование битирозина регистрировали по интенсивности флуоресценции в фосфатном буфере (рН 7,4) при длине волны возбуждения $\lambda_{ext}=325$ нм и длине волны испускания $\lambda_{em}=415$ нм на спектрофлуориметре Shimadzu RF-6000 («Shimadzu», Япония) [45]. Полученные результаты выражали в нмоль/мг белка. В качестве стандарта использовался битирозин («Cambridge Isotope Laboratories», Франция).

Концентрацию пероксинитрита анализировали спектрофотометрическим методом. Оптические спектры записывали на спектрофотометре СФ 2000 («ОКБ Спектр», Россия). Интенсивность сигнала оценивали по характерной полосе поглощения пероксинитрита при длине волны 302 нм и пересчитывали в нмоль/мг белка с использованием молярного коэффициента $\varepsilon = 1670 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ [1, 146].

2.9. Определение относительного количества прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора

Количество PXR и CAR в клетках линии Caco-2 оценивали методом вестерн-блот.

Белки полученного тотального клеточного лизата (30 мкг) подвергали электрофорезу с использованием TGX Stain-Free Fast Cast Acrylamide Kit («Bio-Rad», США) в буферной системе Laemmli («Bio-Rad», США). Перед загрузкой образцы обрабатывали в соответствии с протоколом «Bio-Rad», смешивали в соотношении 1:3 с буфером для образцов Laemmli («Bio-Rad», США), содержащем 2,5% 2-меркаптоэтанола («Helicon», Россия), инкубировали 5 мин при температуре 70°C. Электрофорез проводили при 100 В в течение 90 мин.

Для определения относительного количества PXR использовали первичные мышинные моноклональные антитела MA5-31808PXR Monoclonal Antibody (1D12G1, «Invitrogen», США), относительного количество CAR – первичные

мышинные моноклональные антитела MB67 Monoclonal Antibody («Invitrogen», США в разведении 1:200.

Визуализацию первичных антител осуществляли с использованием Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP («Invitrogen», США) в разведении 1:4000. Белки детектировали хемилюминесценцией с помощью ChemiDocXRS+ («Bio-Rad», США). Интенсивность полученных полос (бэндов) анализировали денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab («Bio-Rad», США).

Количество CAR и PXR оценивали относительно содержания белка домашнего хозяйства GAPDH с использованием первичных мышинных моноклональных антител GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight68 (1:1000; «Invitrogen», США) и вторичных антител Rabbit anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody (1:4000; «Invitrogen», США).

2.10. Определение внутриклеточной локализации прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора

Для оценки внутриклеточной локализации PXR и CAR при воздействии H₂O₂ и GSNO выполняли иммуоцитохимическое исследование. Для этого клетки культивировали в 96-луночных планшетах. После воздействия H₂O₂ и GSNO клетки фиксировали охлажденным до -20⁰C метанолом (15 мин), пермеабелизировали мембрану 0,1% раствором Тритона X-100 (15 мин), блокировали раствором BSA-DPBST (1 г 99% бычьего сывороточного альбумина («CDH», Индия), 100 мл раствора фосфатного буфера («Bio-Rad», США), 100 мкл Tween-20 («Sigma-Aldrich», Германия)) в течение 30 минут при комнатной температуре. Далее инкубировали с первичными кроличьими поликлональными антителами к PXR (DF6478 Polyclonal NR1I2 Antibody, «Cloud-Clone Corp», КНР) и CAR (DF6725 Polyclonal NR1I3 Antibody, «Cloud-Clone Corp», КНР) в течение ночи при +4 ⁰C. Визуализацию первичных антител осуществляли с помощью вторичных антител против белка кролика (S0018 Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG

(H+L) Fluor488-conjugated, «Affinity Biosciences», КНР), которые инкубировали с клетками в течение 1 ч в темноте при комнатной температуре.

Визуализацию клеток выполняли с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Olympus CKX-53 («Olympus», Япония) при увеличении в 400 раз.

2.11. Статистический анализ

Полученные результаты анализировались с помощью программ «Statsoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и GraphPadPrism 8. Для оценки статистической значимости различий между двумя группами использовали t-критерий Стьюдента, при сравнении более чем двух групп применяли дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена-Кейлса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Данные в таблицах и на графиках представлены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$) [21].

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Влияние пероксида водорода на биохимические изменения в клетках линии Сасо-2

ОС в настоящем исследовании моделировали добавлением к клеткам линии Сасо-2 H_2O_2 в диапазоне концентраций 0,1-100 мкМ и длительностью экспозиции 3-72 ч. Выраженность свободно-радикального повреждения оценивали по уровню карбонильных производных белков и продуктов ПОЛ – суммарного содержания МДА и 4-гидроксиолефинов.

При воздействии H_2O_2 в течение 3 ч содержание карбонильных производных белков не изменялось по сравнению с контролем при концентрациях прооксиданта 0,1-10 мкМ и возрастало на 88,9% ($p=0,0005$) и на 137,1% ($p=0,0004$) при концентрациях 50 и 100 мкМ соответственно (Рисунок 5).

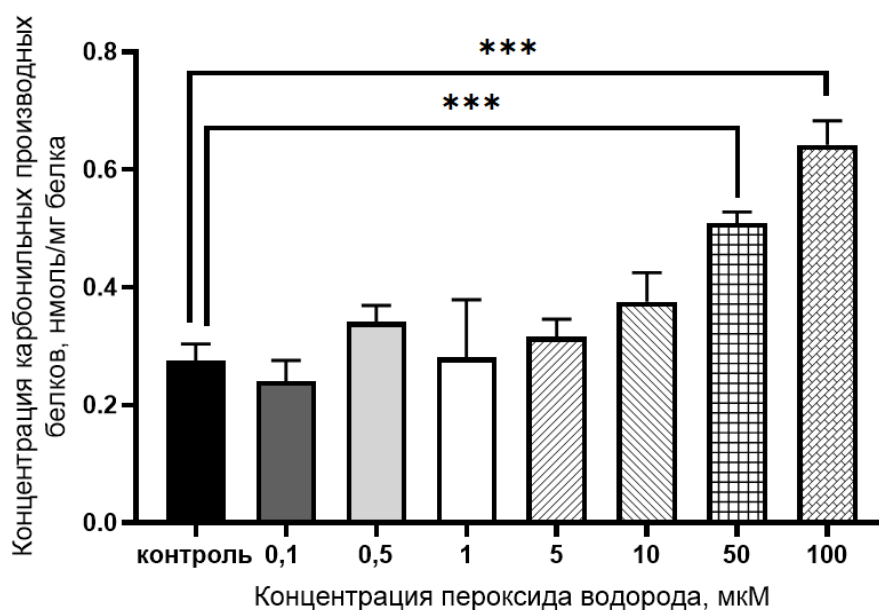


Рисунок 5 – Концентрация карбонильных производных белков в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течении 3 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание – *** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$.

Воздействие 0,1-1 мкМ H_2O_2 в течение 24 ч достоверно не влияло на концентрацию карбонильных производных белков по сравнению с контролем, при этом H_2O_2 в концентрациях 5, 10, 50 и 100 мкМ увеличивал данный показатель на 96,3% ($p=0,003$), 137,1% ($p=0,003$), 174,1% ($p=0,001$) и 148,1% ($p=0,0003$) соответственно (Рисунок 6).

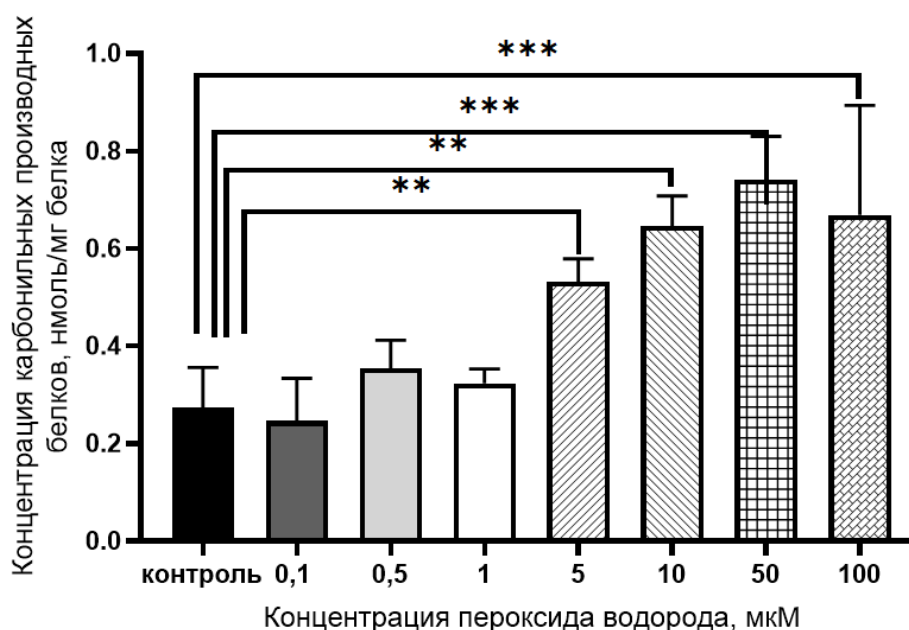


Рисунок 6 – Концентрация карбонильных производных белков в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течении 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечания

** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,01$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p \leq 0,001$.

Уровень карбонильных производных белков возрастал при экспозиции H_2O_2 в течение 72 ч в концентрации 50 мкМ на 36,7% ($p=0,001$), а в концентрации 100 мкМ – на 110% ($p=0,001$) (Рисунок 7). В остальных концентрациях прооксидант достоверно не влиял на данный показатель.

Воздействие H_2O_2 на клетки линии Сасо-2 в течение 3 ч приводило к увеличению уровня продуктов ПОЛ лишь в концентрации 100 мкМ на 35,7% ($p=0,04$) по сравнению с контролем (Рисунок 8).

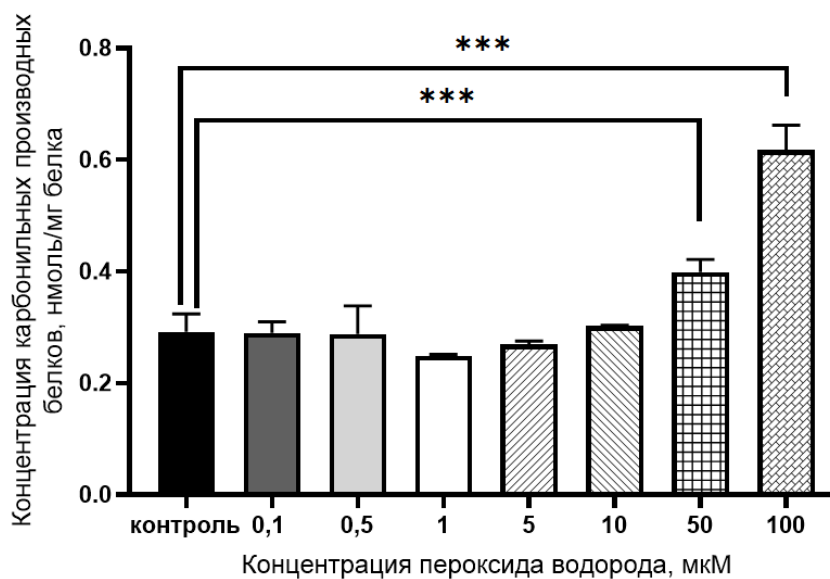


Рисунок 7 – Концентрация карбонильных производных белков в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течении 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание – *** – статистически значимые отличия от контроля, $p \leq 0,001$.

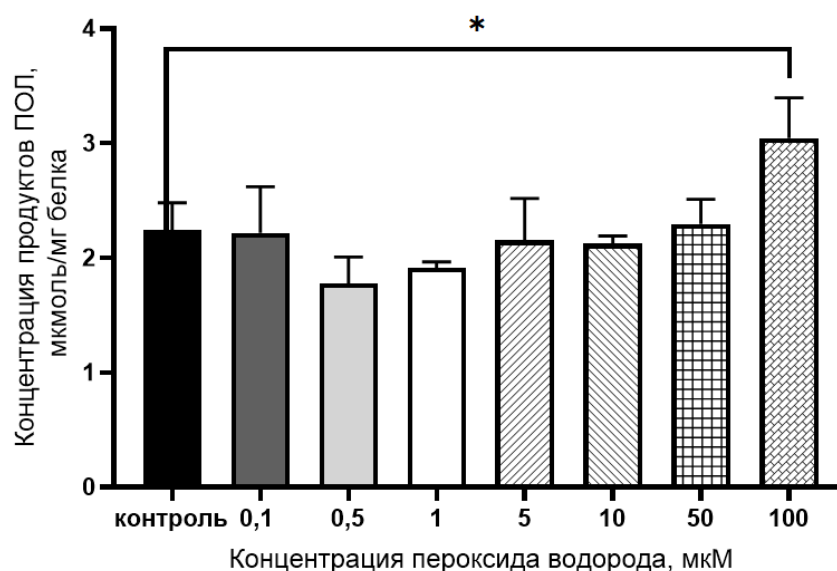


Рисунок 8 – Концентрация продуктов перекисного окисления липидов (МДА и 4-гидроксиолефинов) в клетках линии Сасо-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течении 3 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

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

Увеличение длительности экспозиции H_2O_2 до 24 ч сопровождалось повышением содержания МДА и 4-гидроксиолефинов уже при двух концентрациях прооксиданта: 50 мкМ – на 42,1% ($p=0,006$) и 100 мкМ – на 57,1% ($p=0,0007$) соответственно (Рисунок 9).

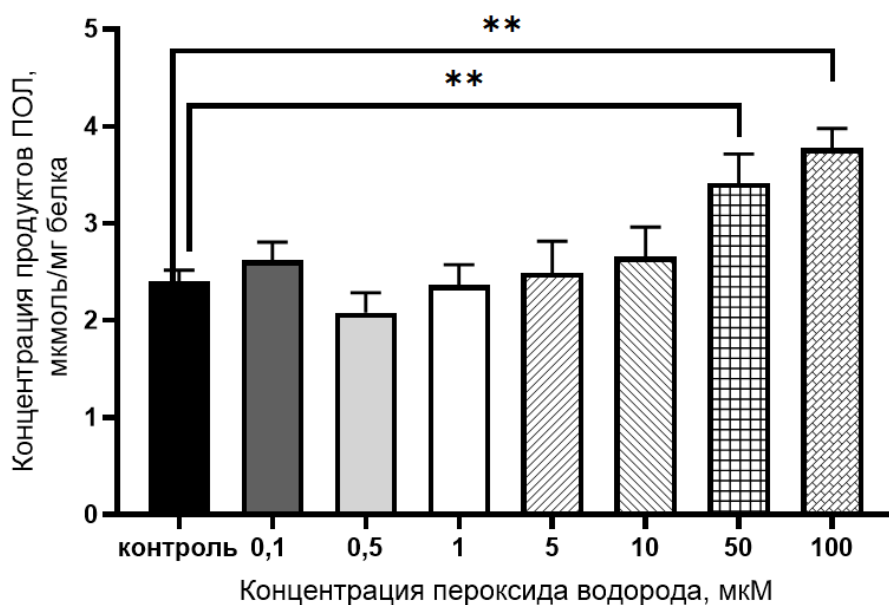


Рисунок 9 – Концентрация продуктов перекисного окисления липидов (МДА и 4-гидроксиолефинов) в клетках линии Caco-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течении 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание – ** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,01$.

При увеличении длительности воздействия прооксиданта до 72 ч отмечалось дальнейшее нарастание уровня продуктов ПОЛ при концентрациях H_2O_2 50 и 100 мкМ, данный показатель превышали значение контроля на 194,9% ($p=0,0002$) и 323,4% ($p=0,0003$) соответственно (Рисунок 10).

В заключении было оценено цитотоксическое действие H_2O_2 по результатам МТТ-теста. Полученные результаты представлены на Рисунке 11.

В контрольной группе жизнеспособность клеток была принята за 100%. При воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1–10 мкМ и сроках инкубации

3, 24 и 72 ч жизнеспособность клеток не изменялась и составляла в среднем $87,6 \pm 9,3\%$ (Рисунок 11).

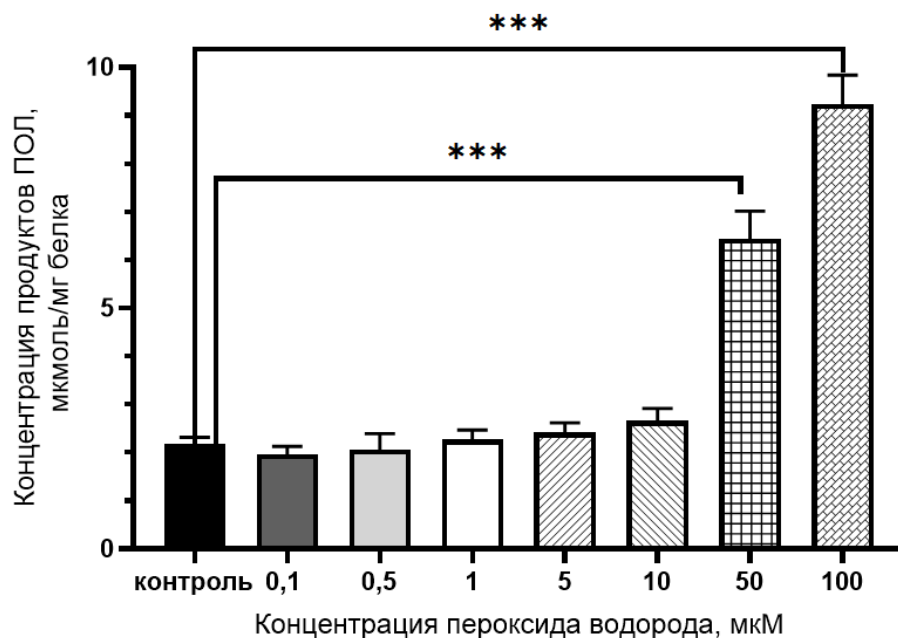


Рисунок 10 – Концентрация продуктов перекисного окисления липидов (МДА и 4-гидроксиолефинов) в клетках линии Сасо-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течении 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечание – *** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$.

При инкубации клеток с H_2O_2 в течение 3, 24 и 72 ч при концентрации прооксиданта 50 мкМ жизнеспособность клеток снижалась до $71,3 \pm 12,1\%$ ($p=0,01$), $54,1 \pm 9,5\%$ ($p=0,001$) и $58,8 \pm 11,5$ ($p=0,02$), а при концентрации 100 мкМ – до $70,9 \pm 12,2\%$ ($p=0,006$), $26,8 \pm 14,3\%$ ($p=0,0003$) и $34,3 \pm 11,1\%$ ($p=0,002$) соответственно (Рисунок 11).

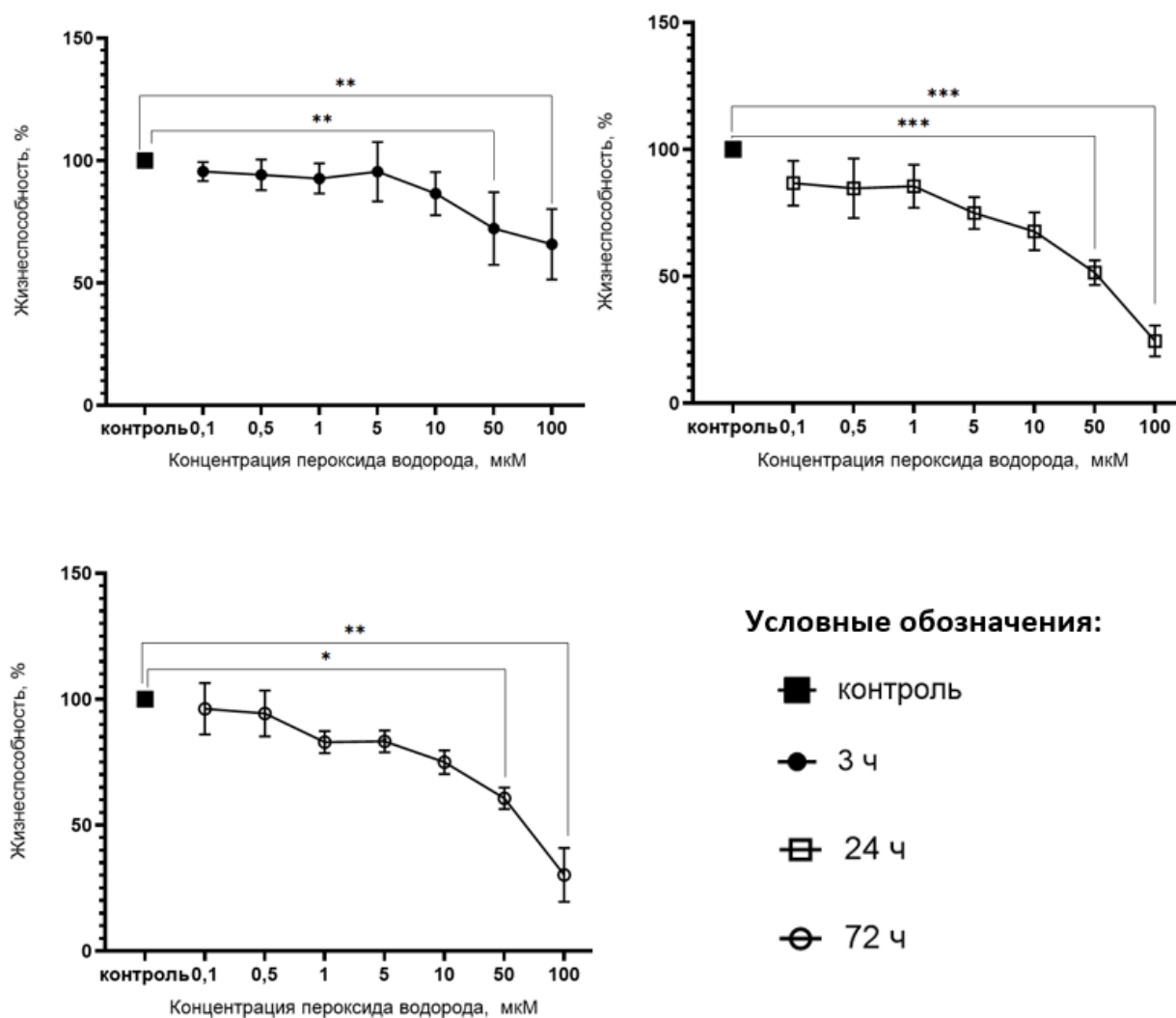


Рисунок 11 – Жизнеспособность клеток линии Caco-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечания

* – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$;

** – статистически значимые отличия от контроля, $p \leq 0,01$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p \leq 0,001$.

Таким образом, H_2O_2 в концентрациях 5, 10, 50, 100 мкМ и длительности воздействия 24 ч и в концентрациях 50 и 100 мкМ и экспозицией 3 и 72 ч вызывает развитие ОС, что в максимальных концентрациях 50 и 100 мкМ при всех сроках эксперимента вызывает снижение жизнеспособности клеток.

3.2. Влияние пероксида водорода на относительное количество и внутриклеточную локализацию прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора

Относительное количество изучаемых рецепторов оценивали методом вестерн-блот, а их внутриклеточную локализацию – иммуноцитохимически.

Воздействие H_2O_2 на клетки линии Caco-2 в течение 3 ч не влияло на относительное количество PXR, данный показатель достоверно не отличался от значений контроля (Рисунок 12).

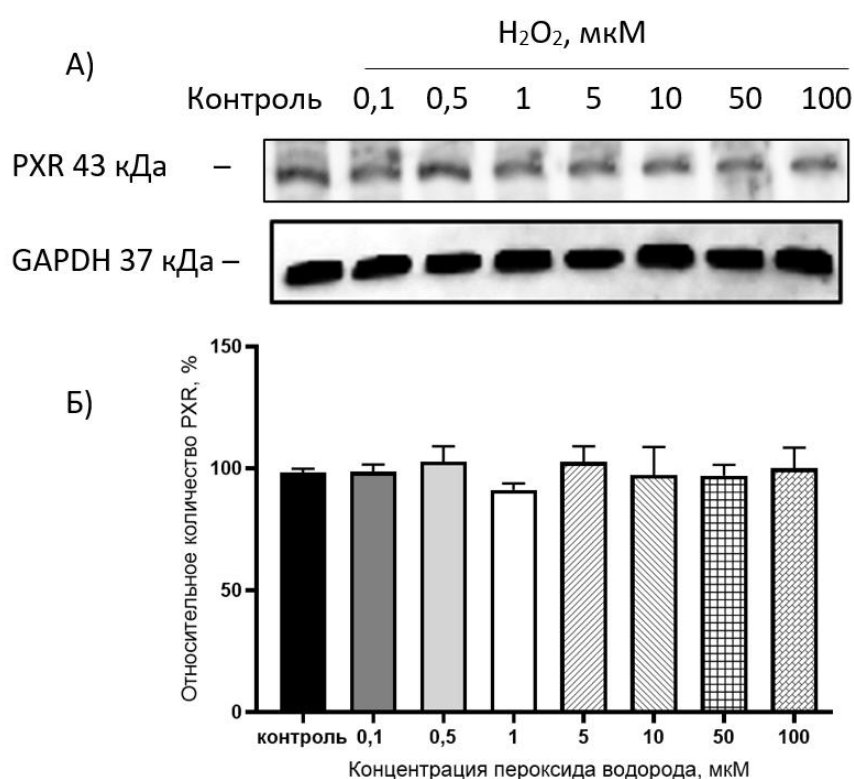


Рисунок 12 – Относительное количество PXR в клетках линии Caco-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечания

А) – результаты детекции PXR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

Увеличение длительности экспозиции с прооксидантом до 24 ч вызывало повышение количества PXR при концентрации H_2O_2 10 мкМ на 67,1% ($p=0,03$), 50 мкМ – на 25,9% ($p=0,0003$), 100 мкМ – на 35,9% ($p=0,0003$) соответственно, а в остальных концентрациях достоверного эффекта не оказывало (Рисунок 13).

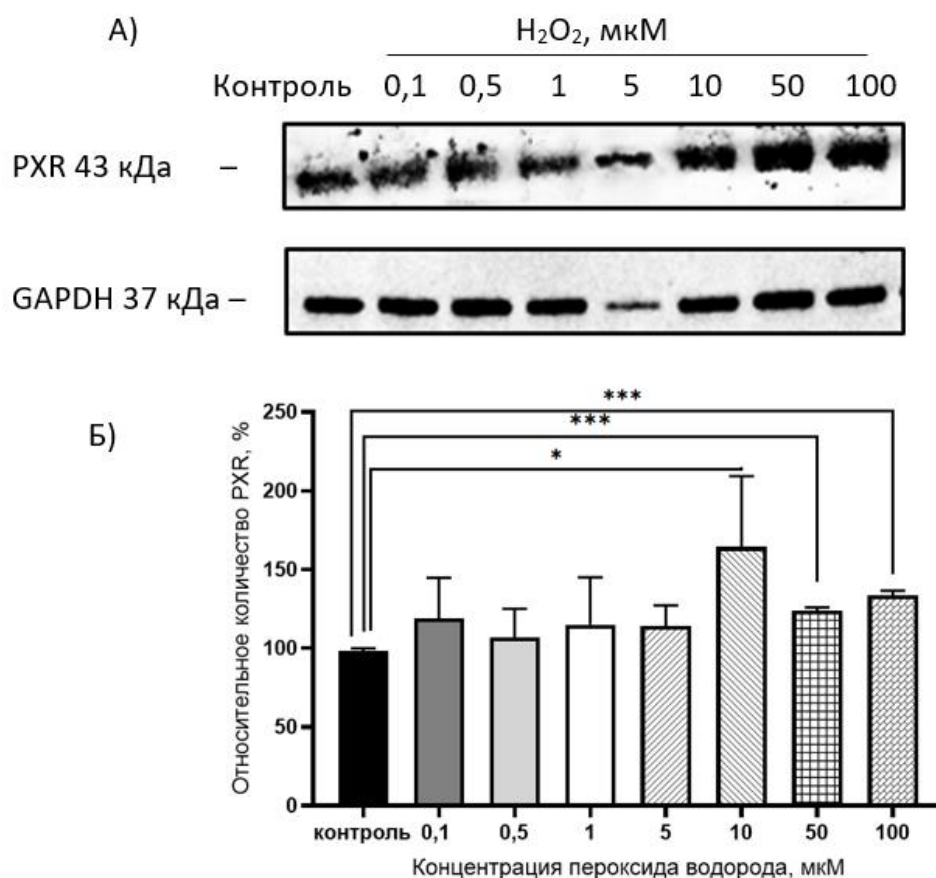


Рисунок 13 – Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечания

* – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$

А) – результаты детекции PXR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

При длительности воздействия 72 ч H_2O_2 в концентрациях 0,1–10 мкМ не влиял на уровень PXR, а в концентрациях 50 и 100 мкМ его снижал на 18,6% ($p=0,0003$) и на 26,9% ($p=0,03$) по сравнению с контролем соответственно (Рисунок 14).

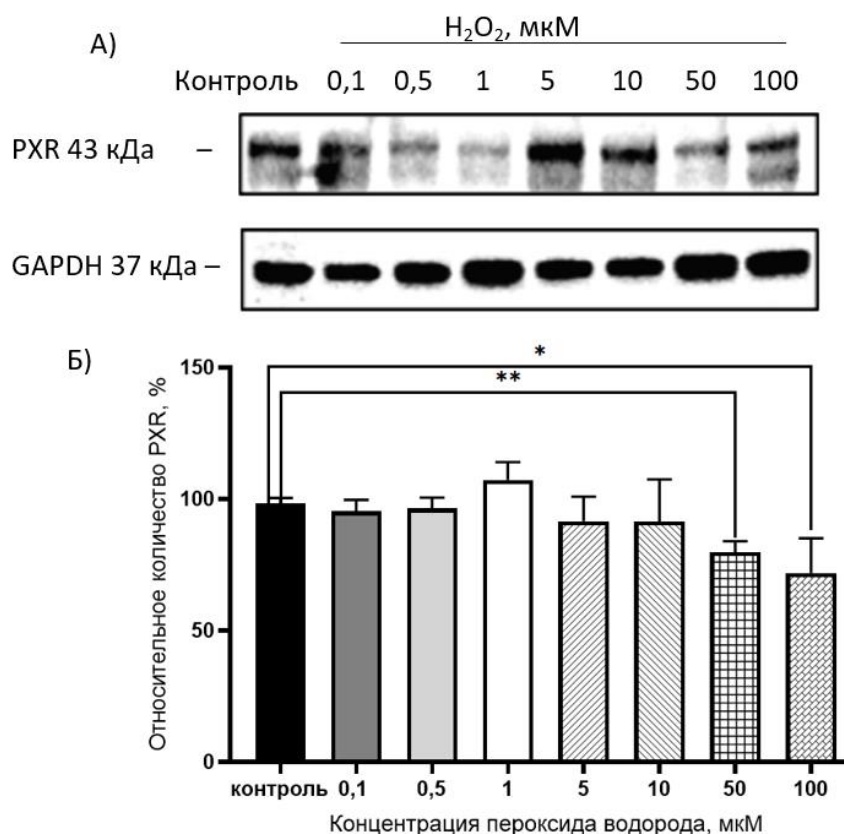


Рисунок 14 – Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечания

* – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$;

** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,01$

А) – результаты детекции PXR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

Стоит отметить, что при концентрации H_2O_2 100 мкМ и длительности инкубации 72 ч отмечалось расщепление бэнда PXR, что, скорее всего, связано с повреждением молекулы транскрипционного фактора за счет окислительного повреждения или действием протеолитических ферментов.

Воздействие H_2O_2 в течение 3 ч (Рисунок 15) и 24 ч (Рисунок 16) во всех протестированных концентрациях (0,1-100 мкМ) достоверно не влияло на относительное количество CAR.

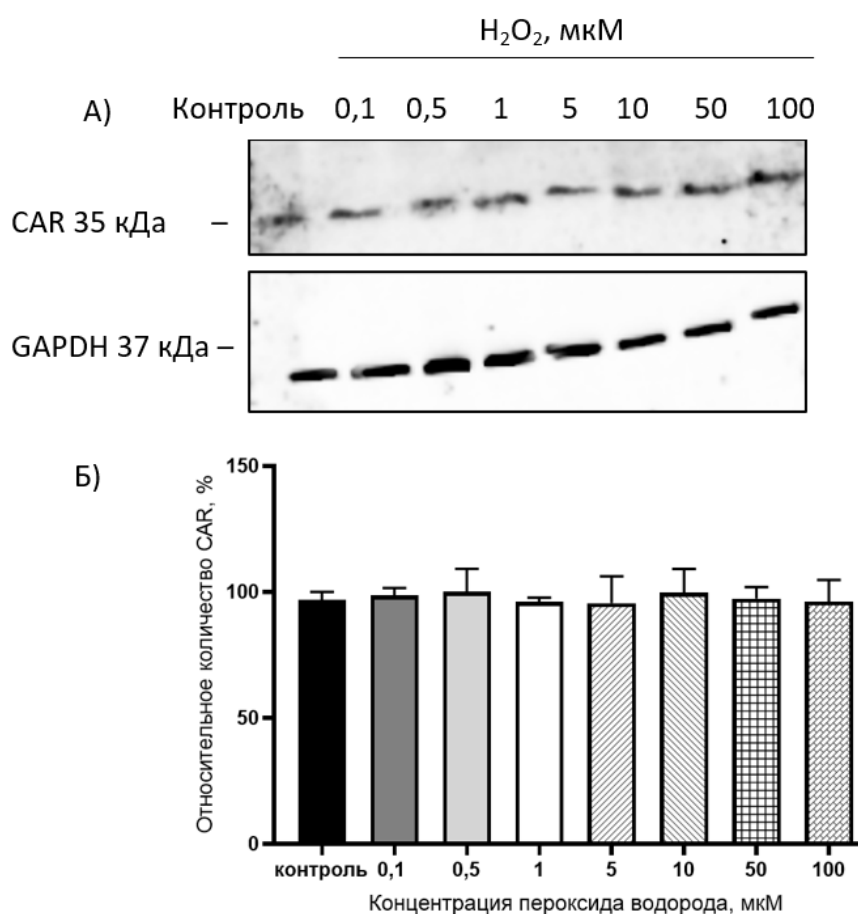


Рисунок 15 – Относительное количество CAR в клетках линии Caco-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 3 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечания

А) – результаты детекции CAR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

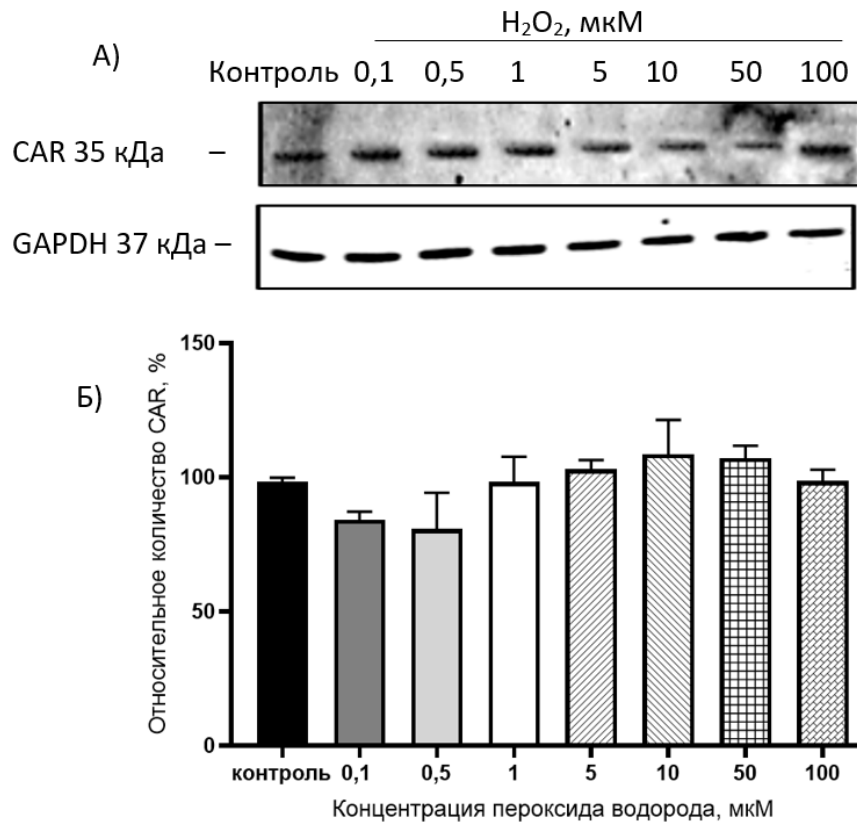


Рисунок 16 – Относительное количество CAR в клетках линии Сасо-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 24 ч (M ±SD, n = 3)

Примечания

А) – результаты детекции CAR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

В то же время увеличение экспозиции клеток Сасо-2 с прооксидантом до 72 ч приводило к значимому повышению относительного количества CAR по сравнению с контрольными значениями при воздействии H₂O₂ в концентрациях 5, 10 и 50 мкМ на 21,9% (p=0,03), на 47,4% (p=0,0005) и на 34,9% (p=0,003) соответственно, а в концентрации 100 мкМ вызывало снижение уровня CAR на 22,9% (p=0,02) (Рисунок 17).

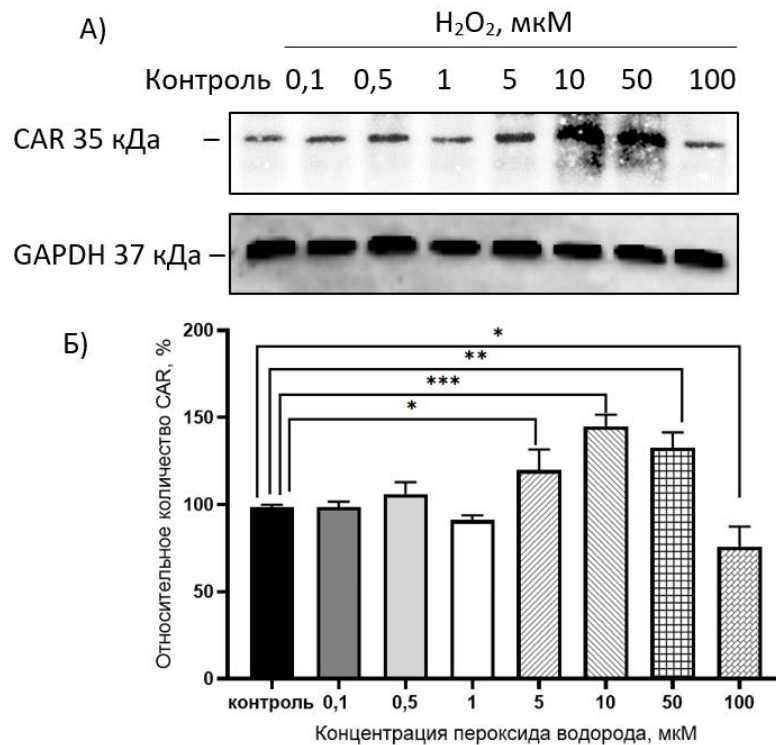


Рисунок 17 – Относительное количество САР в клетках линии Сасо-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в течение 72 ч (M ±SD, n = 3)

Примечания

* – статистически значимые отличия от контроля, p < 0,05;

** – статистически значимые отличия от контроля, p < 0,01;

*** – статистически значимые отличия от контроля, p < 0,001.

А) – результаты детекции САР и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

При оценке внутриклеточной локализации PXR и САР при экспозиции с пероксидом водорода в индуцирующих концентрациях были получены следующие результаты (Рисунок 18).

H₂O₂ при воздействии в течение 24 ч в концентрациях 10-100 мкМ вызывал усиление иммунопозитивной реакции с антителами к PXR, при этом более интенсивно окрашивалась цитоплазма.

H_2O_2 при воздействии в течение 72 ч в концентрациях 5-50 мкМ вызывал усиление иммунопозитивной реакции с антителами к CAR, которая равномерно распределялась по всей поверхности клеток (окрашивались и ядра и цитоплазма) в концентрации 5 мкМ или концентрировалась в цитоплазме в концентрациях 10-50 мкМ.

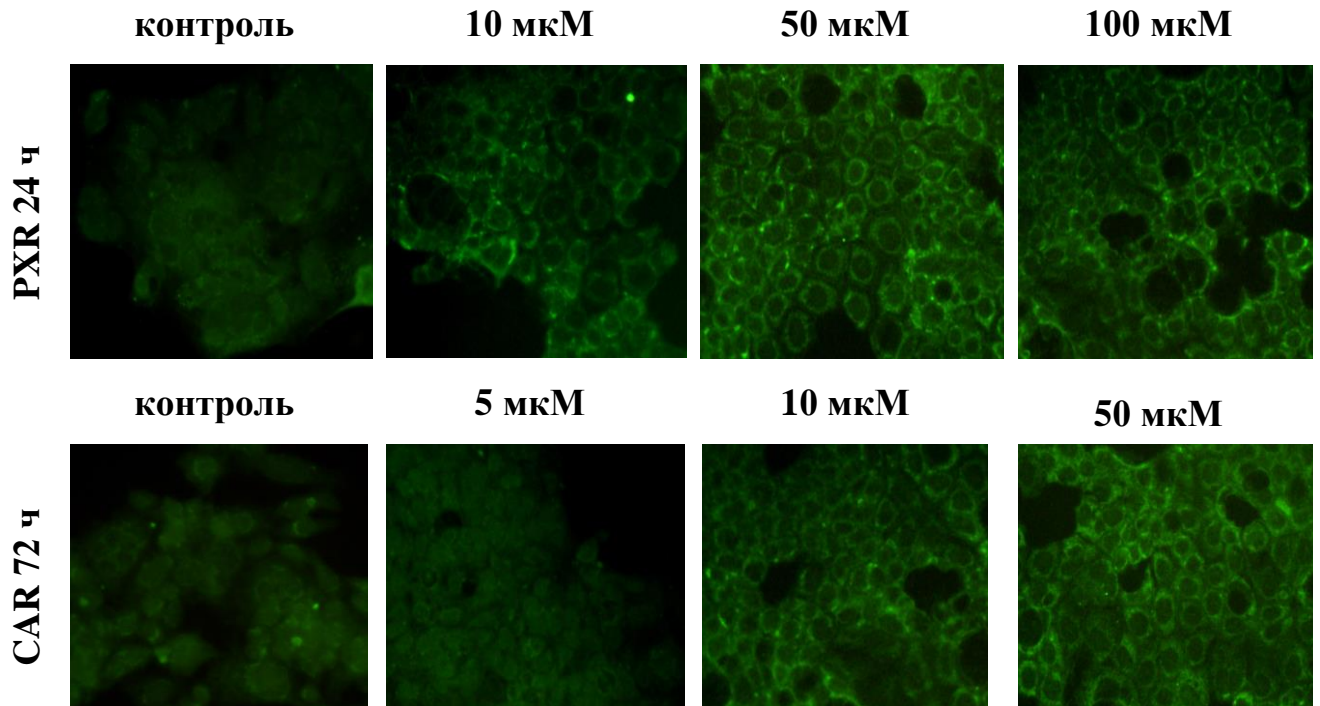


Рисунок 18 – Иммуноцитохимическое окрашивание клеток Caco-2 с использованием антител к PXR, CAR, вторичных антител S0018 Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Fluor488-conjugated, Affinity Biosciences, КРН, увеличение $\times 400$ раз

Таким образом, H_2O_2 при экспозиции 3 ч не влияет на относительное количество PXR и CAR, при длительности воздействия 24 ч в концентрациях 10-100 мкМ повышает уровень PXR и не влияет на CAR, при 72 ч эксперименте в концентрациях 5 - 50 мкМ увеличивает содержание CAR, а в концентрациях 100 мкМ и 50-100 мкМ уменьшает количество CAR и PXR соответственно. При увеличении относительного количества PXR и CAR данные рецепторы

преимущественно концентрируются в цитоплазме, а не в ядре, что косвенно свидетельствует об отсутствии их активации.

3.3. Влияние малонового диальдегида на относительное количество прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора

Для изучения механизмов влияния H_2O_2 на относительное количество RXR и CAR были выполнены эксперименты по оценке воздействия конечного продукта ПОЛ – МДА на данные рецепторы.

Вначале была оценена проницаемость МДА внутрь клеток Сасо-2. Для этого после окончания экспозиции с МДА в лизате клеток оценивалась его концентрация.

Добавление МДА в питательную среду к клеткам линии Сасо-2 (24 ч) в концентрации 10, 100 и 150 мкМ приводило к статистически значимому увеличению данного продукта ПОЛ в лизате клеток на 63,8% ($p=0,03$), 168,3% ($p=0,02$), 325,1% ($p=0,0008$) (Рисунок 19 (А)).

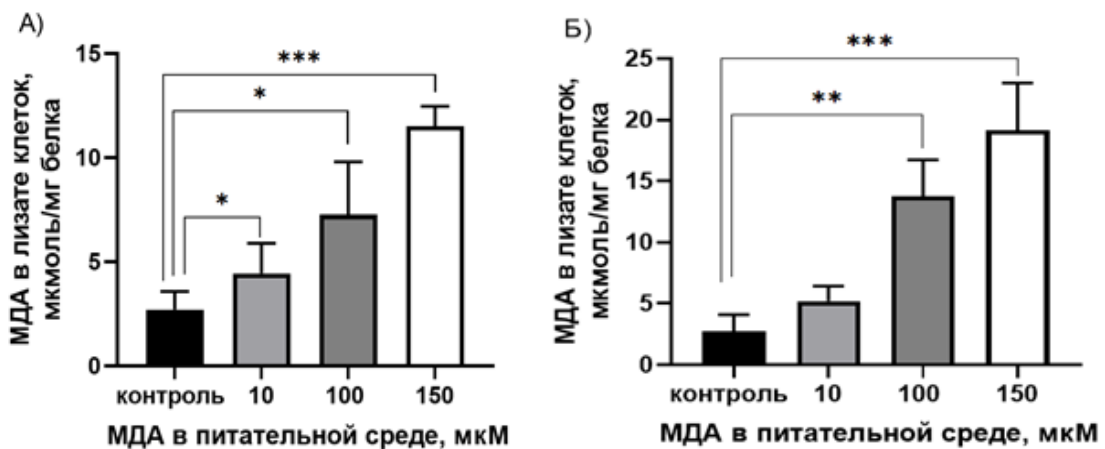


Рисунок 19 – Изменение концентрации МДА в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии МДА в концентрациях 10-150 мкМ в течение 24 ч (А) и 72 ч (Б)

($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечания

* – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$;

** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,01$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$.

Инкубации клеток линии Сасо-2 в течение 72 ч с МДА в концентрациях 100 и 150 мкМ приводила к статистически значимому увеличению данного продукта ПОЛ в лизате клеток на 406,2% ($p=0,002$) и 604,4% ($p=0,0002$) соответственно (Рисунок 19 (Б)).

Полученные результаты свидетельствует о проникновении продукта ПОЛ в цитоплазму клеток.

Инкубирование клеток линии Сасо-2 в течение 24 ч с МДА в концентрации 10 мкМ повышало количество PXR на 38,6% ($p = 0,007$), а в концентрациях 100 мкМ и 150 мкМ достоверного эффекта не оказывало (Рисунок 20).

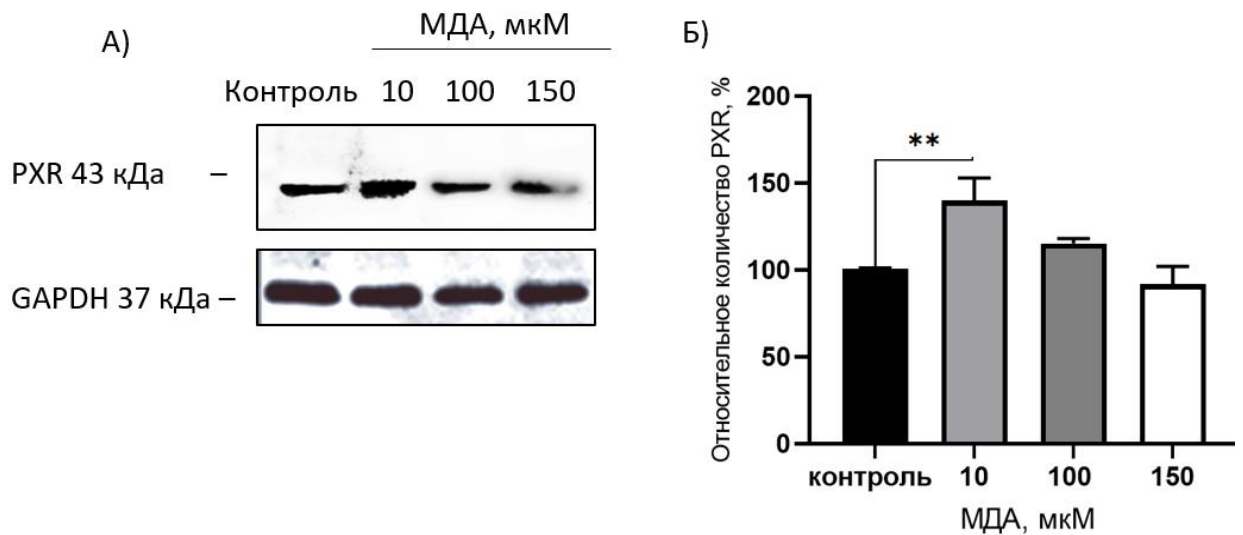


Рисунок 20 – Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 при воздействии МДА в концентрациях 10-150 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечания

** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,01$.

А) – результаты детекции PXR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

Конечный продукт пероксидации при длительности экспозиции 72 ч во всех протестированных концентрациях достоверного эффекта на уровень PXR не оказал (Рисунок 21).

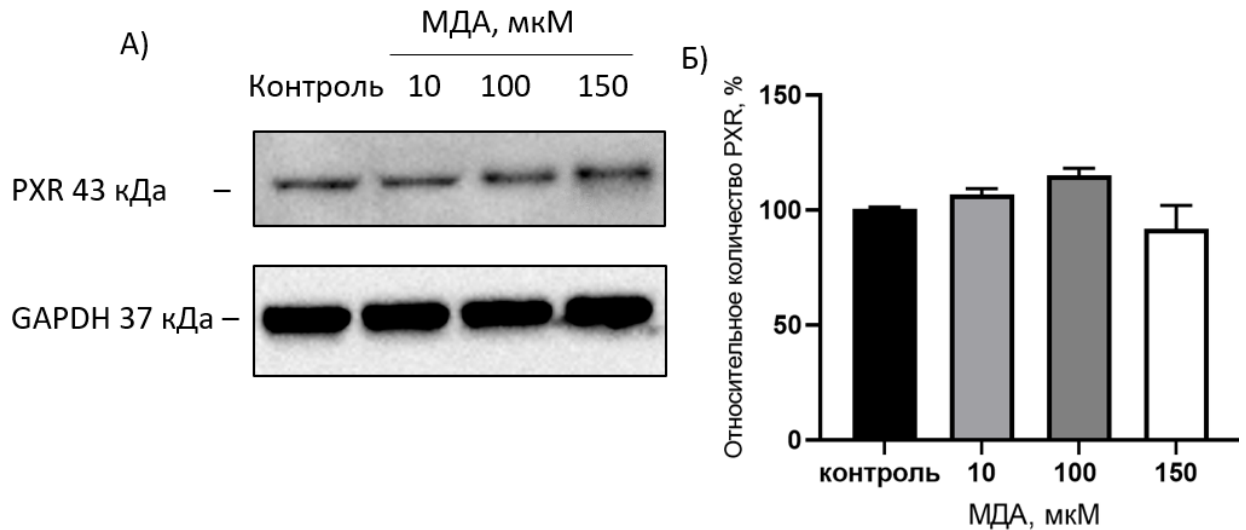


Рисунок 21 – Относительное количество PXR в клетках линии Caco-2 при воздействии МДА в концентрациях 10-150 мкМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечания

А) – результаты детекции PXR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

МДА во всех протестированных концентрациях (10-150 мкМ) и сроках воздействия (24-72 ч) достоверного не влиял на относительное количество CAR (Рисунок 22).

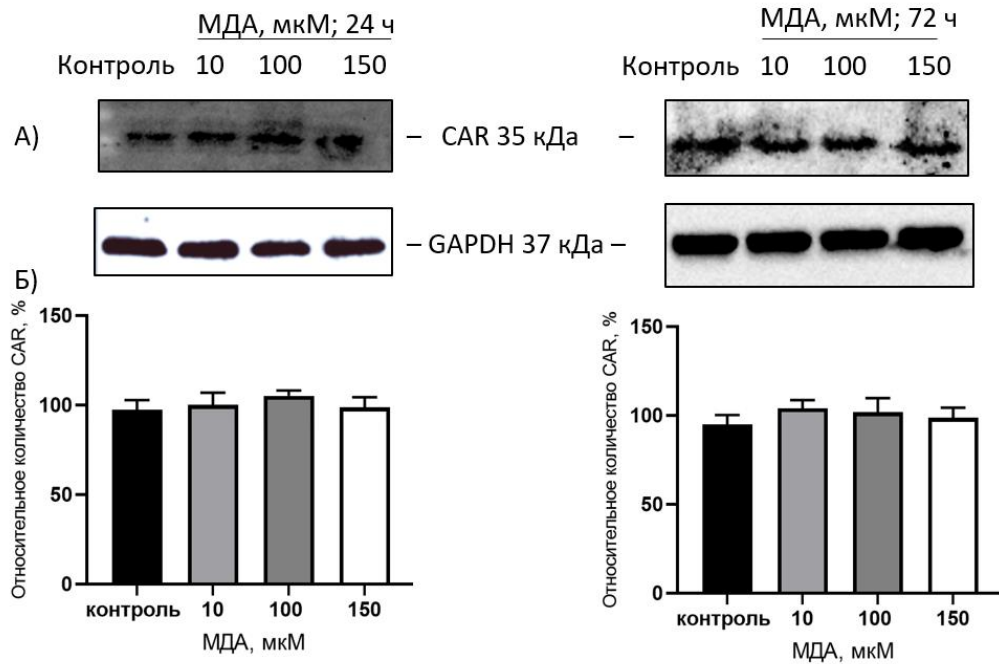


Рисунок 22 – Относительное количество CAR в клетках линии Caco-2 при воздействии МДА в концентрациях 10-150 мкМ в течение 24 (А) и 72 (Б) ч (M ±SD, n = 3)

Примечания

А) – результаты детекции CAR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

Таким образом, конечный продукт ПОЛ – МДА, может вызывать индукцию PXR только в низких концентрациях и при длительности воздействия 24 ч и не принимает участия в регуляции CAR.

3.4. Оценка роли Nrf2 в индукции прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора под действием пероксида водорода

Для оценки роли транскрипционного фактора Nrf2 в индукции PXR и CAR под действием H₂O₂, предварительно за 30 мин до внесения прооксиданта в питательную среду к клеткам добавляли ингибитор Nrf2 – АЕМ1 в концентрации 5

мкМ и инкубировали в течение времени, вызывающего изменение относительного количества данных рецепторов (24 ч для PXR, 72 ч для CAR).

Ингибирование Nrf2 при воздействии H_2O_2 в течение 24 ч не влияло на индуцирующее действие прооксиданта на уровень PXR. Относительное количество рецептора увеличивалось на 34,1% ($p=0,0001$), 53,8% ($p=0,0001$) и 66,4% ($p=0,0001$) при воздействии H_2O_2 в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ (Рисунок 23).

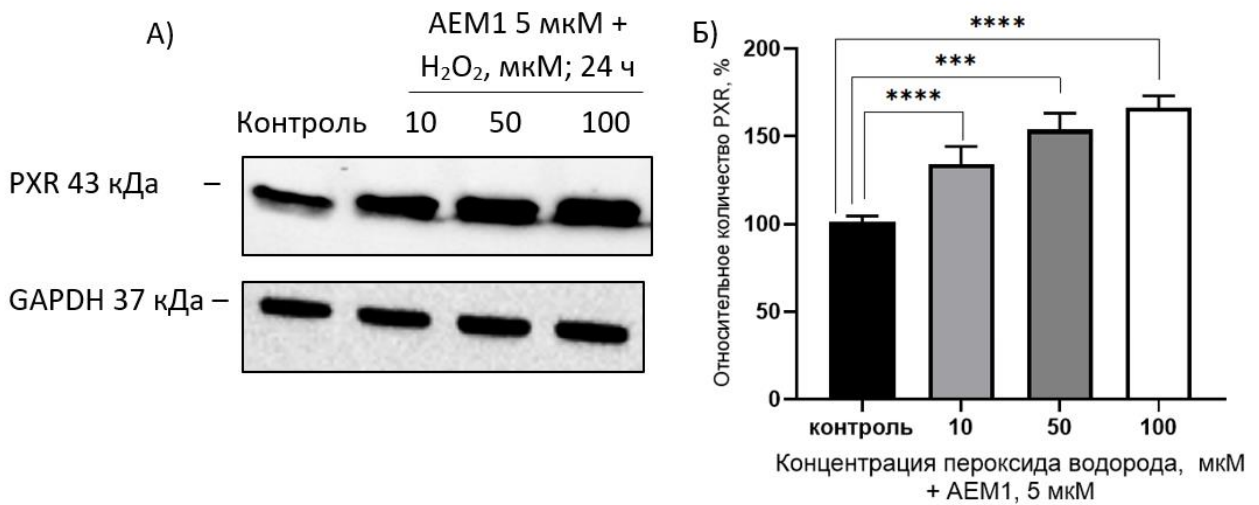


Рисунок 23 – Относительное количество PXR в клетках линии Caco-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 10-100 мкМ в условиях ингибирования Nrf2 АЕМ1 в концентрации 5 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечания

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$;

**** – статистически значимые отличия от контроля, $p \leq 0,0001$.

А) – результаты детекции PXR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

В ходе исследования было показано, что относительное количество CAR при сочетанном воздействии АЕМ1 и H_2O_2 в концентрации 10 мкМ возрастало на 27,9% ($p=0,036$), при 50 мкМ не изменялось, а при 100 мкМ снижалось на 26,4% ($p=0,048$) по сравнению с контролем (Рисунок 24).

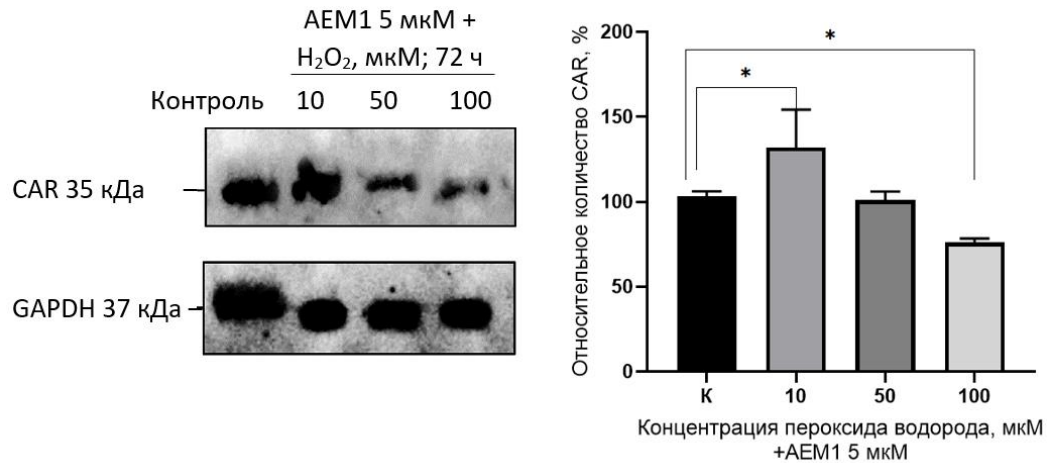


Рисунок 24 – Относительное количество CAR в клетках линии Caco-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 10-100 мкМ в условиях ингибирования Nrf2 АЕМ1 в концентрации 5 мкМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечания

* – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$.

А) – результаты детекции CAR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

Таким образом, транскрипционный фактор Nrf2 принимает участие в индукции CAR под действием H_2O_2 в концентрации 50 мкМ и длительности воздействия 72 ч и не связан с индукцией PXR под действием прооксиданта во всех концентрациях и экспозиции 24 ч.

3.5. Оценка роли прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора в защите клеток от окислительного стресса

Для оценки роли PXR и CAR в защите клеток от ОС за 30 мин до добавления H_2O_2 в питательную среду вносили ингибитор PXR кетоконазол в концентрации 10 мкМ или ингибитор CAR CINPA1 в концентрации 10 мкМ.

Клетки инкубировали в течение 24 ч в условиях ингибирования PXR и в течение 72 ч в условиях ингибирования CAR, так как именно при этих сроках

воздействия H_2O_2 вызывал индукцию рецепторов. После окончания инкубации анализировали выживаемость клеток в ходе МТТ-теста.

Ингибирование PXR (Рисунок 25) и CAR (Рисунок 26) предотвращало снижение жизнеспособности клеток под действием H_2O_2 , во всех концентрациях прооксиданта данный показатель достоверно от значений контроля не отличался.

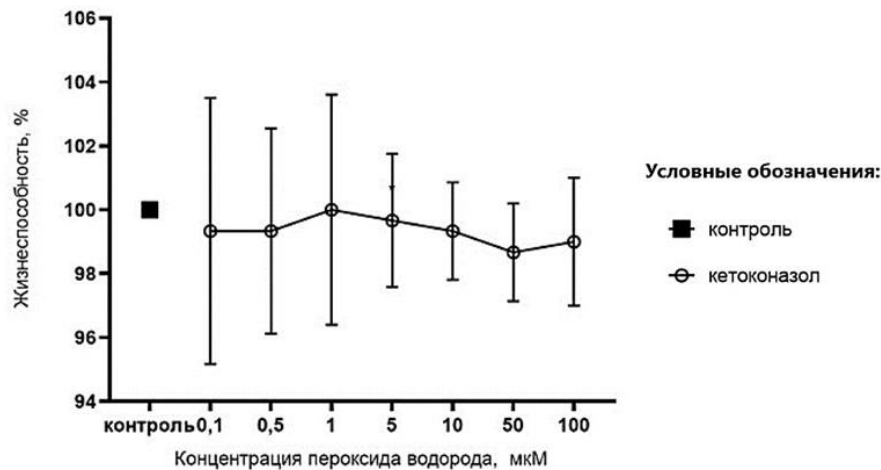


Рисунок 25 – Жизнеспособность клеток линии Сасо-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в условиях ингибирования PXR кетоконазолом в концентрации 10 мкМ в течение 24 (M±SD, n=3)

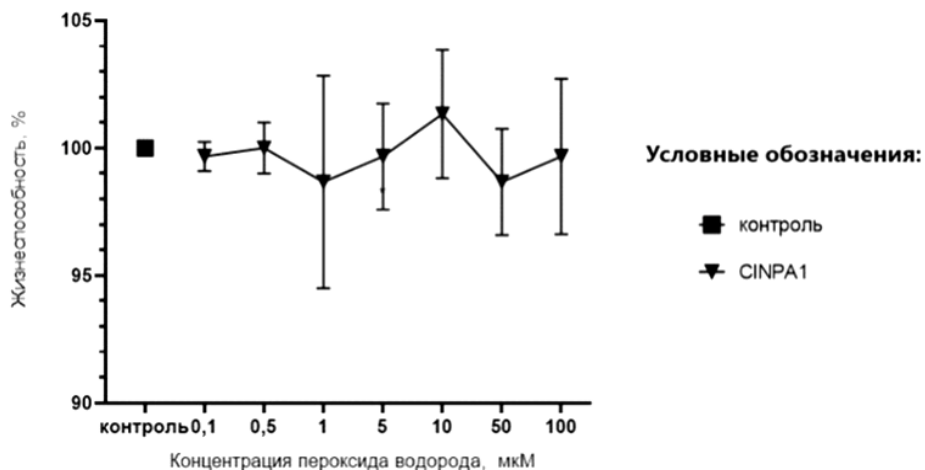


Рисунок 26 – Жизнеспособность клеток линии Сасо-2 при воздействии пероксида водорода в концентрациях 0,1-100 мкМ в условиях ингибирования CAR CINPA1 в концентрации 10 мкМ в течение 72 ч (M±SD, n=3)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что PXR и CAR повышают чувствительность клеток к ОС.

3.6. Влияние S-нитрозоглутатиона на биохимические изменения в клетках линии Сасо-2

В качестве донора NO использовали GSNO, который добавляли к клеткам линии Сасо-2 в концентрациях 1-500 мкМ и инкубировали в течение 3-72 ч.

На первом этапе исследования для подтверждения повышения уровня NO в клетках линии Сасо-2 под действием GSNO оценивался уровень метаболитов оксида азота (NO_x) в клеточном лизате после завершения экспериментальных воздействий.

Данный показатель 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 3 ч (Рисунок 27), на 58,9% ($p=0,0002$) (Рисунок 28) при инкубации 24 ч и на 68,5% ($p=0,0002$) (Рисунок 29) при инкубации 72 ч.

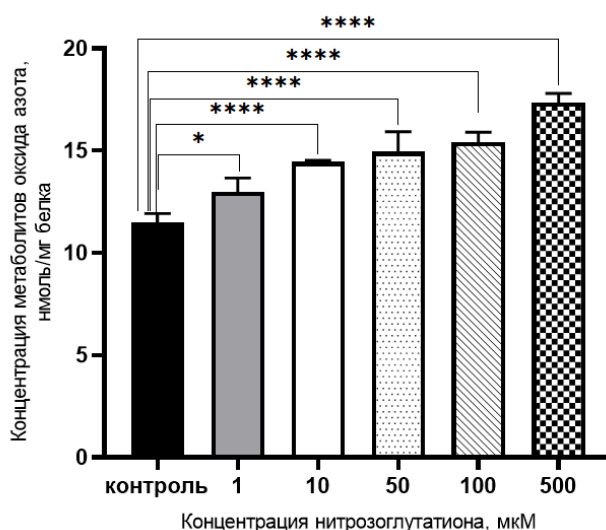


Рисунок 27 – Концентрация метаболитов оксида азота (NO_x) в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечания

* – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$;

**** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,0001$.

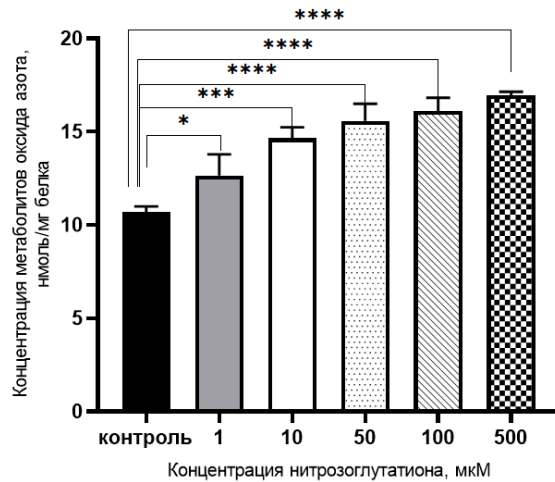


Рисунок 28 – Концентрация метаболитов оксида азота (NO_x) в лизате клеток линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1-500 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечания

- * – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$;
- *** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$;
- **** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,0001$.

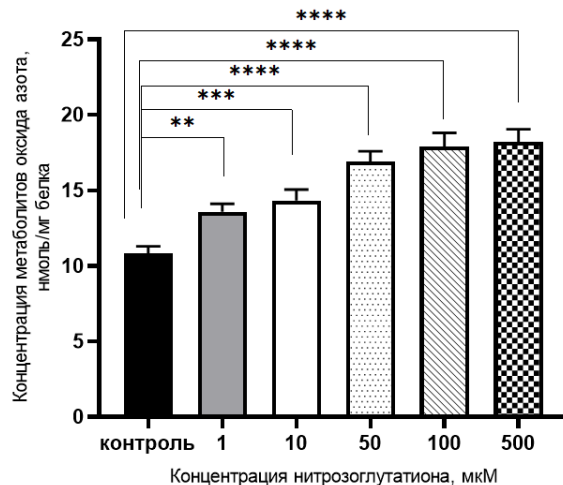


Рисунок 29 – Концентрация метаболитов оксида азота (NO_x) в лизате клеток линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1-500 мкМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечания

- ** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,01$;
- *** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$;
- **** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,0001$.

Далее в лизате клеток оценивали содержание активной формы азота – пероксинитрита и продукта НС– битирозина.

Уровень пероксинитрита при инкубации с GSNO в концентрациях 100 и 500 мкМ длительностью 3 ч увеличивался на 68,1% ($p=0,01$) и 92,6% ($p<0,0006$) по сравнению с контролем соответственно (Рисунок 30).

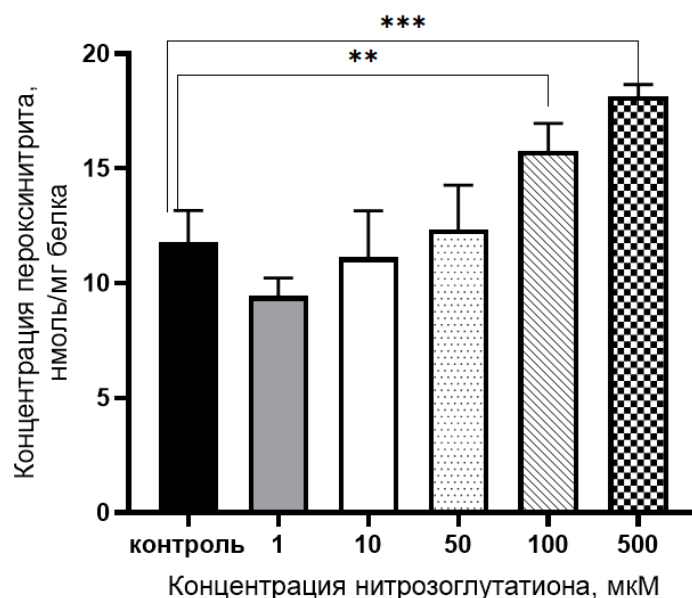


Рисунок 30 – Концентрация пероксинитрита в лизате клеток линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечания

** – статистически значимые отличия от контроля, $p<0,01$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p<0,001$.

Аналогичные результаты были получены и при длительности эксперимента 24 ч: содержание пероксинитрита увеличивалось на 34,0% ($p=0,005$) и 53,6% ($p=0,0002$) при инкубации с GSNO в концентрациях 100 и 500 мкМ соответственно (Рисунок 31).

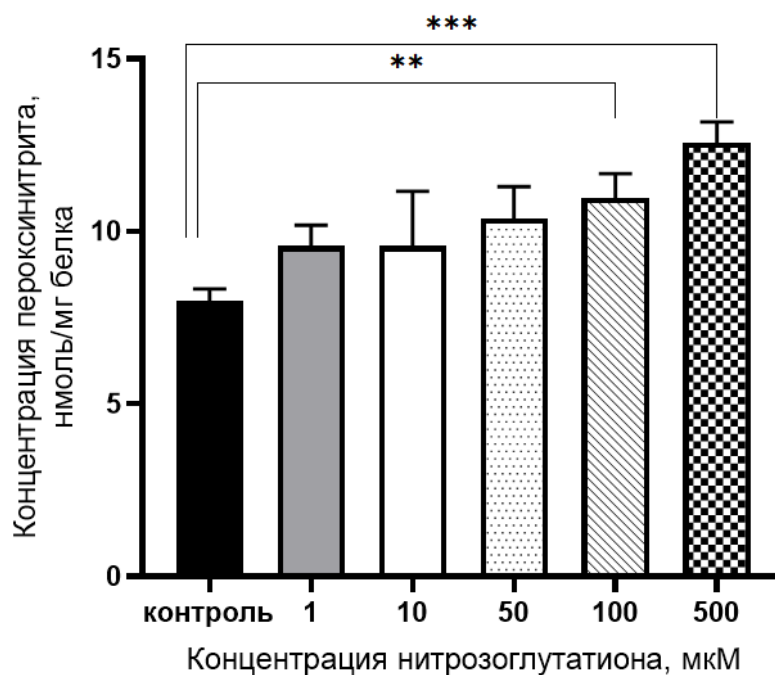


Рисунок 31 – Концентрация пероксинитрита в лизате клеток линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1-500 мкМ в течение 24 ч ($M \pm SD$, $n=3$)

Примечания

** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,01$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$.

При увеличении длительности экспозиции до 72 ч содержание пероксинитрита возрастало по сравнению с контролем при всех концентрациях GSNO, максимально - при концентрации 500 мкМ на 84,4% ($p < 0,0001$) (Рисунок 32).

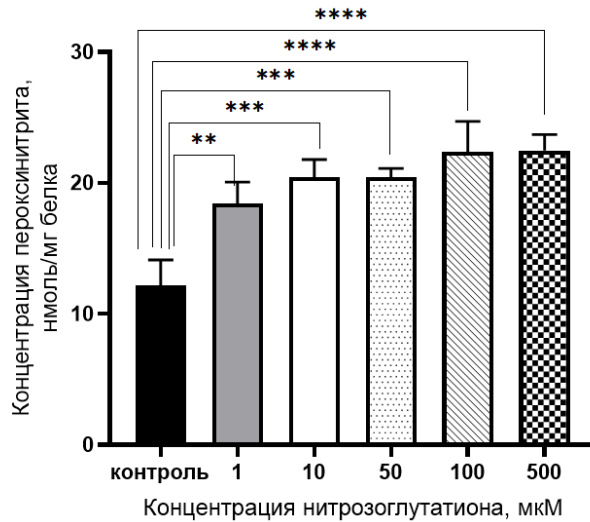


Рисунок 32 – Концентрация пероксинитрита в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии S-нитроглютамина в концентрациях 1-500 мкМ в течение 72 ч (M±SD, n=3)

Примечания

** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,01$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$;

**** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,0001$.

GSNO во всех концентрациях и сроке инкубации 3 ч не влиял на содержание битирозина в лизате клеток линии Сасо-2 (Рисунок 33).

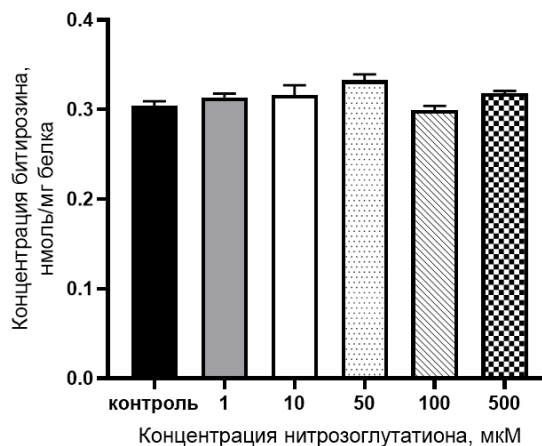


Рисунок 33 – Концентрация битирозина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии S-нитроглютамина в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3 ч (M±SD, n=3)

Данный показатель статистически значимо возрастал 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% ($p=0,0001$), 50 мкМ – на 22,1% ($p<0,001$) и 27,3% ($p<0,0001$), 100 мкМ – на 29,4% ($p<0,0001$) и 32,6% ($p<0,0001$) соответственно. При этом максимальное возрастание уровня битирозина происходило при концентрации GSNO 500 мкМ на 34,9% ($p=0,0002$) при инкубации 24 ч и на 38,3% ($p=0,0003$) при инкубации 72 ч (Рисунок 34, Рисунок 35).

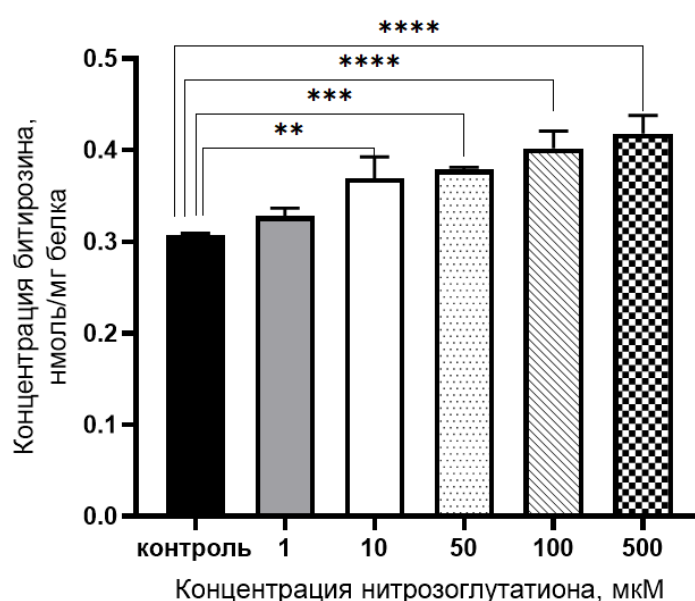


Рисунок 34 – Концентрация битирозина в лизате клеток линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1-500 мкМ в течение 24 ч
($M \pm SD$, $n=3$)

Примечания

** – статистически значимые отличия от контроля, $p<0,01$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p<0,001$;

**** – статистически значимые отличия от контроля, $p<0,0001$.

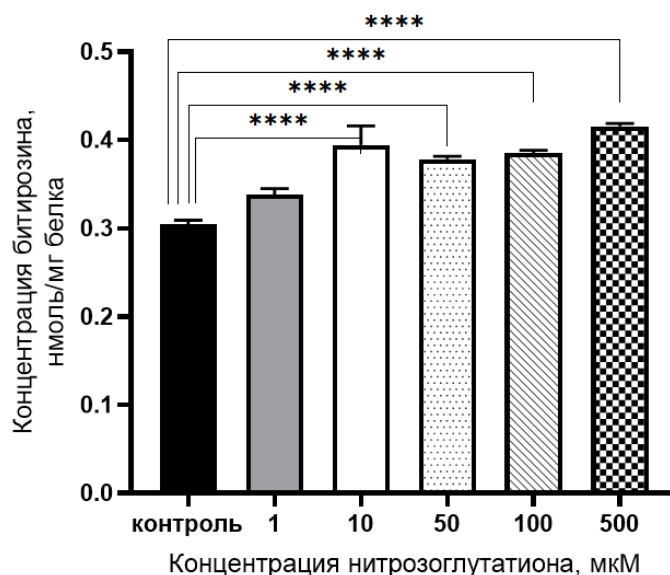


Рисунок 35 – Концентрация битирозина в лизате клеток линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1-500 мкМ в течение 72 ч (M±SD, n=3)

Примечание – **** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,0001$.

В заключении было оценено цитотоксическое действие GSNO в ходе выполнения МТТ-теста (Рисунок 36).

В контрольной группе жизнеспособность клеток была принята за 100%. GSNO в концентрациях 1-500 мкМ и длительности инкубации 3 ч достоверно не влиял на жизнеспособность клеток. Данный показатель составил $102,4 \pm 5,6\%$.

При воздействии GSNO в концентрациях 1-50 мкМ и длительности инкубации 24 ч жизнеспособность клеток также не изменялась, а при концентрациях 100 мкМ и 500 мкМ снижалась до $79,9 \pm 6,7\%$ ($p=0,02$) и $78,8 \pm 7,2\%$ ($p=0,03$) (Рисунок 36).

Увеличение длительности экспозиции до 72 ч приводило к снижению жизнеспособности 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 мкМ, 100 мкМ и 500 мкМ соответственно и не влияло на данный показатель при концентрации GSNO 1-10 мкМ (Рисунок 36).

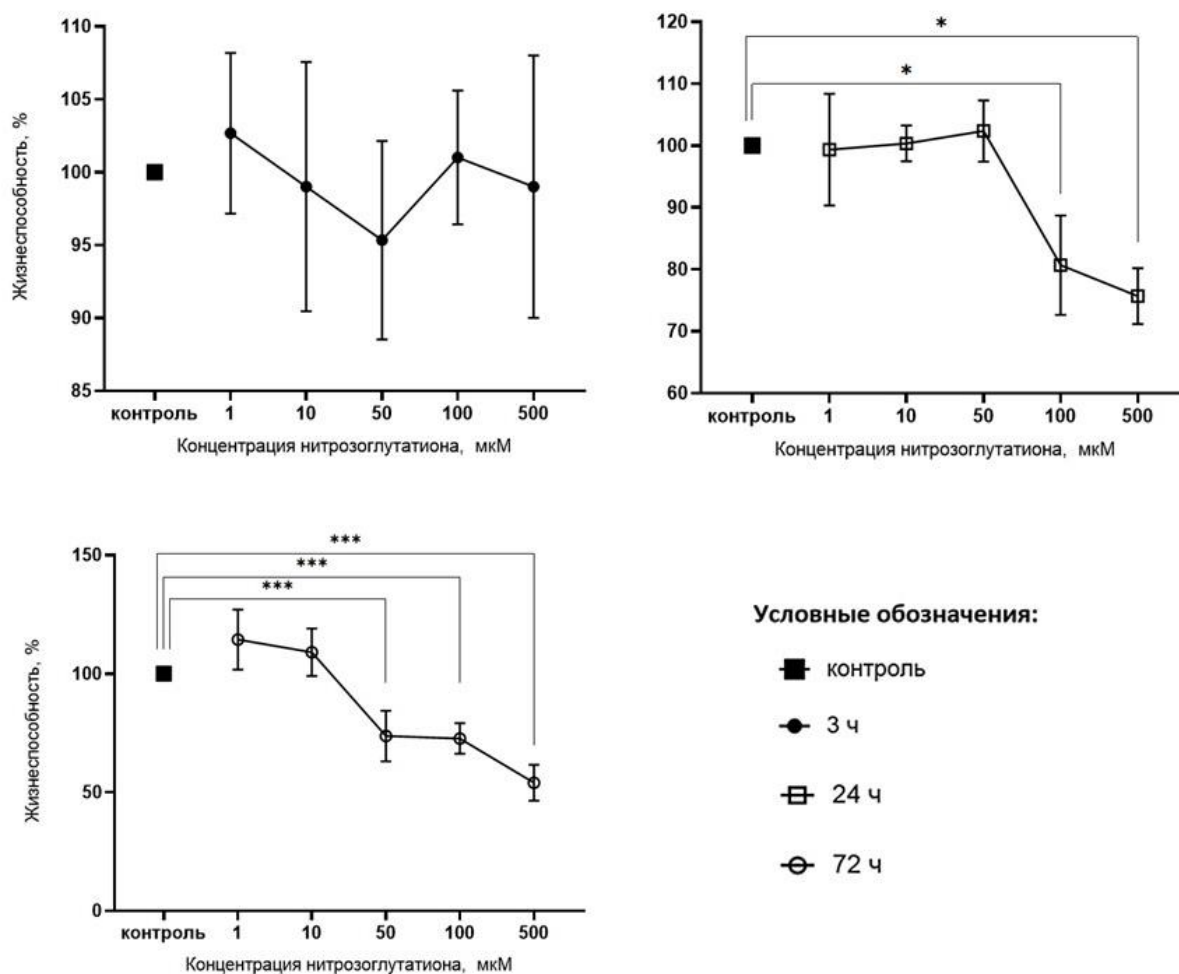


Рисунок 36 – Жизнеспособность клеток линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3, 24 и 72 ч

Примечания

* – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$.

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

3.7. Влияние S-нитрозоглутатиона на относительное количество и внутриклеточную локализацию прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора

Инкубирование клеток линии Caco-2 с GSNO в концентрациях 1 мкМ, 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ и 500 мкМ в течение 3 ч приводило к снижению количества PXR по сравнению с показателями контроля на 30,4% ($p=0,005$), 45,5% ($p=0,002$), 57,0% ($p=0,0002$), 12,5% ($p=0,03$) и 32,2% ($p=0,0003$) соответственно (Рисунок 37).

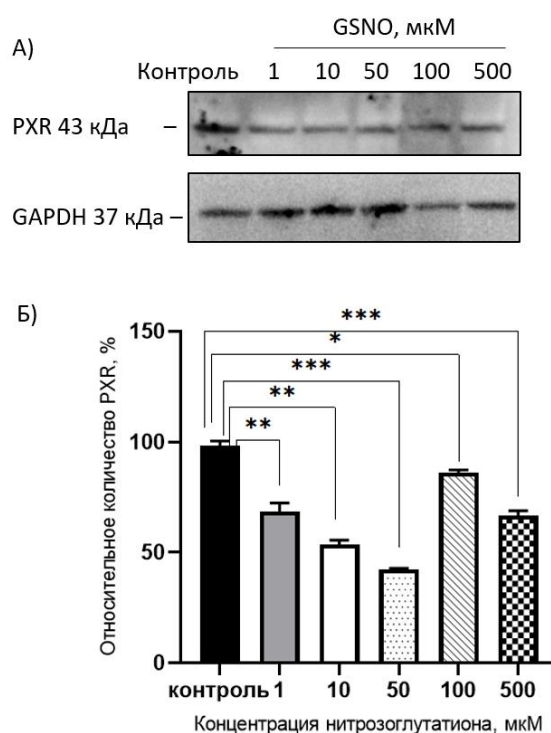


Рисунок 37 – Относительное количество PXR в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3 ч

Примечания

* – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$;

** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,01$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$.

А) – результаты детекции PXR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

Увеличение длительности экспозиции до 24 ч сопровождалось повышением количества PXR при концентрации GSNO 1 мкМ на 154,9% ($p=0,0002$), 10 мкМ – на 110,3% ($p=0,01$), 50 мкМ – на 32,8% ($p=0,001$). При концентрации GSNO 100 мкМ уровень PXR достоверно не отличался от показателей контроля, а в концентрации 500 мкМ был его ниже на 14,0% ($p=0,004$) (Рисунок 38).

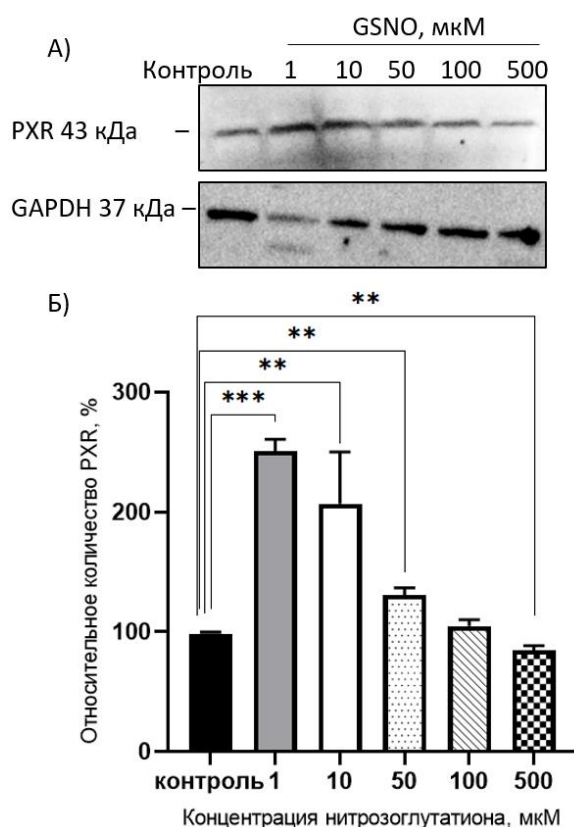


Рисунок 38 – Относительное количество PXR в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1-500 мкМ в течение 24 ч

Примечания

** – статистически значимые отличия от контроля, $p \leq 0,01$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$.

A) – результаты детекции PXR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

B) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

Увеличение срока инкубации до 72 ч приводило к нормализации уровня PXR при концентрации GSNO 1 мкМ и к его снижению в концентрациях 10 мкМ, 50 мкМ, 100 мкМ и 500 мкМ на 18,6% ($p=0,01$), 16,7% ($p=0,04$), 16,6% ($p=0,05$) и 34,5% ($p=0,001$) соответственно (Рисунок 39).

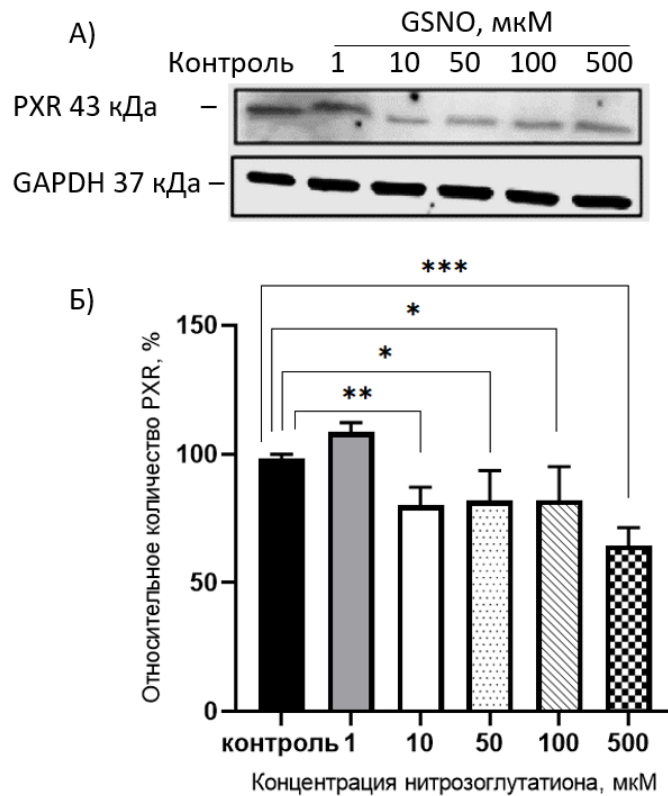


Рисунок 39 – Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1-500 мкМ в течение 72 ч ($M \pm SD, n = 3$)

Примечания

* – статистически значимые отличия от контроля, $p \leq 0,05$;

** – статистически значимые отличия от контроля, $p \leq 0,01$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p \leq 0,001$.

А) – результаты детекции PXR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

При воздействии GSNO на клетки линии Сасо-2 в течение 3 и 24 ч относительное количество CAR достоверно по сравнению с контролем не изменялось (Рисунок 40).

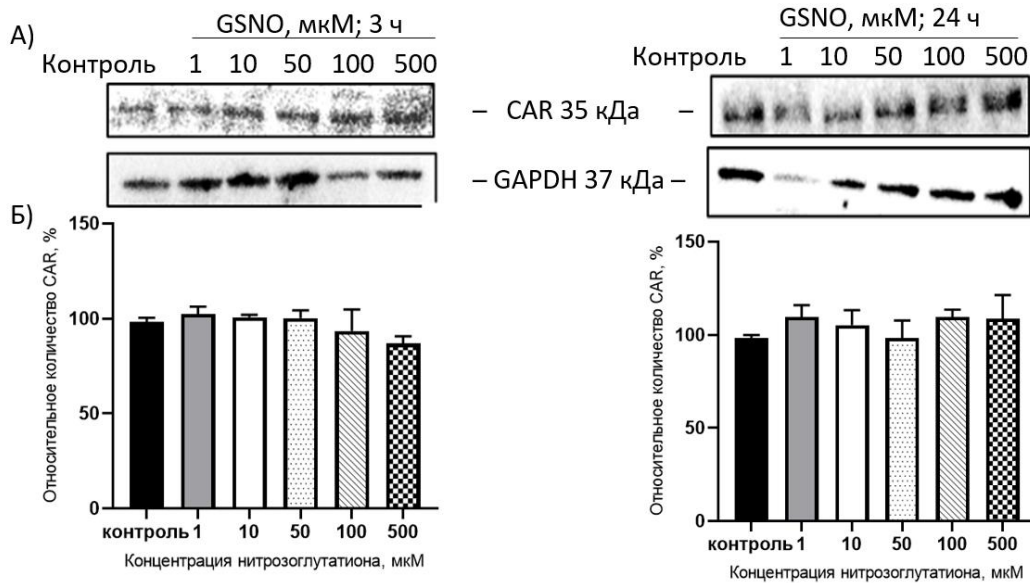


Рисунок 40 – Относительное количество CAR в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1-500 мкМ в течение 3 и 24 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечания

А) – результаты детекции CAR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

При культивировании клеток линии Сасо-2 с GSNO в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ в течение 72 ч количество CAR статистически значимо увеличивалось по сравнению с контролем на 25,5% ($p < 0,05$), на 47,9% ($p < 0,001$) и 18,7% ($p < 0,05$) соответственно. При повышении концентрации донора NO до 100 и 500 мкМ наблюдалось снижение количества транскрипционного фактора на 27,5% ($p < 0,01$)

и на 38,8% ($p < 0,001$) соответственно относительно контрольных значений (Рисунок 41).

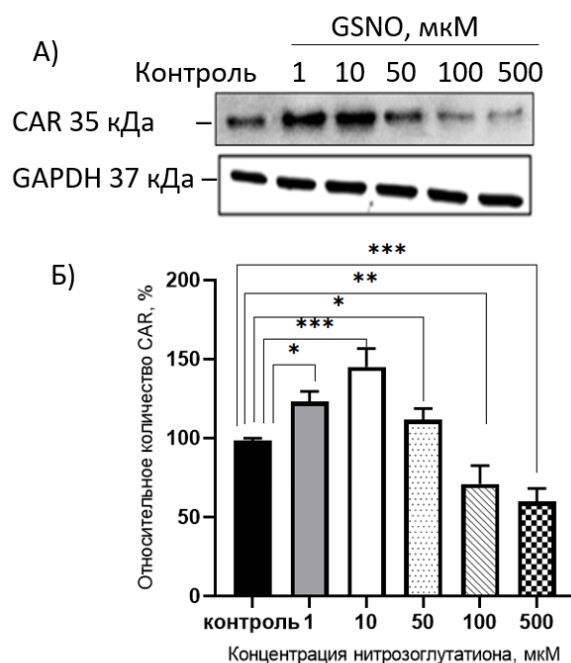


Рисунок 41 – Относительное количество CAR в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитроглютамина в концентрациях 1-500 мкМ в течение 72 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечания

* – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$;

** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,01$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$.

A) – результаты детекции CAR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

При оценке внутриклеточной локализации PXR и CAR при экспозиции с GSNO в индуцирующих концентрациях были получены следующие результаты (Рисунок 42).

GSNO при воздействии в течение 24 ч в концентрациях 1-50 мкМ вызывал усиление иммунопозитивной реакции с антителами к PXR, при этом более интенсивно окрашивалась цитоплазма.

Аналогичные результаты были получены при изучении влияния GSNO в концентрациях 1-50 мкМ на CAR-позитивную иммунохимическую реакцию: отмечалось уличение реакции, однако более интенсивно окрашивалась цитоплазма.

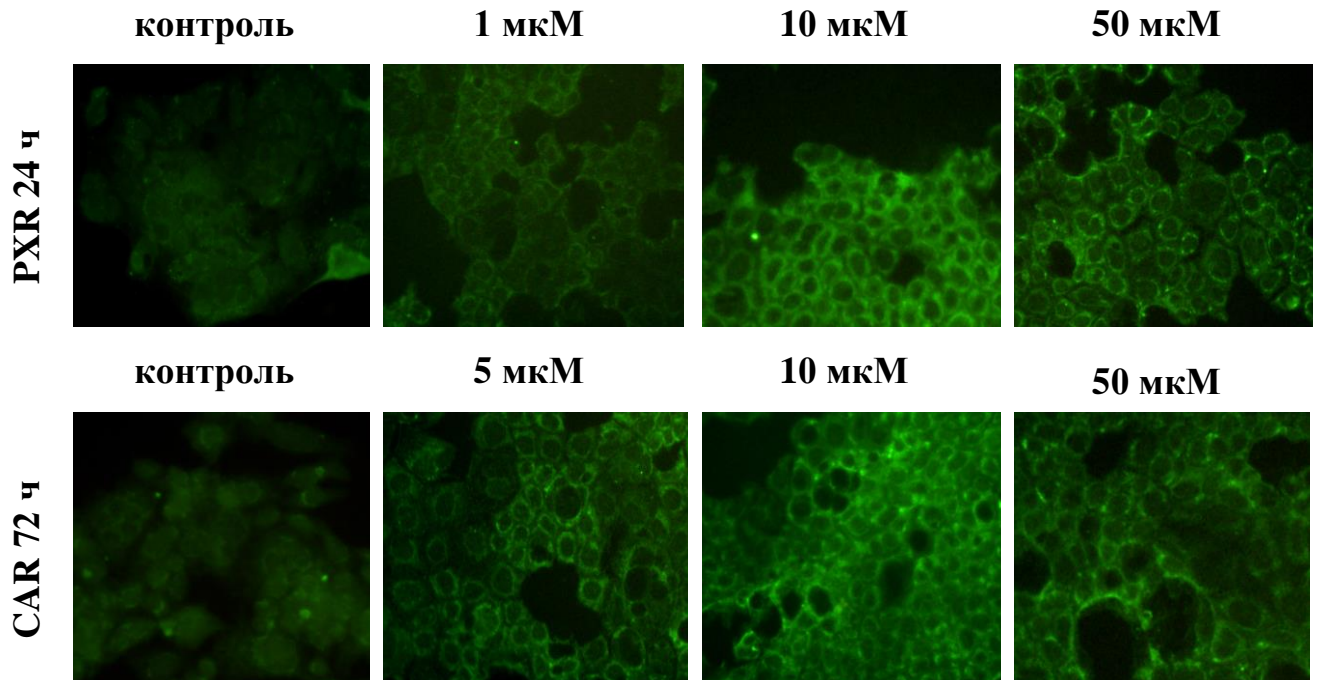


Рисунок 42 – Иммуноцитохимическое окрашивание клеток Caco-2 с использованием антител к PXR, CAR, вторичных антител S0018 Polyclonal Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) Fluor488-conjugated, Affinity Biosciences, КРН, увеличение $\times 400$ раз

Таким образом, донор NO GSNO при длительности воздействия 3 ч в концентрациях 1-500 мкМ снижает относительное количество PXR и не влияет на CAR; при 24 ч экспозиции в концентрациях 1-50 мкМ повышает, а в концентрации 500 мкМ снижает уровень PXR и не оказывает воздействия на CAR. При длительности эксперимента 72 ч в концентрациях 10-500 мкМ GSNO снижает относительное количество PXR, в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ увеличивает содержание CAR, а в концентрациях 100 и 500 мкМ его снижает.

При увеличении относительного количества PXR и CAR данные рецепторы распределяются преимущественно в цитоплазме, что косвенно свидетельствует об отсутствии их активации.

3.8. Влияние битирозина на относительное количество прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора

Для изучения механизмов изменения относительного количества PXR и CAR под действием GSNO были выполнены эксперименты по оценке воздействия конечного продукта HC – битирозина на данные рецепторы.

Вначале была оценена проницаемость битирозина внутрь клеток Caco-2. Для этого после окончания экспозиции с битирозином в лизате клеток оценивалась его концентрация.

При внесении в питательную среду битирозина на срок 24 ч в концентрации 0,2 мМ его содержание в клетке не отличалось от контрольных значений, при 0,4 мМ было выше контроля на 30,1% ($p=0,014$), при 1 мМ – на 65,5% ($p<0,001$), при 1,5 мМ – на 93,1% ($p<0,001$). При сроке инкубации 72 ч и концентрациях битирозина 0,4 мМ, 1 мМ и 1,5 мМ его содержание в лизате клеток повышалось на 48,9% ($p=0,04$), 96,5% ($p=0,0006$) и 139,1% ($p<0,0001$) соответственно, а в концентрации 0,2 мМ также достоверно от контроля не отличалось (Рисунок 43).

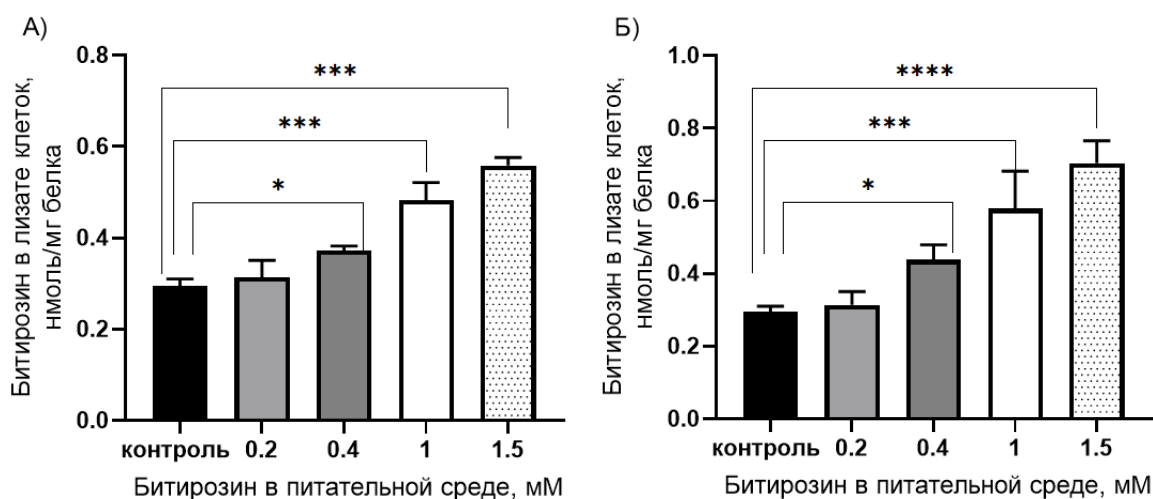


Рисунок 43 – Концентрация битирозина в лизате клеток линии Сасо-2 при воздействии битирозина в концентрациях 0,2-1,5 мМ в течение 24 ч (А) и 72 ч (Б) (М ±SD, n = 3)

Примечания

* – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$;

**** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,0001$.

При воздействии битирозина в течение 24 ч в концентрации 0,4 мМ количество PXR возросло на 64,1% ($p = 0,0002$), в концентрации 1 мМ – на 34,5% ($p = 0,0007$), а при концентрациях 0,2 мМ и 1,5 мМ не изменялось (Рисунок 44). При длительности инкубации 72 ч битирозин достоверного эффекта на относительное количество PXR не оказал (Рисунок 44).

Воздействие битирозина в течение 24 ч достоверного эффекта на количество CAR не оказало. При длительности эксперимента 72 ч добавление битирозина в питательную среду в концентрации 0,4 мМ приводило к возрастанию относительного количества CAR на 26,2% ($p < 0,001$), в концентрации 1 мМ – на 13,1% ($p < 0,01$) по сравнению с контролем, а в концентрациях 0,2 мМ и 1,5 мМ не оказывало эффекта (Рисунок 45).

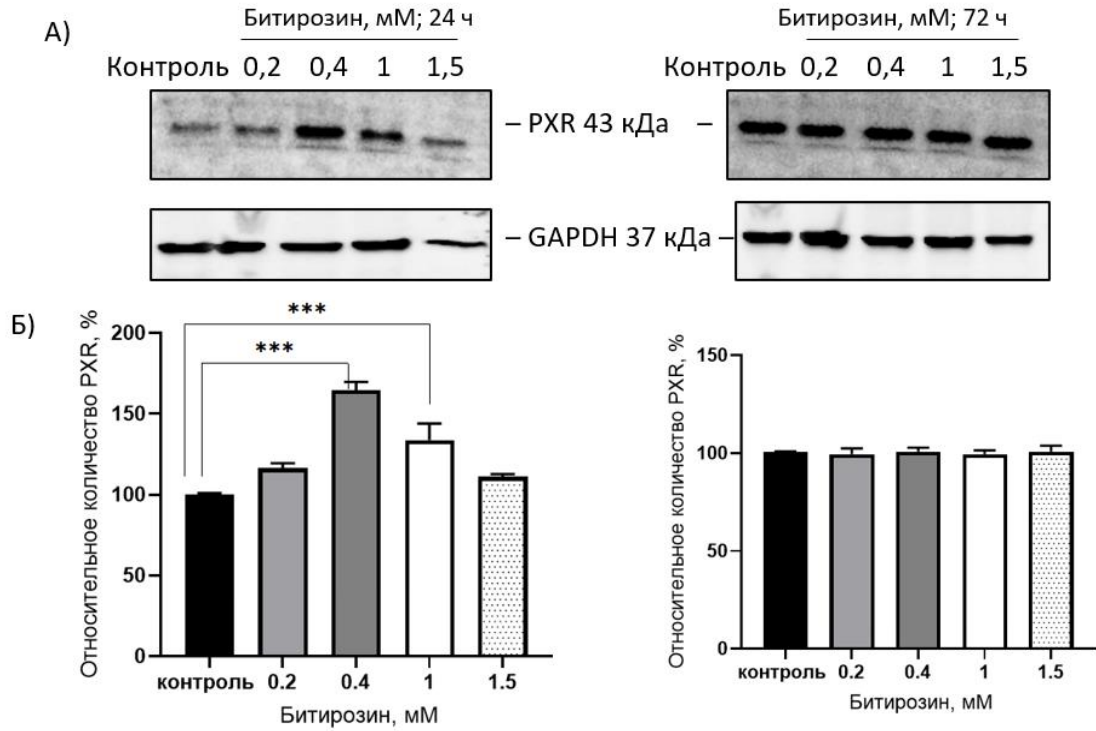


Рисунок 44 – Относительное количество PXR в клетках линии Caco-2 при воздействии битирозина в концентрациях 0,2-1,5 мМ в течение 24 и 72 ч (M ±SD, n = 3)

Примечания

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$

А) – результаты детекции PXR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

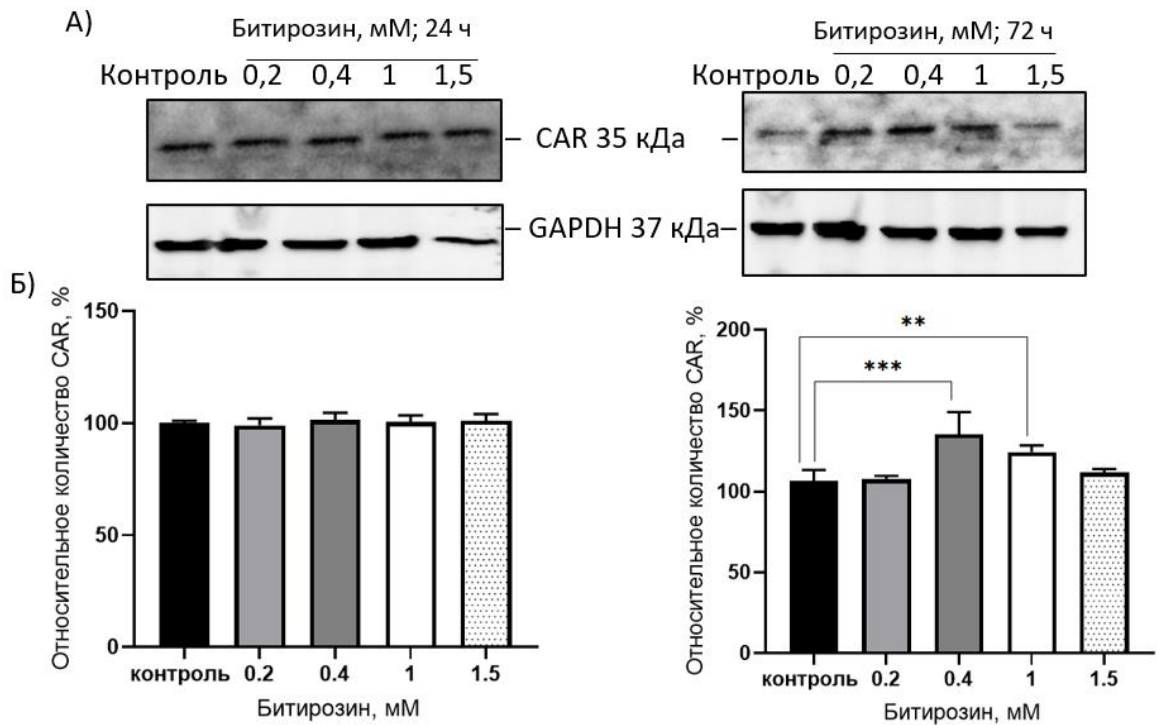


Рисунок 45 – Относительное количество CAR в клетках линии Caco-2 при воздействии битирозина в концентрациях 0,2-1,5 мМ в течение 24 и 72 ч ($M \pm SD$, $n = 3$)

Примечания

** - статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,01$;

*** - статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$.

А) – результаты детекции CAR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что продукт НС битирозин вызывает индукцию PXR при длительности воздействия 24 ч и индукцию CAR при экспозиции 72 ч.

3.9. Оценка роли NO-цГМФ-сигнального пути в индукции прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора под действием S-нитрозоглутатиона

Для оценки роли NO-цГМФ-сигнального пути в индукции CAR и PXR под действием GSNO, предварительно за 30 мин до внесения донора NO в питательную среду к клеткам добавляли ингибитор рГЦ – ODQ в концентрации 10 мкМ.

ODQ предотвращал снижение относительного количества PXR под действием GSNO в концентрациях 1-500 мкМ при инкубации 3 ч, содержание рецептора достоверно от показателей контроля не отличалось (Рисунок 46).

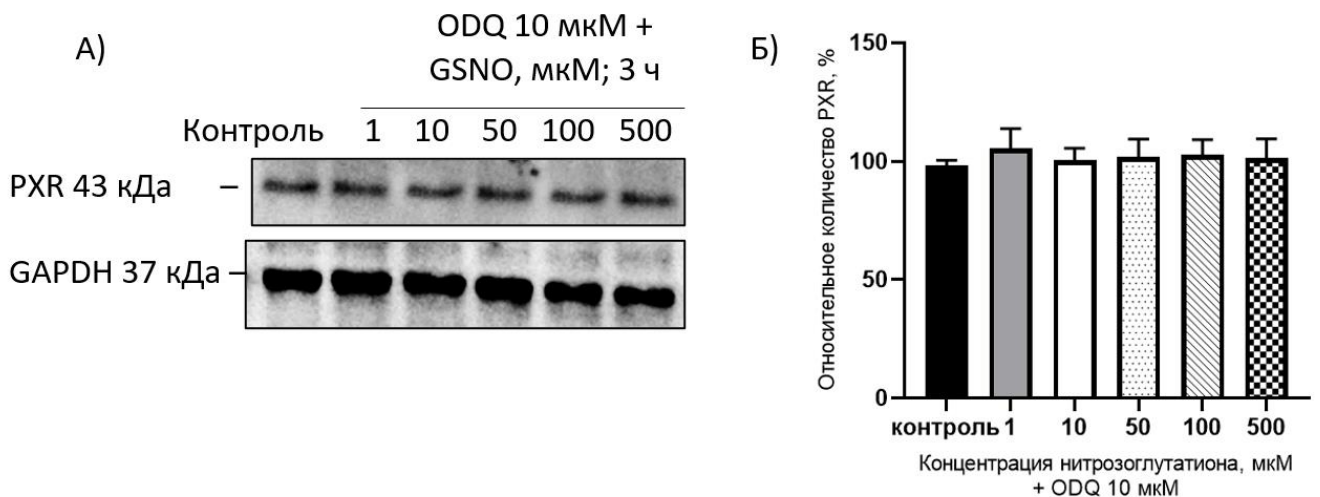


Рисунок 46 – Относительное количество PXR в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в условиях ингибирования растворимой гуанилатциклазы ODQ в концентрации 10 мкМ в течение 3 ч

Примечания

А) – результаты детекции CAR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

При инкубации в течение 24 ч ODQ не оказал достоверного действия на эффект GSNO, содержание PXR под действием донора NO увеличивалось по сравнению с контролем в концентрациях 1-50 мкМ, и снижалось в концентрации 500 мкМ (Рисунок 47).

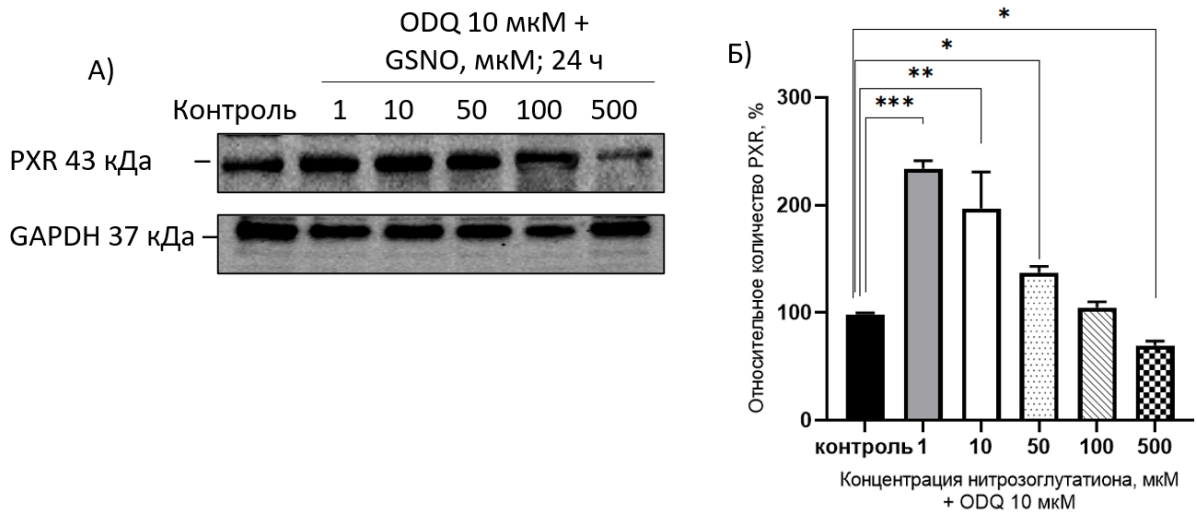


Рисунок 47 – Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в условиях ингибирования растворимой гуанилатциклазы ODQ в концентрации 10 мкМ в течение 24 ч

Примечания

* – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,05$;

** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,01$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$.

А) – результаты детекции CAR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

При сроке экспозиции 72 ч ингибитор растворимой гуанилатциклазы предотвращал снижение относительного количества PXR под действием GSNO в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ, уровень рецептора достоверно не отличался от контроля (Рисунок 48).

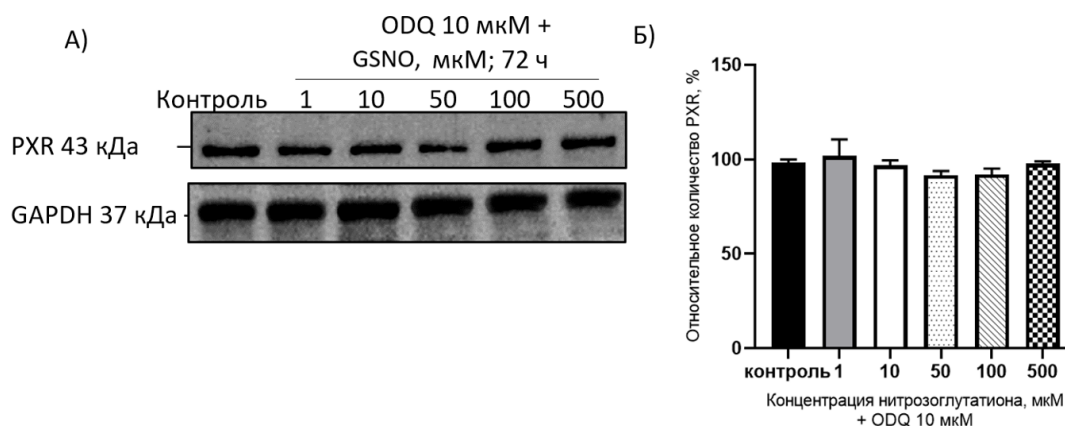


Рисунок 48 – Относительное количество PXR в клетках линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в условиях ингибирования растворимой гуанилатциклазы ODQ в концентрации 10 мкМ в течение 72 ч

Примечания

А) – результаты детекции CAR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

Сочетанное применение ODQ и GSNO при 72 ч инкубации в концентрации 1 мкМ приводило к нормализации относительного количества CAR по сравнению с контролем (индуцирующий эффект GSNO подавлялся ODQ). В то же время ODQ не влиял на действие GSNO в концентрации 10 и 50 мкМ: относительное количество CAR возрастало на 22,3% ($p < 0,01$) и 43,8% ($p < 0,0001$) соответственно по сравнению с контролем (самостоятельный эффект GSNO) (Рисунок 49).

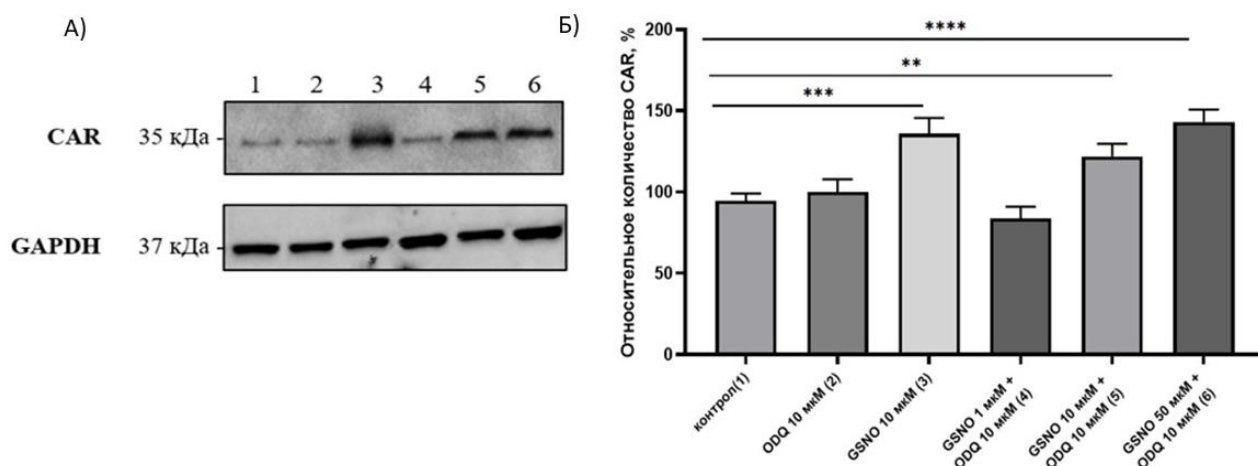


Рисунок 49 – Относительное количество CAR в клетках линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в условиях ингибирования растворимой гуанилатциклазы ODQ в концентрации 10 мкМ в течение 72 ч.

Примечания

** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,01$;

*** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,001$;

**** – статистически значимые отличия от контроля, $p < 0,0001$.

А) – результаты детекции CAR и GAPDH методом вестерн-блот с помощью ChemiDocXRS+;

Б) – результаты денситометрического анализа, выполненного с помощью программного обеспечения ImageLab.

Таким образом, NO-цГМФ-сигнальный путь принимает участие в снижении относительного количества PXR, вызванного GSNO при экспозиции 3 и 72 ч, а также в повышении уровня CAR при 72 ч воздействии донора NO в концентрации 1 мкМ.

3.10. Оценка роли прегнан X рецептора и конститутивного андростанового рецептора в защите клеток от нитрозативного стресса

Для оценки роли PXR и CAR в защите клеток от нитрозативного стресса за 30 мин до добавления GSNO в питательную среду вносили ингибитор PXR

кетоконазол в концентрации 10 мкМ или ингибитор CAR – CINPA1 в концентрации 10 мкМ. Клетки инкубировали в течение 24 ч в условиях ингибирования PXR и в течение 72 ч в условиях ингибирования CAR, так как именно при этих сроках воздействия GSNO вызывал индукцию рецепторов. После окончания инкубации анализировали выживаемость клеток в ходе МТТ-теста.

При инкубации клеток с GSNO в течение 24 и 72 ч жизнеспособность клеток снижалась при концентрациях донора NO 100 и 500 мкМ и 50-500 мкМ соответственно.

Ингибирование PXR (Рисунок 50) и CAR (Рисунок 51) предотвращало снижение жизнеспособности клеток под действием GSNO, данный показатель достоверно от значений контроля не отличался.

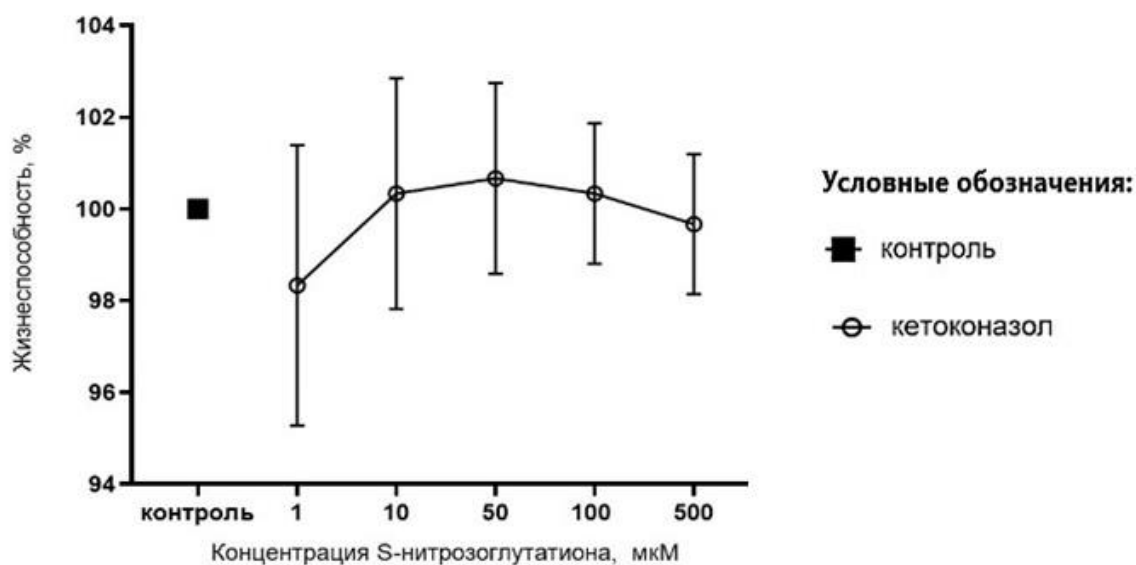


Рисунок 50 – Жизнеспособность клеток линии Caco-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1-500 мкМ в течение 24 ч в условиях ингибирования PXR кетоконазолом в концентрации 10 мкМ ($M \pm SD$, $n=3$)

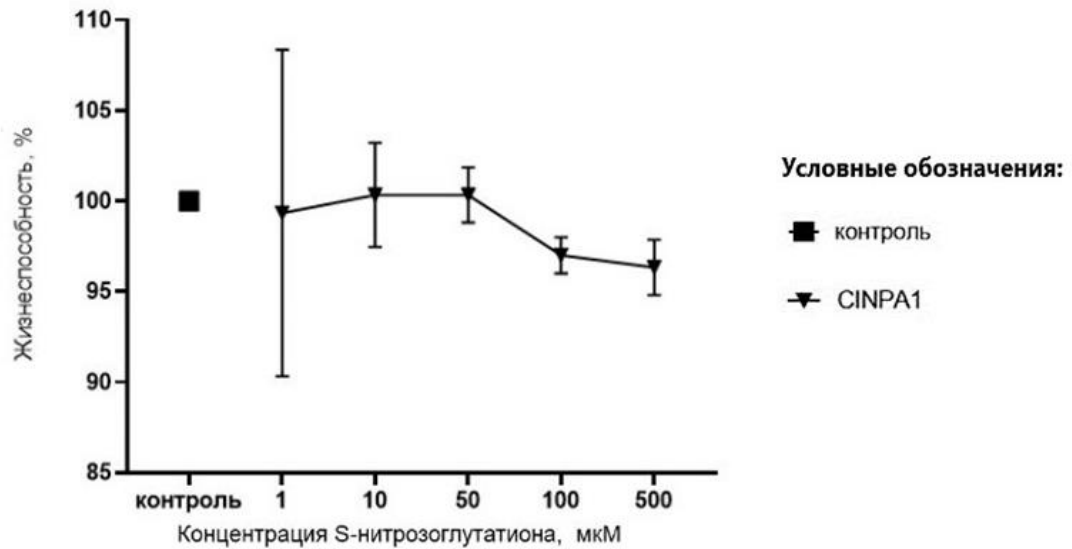


Рисунок 51 – Жизнеспособность клеток линии Сасо-2 при воздействии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1-500 мкМ в течение 72 ч в условиях ингибирования CAR CINPA1 в концентрации 10 мкМ ($M \pm SD$, $n=3$).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что PXR и CAR повышают чувствительность клеток к НС.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ядерные рецепторы – это суперсемейство лиганд-активируемых факторов транскрипции [103, 135], участвующих в регуляции многих физиологических и биохимических процессов [108, 194].

В настоящее время у людей семейство включает в себя 48 представителей. 12 рецепторов используют в качестве эндогенных лигандов гормоны, поэтому их относят к группе эндокринных ядерных рецепторов [84, 86].

10 из 48 представителей относятся к группе орфанных ядерных рецепторов, так как их лиганды еще не идентифицированы [49, 84, 265, 267]. В течение долгого времени PXR и CAR относились именно к данной группе, однако, в последние годы для них были обнаружены низкоаффинные эндогенные лиганды, такие как прогестерон, прегненолон, 17-гидроксиpregненолон, холестерин и его метаболиты. Впоследствии они были переведены в группу «усыновленных» ядерных рецепторов [69, 101].

Доказана важная роль CAR и PXR в регуляции экспрессии генов ферментов I и II фазы биотрансформации (например, изоферментов цитохромов P450), а также белков-транспортеров. Кроме того, эти рецепторы могут принимать участие в регуляции внутриклеточного метаболизма и окислительно-восстановительного баланса [25, 96, 216, 248].

В настоящее время продолжается поиск специфичных лигандов-ксенобиотиков PXR и CAR [90, 109, 205, 218, 226], а также изучаются механизмы регуляции данных транскрипционных факторов [202, 207] и их роль в развитии различных патофизиологических процессов [219].

Известно, что АФК/АФА принимают участие в патогенезе широкого спектра заболеваний [7, 198, 199]. Причем их низкие концентрации играют преимущественно регуляторную роль, в то время как высокие концентрации приводят к повреждению биомакромолекул и гибели клеток [198].

NO – сигнальная молекула, принимающая участие в регуляции широкого спектра физиологических процессов [23, 24].

Влияние активных форм кислорода, продуктов свободнорадикального окисления, NO и продуктов нитрозативного стресса на PXR и CAR на данный момент практически не изучено. Однако, учитывая их участие в регуляции окислительно-восстановительных процессов [201], а также в защите клеток от токсических продуктов, в том числе и ксенобиотиков, логично предположить, что они вносят важный вклад в развитие свободно-радикальной патологии.

В ходе настоящего исследования оценивалось влияние H_2O_2 и донора NO – GSNO на функционирование PXR и CAR, а также были изучены его возможные механизмы.

Добавление H_2O_2 в высоких концентрациях (50-100 мкМ) к клеткам линии Сасо-2 с экспозицией в течение 3, 24 и 72 ч приводило к развитию окислительного стресса, о чем свидетельствовало повышение уровня карбонильных производных белков, продуктов окисления липидов – суммарного содержания МДА и 4-гидроксиолефинов, и сопровождалось снижением выживаемости клеток.

При этом H_2O_2 при длительности воздействия 24 ч в концентрациях 10 - 100 мкМ вызывал повышение относительного количества PXR, а при длительности экспозиции 72 ч в концентрациях 50 и 100 мкМ снижал его уровень. При иммуноцитохимическом исследовании было показано, что иммунопозитивную реакцию давала преимущественно цитоплазма, что косвенно свидетельствует о том, что повышение количества PXR не сопровождается его активацией.

Для исследования механизма повышения количества PXR при развитии ОС были выполнены эксперименты по оценке влияния МДА - конечного продукта ПОЛ на уровень изучаемого рецептора, а также оценена роль транскрипционного фактора Nrf2 в данном процессе.

Установлено, что МДА может растворяться в билипидной мембране клеток и проникать внутрь клеток [119], тем самым оказывая внутриклеточные эффекты, что было подтверждено в настоящем исследовании. Так же известно, что МДА и 4-гидроксиолефины могут выступать в качестве сигнальных молекул, а именно доказана их роль в подавлении экспрессии генов [27, 55].

В ходе настоящей работы было показано, что МДА повышает содержание PXR при сроке инкубации 24 ч.

Транскрипционный фактор Nrf2 является основным регулятором экспрессии генов антиоксидантных ферментов, локализованным при нормальных условиях в цитозоле клеток в виде комплекса с Keap1 [162, 235, 262]. При развитии ОС происходят конформационные изменения в Keap1, что приводит к стабилизации и ядерной транслокации Nrf2, где он гетеродимеризуется с белками семейства Maf и связывается с элементами антиоксидантного ответа (ARE), что приводит к индукции антиоксидантных ферментов [129, 162].

Ингибирование Nrf2 при воздействии H_2O_2 в течение 24 ч не влияло на индуцирующее действие прооксиданта на уровень PXR. С другой стороны, в литературе описано, что активация PXR может ингибировать сигнальный каскад Nrf2 *in vitro* [184].

Таким образом, повышение количества PXR в клетках линии Caco-2 при воздействии H_2O_2 в течение 24 ч, скорее всего, опосредовано влиянием продукта пероксидации – МДА.

На данный момент механизмы индукции PXR продолжают активно изучаться [81, 179, 182]. Для низкомолекулярных веществ наиболее вероятным механизмом является их связывание с аналогичными рецепторами ксенобиотиков (например, farnesoid X receptor) и повышение транскрипции гена PXR.

В ходе настоящего исследования было показано, что только развитие длительного (в течение 72 ч) ОС, вызванного H_2O_2 в концентрациях 5-50 мкМ, приводит к повышению количества транскрипционного фактора CAR, а в концентрации 100 мкМ – к его снижению. При иммуноцитохимическом исследовании было показано, что иммунопозитивную реакцию давала преимущественно цитоплазма, что косвенно свидетельствует о том, что повышение количества CAR не сопровождается его активацией.

При изучении роли МДА в индукции CAR под действием H_2O_2 было показано, что МДА во всех протестированных концентрациях (10-150 мкМ) и

сроках воздействия (24-72 ч) достоверного эффекта на относительное количество CAR не оказал.

При этом, ингибирование Nrf2 препятствовало повышению количества CAR при действии H_2O_2 в концентрации 50 мкМ. Отсутствие подавления индукции CAR ингибитором Nrf2 при других концентрациях H_2O_2 может быть связано с участием других сигнальных путей в данном процессе. Например, показано, что прооксидантные токсиканты могут изменять метаболизм лекарственных веществ посредством активации CAR независимо от сигнального пути Nrf2-keap1, например через ось окислительный стресс-Mapk-CAR [172].

С другой стороны, в исследовании J.P. Roonet et al. (2019) было установлено, что CAR активировался раньше и в более низких дозах, чем Nrf2, что указывает на активацию CAR перед активацией Nrf2. Активация Nrf2 двумя активаторами CAR была подавлена у мышей с нокаутом CAR. Авторы предположили, что Nrf2 активируется активными формами кислорода, образующимися вследствие повышенной активности ферментов Cyp2b [75].

На следующем этапе исследования было изучено влияния донора NO GSNO на относительное количество PXR и CAR.

GSNO представляет собой S-нитрозированное производное глутатиона и является физиологической эндогенной молекулой-носителем NO. Гомеостатический уровень GSNO в клетке низкий, поскольку он быстро и необратимо разлагается на NO и глутатион при участии фермента S-нитрозоглутатионредуктазы [1, 10, 249].

GSNO не проникает в клетки напрямую, однако, его добавление вызывает повышение внутриклеточных уровней S-нитрозотиолов [1, 10]. Предполагается, что GSNO диссоциирует во внеклеточном пространстве с высвобождением NO, который затем может диффундировать через клеточную мембрану [147]. Также описан независимый от NO механизм его проникновения внутрь клеток. Нитрозогруппа от GSNO переносится на цистеин с образованием S-нитрозоцистеина, способного проникать внутрь клеток с помощью специфических транспортеров [147]. S-нитрозоцистеин внутри клеток может либо вновь

нитрозировать глутатион с образованием GSNO, либо непосредственно нитрозировать тиолы белков и запускать сигнальные каскады.

GSNO считается важным медиатором сигнальных механизмов NO, однако, его эффект зависит от концентрации и времени воздействия: концентрации от 1 до 100 мкМ оказывают регуляторное действие [1, 203, 221, 222], а концентрации выше 500 мкМ могут являться токсичными [220].

На первом этапе исследования для подтверждения повышения уровня NO в клетках линии Caco-2 под действием GSNO оценивался уровень метаболитов оксида азота (NO_x) в клеточном лизате после завершения экспериментальных воздействий. Данный показатель возрастал при всех концентрациях GSNO (1-500 мкМ) и всех сроках эксперимента; максимально - при концентрации 500 мкМ. Полученные результаты свидетельствуют об адекватности использованной экспериментальной модели.

Далее в лизате клеток оценивали содержание АФА – пероксинитрита и продукта нитрозативного стресса – битирозина.

Пероксинитрит (ONOO^-) – это эндогенный оксидант, образующийся в результате взаимодействия NO и $\text{O}_2^{\bullet-}$ [10, 23, 24]. ONOO^- может играть защитную роль в организме, оказывая бактерицидное действие, но в большинстве случаев он токсичен из-за своей высокой реакционной способности. Повышенная продукция ONOO^- может привести к развитию нейродегенеративных заболеваний, инсульту, острому повреждению почек и печени [200].

Нитрозирование тирозина представляет собой наиболее специфичную окислительную модификацию при развитии НС. Нитротирозин частично диссоциирует до фенолята, но основное его количество конденсируется до 3,3-дитирозина (битирозина) [60]. Доказано, что образование битирозина превалирует над нитротирозином при длительном воздействии и/или более высоком уровне АФА, что позволяет рассматривать его в качестве маркера НС [61].

Уровень ONOO^- увеличивался при инкубации клеток длительностью 3 и 24 ч с GSNO только в концентрациях 100 и 500 мкМ. При увеличении длительности экспозиции до 72 ч содержание ONOO^- возрастало по сравнению с контролем во

всех протестированных концентрациях донора NO. Содержание битирозина статистически значимо возрастало при действии GSNO в концентрациях 10-500 мкМ и сроках инкубации 24 ч и 72 ч. Развитие нитрозативного стресса сопровождалось снижением жизнеспособности клеток.

Инкубирование клеток линии Caco-2 с 1-500 мкМ GSNO в течение 3 ч приводило к снижению количества PXR по сравнению с показателями контроля.

Увеличение длительности экспозиции до 24 ч сопровождалось повышением количества PXR при концентрации GSNO 1 - 50 мкМ, а в концентрации 500 мкМ происходило его снижение. Продление инкубации до 72 ч приводило к снижению относительного количества PXR в концентрациях GSNO 10-500 мкМ.

В ходе иммуноцитохимического исследования было показано, что при повышении количества PXR иммунопозитивную реакцию давала преимущественно цитоплазма, что косвенно свидетельствует о том, что увеличение количества PXR не сопровождается его активацией.

Основной физиологической мишенью для NO в клетке является рГЦ, которая катализирует биосинтез из гуанозинтрифосфата (ГТФ) циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). цГМФ – это универсальная внутриклеточная сигнальная молекула, присутствующая в большинстве типов клеток [238].

В ряде исследований была установлена сигнальная роль продукта HC – битирозина [87, 91].

Поэтому в настоящем исследовании был изучен вклад данных механизмов в изменение относительного количества PXR и CAR под действием донора NO – GSNO.

Для этого были выполнены эксперименты по оценке прямого воздействия битирозина на данные рецепторы, а также изучено влияние ингибитора рГЦ ODQ на действие GSNO.

При инкубации в течение 24 ч битирозин в концентрации 0,4 мМ и 1 мМ проникал внутрь клеток и повышал количество PXR.

ODQ предотвращал снижение относительного количества PXR под действием GSNO при инкубации 3 и 72 ч, содержание рецептора достоверно от показателей контроля не отличалось.

Таким образом, снижение PXR под действием GSNO при 3 и 72 ч воздействии реализуется через NO-цГМФ сигнальный путь, а повышение уровня PXR при 24 ч экспозиции осуществляется через продукт HC – битирозин.

При культивировании клеток линии Caco-2 с GSNO в концентрациях 1 - 50 мкМ в течение 72 ч количество CAR статистически значимо увеличивалось по сравнению с контролем. При повышении концентрации донора NO до 100 и 500 мкМ и усилении HC наблюдалось снижение жизнеспособности клеток и уменьшение относительного количества CAR.

По результатам иммуноцитохимического исследования было показано, что при повышении количества CAR иммунопозитивную реакцию давала преимущественно цитоплазма, что косвенно свидетельствует о том, что увеличение количества CAR не сопровождается его активацией.

CAR состоит из 301 аминокислоты, из них 33 приходится на формирование LBP [79, 242, 244]. Аминокислоты, выстилающие и окружающие LBP, идентифицированы как наиболее важные и определяющие активность CAR [232].

При усугублении HC может происходить взаимодействие пероксинитрита с аминокислотными остатками белков. ONOO⁻ проявляет высокую реакционную активность в отношении следующих аминокислот: цистеин, триптофан, метионин, тирозин. Вероятно, изменение относительного количества CAR (при высоких (100 и 500 мкМ) концентрациях GSNO) может объясняться его структурной модификацией – нитрозилированием цистеина (292), триптофана (283, 305), метионина (241, 272, 316, 418) и тирозина (283, 311, 399), входящих в состав LBP CAR.

На следующем этапе исследования была изучена роль битирозина и NO-цГМФ-сигнального пути в механизмах влияния GSNO на CAR.

При длительности эксперимента 72 ч добавление битирозина в питательную среду в концентрации 0,4 и 1 мМ приводило к возрастанию относительного количества CAR.

Сочетанное применение ODQ и GSNO в концентрации 1 мкМ приводило к нормализации относительного количества CAR по сравнению с контролем (индуцирующий самостоятельный эффект GSNO подавлялся ODQ).

Таким образом, воздействие GSNO на CAR в течение 72 ч в низких концентрациях реализуется через NO-цГМФ-сигнальный путь, а при повышении концентрации через битирозин. Снижение уровня CAR при высоких концентрациях GSNO может быть связано с развитием НС и повреждением молекулы рецептора.

Интересно отметить, что GSNO в концентрации 1 мкМ в течение 72 ч вызывал повышение уровня метаболитов NO и ONOO⁻, что свидетельствует о генерации NO. Содержание битирозина начинало повышаться только при более высоких концентрациях GSNO. Данные результаты подтверждают сделанный нами вывод.

Изменение количества PXR и CAR при развитии ОС и НС может играть двоякую роль. С одной стороны, PXR и CAR могут способствовать генерации АФК/АФА и усиливать повреждение клеток за счёт индукции изоферментов цитохрома P450 (CYP2B1/2B2, CYP3A1/3A2 и CYP2C6) и интенсификации метаболизма ксенобиотиков [154]. С другой – PXR и CAR могут иметь и защитное значение, так как данные транскрипционные факторы стимулируют экспрессию антиоксидантного фермента глутатион-S-трансферазы [39, 41, 206].

В ходе настоящего исследования ингибирование PXR и CAR с помощью специфических ингибиторов кетоконазола и CINPA1 повышало выживаемость клеток при воздействии H₂O₂ и GSNO при всех сроках эксперимента.

Полученные данные свидетельствуют о том, что PXR и CAR, скорее всего, играют отрицательную роль, снижая резистентность клеток к изучаемым воздействиям.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе настоящего исследования на клетках линии Caco-2 показано, что пероксид водорода в концентрациях 10-100 мкМ при сроке инкубации 24 ч вызывает повышение относительного количества прегнан X рецептора, а при сроке воздействия 72 ч в концентрациях 50 и 100 мкМ – снижение данного показателя. Относительное количество конститутивного андростанового рецептора повышается по сравнению с контролем при воздействии пероксида водорода в течение 72 ч в концентрациях 5-50 мкМ и снижается при воздействии прооксиданта в концентрации 100 мкМ. Повышение относительного количества прегнан X рецептора опосредовано продуктом перекисного окисления липидов – малоновым диальдегидом, а индукция конститутивного андростанового рецептора при воздействии пероксида водорода связана с ядерным фактором эритроидного происхождения-2.

S-нитрозоглутатион при сроке экспозиции 3 ч во всех концентрациях (1-500 мкМ) приводит к снижению относительного количества прегнан X рецептора, при инкубации в течение 24 ч в концентрациях 1-50 мкМ – к повышению, а в концентрации 500 мкМ – к снижению данного показателя. Увеличение срока воздействия S-нитрозоглутатиона в концентрациях 10-500 мкМ до 72 ч снижает относительное количество прегнан X рецептора. Относительное количество конститутивного андростанового рецептора повышается по сравнению с контролем при воздействии S-нитрозоглутатиона в течение 72 ч в концентрациях 1-50 мкМ и снижается при увеличении концентрации до 100 и 500 мкМ. Снижение относительного количества прегнан X рецептора при инкубации в течение 3 и 72 ч с S-нитрозоглутатионом во всех концентрациях и повышение относительного количества конститутивного андростанового рецептора при сроке инкубации 72 ч с донором NO в низких концентрациях реализуются через NO-цГМФ-сигнальный путь. Повышение уровня прегнан X рецептора при сроке инкубации 24 ч и конститутивного андростанового рецептора при сроке инкубации 72 ч с S-нитрозоглутатионом связано с продуктом нитрозативного стресса – битиразином.

ВЫВОДЫ

1. Пероксид водорода при экспозиции 3 ч не влияет на относительное количество PXR и CAR, при длительности воздействия 24 ч в концентрациях 10-100 мкМ повышает уровень PXR и не влияет на CAR, при 72-часовом эксперименте в концентрациях 5 - 50 мкМ увеличивает содержание CAR, а в концентрациях 50-100 мкМ и 100 мкМ уменьшает количество PXR и CAR соответственно. Повышение количества изучаемых рецепторов не сопровождается их транслокацией в ядро.

2. Конечный продукт перекисного окисления липидов малоновый диальдегид повышает относительное количество PXR только в концентрации 10 мкМ и длительности воздействия 24 ч и не влияет на уровень CAR. Транскрипционный фактор Nrf2 принимает участие в индукции CAR под действием пероксида водорода в концентрации 50 мкМ и длительности воздействия 72 ч и не связан с индукцией PXR под действием прооксиданта при экспозиции 24 ч.

3. Донор оксида азота (II) S-нитрозоглутатион при длительности воздействия 3 ч в концентрациях 1-500 мкМ снижает относительное количество PXR и не влияет на CAR, при 24-часовой экспозиции в концентрациях 1-50 мкМ повышает, в концентрации 500 мкМ снижает уровень PXR и не оказывает воздействия на CAR, а при длительности эксперимента 72 ч в концентрациях 10-500 мкМ снижает относительное количество PXR, в концентрациях 1-50 мкМ увеличивает, а в концентрациях 100 и 500 мкМ уменьшает содержание CAR. Повышение количества изучаемых рецепторов не сопровождается их транслокацией в ядро.

4. Продукт нитрозативного стресса – битирозин вызывает индукцию PXR при длительности воздействия 24 ч и индукцию CAR при экспозиции 72 ч. Ингибирование NO-цГМФ-сигнального пути предотвращает снижение относительного количества PXR, вызванного GSNO при экспозиции 3 и 72 ч, а также препятствует повышению уровня CAR при 72-часовом воздействии донора оксида азота (II) в концентрации 1 мкМ.

5. Ингибирование PXR и CAR оказывает защитное действие и повышает выживаемость клеток при развитии окислительного и нитрозативного стресса.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Воздействие H_2O_2 (для PXR в концентрациях 10-100 мкМ в течение 24 ч, для CAR - 5-50 мкМ в течение 72 ч), МДА (для PXR в концентрации 10 мкМ в течение 24 ч) и битирозином (для PXR в концентрациях 0,4 мМ и 1 мМ в течение 24 ч, для CAR - 0,4 и 1 мМ в течение 72 ч) можно использовать с целью индукции CAR и PXR.

2. Кратковременное воздействие донора NO S-нитрозоглутатиона во всех концентрациях (1-500 мкМ) можно использовать для ингибирования PXR.

3. Воздействие S-нитрозоглутатиона в концентрации 500 мкМ в течение 72 ч можно использовать в целях ингибирования CAR.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Для подтверждения клинической значимости полученных результатов об изменении количества PXR и CAR под действием донора NO необходимо проведение аналогичных клинических исследований с использованием лекарственных препаратов – источников NO.
2. NO-цГМФ сигнальный путь и Nrf2, принимающие участие в регуляции PXR и CAR, могут являться фармакологической мишенью для модулирования данных рецепторов и генов, экспрессия которых контролируется ими.
3. Учитывая показанное *in vitro* влияние H₂O₂ и донора NO на PXR и CAR, целесообразно продолжить изучение их функционирования при заболеваниях, сопровождающихся развитием окислительного и нитрозативного стресса.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

КО – ксантиоксидаза

МДА – малоновый диальдегид

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

НАДФН - никотинамидадениндинуклеотидфосфат

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НС – нитрозативный стресс

НТО – нетранслируемую область

ОС – окислительный стресс

ПКС – протеинкиназа С

ПКГ-1, ПКГ-2 – протеинкиназы G

п.н. – пары нуклеотидов

ПОЛ – перекисное окисление липидов

рГЦ– растворимая гуанилатциклаза

РНК – рибонуклеиновая кислота

СОД – супероксиддисмутаза

ФАД – флавинадениндинуклеотид

ФЕПКС – фосфоенолпируваткарбоксикиназа

ФМН – флавинмононуклеотид

ЭТБЭ – этил-трет-бутиловый эфир

ЯР – ядерные рецепторы

АВСС – АТФ-связывающий кассетный транспортер С2

АФ-1, АФ-2 – домены активаторной функции (англ.: activation function)

АР-1 - активирующий белок-1 (англ. activating protein-1)

АQP – семейство белков-аквапоринов

ARE – элементы антиоксидантного ответа (англ.: antioxidant response elements)

BCRP – белок устойчивости рака молочной железы (англ.: breast cancer resistance protein)

ВНК 21 – линия клеток, полученных из почки золотистого хомячка

Caco-2 – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека (англ.: cancer coli, colon cancer)

CAR – конститутивный андростановый рецептор (англ.: constitutive androstane receptor)

CCRP – белок цитоплазматического удержания CAR (англ.: cytoplasmic accumulation of the nuclear receptor CAR)

CPT1 – карнитинпальмитоилтрансфераза 1

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

CPT1 – карнитинпальмитоилтрансфераза 1 (англ.: carnitine palmitoyltransferase)

CREB – белок, связывающий элемент ответа цАМФ (англ. cAMP response element-binding protein)

CYP3A, CYP3A4, CYP2B, CYP2B6, CYP2C9 – монооксигеназы (изоформы) группы цитохрома P 450

DBD – ДНК-связывающий домен (англ.: DNA binding domain)

DMEM – Дульбекко модифицированная среда Игла

ESI – еноил-КоА изомераза (англ.: enoyl-CoA-Δ isomerase)

eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота II

ERK^{1/2} – внеклеточная регулируемая протеинкиназа ^{1/2} p (англ.: extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2)

FGF19 – фактор роста фибробластов 19 (англ.: fibroblast growth factor 19)

FOXO1 (англ. forkhead box protein O1) - белок O1, являющийся одним из основных регуляторов глюконеогенеза в условиях голодания

GAPDH – первичные антитела к белку домашнего хозяйства

GR – глюкокортикоидный рецептор (англ.: glucocorticoid receptor)

GSK3 – киназа гликогенсинтазы-3 (англ.: glycogen synthase kinase 3)

GSNO – S-нитрозоглутатион

G6Pase – глюкозо-6-фосфатаза (англ.: glucose 6-phosphatase)

GPx – глутатионпероксидаза (англ.: glutathione peroxidase)

GSR – глутатион-дисульфидредуктаза (англ.: glutathione-disulfide reductase)

GSS – глутатионсинтетаза (англ.: glutathione synthetase)

HAT – гистоновая ацетилтрансфераза (англ.: histone acetyltransferase)

HDACs – гистоновые деацетилазы

HepG2 – клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы человека, полученная из тканей печени 15-летнего белого кавказского мужчины с хорошо дифференцированной гепатоцеллюлярной карциномой

HIF-1 α , HIF-4 α - факторы, индуцируемые гипоксией (англ.: hypoxia inducible factor)

HNF4 α – ядерный фактор гепатоцитов 4 α (англ.: hepatocyte nuclear factor)

HREs – элементы гормонального ответа (англ.: hormone response elements)

HSP – белок теплового шока

HSF1 – фактор теплового шока 1 (англ.: heat shock factor 1)

Huh7 – линия клеток печени человека (гепатокарцинома), выделенная из гепатоцитов, первоначально взятых из опухоли печени 57-летнего японского мужчины

I κ B α – ингибитор NF- κ B (англ.: NF- κ B inhibitor α)

Insig-1 – инсулин-индуцированный ген-1

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота II

Keap1 – Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 (англ.: Kelch-like ECH-associated protein 1)

LBD – лиганд-связывающий домен (англ.: ligand binding domain)

LBP – лиганд-связывающий карман (англ.: ligand-binding pocket)

LXR – X-рецептор печени

Maf – семейство Maf-подобных малых белков (англ.: musculoaponeurotic fibrosarcoma)

MAPKs – митоген-активируемые протеинкиназы (англ.: mitogen-activated protein kinase)

MDR1 – белок множественной лекарственной устойчивости 1 (англ.: multidrug resistance protein 1)

МК – митоген-активируемая протеинкиназа

МКК – киназа митоген-активируемой протеинкиназы

МККК – киназа киназы митоген-активируемой протеинкиназы

MRE – микроРНК-ответные элементы (англ.: microRNA response elements)

NAA10 – N- α -ацетилтрансфераза 10 (англ.: N-alpha-acetyltransferase 10).

NCoR – корепрессор ядерного рецептора (англ.: nuclear receptor co-repressor)

NES – сигнал ядерного экспорта (англ.: nuclear export signal)

NF- κ B – ядерного фактора каппа В (англ. nuclear factor kappa B)

NLS – сигнал ядерной локализации (англ.: nuclear localization signal)

nNOS – нейрональная синтаза оксида азота II

NO – оксид азота II

NR (англ. Nuclear Receptor) – ядерный рецептор

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

OATP – органический анион-транспортирующий полипептидный белок (англ.: organic anion transporting polypeptides)

OCT – транспортер органических катионов (англ.: organic cation transporting polypeptides)

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

OONO⁻ – пероксинитрит

PBK/Akt - протеинкиназа В

PBREM – фенобарбитал-чувствительный энхансерный модуль (англ.: phenobarbital-responsive enhancer module)

PCN – прегненолон-16-карбонитрил

PGC1 α – коактиватор γ -рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом (англ.: peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator)

PI3Ks – фосфатидилинозитол-3-киназы (англ.: phosphoinositide 3-kinases)

PLA2 – фосфолипаза A2 (англ.: phospholipase A2)

PP1, PP2A – протеинфосфатаза 1, протеинфосфатаза 2A (англ.: protein phosphatase)

PSH – белки, содержащие тиоловые (-SH) группы

PXR – прегнан X рецептор (англ.: pregnane X receptor)

RXR α – ретиноидный X рецептор α (англ.: retinoid X receptor α)

Prx - пероксиредоксин (англ.: peroxiredoxin)

SIN-1 - S-морфолинозиднонимин

SIRT1 – сиртуин 1

SMRT – медиатор сайленсинга рецепторов ретиноидов и тиреоидных гормонов (англ.: silencing mediator of retinoic acid and thyroid hormone receptor)

SRC – коактиватор стероидных рецепторов (англ.: steroid receptor coactivator)

SREBPs – белки, связывающие регуляторный элемент стеролов (англ.: sterol regulatory element-binding proteins)

SULTs – сульфотрансферазы

SXR – стероидный ксенобиотический рецептор

TP53 – ген-супрессор опухолевого роста (англ.: tumor protein p53)

Trx – тиоредоксин (англ.: thioredoxin),

UGTs – УДФ-глюкуронозилтрансферазы

VDR – рецептор витамина Д

VEGF – эндотелиальный фактор роста сосудов (англ.: vascular endothelial growth factor)

XREs – элементы ксенобиотического ответа (англ.: xenobiotic response elements)

8-OHdG - 8-ОН-дезоксигуанозин (англ.: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S-нитрозоглутатион в высоких концентрациях (75 : 1) ингибирует кислородсвязывающую функцию оксигемоглобина человека / О.В. Путинцева, Е.А. Калаева, В.Г. Артюхов [и др.]. – Текст: непосредственный // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2018. – № 4. – С. 66-72.
2. Влияние монооксида азота на свойства эритроцитарной альдегиддегидрогеназы крыс / А. К. Мартусевич, А. Г. Соловьева, К. Б. Шумаев [и др.]. – Текст: непосредственный // Биорадикалы и антиоксиданты. – 2020. – Т. 7, №4. – С. 20-26.
3. Глебов, А. Н. Патогенез окислительного стресса, индуцированного липополисахаридом / А. Н. Глебов. – Текст: непосредственный // Журнал ГрГМУ. – 2005. – № 2. – С. 3–8.
4. Загоскин, П. П. Желчные кислоты – новый тип стероидных гормонов, регулирующих неспецифические энерготраты организма / П. П. Загоскин, Е. И. Ерлыкина. – Текст: непосредственный // Современные технологии в медицине. – 2020. – Т. 12, №5. – С. 114-128.
5. Зырянов, С. К. Рифаксимин-альфа и другие кристаллические формы рифаксимины: есть ли отличия? / С. К. Зырянов, Е. А. Байбулатова. – Текст: непосредственный // Антибиотики и химиотерапия. – 2020. – Т. 65, №7. – С. 52-62.
6. Киреев, С. С. Экспрессия мРНК NIF-1 α и NIF-3 α , уровень нитротирозина, цГМФ и интерлейкинов в гомогенате мозга монгольских песчанок с острым нарушением мозгового кровотока / С. С. Киреев. – Текст: непосредственный // Вестник новых медицинских технологий. – 2018. – Т. 25, № 1. – С. 79-86.
7. Котова, Ю.А. Изучение маркеров повреждения эндотелия, окислительного и клеточного стресса у больных ИБС и сопутствующим ожирением

/ Ю. А. Котова, А. А. Зуйкова – Текст: непосредственный // Вестник новых медицинских технологий. – 2021. – Т. 28, № 2. – С. 25-28.

8. Кулеш, А. А. Современная концепция нейропротективной терапии в остром периоде ишемического инсульта / А. А. Кулеш. – Текст: непосредственный // Медицинский совет. – 2020. - № 11. – С. 82-91.

9. Мартусевич, А. К. Оксид азота как универсальный биорегулятор / А. К. Мартусевич. – Текст : непосредственный // Биорадикалы и Антиоксиданты. – 2019. – Т. 6, № 1. – С. 5-19.

10. Метаболиты оксида азота при развитии осложнений после открытых реконструктивных вмешательств у пациентов с периферическим атеросклерозом / Р. Е. Калинин, И. А. Сучков, Н. Д. Мжаванадзе [и др.]. – Текст : непосредственный // Наука молодых. – 2021. – Т. 9, № 3. – С. 407-414.

11. Метаболические маркеры и окислительный стресс в патогенезе ожирения у детей / О. В. Поварова, Е. А. Городецкая, Е. И. Каленикова [и др.]. – Текст : непосредственный // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2020. – Т. 65, № 1. – С. 22-29.

12. Метельская, В. А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови человека / В. А. Метельская, Н. Г. Гуманова. – Текст : непосредственный // Клиническая лабораторная диагностика. – 2005. – № 6. – С. 15-18.

13. Метод анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-R *in vitro* / Е. Н. Якушева, А. В. Шулькин, И. В. Черных [и др.]. – Текст : непосредственный // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2019. – Т. 17, № 1. – С. 71-78.

14. Милош, Т. С. Роль оксида азота, окислительного стресса в патогенезе нарушений развития потомства при экспериментальном введении липополисахарида / Т. С. Милош, Н. Е. Максимович, Ю. Г. Куровская. – Текст : непосредственный // Вестник ВГМУ. – 2008. – Т. 7, № 1. – С. 1-10.

15. Моделирование и динамика развития экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro* / Ю. В. Абаленихина, С. К. Правкин, А. В. Щулькин [и др.]. – Текст : непосредственный // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2022. – Т. 25, № 12. – С. 10-17.

16. Молекулярный стресс и хроническое нарушение обмена веществ / Э. А. Юрьева, Н. Н. Новикова, В. В. Длин [и др.]. – Текст : непосредственный // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2020. – Т. 65, № 5. – С. 12-22.

17. Надеев, А. Д. Активные формы кислорода в клетках сердечно-сосудистой системы / А. Д. Надеев, Н. В. Гончаров. – Текст : непосредственный // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2014. - № 4. – С. 80-94.

18. Новиков, В. Е. Роль активных форм кислорода в физиологии и патологии клетки и их фармакологическая регуляция / В. Е. Новиков, О. С. Левченкова, Е. В. Пожилова. – Текст : непосредственный // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2014. - Т. 12, № 4. – С. 13-21.

19. Пожилова, Е. В. Активные формы кислорода в физиологии и патологии клетки / Е. В. Пожилова, В. Е. Новиков, О. С. Левченкова. – Текст : непосредственный // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2015. – Т. 14, № 2. – С. 13-22.

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

21. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с. – Текст: непосредственный.

22. Роль окислительного стресса в патофизиологии кардиоваскулярной патологии / И.В. Демко, Е.А. Собко, И.А. Соловьева [и др.]. – Текст : непосредственный // Вестник современной клинической медицины. – 2022. – Т. 15, № 1. – С. 100-117.

23. Роль оксида азота в патофизиологии и лечении хронической обструктивной болезни легких / О. Ю. Кытикова, Т. А. Гвозденко, М. В. Антонюк [и др.]. – Текст : непосредственный // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – 2019. - № 71. – С. 105-111.

24. Роль оксида азота и эндотелиальной NO-синтазы в канцерогенезе / В. П. Дерягина, Н. И. Рыжова, Л. А. Савлущинская [и др.]. – Текст : непосредственный // Успехи молекулярной онкологии. – 2021. – Т. 8, №2. – С. 29-39.

25. Роль ядерных рецепторов в регуляции биотрансформации ксенобиотиков / С. Н. Ларина, И. В. Игнатъев, Н. В. Чебышев [и др.]. – Текст : непосредственный // Биомедицина. – 2010. – № 1. – С. 5-16.

26. Тасакова, О. С. Биологическая роль тиоредоксин-опосредованной внутриклеточной сигнализации при физиологическом старении / О. С. Тасакова, Н. Н. Голубцова. – Текст : непосредственный // Acta medica Eurasia. – 2023. - № 1. – С. 139-146.

27. Токсические и сигнальные свойства активных форм кислорода / А.Д. Надеев, В.П. Зинченко, П.В. Авдонин [и др.]. – Текст : непосредственный // Токсикологический вестник. – 2014. - № 2. – С. 22-27.

28. Цейликман, В. Э. Влияние окислительного стресса на организм человека / В. Э. Цейликман, А. А. Лукин. – Текст : непосредственный // Международный научно-исследовательский журнал. – 2022. - №3. – С. 206-211.

29. Чаулин, А. М. Статины и окислительный стресс при сердечно-сосудистой патологии / А. М. Чаулин, В. А. Ваньков. – Текст : непосредственный // Бюллетень науки и практики. – 2022. – Т. 8, №6. – С. 398-417.

30. Шаповал, Г.С. Механизмы антиоксидантной защиты организма при действии активных форм кислорода / Г.С. Шаповал, В.Ф. Громова. – Текст : непосредственный // Укр. биохим. журн. – 2003. – Т.75, №2. – С.5-13.

31. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation / Y. Cai, X. Yu, S. Hu [et al.]. – Text: visual // Genomics Proteomics Bioinformatics. – 2009. – Vol. 7, N 4. – P. 147-154.

32. A Small Molecule Inhibits Deregulated NRF2 Transcriptional Activity in Cancer / M. J. Bollong, H. Yun, L. Sherwood [et al.]. – Text: visual // ACS Chem Biol. – 2015. – Vol. 10, N 10. – P. 2193-2198.
33. A structural basis for constitutive activity in the human CAR/RXRalpha heterodimer / R.X. Xu, M. H. Lambert, B. B. Wisely [et al.]. – Text: visual // Mol Cell. – 2004. – Vol. 16, N 6. – P. 919-928.
34. A SUMO-acetyl switch in PXR biology / W. Cui, M. Sun, S. Zhang [et al.]. – Text: visual // Biochim Biophys Acta. – 2016. – Vol. 1859, N 9. – P. 1170-1182.
35. A transcriptional regulatory network containing nuclear receptors and long noncoding RNAs controls basal and drug-induced expression of cytochrome P450s in HepaRG cells / L. Chen, Y. Bao, S. C. Piekos [et al.]. – Text: visual // MolPharmacol. – 2018. – Vol. 94, N 1. – P. 749–759.
36. Acetylation of lysine 109 modulates pregnane X receptor DNA binding and transcriptional activity / D. Pasquel, A. Doricakova, H. Li [et al.]. – Text: visual // Biochim Biophys Acta. – 2016. – Vol. 1859, N 9. – P. 1155-1169.
37. Acetylation of pregnane X receptor protein determines selective function independent of ligand activation / A. Biswas, D. Pasquel, R. K. Tyagi [et al.]. – Text: visual // Biochem Biophys Res Commun. – 2011. – Vol. 406, N 3. – P. 371-376.
38. Activation of nuclear receptor CAR ameliorates diabetes and fatty liver disease / B. Dong, P. K. Saha, W. Huang [et al.]. – Text: visual // Proc Natl Acad Sci USA. – 2009. – Vol. 106, N 44. – P. 18831-18836.
39. Activation of orphan nuclear constitutive androstane receptor requires subnuclear targeting by peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha. A possible link between xenobiotic response and nutritional state / T. Shiraki, N. Sakai, E. Kanaya [et al.]. – Text: visual // J Biol Chem. – 2003. – Vol. 278, N 13. – P. 11344-11350.
40. Advances in our structural understanding of orphan nuclear receptors / N. Gallastegui, J. A. Mackinnon, R. J. Fletterick [et al.]. – Text: visual // Trends Biochem. Sci. – 2015. – Vol. 40, N 1. – P. 25–35.

41. Aleksunes, L. M. Coordinated regulation of hepatic phase I and II drug-metabolizing genes and transporters using AhR-, CAR-, PXR-, PPAR α -, and Nrf2-null mice / L. M. Aleksunes, C. D. Klaassen – Text: visual // Drug Metab Dispos. – 2012. – Vol. 40, N 7. – P. 1366-1379.
42. Allosteric Antagonism of the Pregnane X Receptor (PXR): Current-State-of-the-Art and Prediction of Novel Allosteric Sites. / R. Kamaraj, M. Drastik, J. Maixnerova [et al.]. – Text: visual // Cells. – 2022. – Vol. 11, N 19. – P. 2974.
43. Alp, N. J. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by tetrahydrobiopterin in vascular disease / N. J. Alp, K. M. Channon. – Text: visual // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2004. – Vol. 24, N 3. – P. 413-420.
44. Alternatively spliced isoforms of the human constitutive androstane receptor / S.S. Auerbach, R. Ramsden, M.A. Stoner [et al.]. – Text: visual // Nucleic Acids Res. – 2003. – Vol. 31, N 12. – P 3194-3207.
45. Amadò, R. Dityrosine: in vitro production and characterization / R. Amadò, R. Aeschbach, H. Neukom. – Text: visual // Methods Enzymol. – 1984. – Vol. 107. – P. 377-388.
46. An evolving understanding of the S-glutathionylation cycle in pathways of redox regulation / J. Zhang, Z. W. Ye, S. Singh [et al.]. – Text: visual // Free Radic Biol Med. – 2018. – Vol. 120. – P. 204-216.
47. An integrated bioinformatics platform for investigating the human E3 ubiquitin ligase-substrate interaction network / Y. Li, P. Xie, L. Lu [et al.]. – Text: visual // Nat Commun. – 2017 – Vol. 8, N 1. – P. 347.
48. Antunes, F. Quantitative biology of hydrogen peroxide signaling / F. Antunes, P. M. Brito. – Text: visual // Redox Biol. – 2017. – Vol. 13. – P. 1-7.
49. An Updated Evolutionary Study of the Nuclear Receptor Protein / L. Papageorgiou, L. Shalzi, K. Pierouli [et al.]. - Text: visual // World Acad. Sci. J. – 2021. – Vol. 3. – P. 1–8.
50. Antioxidants and human diseases / P. Rajendran, N. Nandakumar, T. Rengarajan [et al.]. - Text: visual // Clin Chim Acta. – 2014. – N 436. – P. 332-347.

51. Antiproliferation of berberine is mediated by epigenetic modification of constitutive androstane receptor (CAR) metabolic pathway in hepatoma cells / L. Zhang, X.-J. Miao, X. Wang [et al.]. – Text: visual // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 28116.
52. Arral, M. L. Electrochemical Detection of NG-Hydroxy-L-arginine / M. L. Arral, J. M. Halpern – Text: visual // *ECS Trans.* – 2018. – Vol. 85, N 13. – P. 1163-1169.
53. Associations between Pregnane X Receptor and Breast Cancer Growth and Progression / B. A. Creamer, S. N. B. Sloan, J. F. Dennis [et al.]. – Text: visual // *Cells.* – 2020. – Vol. 9, N 10. – P. 2295.
54. Auten, R. L. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details / R. L. Auten, J. M. Davis. – Text: visual // *Pediatr Res.* – 2009. – Vol. 66, N 2. – P. 121-127.
55. Ayala, A. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal / A. Ayala, M. F. Muñoz, S. Argüelles. – Text: visual // *Oxid Med Cell Longev.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 360438.
56. Barbusiński, K. Fenton reaction controversy concerning the chemistry / K. Barbusiński. – Text: visual // *Ecological Chemistry and Engineering Science.* – 2009. – Vol. 16, N 3. – P. 309–314.
57. Bassil, M. Peroxynitrite inhibits the expression of G (i) alpha protein and adenylyl cyclase signaling in vascular smooth muscle cells / M. Bassil, Y. Li, M. B. Anand-Srivastava. – Text: visual // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2008. – Vol. 294, N 2. – P. H775–H784.
58. Bautista-Olivier, C. D. PXR as the tipping point between innate immune response, microbial infections, and drug metabolism / C. D. Bautista-Olivier, G. Elizondo. – Text: visual // *Biochem Pharmacol.* – 2022. – Vol. 202, N 1. – P. 115-147.
59. Bolisetty S., Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology / S. Bolisetty, E. A. Jaimes. – Text: visual // *International Journal of Molecular Science.* – 2013. – Vol. 14. – P. 6306–6344.
60. Biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration / G. Ferrer-Sueta, N. Campolo, M. Trujillo [et al.]. – Text: visual // *Chem Rev.* – 2018. – Vol. 118, N 3. – P. 1338–1408.

61. Boer, T.R. Peroxynitrite-mediated dimerization of 3-nitrotyrosine: unique chemistry along the spectrum of peroxynitrite-mediated nitration of tyrosine / T. R. Boer, R. I. Palomino, P. K. Mascharak. – Text: visual // *Med One*. – 2019. - Vol. 4. – P. e190003.
62. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford. – Text : visual // *Anal Biochem*. – 1976. – Vol. 7, №72. – P. 248-254.
63. Bromuconazole-induced hepatotoxicity is accompanied by upregulation of PXR/CYP3A1 and downregulation of CAR/CYP2B1 gene expression / D. H. Abdelhadya, M. A. El-Magd, Z. I. Elbially [et al.]. – Text: visual // *Toxicol Mech Methods*. – 2017. – Vol. 27, N 7. – P. 544-550.
64. Broniowska K. A. S-nitrosoglutathione / K. A. Broniowska, A. R. Diers, N. Hogg – Text: visual // *Biochim Biophys Acta*. – 2013. – Vol. 1830, N 5. – P. 3173-3181.
65. Buchman, C. D. A current structural perspective on PXR and CAR in drug metabolism / C. D. Buchman, S. C. Chai, T.Chen. – Text: visual // *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. – 2018. – Vol. 14, N 6. – P. 635-647.
66. Building a Chemical Toolbox for Human Pregnane X Receptor Research: Discovery of Agonists, Inverse Agonists, and Antagonists Among Analogs Based on the Unique Chemical Scaffold of SPA70 / Y. Li, W. Lin, W.C. Wright [et al.]. – Text: visual // *J Med Chem*. – 2021. – Vol. 64, N 3. – P. 1733-1761.
67. Burdon, R. H. Cell proliferation and oxidative stress / R. H. Burdon, V. Gill, C. Rice-Evans. – Text: visual // *Free Radic Res Commun*. – 1989. – Vol. 7. – P. 149-159.
68. Chai, S. C. Strategies for Developing Pregnane X Receptor Antagonists: Implications from Metabolism to Cancer / S. C. Chai, W.C. Wright, T. Chen. – Text: visual // *Med. Res. Rev*. – 2020. – Vol. 40. – P. 1061–1083.
69. Chai, X. Nuclear receptors PXR and CAR: implications for drug metabolism regulation, pharmacogenomics and beyond / X. Chai, S. Zeng, W. Xie. – Text: visual // *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. – 2013. – Vol. 9, N 3. – P. 253-266.
70. Chakravarti, B. Protein Tyrosine Nitration: Role in Aging / B. Chakravarti, D. N. Chakravarti. – Text: visual // *Curr Aging Sci*. –2017. - Vol.10, N 4. – P. 246-262.

71. Chang, T.K. Synthetic drugs and natural products as modulators of constitutive androstane receptor (CAR) and pregnane X receptor (PXR) / T.K. Chang, D. J. Waxman. – Text: visual // *Drug Metab Rev.* – 2006. – Vol. 38, N 1-2. – P. 51-73.
72. Characterization of human pregnane X receptor activators identified from a screening of the Tox21 compound library / C. Lynch, S. Sakamuru, R. Huang [et al.]. – Text: visual // *Biochem Pharmacol.* – 2021. – Vol. 184. – P. 114368.
73. Characterization of nuclear localization signals and cytoplasmic retention region in the nuclear receptor CAR / Y. Kanno, M. Suzuki, T. Nakahama [et al.]. – Text: visual // *Biochim Biophys Acta.* – 2005. – Vol. 1745, N 2. – P. 215-222.
74. Characterization of PXR mediated P-glycoprotein regulation in intestinal LS174T cells / B. P. Kota, V. H. Tran, J. Allen [et al.]. – Text: visual // *Allen Pharmacol Res.* – 2010. – Vol. 62, N 5. – P. 426-431.
75. Chemical Activation of the Constitutive Androstane Receptor Leads to Activation of Oxidant-Induced Nrf2 / J.P. Rooney, K. Oshida, R. Kumar [et al.]. – Text: visual // *Toxicol Sci.* – 2019. – Vol. 167, N 1. – P. 172-189.
76. Chen, J. D. A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors / J. D. Chen, R. M. Evans. – Text: visual // *Nature.* – 1995. – Vol. 377. – P. 454-457.
77. Cherian, M.T. Small-molecule modulators of the constitutive androstane receptor / M. T. Cherian, S. C. Chai, T. Chen. – Text: visual // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* – 2015. – Vol. 11, N 7. – P. 1099-1114.
78. CINPA1 is an inhibitor of constitutive androstane receptor that does not activate pregnane X receptor / M.T. Cherian, W. Lin, J. Wu, T. Chen. – Text : visual // *Mol. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 87, №5. – P. 878-89.
79. Constitutive androstane receptor (CAR) is a xenosensor and target for therapy / E.M. Kachaylo, V.O. Pustylnyak, V.V. Lyakhovich [et al.]. – Text: visual // *Biochemistry (Mosc).* – 2011. – Vol. 76, N 10. – P. 1087-1097.
80. CYP3A5 mediates basal and acquired therapy resistance indifferent subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma / E. M. Noll, C. Eisen, A. Stenzinger [et al.]. – Text: visual // *NatMed.* – 2016. – Vol. 22, N 3. – P. 278–287.

81. Daujat-Chavanieu, M. Regulation of CAR and PXR Expression in Health and Disease / M. Daujat-Chavanieu, S. Gerbal-Chaloin. – Text: visual // *Cells*. – 2020. – Vol. 9, N 11. – P. 2395.
82. Deciphering the roles of the constitutive androstane receptor in energy metabolism / J. Yan, B. Chen, J. Lu [et al.]. – Text: visual // *Acta Pharmacol Sin*. – 2015. – Vol. 36, N 1. – P. 62-70.
83. Dephosphorylation of threonine 38 is required for nuclear translocation and activation of human xenobiotic receptor CAR (NR1I3) / S. Mutoh, M. Osabe, K. Inoue [et al.]. – Text: visual // *J Biol Chem*. – 2009. – Vol. 284. – P. 34785 – 34792.
84. de Vera, I. M. S. Advances in Orphan Nuclear Receptor Pharmacology: A New Era in Drug Discovery / I. M. S. de Vera. – Text: visual // *ACS Pharmacol Transl Sci*. – 2018. – Vol. 1, N 2. – P. 134-137.
85. Dexamethasone enhances constitutive androstane receptor expression in human hepatocytes: Consequences on cytochrome P450 gene regulation / J.-M. Pascussi, S. Gerbal-Chaloin, J.-M. Fabre [et al.]. – Text: visual // *Mol. Pharmacol*. – 2000. – Vol. 58, N 6. – P. 1441–1450.
86. Dhiman, V.K. Nuclear receptors in cancer - uncovering new and evolving roles through genomic analysis. / V.K. Dhiman, M. J. Bolt, K. P. White. – Text: visual // *Nat Rev Genet*. – 2018. – Vol. 19, N 3. – P. 160-174.
87. Dietary Dityrosine Induces Mitochondrial Dysfunction by Diminished Thyroid Hormone Function in Mouse Myocardia / Y. Lu, S. Ma, X. Tang [et al.]. – Text: visual // *J Agric Food Chem*. – 2020. - Vol. 68, N 34. – P. 9223–9234.
88. Ding, X. Induction of drug metabolism by forskolin: the role of the pregnane X receptor and the protein kinase a signal transduction pathway / X. Ding, J. L. Staudinger. – Text: visual // *J Pharmacol Exp Ther*. – 2005. – Vol. 312, N 2. – P. 849-856.
89. Ding, X. Repression of PXR-mediated induction of hepatic CYP3A gene expression by protein kinase C / X. Ding, J. L. Staudinger. – Text: visual // *Biochem Pharmacol*. – 2005. – Vol. 69, N 5. – P. 867-873.

90. Discovery of Novel Human Constitutive Androstane Receptor Agonists with the Imidazo[1,2-*a*]pyridine Structure / I. Mejdrová, J. Dušek, K. Škach [et al.]. – Text: visual // *J Med Chem.* – 2023. – Vol. 66, N 4. – P. 2422-2456.
91. Dityrosine crosslinking of collagen and amyloid- β peptides is formed by vitamin B12 deficiency-generated oxidative stress in *Caenorhabditis elegans* / K. Koseki, A. Yamamoto, K. Tanimoto [et al.] – Text: visual // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, N 23. – P. 12959.
92. Dong, B. Constitutive androstane receptor mediates the induction of drug metabolism in mouse models of type 1 diabetes / B. Dong, M. Qatanani, D. D. Moore. – Text: visual // *Hepatology.* – 2009. – Vol. 50, N 2. – P. 622-629.
93. Drug Development - A Case Study Based Insight into Modern Strategies / S. S. Ong, Y.-M. Wang, S. C. Chai, T. Chen. – London: InTech, 2011. – P. 337-364. – Text: visual.
94. Effects and Mechanism of Nano-Copper Exposure on Hepatic Cytochrome P450 Enzymes in Rats / H. Tang, M. Xu, F. Shi [et al.]. – Text: visual // *Int J Mol Sci.* – 2018. – Vol. 19, N 7. – P. 2140.
95. Elias, A. Tumor suppressor protein p53 negatively regulates human pregnane X receptor activity / A. Elias, J. Wu, T. Chen. – Text: visual // *Mol Pharmacol.* – 2013. – Vol. 83, N 6. – P. 1229-36.
96. Evolution of promiscuous nuclear hormone receptors: LXR, FXR, VDR, PXR, and CAR / M. D. Krasowski, A. Ni, L. R. Hagey [et al.]. – Text: visual // *Mol Cell Endocrinol.* – 2011. – Vol. 334, N 1-2. – P. 39-48.
97. Expression variability of absorption, distribution, metabolism, excretion-related microRNAs in human liver: influence of nongenetic factors and association with gene expression / J. K. Rieger, K. Klein, S. Winter [et al.]. – Text: visual // *Drug Metab Dispos.* – 2013. – Vol. 41, N 10. – P. 1752-1762.
98. Flavonoids activate pregnane x receptor-mediated CYP3A4 gene expression by inhibiting cyclin-dependent kinases in HepG2 liver carcinoma cells / H. Dong, W. Lin, J. Wu [et al.]. – Text: visual // *BMC Biochem.* – 2010. – Vol. 11. - P. 23.

99. Forman, H. J. Signaling functions of reactive oxygen species / H. J. Forman, M. Maiorino, F. Ursini. – Text: visual // *Biochemistry*. – 2010. – Vol. 49, N 5. – P. 835-42.
100. Furukawa, M. BTB protein Keap1 targets antioxidant transcription factor Nrf2 for ubiquitination by the cullin 3-Roc1 ligase / M. Furukawa, Y. Xiong. – Text: visual // *Molecular and Cellular Biology*. - 2005. – Vol. 25, N 1. – P. 162–171.
101. Giguere, V. Orphan nuclear receptors:from gene to function / V. Giguere. – Text: visual // *Endocr Rev*. – 1999. – Vol. 20, N 5. – P. 689-725.
102. Glutathione Protects against Paraquat-Induced Oxidative Stress by Regulating Intestinal Barrier, Antioxidant Capacity, and CAR Signaling Pathway in Weaned Piglets / X. Xiang, H. Wang, W. Zhou [et al.]. – Text: visual // *Nutrients*. – 2022. – Vol. 15, N 1. – P. 198.
103. Gustafsson, J. A. Historical overview of nuclear receptors / J. A. Gustafsson. – Text: visual // *J Steroid Biochem Mol Biol*. – 2016. – Vol. 157. – P. 3-6.
104. Halliwell, B. Biochemistry of oxidative stress / B. Halliwell. – Text: visual // *Biochemical Society Transactions*. – 2007. – Vol. 35. – P. 1147–1150.
105. Hay, R. T. SUMO-specific proteases: a twist in the tail / R. T. Hay. – Text: visual // *Trends Cell Biol*. – 2007. – Vol. 17, N 8. – P. 370-376.
106. Hayes, J. D. NRF2 and KEAP1 mutations: permanent activation of an adaptive response in cancer / J. D. Hayes, M. McMahon. – Text: visual // *Trends Biochem Sci*. – 2009. – Vol. 34, N 4. – P. 176-188.
107. Heterodimerization of Retinoid X Receptor with Xenobiotic Receptor partners occurs in the cytoplasmic compartment: Mechanistic insights of events in living cells / A. K. Dash, A. S. Yende, B. Jaiswal [et al.]. – Text: visual // *Exp Cell Res*. – 2017. – Vol. 360, N 2. – P. 337-346.
108. Hoffmann, J. M. and Partridge L. Nuclear hormone receptors: Roles of xenobiotic detoxification and sterol homeostasis in healthy aging / J. M. Hoffmann, L.

Partridge. – Text: visual // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2015. - Vol. 50, N 5. – P. 380–392.

109. Honkakoski, P. Searching for Constitutive Androstane Receptor Modulators / P. Honkakoski. – Text: visual // *Drug Metab Dispos.* – 2022. – Vol. 50, N 7. – P. 1002-1009.

110. Human constitutive androstane receptor represses liver cancer development and hepatoma cell proliferation by inhibiting erythropoietin signaling / Z. Li, S. M. Kwon, D. Li [et al.]. – Text: visual // *Biol Chem.* – 2022. – Vol. 298, N 5. – P. 101885.

111. Hwang, T.L. Comparison of two soluble guanylyl cyclase inhibitors, methylene blue and ODQ, on sodium nitroprusside-induced relaxation in guinea-pig trachea / T.L. Hwang, C.C. Wu, C.M. Teng. – Text : visual // *Br. J. Pharmacol.* – 1998. – Vol. 125. – P. 1158-1163.

112. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors / H. S. Marinho, C. Real, L. Cyrne [et al.]. – Text: visual // *Redox Biol.* – 2014. – Vol. 2. – P. 535-562.

113. Identification of PXR Activators from *Uncaria Rhynchophylla* (Gou Teng) and *Uncaria TomENTOSA* (Cat's Claw) / S. Lei, J. Lu, A. Cheng [et al.]. – Text: visual // *Drug Metab Dispos.* – 2023. – Vol. 51, N 5. – P. 629-636.

114. Identification of the nuclear receptor CAR: HSP90 complex in mouse liver and recruitment of protein phosphatase 2A in response to phenobarbital / K. Yoshinari, K. Kobayashi, R. Moore [et al.]. – Text: visual // *FEBS Letters.* – 2003. – Vol. 548, N 1–3. – P. 17–20.

115. Identifying CAR Modulators Utilizing a Reporter Gene Assay / C. Lynch, J. Zhao, H. Wang [et al.]. – Text: visual // *Methods Mol Biol.* – 2022. – Vol. 2474. – P. 29-38.

116. In silico and in vitro identification of microRNAs that regulate hepatic nuclear factor 4 α expression / A. Ramamoorthy, L. Li, A. Gaedigk [et al.]. – Text: visual // *Drug Metab Dispos.* – 2012. – Vol. 40, N 4. – P. 726-733.

117. Individualized pathway activity algorithm identifies oncogenic pathways in pan-cancer analysis / X. Ke, H. Wu, Y. X. Chen [et al.]. – Text: visual // EBioMedicine. – 2022. – Vol. 79. – P. 104014.

118. Induction of bilirubin clearance by the constitutive androstane receptor (CAR) / W. Huang, J. Zhang, S. S. Chua [et al.]. – Text: visual // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. – Vol. 100. – P. 4156–4161.

119. Interaction of the malonyldialdehyde molecule with membranes. A differential scanning calorimetry, ¹H-, ³¹P-NMR and ESR study / J. C. Debouzy, F. Fauvelle, H. Vezin [et al.]. – Text: visual // Biochem Pharmacol. – 1992. – Vol. 44, N 9. – P. 1787-1793.

120. Interleukin 1beta inhibits CAR-induced expression of hepatic genes involved in drug and bilirubin clearance / E. Assenat, S. Gerbal-Chaloin, D. Larrey, [et al.]. – Text: visual // Hepatology. – 2004. – Vol. 40, N 4. – P. 951–960.

121. International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan nuclear receptors / G. Benoit, A. Cooney, V. Giguere [et al.]. – Text: visual // Pharmacol Rev. – 2006. – Vol. 58, N 4. – P. 798-836.

122. Interplay between the nuclear receptor pregnane X receptor and the uptake transporter organic anion transporter polypeptide 1A2 selectively enhances estrogen effects in breast cancer / H.E. Meyer zu Schwabedissen, R.G. Tirona, C.S. Yip [et al.]. – Text: visual // Cancer Res. – 2008. – Vol. 68, N 22. – P. 9338-9347.

123. Intracellular localization of pregnane X receptor in HepG2 cells cultured by the hanging drop method / K. Yokobori, K. Kobayashi, I. Azuma [et al.]. – Text: visual // Drug Metab.Pharmacokinet. – 2017. – Vol. 32. – P. 265–272.

124. Involvement of hepatocyte nuclear factor 4 alpha in transcriptional regulation of the human pregnane X receptor gene in the human liver/ N . Iwazaki, K. Kobayashi, K. Morimoto [et al.]. – Text: visual // Drug Metab Pharmacokinet. – 2008. – Vol. 23, N 1. – P. 59–66.

125. Involvement of promoter methylation in the regulation of Pregnane X receptor in colon cancer cells / W. Habano, T. Gamo, J. Terashima [et al.]. – Text: visual // BMC Cancer. – 2011. – Vol. 11. – P. 81.

126. Irinotecan induces steroid and xenobiotic receptor (SXR) signaling to detoxification pathway in colon cancer cells / A. Basseville, L. Preisser, S. de Carné Trécesson [et al.]. – Text: visual // *Mol Cancer*. – 2011. – Vol. 10. – P. 80.

127. Jackson, M.J. Control of Reactive Oxygen Species Production in Contracting Skeletal Muscle / M.J. Jackson. – Text: visual // *Antioxid. Redox Signal*. – 2011. – Vol. 15. – P. 2477–2486.

128. Jain, A. K. Jaiswal AK. GSK-3beta acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2 / A. K. Jain, A. K. Jaiswal. – Text: visual // *J Biol Chem*. – 2007. – Vol. 282, N 22. – P. 16502-16510.

129. Jung, K.-A. The Nrf2 system as a potential target for the development of indirect antioxidants / K.-A. Jung, M.-K. Kwak. – Text: visual // *Molecules*. – 2010. – Vol. 15, N 10. – P. 7266–7291.

130. Kachaylo, E. M. Constitutive androstane receptor activation by 2,4,6-triphenyldioxane-1,3 suppresses the expression of the gluconeogenic genes / E. M. Kachaylo, A. A. Yarushkin, V. O. Pustyl'nyak. - Text: visual // *Eur J Pharmacol*. – 2012. – Vol. 679, N 1. – P. 139-43.

131. Karpale, M. Nuclear Receptor PXR in Drug-Induced Hypercholesterolemia / M. Karpale, J. Hukkanen, J. Hakkola. – Text: visual // *Cells*. – 2022. – Vol. 11, N 3. – P. 313.

132. Kaspar, J. W. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress / J. W. Kaspar, S. K. Niture, A. K. Jaiswal. – Text: visual // *Free Radic Biol Med*. – 2009. – Vol. 47, N 9. – P. 1304-1309.

133. Kensler, T. W. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway / N. Wakabayashi, S. Biswal. – Text: visual // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. – 2007. – Vol. 47. – P. 89-116.

134. Ketoconazole and miconazole are antagonists of the human glucocorticoid receptor: Consequences on the expression and function of the constitutive androstane receptor and the pregnane X receptor / C. Duret, M. Daujat-Chavanieu, J.-M. Pascussi [et al.]. – Text: visual // *Mol. Pharmacol*. – 2006. – Vol. 70, N 1. – P. 329–339.

135. Kininis, M. A global view of transcriptional regulation by nuclear receptors: gene expression, factor localization, and DNA sequence analysis / M. Kininis, W. L. Kraus. – Text: visual // Nucl Recept Signal. – 2008. – Vol. 6, N 1. - P.e005.
136. Klotz, L.O. Peroxynitrite signaling: receptor tyrosine kinases and activation of stress-responsive pathways / L.O. Klotz, P. Schroeder, H. Sies. – Text: visual // Free Radic Biol Med. – 2002. – Vol. 33, N 6. – P. 737-743.
137. Kupffer cells and reactive oxygen species partially mediate lipopolysaccharide-induced downregulation of nuclear receptor pregnane x receptor and its target gene CYP3a in mouse liver / D. X. Xu, W. Wei, M. F. Sun [et al.]. – Text: visual // Free Radic Biol Med. – 2004. – Vol. 37, N 1. – P. 10-22.
138. Lamba, J. Genetic variants of PXR (NR1I2) and CAR (NR1I3) and their implications in drug metabolism and pharmacogenetics / J. Lamba, V. Lamba, E. Schuetz. – Text: visual // Curr Drug Metab. – 2005. – Vol. 6, N 4. – P. 369-383.
139. Lancaster, J.R. Nitroxidative, Nitrosative, and Nitritative Stress: Kinetic Predictions of Reactive Nitrogen Species Chemistry Under Biological Conditions / J.R. Lancaster. – Text: visual // Chem. Res. Toxicol. – 2006. – Vol. 19. – P. 1160–1174.
140. Lee, J. Reactive Oxygen Species, Aging, and Antioxidative Nutraceuticals / J. Lee, N. Koo, D. B. Min. – Text: visual // Compr Rev Food Sci Food Saf. – 2004. – Vol. 3, N 1. – P. 21-33.
141. Li, J. Current experimental strategies for intracellular target identification of microRNA. / J. Li, Y. Zhang. – Text: visual // ExRNA. – 2019. – Vol. 1, N 6. – P. 1-8.
142. Liaudet, L. Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways / L. Liaudet, G. Vassalli, P. Pacher. – Text: visual // Front Biosci (Landmark Ed). – 2009. – Vol. 14, N 12. – P. 4809-4814.
143. Lichti-Kaiser, K. Cyclic AMP-dependent protein kinase signaling modulates pregnane x receptor activity in a species-specific manner / K. Lichti-Kaiser, C. Xu, J. L. Staudinger. – Text: visual // J Biol Chem. – 2009. – Vol. 284, N 11. – P. 6639-6649.

144. Lismont, C. Peroxisomal Hydrogen Peroxide Metabolism and Signaling in Health and Disease / C. Lismont, I. Revenco, M. Fransen. – Text: visual // *Int J Mol Sci.* – 2019. – Vol. 20, N 15. – P. 3673.

145. Liu, T. A concise review on hPXR ligand-recognizing residues and structure-based strategies to alleviate hPXR transactivation risk / T. Liu, J. P. Beck, J. Hao. – Text: visual // *RSC Med Chem.* – 2022. - Vol. 13, N 2. – P. 129-137.

146. Lobysheva, I.I. Interaction of peroxyxynitrite and hydrogen peroxide with dinitrosyl iron complexes containing thiol ligands in vitro / I.I. Lobysheva, V.A. Serezhenkov, A.F. Vanin. – Text : visual // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 64. – P. 194-200.

147. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase / N. Ramachandran, P. Root, X. M. Jiang [et al.]. – Text: visual // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. – Vol. 98, N 17. – P. 9539-9544.

148. Mellor, H. R. Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response / H. R. Mellor, R. Callaghan. – Text: visual // *Pharmacology.* – 2008. – Vol. 81, N 4. – P. 275-300.

149. Methylation-associated silencing of the nuclear receptor 112 gene in advanced-type neuroblastomas, identified by bacterial artificial chromosome array-based methylated CpG island amplification / A. Misawa, J. Inoue, Y. Sugino [et al.]. – Text: visual // *Cancer Res.* – 2005. – Vol. 65, N 22. – P. 10233-10242.

150. Microtubule-targeting anticancer drug eribulin induces drug efflux transporter P-glycoprotein / T. Nabekura, T. Kawaski, Jimura M. [et al.]. – Text: visual // *Biochem. Biophys. Rep.* – 2020. – Vol. 21. – P. 100727.

151. Mihara, M. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication, and vitamin E deficiency / M. Mihara, M. Uchiyama, K. Fukuzawa. – Text : visual // *Biochem Med.* – 1980. – Vol. 23, N 3. – P. 302-311.

152. MicroRNA-140-3p enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to sorafenib by targeting pregnenolone X receptor / J. Li, J. Zhao, H. Wang [et al.]. – Text : visual // *Onco Targets Ther.* – 2018. – Vol. 11. – P. 5885-5894.

153. Min, G. Glucocorticoid receptor-interacting protein 1 mediates ligand-independent nuclear translocation and activation of constitutive androstane receptor in vivo / G. Min, K. Kemper, B. Kemper. – Text: visual // *Journal of Biological Chemistry.* – 2002. – Vol. 277, N 29. – P. 26356-26363.

154. Mode of action of ethyl tertiary-butyl ether hepatotumorigenicity in the rat: evidence for a role of oxidative stress via activation of CAR, PXR and PPAR signaling pathways / A. Kakehashi, A. Hagiwara, N. Imai [et al.]. – Text: visual // *Toxicol Appl Pharmacol.* – 2013. – Vol. 273, N 2. – P. 390-400.

155. Molecular basis of crosstalk in nuclear receptors: heterodimerization between PXR and CAR and the implication in gene regulation / M. N. Bwayi, E. Garcia-Maldonado, S. C. Chai [et al.]. – Text: visual // *Nucleic Acids Res.* – 2022. – Vol. 50, N 6. P. 3254-3275.

156. Molecular mechanism investigation of phenobarbital-induced serum cholesterol elevation in rat livers by microarray analysis / N. Kiyosawa, K. Tanaka, J. Hirao [et al.]. – Text: visual // *Arch Toxicol.* – 2004. – Vol. 78, N 8. – P. 435-442.

157. Moncada, S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology / S. Moncada, R. M. Palmer, E. A. Higgs. – Text: visual // *Pharmacol Rev.* – 1991. – Vol. 43, N 2. – P. 109-142.

158. Mukha, A. Splice variants of metabolic nuclear receptors: Relevance for metabolic disease and therapeutic targeting / A. Mukha, E. Kalkhoven, S. W. C. van Mil. – Text: visual // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* – 2021. – Vol. 1867, N 10. – P. 166183.

159. Multiple microRNAs function as self-protective modules in acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans / D. Yu, L. Wu, P. Gill [et al.]. – Text: visual // *Arch Toxicol.* – 2018. - Vol. 92, N 2. – P. 845–858.

160. Mutation of a single amino acid of pregnane X receptor switches an antagonist to agonist by altering AF-2 helix positioning / A.D. Huber, W.C. Wright, W. Lin [et al.]. – Text: visual // *Cell Mol Life Sci.* – 2021. – Vol. 78, N 1. – P. 317-335.

161. Negative regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA-18a-5p: evidence for suppression of microRNA-18a-5p expression by rifampin and rilpivirine / D. Sharma, A. A. Turkistani, W. Chang [et al.]. – Text: visual // *Mol Pharmacol.* – 2017. – Vol. 92, N 1. – P. 48–56.

162. Ngo, V. Nrf2 and Oxidative Stress: A General Overview of Mechanisms and Implications in Human Disease / V. Ngo, M. L. Duennwald. – Text: visual // *Antioxidants (Basel)*. – 2022. – Vol. 11, N 12. – P. 2345.

163. Nitrosative Stress and Its Association with Cardiometabolic Disorders / I. Pérez-Torres, L. Manzano-Pech, M. E. Rubio-Ruíz [et al.] – Text: visual // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, N 11. – P. 2555.

164. Nuclear receptors CAR and PXR: Molecular, functional, and biomedical aspects / A. di Masi, E. De Marinis, P. Ascenzi [et al.]. – Text: visual // *Mol Aspects Med.* – 2009. – Vol. 30, N 5. – P. 297-343.

165. Off-target lipid metabolism disruption by the mouse constitutive androstane receptor ligand TCPOBOP in humanized mice / J. Skoda, K. Dohnalova, K. Chalupsky [et al.]. – Text: visual // *Biochem Pharmacol.* -2022. – Vol. 197. – P. 114905.

166. Oladimeji, P.O. PXR: More Than Just a Master Xenobiotic Receptor / P.O. Oladimeji, T. Chen. – Text: visual // *Mol Pharmacol.* – 2018. – Vol. 93, N 2. – P. 119-127.

167. Osabe, M. Active ERK1/2 protein interacts with the phosphorylated nuclear constitutive active/androstane receptor (CAR; NR1I3), repressing dephosphorylation and sequestering CAR in the cytoplasm / M. Osabe, M. Negishi. – Text: visual // *J Biol Chem.* – 2011. – Vol. 286. – P. 35763 – 35769.

168. Overexpression of human catalase inhibits proliferation and promotes apoptosis in vascular smooth muscle cells / M. R. Brown, F. J. Jr. Miller, W. G. Li [et al.]. – Text: visual // *Circ Res.* -1999. – Vol. 85, N 6. – P. 524-533.

169. Oxidative stress, aging, and diseases / I. Liguori, G. Russo, F. Curcio [et al.]. – Text: visual // *Clin Interv Aging*. – 2018. – Vol. 13. – P. 757-772.

170. Oxidative Stress in Cancer Cell Metabolism / S. Arfin, N. K. Jha, S. K. Jha [et al.]. – Text: visual // *Antioxidants (Basel)*. – 2021. – Vol. 10, N 5. – P. 642.

171. Parascandolo, A. Carcinogenesis and Reactive Oxygen Species Signaling: Interaction of the NADPH Oxidase NOX1-5 and Superoxide Dismutase 1-3 Signal Transduction Pathways / A. Parascandolo, M. O. Laukkanen. – Text: visual // *Antioxid Redox Signal*. – 2019. – Vol. 30, N 3. – P. 443-486.

172. Paszek, M. NRF2-Independent Regulation of Intestinal Constitutive Androstane Receptor by the Pro-Oxidants Cadmium and Isothiocyanate in *hUGT1* Mice / M. Paszek, R. H. Tukey. – Text: visual // *Drug Metab Dispos*. – 2020. – Vol. 48, N 1. – P. 25-30.

173. Pérez-Torres, I. Reductive Stress in Inflammation-Associated Diseases and the Pro-Oxidant Effect of Antioxidant Agents / I. Pérez-Torres, V. Guarner-Lans, M.E. Rubio-Ruiz. – Text: visual // *Int. J. Mol. Sci*. – 2017. – Vol. 18. – P. 2098.

174. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence / R. Radi, T. P. Cosgrove, J. S. Beckman [et al.] – Text: visual // *Biochem J*. – 1993. – Vol. 290, N 1. – P. 51-57.

175. Phosphorylation Modulates the Coregulatory Protein Exchange of the Nuclear Receptor Pregnane X Receptor / W. Cui, X. Shen, E. Agbas [et al.]. – Text: visual // *J Pharmacol Exp Ther*. – 2020. – Vol. 373, N 3. – P. 370-380.

176. Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P450 3A4 / S. Takagi, M. Nakajima, T. Mohri [et al.]. – Text: visual // *J Biol Chem*. – 2008. – Vol. 283, N 15. – P. 9674–9680.

177. Poudel, S. Regulation of Nuclear Receptors PXR and CAR by Small Molecules and Signal Crosstalk: Roles in Drug Metabolism and Beyond / S. Poudel, A. D. Huber, T. Chen. – Text: visual // *Drug Metab Dispos*. – 2023. – Vol. 51, N 2. – P. 228-236.

178. Powers, S.K. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production / S.K. Powers, M.J. Jackson. – Text: visual // *Physiol. Rev.* – 2008. – Vol. 88. – P. 1243–1276.

179. Pregnane X receptor activation and silencing promote steatosis of human hepatic cells by distinct lipogenic mechanisms / A. Bitter, P. Rummele, K. Klein [et al.]. – Text: visual // *Arch Toxicol.* – 2015. – Vol. 89, N 11. – P. 2089–2103.

180. Pregnane X Receptor Activation Attenuates Inflammation-Associated Intestinal Epithelial Barrier Dysfunction by Inhibiting Cytokine-Induced Myosin Light-Chain Kinase Expression and c-Jun N-Terminal Kinase 1/2 Activation / A. Garg, A. Zhao, S. L. Erickson [et al.]. – Text: visual // *Erickson Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.* -2016. – Vol. 359, N 1. – P. 91–101.

181. Pregnane X receptor activation induces FGF19-dependent tumor aggressiveness in humans and mice / H. Wang, M. Venkatesh, H. Li [et al.]. – Text: visual // *J. Clin. Investig.* – 2011. – Vol. 121. – P. 3220–3232.

182. Pregnane X Receptor Activation in Liver Perfusion / S. Moulding, R. Figueiredo, A. Sewpaul [et al.]. – Text: visual // *Transplant Proc.* – 2022. – Vol. 54, N 3. – P. 600-604.

183. Pregnane X receptor agonists impair postprandial glucose tolerance / J. Rysä, M. Buler, M. J. Savolainen [et al.]. – Text: visual // *Clin Pharmacol Ther.* – 2013. – Vol. 93, N 6. – P. 556-563.

184. Pregnane X receptor (PXR) deficiency protects against spinal cord injury by activating NRF2/HO-1 pathway / L. N. Xuan, Z. X. Hu, Z. F. Jiang [et al.]. – Text: visual // *CNS Neurosci Ther.* – 2023. – P. 1–19.

185. Pregnane X receptor regulates drug metabolism and transport in the vasculature and protects from oxidative stress / K. E. Swales, R. Moore, N. J. Truss [et al.]. – Text: visual // *Cardiovasc Res.* – 2012. – Vol. 93, N 4. – P. 674-681.

186. Pregnane X Receptor Regulates Liver Size and Liver Cell Fate by Yes-Associated Protein Activation in Mice / Y. Jiang, D. Feng, X. Ma [et al.]. – Text: visual // *Hepatology.* – 2019. – Vol. 69. – P. 343–358.

187. Promotion of NR1I3-mediated liver growth is accompanied by STAT3 activation / M. E. Mazin, A. A. Yarushkin, Y. A. Pustyl'nyak [et al.]. – Text: visual // *Mol Biol Rep.* – 2022. – Vol. 49, N 5. – P.4089-4093.

188. Proteasomal interaction as a critical activity modulator of the human constitutive androstane receptor / T. Chen, E. M. Laurenzana, D. M. Coslo [et al.]. – Text: visual // *Biochem J.* – 2014. - Vol. 458, N 1. – P. 95–107.

189. Pryor, W. A. The chemistry of peroxyxynitrite: A product from the reaction of nitric oxide with superoxide / W. A. Pryor, G. L. Squadrito. – Text: visual // *American Journal of Physiology.* – 1995. – Vol. 268. – P. 699– 722.

190. Pustyl'nyak, V.O. Induction of cytochrome P4502B: role of regulatory elements and nuclear receptors / V.O. Pustyl'nyak, L.F. Gulyaeva, V. V. Lyakhovich. – Text: visual // *Biochemistry (Mosc).* – 2007. – Vol. 72, N 6. – P. 608-617.

191. PXR (NR1I2): splice variants in human tissues, including brain, and identification of neurosteroids and nicotine as PXR activators / V. Lamba, K. Yasuda, J.K. Lamba [et al.]. – Text: visual // *Toxicol Appl Pharmacol.* -2004. – Vol. 199, N 3. – P. 251-265.

192. PXR interaction with p53: a meeting of two masters / D. Robbins, J. Bakke, M. T. Cherian [et al.]. – Text: visual // *Cell Death Dis.* – 2016. – Vol. 7, N 5. – P. e2218.

193. PXR triggers YAP-TEAD binding and Sirt2-driven YAP deacetylation and polyubiquitination to promote liver enlargement and regeneration in mice / S. Zhang, M. Guo, X. Jiang [et al.]. – Text: visual // *Pharmacol Res.* – 2023. – Vol. 188. – P. 106666.

194. Ranhotra, H. S. The orphan nuclear receptors in cancer and diabetes / H. S. Ranhotra. – Text: visual // *Journal of Receptors and Signal Transduction.* – 2013. – Vol. 33, N 4. – P. 207-212.

195. Raucy, J.L. Cell-based systems to assess nuclear receptor activation and their use in drug development / J.L. Raucy, J.M. Lasker. – Text: visual // *Drug Metab Rev.* – 2013. – Vol. 45, N 1. – P. 101-109.

196. RBCK1, an E3 ubiquitin ligase, interacts with and ubiquitinates the human pregnane X receptor / R. Rana, S. Coulter, H. Kinyamu [et al.]. – Text: visual // *Drug Metab Dispos.* – 2013. – Vol. 41, N 2. – P. 398-405.

197. Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation / D. Gérard-Monnier, I. Erdelmeier, K. Régnard. – Text: visual // *Chem Res Toxicol.* – 1998. – Vol. 11, N 10. – P. 1176-83.

198. Reactive nitrogen species-induced cell death requires Fas-dependent activation of c-Jun N-terminal kinase / P. Shrivastava, C. Pantano, R. Watkin [et al.]. – Text: visual // *Mol Cell Biol.* – 2004. – Vol. 24, N 15. – P. 6763–6772.

199. Reactive Oxygen Species (ROS): Key Components in Cancer Therapies / B. M. Sahoo, B. K. Banik, P. Borah [et al.]. – Text: visual // *Anticancer Agents Med Chem.* – 2022. – Vol. 22, N 2. – P. 215-222.

200. Recent advances in fluorescent probes of peroxynitrite: Structural, strategies and biological applications / J. Sun, X. Cao, W. Lu [et al.]. – Text: visual // *Theranostics.* – 2023. – Vol. 13, N 5. – P. 1716-1744.

201. Redox regulation of cancer cell migration and invasion / L. Tochwawng, S. Deng, S. Pervaiz [et al.]. – Text: visual // *Mitochondrion.* - 2013. – Vol. 13, N 3. – P. 246-253.

202. Regulation and binding of pregnane X receptor by nuclear receptor corepressor silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptors (SMRT) / D. R. Johnson, C. W. Li, L. Y. Chen [et al.]. – Text: visual // *Molecular Pharmacology.* – 2006. – Vol. 69. – P. 99–108.

203. Regulation of B cell functions by S-nitrosoglutathione in the EAE model / J. Kim, S. M. T. Islam, F. Qiao [et al.]. – Text: visual // *Redox Biol.* – 2021. - Vol. 45. – P. 102053.

204. Regulation of cytochrome P450 expression by microRNAs and long noncoding RNAs: Epigenetic mechanisms in environmental toxicology and carcinogenesis/ D. Li, W. H. Tolleson, D. Yu [et al.]. – Text: visual // *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* – 2019. – Vol. 37, N 3. – P. 180-214.

205. Regulation of drug resistance by human pregnane X receptor in breast cancer / Y. Chen, Y. Tang, S. Chen [et al.]. – Text: visual // *Cancer Biol Ther.* – 2009. – Vol. 8, N 13. – P. 1265-1272.

206. Regulation of gene expression by CAR: an update / K. Kobayashi, M. Hashimoto, P. Honkakoski [et al.]. – Text: visual // *Arch Toxicol.* – 2015. – Vol. 89, N 7. – P. 1045-1055.

207. Regulation of PXR and CAR by protein-protein interaction and signaling crosstalk / P. Oladimeji, H. Cui, C. Zhang [et al.]. – Text: visual // *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* – 2016. – Vol. 12, N 9. – P. 997-1010.

208. Regulation of PXR Function by Coactivator and Corepressor Proteins: Ligand Binding Is Just the Beginning / J.P. Rigalli, D. Theile, J. Nilles [et al.]. – Text: visual // *Cells.* – 2021. – Vol. 10, N 11. – P. 3137.

209. Regulatory cross-talk between drug metabolism and lipid homeostasis: constitutive androstane receptor and pregnane X receptor increase Insig-1 expression / A. Roth, R. Looser, M. Kaufmann [et al.]. – Text: visual // *Mol Pharmacol.* – 2008. – Vol. 73, N 4. – P. 1282-1289.

210. Renal toxicity through AhR, PXR, and Nrf2 signaling pathway activation of ochratoxin A-induced oxidative stress in kidney cells / H. J. Lee, M. C. Pyo, H.S. Shin [et al.]. – Text: visual // *Food Chem Toxicol.* – 2018. – Vol. 122. – P. 59-68.

211. Retinoid X receptor α in human liver is regulated by miR-34a / Y. Oda, M. Nakajima, K. Tsuneyama [et al.]. – Text: visual // *Biochem Pharmacol.* – 2014. – Vol. 90, N 2. – P. 179-187.

212. Rifampicin-activated human pregnane X receptor and CYP3A4 induction enhance acetaminophen-induced toxicity / J. Cheng, X. Ma, K. W. Krausz [et al.]. – Text: visual // *Drug Metab Dispos.* – 2009. – Vol. 37, N 8. – P. 1611-1621.

213. Rifaximin, a non-absorbable antibiotic, inhibits the release of pro-angiogenic mediators in colon cancer cells through a pregnane X receptor-dependent pathway / G. Esposito, S. Gigli, L. Seguella [et al.]. – Text: visual // *Int. J. Oncol.* – 2016. – Vol. 49 – P. 639–645.

214. RNA interference screen identifies NAA10 as a regulator of PXR transcription / P. O. Oladimeji, W. C. Wright, J. Wu [et al.]. – Text: visual // *Biochem Pharmacol.* – 2019. – Vol. 160. – P. 92–109.

215. Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression / L. Alland, R. Muhle, H. Jr. Hou [et al.]. – Text: visual // *Nature.* – 1997. – Vol. 387, N 6628. – P. 49-55.

216. Role of nuclear receptor PXR in immune cells and inflammatory diseases / L. Sun, Z. Sun, Q. Wang [et al.]. – Text: visual // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 969399.

217. Role of Oxidative Stress in Reperfusion following Myocardial Ischemia and Its Treatments / M. Xiang, Y. Lu, L. Xin [et al.]. – Text: visual // *Oxid Med Cell Longev.* – 2021. – Vol. 2021. - P. 6614009.

218. Role of pregnane X receptor in chemotherapeutic treatment / W. Zhuo, L. Hu, J. Lv [et al.]. – Text: visual // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2014. – Vol. 74, N 2. – P. 217-227.

219. Roles of Nuclear Receptors in Esophageal Cancer / L. Deng, J. Liu, W. D. Chen [et al.]. – Text: visual // *Curr Pharm Biotechnol.* - 2023. – Vol. 24, N 12. – P. 1489 – 1503.

220. S-glutathiolation by peroxynitrite of p21ras at cysteine-118 mediates its direct activation and downstream signaling in endothelial cells / N. Clavreul, T. Adachi, D. R. Pimental. [et al.]. – Text: visual // *FASEB J.* – 2006. – Vol. 20, N 3. – P. 518–520.

221. S-nitrosoglutathione inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by S-nitrosation of CCAAT/enhancer-binding protein β / M. Mussbacher, H. Stessel, T. Pirker [et al.]. – Text: visual // *Sci Rep.* – 2019. – Vol. 9, N 1. – P. 15403.

222. S-nitrosylation of the Peroxiredoxin-2 promotes S-nitrosoglutathione-mediated lung cancer cells apoptosis via AMPK-SIRT1 pathway / Y. Zhang, C. Sun, G. Xiao [et al.]. – Text: visual // *Cell Death Dis.* – 2019. – Vol. 10, N 5. – P. 329.

223. Salman, K. A. Reactive oxygen species: A link between chronic inflammation and cancer / K. A. Salman, S. Ashraf. – Text: visual // *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*. – 2013. – Vol. 21, N 2. – P. 42-49.

224. Screening for the 3'UTR Polymorphism of the PXR Gene in South Indian Breast Cancer Patients and its Potential Role in Pharmacogenomics / S. Revathidevi, R. Sudesh, V. Vaishnavi [et al.]. – Text: visual // *Asian Pac. J. Cancer Prev.* – 2016. – Vol. 17. – P. 3971–3977.

225. Serine 202 regulates the nuclear translocation of constitutive active/androstane receptor / F. Hosseinpour, R. Moore, M. Negishi M [et al.]. – Text: visual // *Mol Pharmacol.* – 2006. – Vol. 69. – P. 1095 – 1102.

226. Skandalaki, A. Pregnane X Receptor (PXR) Polymorphisms and Cancer Treatment. / A. Skandalaki, P. Sarantis, S. Theocharis. – Text: visual // *Biomolecules*. – 2021 – Vol. 11, N 8. – P. 1142.

227. Squires, E.J. Cytoplasmic localization of pregnane X receptor and ligand-dependent nuclear translocation in mouse liver. / E. J. Squires, T. Sueyoshi, M. Negishi. – Text: visual // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279. – P. 49307–49314.

228. SRC-3 is required for CAR-regulated hepatocyte proliferation and drug metabolism / T. Chen, Q. Chen, Y. Xu [et al.]. – Text: visual // *J Hepatol.* – 2012. – Vol. 56, N 1. – P. 210-217.

229. Stanley, L. A. Through a glass, darkly? HepaRG and HepG2 cells as models of human phase I drug metabolism / L. A. Stanley, C. R. Wolf. – Text: visual // *Drug Metab Rev.* – 2022. – Vol. 54, N 1. – P. 46-62.

230. Stern, S. Clinical Relevance of the Constitutive Androstane Receptor S. Stern, R. Kurian, H. Wang. – Text: visual // *Drug Metab Dispos.* – 2022. – Vol. 50, N 7. – P. 1010-1018.

231. Structural and functional analysis of the human nuclear xenobiotic receptor PXR in complex with RXR α / B. D. Wallace, L. Betts, G. Talmage [et al.]. – Text: visual // *J. Mol. Biol.* – 2013. – Vol. 425, N 14. – P. 2561–2577.

232. Structural and functional similarity of amphibian constitutive androstane receptor with mammalian pregnane X receptor / M. Mathäs, C. Nussbag, O. Burk [et al.]. – Text: visual // PloS One. – 2014. – Vol. 9, N 5. – P. e96263.

233. Structure-Based and Knowledge-Informed Design of B-Raf Inhibitors Devoid of Deleterious PXR Binding / M. Schneider, V. Delfosse, M. Gelin [et al.]. – Text: visual // J Med Chem. – 2022. – Vol. 65, N 2. – P. 1552-1566.

234. Swales, K. CAR, driving into the future / K. Swales, M. Negishi. – Text: visual // Mol Endocrinol. – 2004. – Vol. 18, N 7. – P. 1589-1598.

235. Taguchi, K. Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution / K. Taguchi, H. Motohashi, M. Yamamoto. – Text: visual // Genes Cells. – 2011. – Vol. 16, N 2. – P. 123-140.

236. Tanshinone IIA Protects Endothelial Cells from H₂O₂-Induced Injuries via PXR Activation / H. Zhu, Z. Chen, Z. Ma [et al.]. – Text: visual // Biomol Ther (Seoul). – 2017. – Vol. 25, N 6. – P. 599-608.

237. Tegeder, I. Nitric oxide mediated redox regulation of protein homeostasis / I. Tegeder. – Text: visual // Cell. Signal. – 2019. – Vol. 53. – P. 348–356.

238. Tejero, J. Sources of vascular nitric oxide and reactive oxygen species and their regulation / J. Tejero, S. Shiva, M. T. Gladwin. - Text: visual // Physiol Rev. – 2019. – Vol. 99, N 1. – P. 311–379.

239. The 3'-untranslated region contributes to the pregnane X receptor (PXR) expression down-regulation by PXR ligands and up-regulation by glucocorticoids / T. Smutny, J. Dusek, L. Hyrsova [et al.]. – Text: visual // Acta Pharm Sin B. – 2020. – Vol. 10, N 1. – P. 136-152.

240. The constitutive androstane receptor is an anti-obesity nuclear receptor that improves insulin sensitivity / J. Gao, J. He, Y. Zhai [et al.]. – Text: visual // J Biol Chem. – 2009. – Vol. 284. – P. 25984–25992.

241. The HNF1 alpha-regulated LncRNA HNF1alpha-AS1 is involved in the regulation of cytochrome P450 expression in human liver tissues and Huh7 cells / Y. Wang, L. Yan, J. Liu [et al.]. – Text: visual // J Pharmacol Exp Ther. – 2019. – Vol. 368, N 3. – P. 353–362.

242. The nuclear orphan receptor CAR-retinoid X receptor heterodimer activates the phenobarbital-responsive enhancer module of the CYP2B gene / P. Honkakoski, I. Zelko, T. Sueyoshi [et al.]. – Text: visual // *Mol Cell Biol.* – 1998. – Vol. 18, N 10. – P. 5652-5658.

243. The Nuclear Receptor PXR in Chronic Liver Disease / K. Sayaf, I. Zanotto, F. P. Russo [et al.]. – Text: visual // *Cells.* – 2021. – Vol. 11, N 1. – P. 61.

244. The nuclear xenobiotic receptor CAR: structural determinants of constitutive activation and heterodimerization / K. Suino, L. Peng, R. Reynolds [et al.]. – Text: visual // *Mol Cell.* – 2004. – Vol. 16, N 6. – P. 893-905.

245. The repressed nuclear receptor CAR responds to phenobarbital in activating the human CYP2B6 gene / T. Sueyoshi, T. Kawamoto, I. Zelko [et al.]. – Text: visual // *J Biol Chem.* – 1999. – Vol. 274, N 10. – P. 6043-6046.

246. The role of pregnane X receptor (PXR) in substance metabolism. / Y. Lv, Y.Y. Luo, H.W. Ren [et al.]. – Text: visual // *Front Endocrinol (Lausanne).* - 2022. – Vol. 13. – P. 959902.

247. The Role of Xenobiotic Receptors on Hepatic Glycolipid Metabolism / K. Chen, J. Zhong, L. Hu [et al.]. – Text: visual // *Curr Drug Metab.* – 2019. – Vol. 20, N 1. – P. 29-35.

248. The Roles of Xenobiotic Receptors: Beyond Chemical Disposition / B. Mackowiak, J. Hodge, S. Stern [et al.]. – Text: visual // *Drug Metab Dispos.* – 2018. – Vol. 46, N 9. – P. 1361-1371.

249. Therapeutic Aspects of Protein Denitrosylation / S. Rizza, P. Giglio, F. Faienza [et al.]. – Text: visual // *Therapeutic Application of Nitric Oxide in Cancer and Inflammatory Disorders.* – 2019. – P. 173–189.

250. Thigpen, K.G. International sequencing consortium / K. G. Thigpen. – Text: visual // *Environ Health Perspect.* – 2004. – Vol. 112, N 7. – P. A406.

251. Timsit, Y.E. Coordinated regulation of nuclear receptor CAR by CCRP/DNAJC7, HSP70 and the ubiquitin-proteasome system / Y.E. Timsit, M. Negishi. – Text: visual // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, N 5. – P. e96092.

252. Tinnikov, A.A. A novel cell lysis approach reveals that caspase-2 rapidly translocates from the nucleus to the cytoplasm in response to apoptotic stimuli / A.A. Tinnikov, H.H. Samuels. – Text : visual // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, N 4. – P. e61085.

253. Tolosa, L. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay / L. Tolosa, M. T. Donato, M. J. Gómez-Lechón. – Text: visual // Methods Mol Biol. – 2015. – Vol. 1250. – P. 333-348.

254. Transcription regulation of nuclear receptor PXR: Role of SUMO-1 modification and NDSM in receptor function / Priyanka, D. Kotiya, M. Rana [et al.]. – Text: visual // Mol Cell Endocrinol. – 2016. – Vol. 420. – P. 194-207.

255. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the pregnane X receptor: a rationale for interindividual variability in drug metabolism / T. Smutny, L. Hyrsova, A. Braeuning [et al.]. – Text: visual // Arch Toxicol. – 2021. – Vol. 95, N 1. – P. 11-25.

256. U0126, a mitogen-activated protein kinase kinase 1 and 2 (MEK1 and 2) inhibitor, selectively up-regulates main isoforms of CYP3A subfamily via a pregnane X receptor (PXR) in HepG2 cells / T. Smutny, M. Bitman, M. Urban [et al.]. – Text: visual // Arch Toxicol. – 2014. – Vol. 88, N 12. – P. 2243-2259.

257. Understanding the physiological functions of the host xenobiotic-sensing nuclear receptors PXR and CAR on the gut microbiome using genetically modified mice / M. Little, M. Dutta, H. Li [et al.]. – Text: visual // Acta Pharm Sin B. – 2022. – Vol. 12, N 2. – P. 801-820.

258. Up-regulation of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 expression by eckol, a phlorotannin compound, through activation of Erk and PI3K/Akt / K. C. Kim, K. A. Kang, R. Zhang [et al.]. – Text: visual // Int J Biochem Cell Biol. – 2010. – Vol. 42, N 2. – P. 297-305.

259. Urao, N. Redox regulation of stem/progenitor cells and bone marrow niche / N. Urao, M. Ushio-Fukai. – Text: visual // Free Radic Biol Med. – 2013. – Vol. 54. – P. 26-39.

260. Vachirayonstien, T. MicroRNA-30c-1-3p is a silencer of the pregnane X receptor by targeting the 3'-untranslated region and alters the expression of its target gene cytochrome P450 3A4 / T. Vachirayonstien, B. Yan. – Text: visual // *Biochim Biophys Acta*. – 2016. – Vol. 1859, N 9. – P. 1238-1244.

261. Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions / R. Elsby, D.D. Surry, V.N. Smith, A.J. Gray. – Text : visual // *Xenobiotica*. – 2008. – Vol. 38. – P. 1140-1164.

262. Villeneuve, N. F. Regulation of the Nrf2-Keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: an insight into cullin-ring ubiquitin ligases / N. F. Villeneuve, A. Lau, D. D. Zhang // *Antioxid Redox Signal*. – 2010. – Vol. 13, N 11. – P. 1699-712.

263. Wang, J. Atypical functions of xenobiotic receptors in lipid and glucose metabolism / J. Wang, P. Lu, W. Xie. – Text: visual // *Med Rev (Berl)*. – 2022. – Vol. 2, N 6. – P. 611-624.

264. Weber, D. Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: Focus on sample preparation and derivatization conditions / D. Weber, M.J. Davies, T. Grune. – Text : visual // *Redox Biol*. – 2015. – Vol. 5. – P. 367-380.

265. Weikum, E.R. The Nuclear Receptor Superfamily: A Structural Perspective: The Nuclear Receptor Superfamily / E.R. Weikum, X. Liu, E.A. Ortlund. – Text: visual // *Protein Sci*. – 2018. – Vol. 27. – P. 1876 –1892.

266. Xing, Y. PXR: a center of transcriptional regulation in cancer / Y .Xing, J. Yan, Y. Niu. – Text: visual // *Acta Pharm Sin B*. – 2020. – Vol. 10, N 2. – P. 197-206.

267. Xu, E. H. Structural insights into regulation of nuclear receptors by ligands / E. H. Xu, M. H. Lambert. – Text: visual // *Nucl Recept Signal*. – 2003. – Vol. 1. – P. e004.

268. Yan, J. A brief history of the discovery of PXR and CAR as xenobiotic receptors / J. Yan, W. Xie. – Text: visual // *Acta Pharm Sin B*. – 2016. – Vol. 6, N 5. – P. 450-452.

269. Yang, H. Signaling control of the constitutive androstane receptor (CAR) / H. Yang, H. Wang. – Text: visual // *Protein Cell*. – 2014. – Vol. 5, N 2. – P. 113-123.
270. Yoshinari, K. Distinct Roles of the Sister Nuclear Receptors PXR and CAR in Liver Cancer Development / K. Yoshinari, R. Shizu. – Text: visual // *Drug Metab Dispos*. – 2022. – Vol. 50, N 7. – P. 1019-1026.
271. Yu, C. The Keap1-Nrf2 System: A Mediator between Oxidative Stress and Aging / C. Yu, J. H. Xiao. – Text: visual // *Oxid Med Cell Longev*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 6635460.
272. Zhang, B. PXR: a xenobiotic receptor of diverse function implicated in pharmacogenetics / B. Zhang, W. Xie, M. D. Krasowski. – Text: visual // *Pharmacogenomics*. – 2008. – Vol. 9, N 11. – P. 1695-1709.