



Регуляция печеночных транспортеров OATP1A2 и OATP1B1 под действием оксида азота (II)

Абаленихина Ю. В., Сучкова О. Н., Костюкова Е. В., Шулькин А. В., Якушева Е. Н.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова Минздрава России, (ул. Высоковольная, д. 9, г. Рязань, 390026, Россия)

Для цитирования: Абаленихина Ю. В., Сучкова О. Н., Костюкова Е. В., Шулькин А. В., Якушева Е. Н. Регуляция печеночных транспортеров OATP1A2 и OATP1B1 под действием оксида азота (II). Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2024;(7): 114–121. doi: 10.31146/1682-8658-ecg-227-7-114-121

✉ Для переписки:

Абаленихина

Юлия

Владимировна

abalenihiina88

@mail.ru

Абаленихина Юлия Владимировна, д.м.н., доцент, профессор кафедры биологической химии

Сучкова Ольга Николаевна, ассистент кафедры биологической химии

Костюкова Елена Вениаминовна ассистент кафедры профильных гигиенических дисциплин

Шулькин Алексей Владимирович, д.м.н., доцент, профессор кафедры фармакологии

Якушева Елена Николаевна, д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии

Резюме

Оксид азота II (NO) — сигнальная молекула, обладающая широким спектром физиологических эффектов, включая регуляцию процессов, протекающих в желудочно-кишечном тракте. В печени активно экспрессируются клинически значимые транспортеры OATP1A2 и OATP1B1, которые участвуют в инфлюксе биологически активных и лекарственных веществ. Именно поэтому актуальным представляется выявить участие NO в регуляции печеночных транспортеров.

Цель исследования. Изучить влияние NO на относительное количество и экспрессию транспортеров OATP1A2 и OATP1B1 in vitro в клетках HepG2.

Материалы и методы. Исследование выполнено на культуре клеток HepG2, которые культивировали в 6-луночных планшетах при 37 °C и 5% содержании CO₂ в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), содержащей L-глутамин (4 мМ), 10% фетальной бычьей сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все компоненты производства Sigma-Aldrich, Германия). К культуральной среде добавляли S-нитрозоглутатион (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрациях 1, 10, 50, 100 и 500 мкМ, инкубировали 24 и 72 ч. К контрольным клеткам в эквивалентном объеме добавляли воду для инъекций (растворитель S-нитрозоглутатиона). Относительное количество белков OATP1A2 и OATP1B1 оценивали методом вестерн-блот, экспрессию генов SLCO1A2 и SLCO1B1 — методом ПЦР в реальном времени.

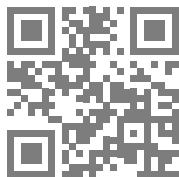
Результаты исследования. В ходе выполнения настоящего исследования было показано, что добавление S-нитрозоглутатиона в диапазоне концентраций 10–500 мкМ и длительности экспозиции 24 и 72 ч вызывает повышение внутриклеточного уровня метаболитов оксида азота, что свидетельствует об адекватности использования данного донора NO. При этом под действием NO происходило увеличение относительного количества изучаемых транспортеров — OATP1A2 при сроке экспозиции 24 ч и концентрациях S-нитрозоглутатиона 50 и 100 мкМ, OATP1B1 через 24 и 72 ч, при концентрациях 10–500, аналогичная тенденция увеличения отмечалась для экспрессии генов SLCO1A2 и SLCO1B1.

Заключение. Донор NO — S-нитрозоглутатион в эксперименте in vitro в клетках линии HepG2 вызывает повышение относительного количества транспортеров семейства OATP — OATP1A2 и OATP1B1, обусловленное усилением экспрессии генов SLCO1A2 и SLCO1B1.

Ключевые слова: HepG2, S-нитрозоглутатион, белки-транспортеры OATP1A2/OATP1B1, SLCO1A2, SLCO1B1.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

EDN: HLF4UE





Regulation of hepatic transporters OATP1A2 and OATP1B1 by the action of nitric oxide (II)

Yu. V. Abalenikhina, O. N. Suchkova, E. V. Kostyukova, A. V. Shchulkin, E. N. Yakusheva

Ryazan State Medical University, (9, Vysokovoltynaya street, Ryazan, 390026, Russia)

For citation: Abalenikhina Yu. V., Suchkova O. N., Kostyukova E. V., Shchulkin A. V., Yakusheva E. N. Regulation of hepatic transporters OATP1A2 and OATP1B1 by the action of nitric oxide (II). *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2024;(7): 114–121. (In Russ.) doi: 10.31146/1682-8658-ecg-227-7-114-121

✉ **Corresponding author:**

Yulia V. Abalenikhina
abalenikhina88@mail.ru

Yulia V. Abalenikhina, PhD in Biological Sciences, Assistant Professor of the Department of Biological Chemistry; ORCID: 0000-0003-0427-0967, Researcher ID: L-8965-2018, Scopus Author ID: 57195266939

Olga N. Suchkova, Assistant of the Department of Biological Chemistry; ORCID: 0000-0001-5227-7288

Elena V. Kostyukova, Assistant of the Department of specialized hygienic disciplines

Alexey V. Shchulkin, MD, PhD, Assistant Professor of the Department of Pharmacology; ORCID: 0000-0003-1688-0017, Researcher ID: N-9143-2016, Scopus Author ID: 55700396200

Elena N. Yakusheva, MD, PhD, Professor, Head of the Department of Pharmacology; ORCID: 0000-0001-6887-4888, Researcher ID: T-6343-2017, Scopus Author ID 6602966794

Summary

Nitric oxide II (NO) is a signaling molecule that has a wide range of physiological effects, including the regulation of gastrointestinal processes. The liver actively expresses the clinically significant transporters OATP1A2 and OATP1B1, which are involved in the influx of biologically active and medicinal substances. That is why it seems relevant to determine the pathways of regulation of hepatic transporters under the influence of NO.

Aim. To study the effect of NO on the relative amount and expression of the transporters OATP1A2 and OATP1B1 in vitro in HepG2 cells.

Materials and methods. The study was performed on a culture of HepG2 cells, which were cultured in 6-well plates at 37 °C and 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with a high glucose content (4500 mg/l) containing L-glutamine (4 mM), 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (all components from Sigma-Aldrich, Germany). S-nitrosoglutathione (Sigma-Aldrich, Germany) was added to the culture medium at concentrations of 1, 10, 50, 100 and 500 μM, incubated for 24 and 72 hours. Water for injection (solvent) was added to control cells in an equivalent volume S-nitrosoglutathione). The relative amounts of OATP1A2 and OATP1B1 proteins were assessed by Western blot, and the expression of SLCO1A2 and SLCO1B1 by real-time PCR.

The results of the study. In the course of this study, it was shown that the addition of S-nitrosoglutathione in the concentration range of 10–500 μM and exposure duration of 24 and 72 hours causes an increase in the intracellular level of nitric oxide metabolites, which indicates the adequacy of the use of this NO donor.

At the same time, under the influence of NO, there was an increase in the relative amount of the studied transporters — OATP1A2 at an exposure period of 24 hours and S-nitrosoglutathione concentrations of 50 and 100 μM, OATP1B1—24 and 72 hours, at concentrations of 10–500 μM, a similar trend was noted for the expression genes SLCO1A2 and SLCO1B1.

Conclusion. The NO donor — S-nitrosoglutathione causes an increase in the relative amount of OATP family transporters — OATP1A2 and OATP1B1, due to increased expression of the SLCO1A2 and SLCO1B1 genes, in vitro in HepG2 cells.

Keywords: HepG2, OATP1A2/OATP1B1 transporter proteins, S-nitrosoglutathione, in expression.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interest.

Введение

Полипептиды, транспортирующие органические анионы (англ.: *organic anion transporting polypeptides*, OATP), являются членами суперсемейства SLC-транспортеров (англ.: *solute carrier family*), которые обеспечивают несвязанный с АТФ (то есть без затраты энергии) перенос субстратов через билипидные цитоплазматические мембраны [1].

Первым обнаруженным у человека членом семейства OATP/Oatp стал OATP1A2, который был клонирован как ортолог крысиного Oatp1a1 [2]. На сегодняшний день семейство OATP человека насчитывает 11 членов: OATP1A2, 1B1, 1B3, 1C1, 2A1, 2B1, 3A1, 4A1, 4C1, 5A1 и 6A1. OATP/Oatps внутри одного семейства имеют 40% идентичности аминокислотных последовательностей и обозначаются арабской нумерацией (например, OATP1). Отдельные подсемейства включают OATP/Oatps с идентичностью аминокислотных последовательностей 60% и обозначаются буквами (например, OATP1B). Отдельные транспортеры (генные продукты) внутри одного подсемейства обозначаются дополнительной арабской нумерацией (например, OATP1B1). При этом заглавными буквами обозначаются белки человека, а строчными – животных [1, 3].

Наибольшее клиническое значение имеют транспортеры: OATP1A2 и OATP1B1 [4].

OATP1A2 экспрессируется практически во всех основных органах, локализован на апикальной поверхности энтероцитов и холангиоцитов, а также в головном мозге, легких, печени, почках и семенниках. Во всех этих органах OATP1A2 выполняет одну функцию – обеспечивает проникновение субстратов внутрь клеток, то есть ускоряет абсорбцию в желудочно-кишечном тракте, и способствует их проникновению через гистогематические барьеры, например, гематоэнцефалический [5].

В печени OATP1A2 экспрессируется исключительно на апикальной (билиарной) мембране

холангиоцитов и может участвовать в реабсорбции субстратов, которые экскретируются в желчь [6].

Субстратами OATP1A2 являются желчные кислоты, гормоны щитовидной железы, фексофенадин, эритромицин, левофлоксацин, саквинавир, иматиниб и др. [7].

В отличие от OATP1A2 OATP1B1 экспрессируется в печени на базолатеральной мембране гепатоцитов, где он опосредует поглощение ряда амфипатических соединений из портального бассейна [8, 9]. OATP1B1 обладает широкой субстратной специфичностью, транспортируя статины, сартаны, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, фаллоидин, тироксин и др. [7].

Описаны следующие механизмы регуляции OATP: изменение экспрессии генов, кодирующих транспортеры, эпигенетическая регуляция, посттрансляционная модификация, фосфорилирование, изменение активности синтезируемых транспортеров (например, ингибирование молекулы-транспортера) [10, 11]. Возможные механизмы регуляции OATP, в настоящее время активно изучаются.

Оксид азота II (NO) – сигнальная молекула, обладающая широким спектром физиологических эффектов. Показано, что NO участвует в синаптической передаче сигнала, нейрогенезе, вазодилатации, защите слизистой желудочно-кишечного тракта, развитии воспаления, повреждении клеток и т.д. [12].

Влияние NO на уровень OATP1A2 и OATP1B1 на данный момент не изучалось, что и послужило целью настоящего исследования.

Цель исследования – изучить влияние NO на относительное количество и экспрессию транспортеров OATP1A2 и OATP1B1 *in vitro* в клетках линии HepG2.

Материалы и методы

Исследование выполнено на культуре клеток HepG2 (ФГБУН ИНЦ РАН, Санкт-Петербург).

Клетки культивировали при 37 °C и 5% содержания CO₂ в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л), содержащей L-глутамин (4 мМ), 10% фетальной бычьей сыворотки, 100 ЕД/мл пеницилина и 100 мкг/мл стрептомицина (все компоненты производства Sigma-Aldrich, Германия).

Клетки культивировали в 6-луночных планшетах (Corning, США).

К культуральной среде в качестве тестируемого вещества добавляли – S-нитрозоглутатион (Sigma-Aldrich, Германия) в концентрациях 1, 10, 50, 100 и 500 мкМ, инкубировали 24 и 72 ч. К контрольным клеткам в эквивалентном объеме добавляли воду для инъекций (растворитель S-нитрозоглутатиона). На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения. Протокол исследования был одобрен Bioэтической комиссией РязГМУ Минздрава России (Протокол № 87 от 07.11.2023).

Для подтверждения повышения уровня NO в клетках HepG2 под действием S-нитрозоглутатиона оценивали уровень метаболитов оксида азота (суммарная концентрация нитратов и нитритов NOx) спектрофотометрическим методом В. А. Метельской. Анализ проводили на микропланшетном анализаторе Stat Fax 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 [13].

Относительное количество OATP1A2 и OATP1B1 оценивали методом вестерн-блот. Для этого после окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, Sigma-Aldrich, Германия), трижды промывали раствором фосфатного буфера (BioRad, США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ (Sigma-Aldrich, Германия)

в течение 30 минут при +4 °C и постоянном перемешивании из расчета 10⁷ клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 5000 g (CM-50, Eppendorf, Германия). Супернатант использовали для выполнения анализа.

Далее 30 мкг белков супернатанта клеточного лизата подвергали электрофорезу с использованием 7,5% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (Bio-Rad, США) в буферной системе Laemmli (BioRad, США).

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

Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose, Bio-Rad, США) с использованием Mini Trans-Blot (Bio-Rad, США) в течение 7 мин при 25 В и 1,3 А.

Белки на мембране блокировали 1% раствором Casein Blocker (Bio-Rad, США), содержащим 0,1% Tween в течение 1 ч при комнатной температуре.

Детекцию OATP1A2 и OATP1B1 проводили с использованием первичных мышиных моноклональных антител (OATP1 rabbit Polyclonal Antibody, ATA34318, Atagenix, Китай; OATP2 Polyclonal Antibody, PA5-113548, Invitrogen, США) в концентрации 1:200 в блокирующем растворе в течение 2 ч при 37 °C. Визуализацию первичных антител OATP1A2 осуществляли с использованием вторичных антител (Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP, Invitrogen, США), первичных антител к OATP1B1 – вторичных кроличьих антител (Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, Invitrogen, США) в разведении 1:4000 и инкубацией в течение 1 ч при комнатной температуре.

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

Молекулярная масса OATP1A2 и OATP1B1 была подтверждена путем сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, Bio-Rad, США).

Содержание OATP1A2 и OATP1B1 оценивали относительно глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, англ.: *glyceraldehyde 3-phosphate*

dehydrogenase, первичные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 («Invitrogen», США), разведение 1:1000, вторичные кроличьи антитела – Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Invitrogen, США), разведение 1:4000).

Экспрессию гена *SLCO1A2* и *SLCO1B1* в клетках HepG2 оценивали методом ПЦР в реальном времени. Для этого клетки культивировали в 6-луночных планшетах (Corning, США). После образования монослоя их механически (с помощью скребка) снимали с лунок. Суммарную РНК выделяли с помощью набора RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно инструкции производителя. Концентрацию РНК определяли спектрофотометрическим способом с помощью NanoPhotometr NP80-Touch (Германия). Реакцию ОТ-ПЦР проводили одношаговым методом с помощью набора «БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue» (Биолабмикс, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Условия обратной транскрипции – температура +45 °C, время инкубации 10 мин, количество циклов 1.

Последовательности праймеров были подобраны с помощью программы DNASTAR Lasergene, PrimerSelect. В качестве референсного гена, относительно экспрессии которого вычислялась экспрессия, был выбран ген, кодирующий GAPDH. Анализ проводили на амплификаторе нуклеиновых кислот Applied Biosystems Quant Studio 5 с гибридационно-флуоресцентной детекцией продуктов ПЦР в режиме реального времени (Life Technologies Holdings Pte. Ltd., Сингапур) с программным обеспечением QuantStudio Design and Analysis. Расчёт уровня экспрессии изучаемых генов относительно референсного гена был осуществлён с помощью программного обеспечения LinRegPCR v.11.0 (Heart failure research center, Нидерланды).

Полученные результаты анализировали с помощью программ StatSoft Statistica 13.0, Microsoft Excel, GraphPad Prism8. Статистическую значимость различий оценивали дисперсионным анализом (ANOVA), парные сравнения с контролем выполняли с помощью теста Даннетта. Результаты в таблицах и на графиках приведены в виде среднего арифметического и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты

Уровень метаболитов оксида азота в клетках линии HepG2 возрастал при действии S-нитрозоглутатиона в концентрациях 10, 50, 100 мкМ и 500 мкМ на 81,5%, 105,8%, 129,9%, 213,7% ($p < 0,0001$ для всех значений) при инкубации 24 ч и на 68,4%, 69,2% ($p < 0,01$), 128,6% и 167,7% ($p < 0,0001$) соответственно при длительности экспозиции 72 ч (рис. 1).

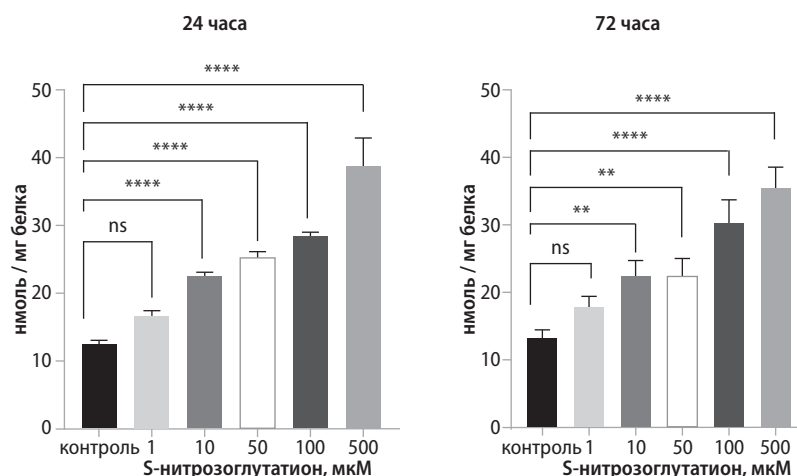
Донор NO S-нитрозоглутатион вызывал увеличение относительного количества OATP1A2 только в концентрациях 50 и 100 мкМ на 16,2% ($p < 0,0001$) и 9,1% ($p = 0,003$) при длительности воздействия

24 ч, а при экспозиции 72 ч достоверного эффекта не оказал (рис. 2).

Донор NO S-нитрозоглутатион при длительности воздействия 24 ч в концентрациях 10, 50, 100 и 500 мкМ увеличивал относительное количество OATP1B1 на 136,7% ($p = 0,0003$), 154,1% ($p < 0,0001$), 124,5% ($p = 0,0006$), 131,6% ($p = 0,0004$) соответственно. При увеличении длительности инкубации до 72 ч относительное количество OATP1B1 также превышало показатели контроля при концентрации S-нитрозоглутатиона 10, 50, 100 и 500 мкМ на 37,6% ($p = 0,01$), 45,8% ($p = 0,004$),

Рисунок 1. Концентрация метаболитов оксида азота в лизате клеток линии HepG2 после воздействия S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1–500 мкМ в течение 24 и 72 ч ($M \pm SD$).

Figure 1. Concentration of nitric oxide metabolites in HepG2 cell lysate after exposure to S-nitrosoglutathione at concentrations of 1–500 microns for 24 and 72 hours ($M \pm SD$).



Примечание:

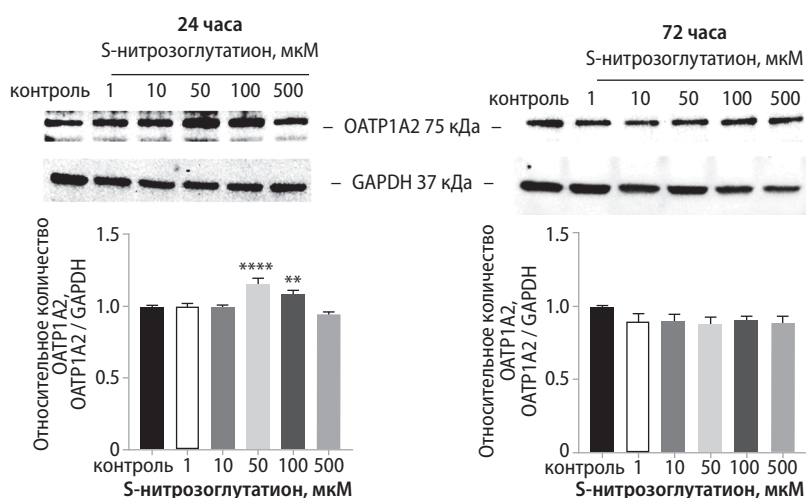
** $p \leq 0.01$ статистически значимые отличия от контроля;
 **** $p < 0.0001$ статистически значимые отличия от контроля;
 ns – статистически значимые отличия от контроля отсутствуют.

Note:

** $p \leq 0.01$ statistically significant differences from the control;
 **** $p < 0.0001$ statistically significant differences from the control;
 ns – there are no statistically significant differences from the control.

Рисунок 2. Относительное количество белка OATP1A2 в лизате клеток линии HepG2 после воздействия S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1–500 мкМ в течение 24 и 72 ч ($M \pm SD$).

Figure 2. The relative amount of OATP1A2 protein in the lysate of HepG2 cells after exposure to S-nitrosoglutathione at concentrations of 1–500 microns for 24 and 72 hours ($M \pm SD$).



Примечание:

** $p < 0.01$ статистически значимые отличия от контроля;
 **** $p < 0.0001$ статистически значимые отличия от контроля.

Note:

** $p < 0.01$ statistically significant differences from the control;
 **** $p < 0.0001$ statistically significant differences from the control.

137,4% ($p < 0.0001$), 105,5% ($p < 0.0001$) соответственно (рис. 3).

Для выявления возможного механизма регуляции количества белков-транспортеров был выполнен ПЦР анализ в реальном времени соответствующих генов транспортеров – *SLCO1A2* и *SLCO1B1*.

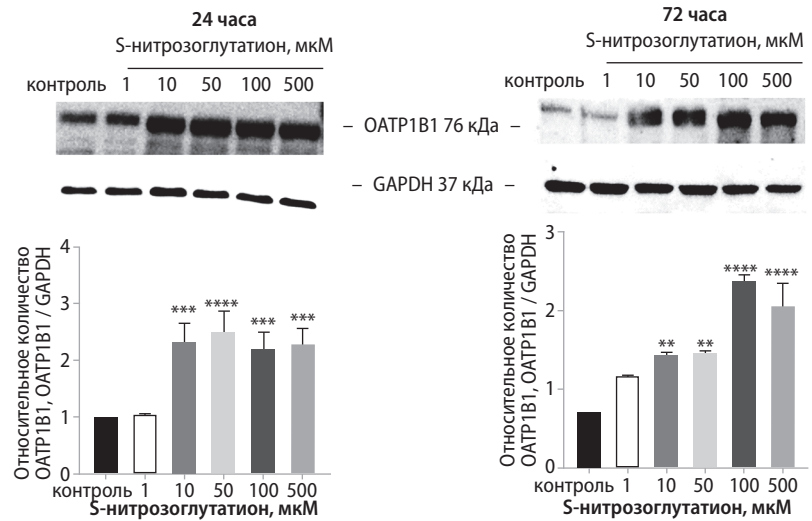
Воздействие S-нитрозоглутатиона в течение 24 ч в концентрациях 50 и 100 мкМ приводило к увеличению экспрессии гена *SLCO1A2* в 3,2 раза и 2,5 раза ($p < 0.0001$) соответственно, а при концентрациях донора NO 1, 10 и 500 мкМ изменений выявлено не было. Воздействие S-нитрозоглутатиона

в диапазоне концентраций 1–500 мкМ и сроке инкубации 72 ч не влияло на экспрессию гена *SLCO1A2* (рис. 4).

Воздействие S-нитрозоглутатиона в течение 24 ч приводило к повышению экспрессии гена *SLCO1B1* под действием S-нитрозоглутатиона в концентрациях 10, 50 мкМ в 40 раз ($p < 0.0001$); 100, 500 мкМ в 10 раз ($p \leq 0.01$) (рис. 5). Воздействие S-нитрозоглутатиона на протяжении 72 ч вызывало возрастание уровня *SLCO1B1* в 3 раза при концентрации 10 мкМ, в 4 раза при 50 мкМ, в 8 раз при 100 мкМ и 4,5 раза при 500 мкМ ($p < 0.0001$ для всех значений) (рис. 5).

Рисунок 3. Относительное количество белка OATP1B1 в лизате клеток линии HepG2 после воздействия S-нитрозоглутатиона в концентрациях 1–500 мкМ в течение 24 и 72 ч ($M \pm SD$).

Figure 3. The relative amount of OATP1B1 protein in the lysate of HepG2 cells after exposure to S-nitrosoglutathione at concentrations of 1–500 microns for 24 and 72 hours ($M \pm SD$).



Примечание:

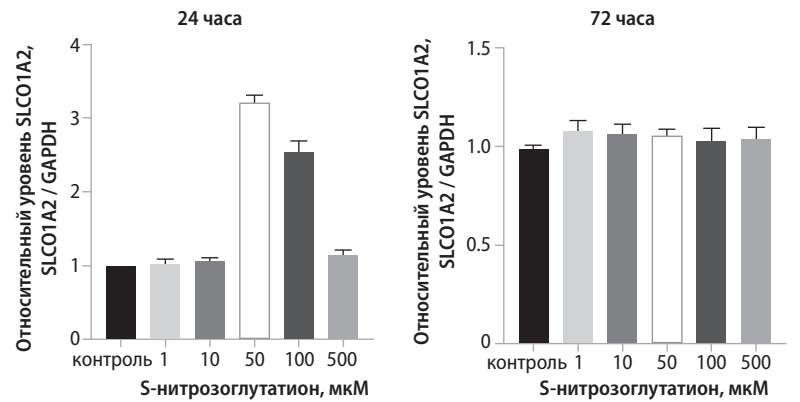
** $p \leq 0,01$ статистически значимые отличия от контроля;
*** $p < 0,001$ статистически значимые отличия от контроля;
**** $p < 0,0001$ статистически значимые отличия от контроля.

Note:

** $p \leq 0.01$ statistically significant differences from the control;
*** $p < 0.001$ statistically significant differences from the control;
**** $p < 0.0001$ statistically significant differences from the control.

Рисунок 4. Относительная представленность ампликонов гена *SLCO1A2* в клетках линии HepG2 по результатам количественного ПЦР-анализа в реальном времени ($M \pm SD$).

Figure 4. Relative representation of the amplicons of the *SLCO1A2* gene in HepG2 cells based on the results of quantitative real-time PCR analysis ($M \pm SD$).



Примечание:

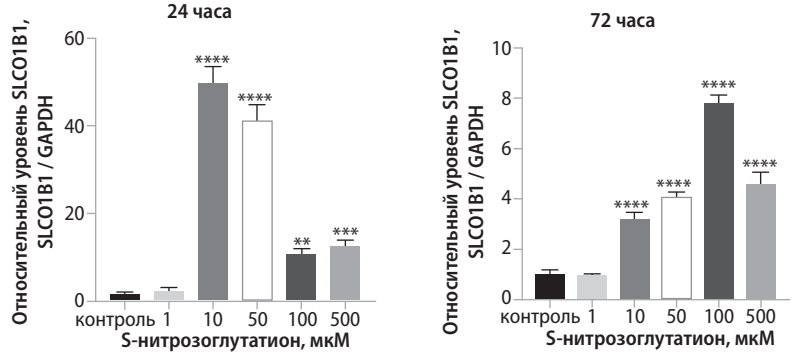
**** $p < 0,0001$ статистически значимые отличия от контроля.

Note:

**** $p < 0.0001$ statistically significant differences from the control.

Рисунок 5. Относительная представленность ампликонов гена *SLCO1B1* в клетках линии HepG2 по результатам количественного ПЦР-анализа в реальном времени ($M \pm SD$).

Figure 5. Relative representation of the amplicons of the *SLCO1B1* gene in HepG2 cells according to the results of quantitative real-time PCR analysis ($M \pm SD$).



Примечание:

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

Note:

** $p \leq 0.01$ statistically significant differences from the control;
*** $p < 0.001$ statistically significant differences from the control;
**** $p < 0.0001$ statistically significant differences from the control.

Обсуждение

В настоящем исследовании оценивалось влияние оксида азота II (NO) на уровень основных клинически значимых транспортеров семейства OATP – OATP1A2 и OATP1B1.

В качестве донора NO – использовали S-нитрозоглутатион, являющийся S-нитрозилированным производным глутатиона, который присутствует в клетках в физиологических условиях, обладает минимальной токсичностью, а также принимает участие в различных биохимических процессах, контролирующих гомеостаз [14].

Установлено, что NO регулирует многочисленные процессы в организме: сосудистый гомеостаз [15], работу органов желудочно-кишечного тракта [16], функционирование центральной и периферической нервной системы [17] и т.д.

Основные физиологические функции NO реализуются через NO-pГЦ-цГМФ-сигнальный каскад [18].

В ходе выполнения настоящего исследования было показано, что добавление S-нитрозоглутатиона в диапазоне концентраций 10–500 мкМ и длительности экспозиции 24 и 72 ч вызывает повышение внутриклеточного уровня метаболитов оксида азота, что свидетельствует об адекватности использования данного донора NO.

В эксперименте *in vitro* на клетках линии HepG2 под действием NO происходило увеличение относительного количества изучаемых транспортеров – OATP1A2 и OATP1B1: OATP1A2 при сроке экспозиции 24 ч и концентрациях S-нитрозоглутатиона 50 и 100 мкМ, OATP1B1 при инкубации 24 и 72 ч

в концентрациях 10–500 мкМ. Аналогичная тенденция увеличения отмечалась для экспрессии генов *SLCO1A2* и *SLCO1B1*, что указывает на регуляцию количества белков-транспортеров посредством изменения экспрессии соответствующих генов в условиях модуляции концентрации NO.

Ранее нами было показано, что NO стимулирует работу эффлюксного транспортера суперсемейства ABC – P-гликопротеина [19].

Так как изученные в данном исследовании транспортеры являются инфлюксными, то есть обеспечивают транспорт субстратов внутрь клеток, в совокупности полученные результаты свидетельствуют о том, что NO может стимулировать разные виды транспорта как внутрь, так и из клеток.

Полученные результаты имеют важное практическое значение. Например, OATP1A2 играет важную роль в реабсорбции желчных кислот [20] и повышение количества транспортера при развитии заболеваний печени, сопровождающихся продукцией NO, может снижать их выделение в желчевыводящие пути.

OATP1B1 играет важную роль в фармакокинетике статинов, обеспечивая их проникновение внутрь гепатоцитов [21]. Совместное применение доноров NO, например, нитратов (нитроглицерина или изосорбида динитрата) вместе со статинами теоретически может приводить к повышению уровня OATP1B1 и таким образом усилить проникновение гиполипидемических средств внутрь гепатоцитов и повысить их фармакологических эффект.

Заключение

Донор NO – S-нитрозоглутатион *in vitro* в клетках линии HepG2 вызывает повышение относительного количества транспортеров семейства OATP – OATP1A2 и OATP1B1, обусловленное усилением экспрессии генов *SLCO1A2* и *SLCO1B1*.

Литература | References

1. Liu X. SLC Family Transporters. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1141:101–202. doi: 10.1007/978-981-13-7647-4_3.
2. Kullak-Ublick G.A., Hagenbuch B., Stieger B., et al. Molecular and functional characterization of an organic anion transporting polypeptide cloned from human liver. *Gastroenterology.* 1995;109:1274–1282. doi: 10.1016/0016-5085(95)90588-x.
3. Hagenbuch B., Meier P.J. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch – Eur J Physiol.* 2004;447:653–665. doi: 10.1007/s00424-003-1168-y.
4. Ungvári O., Bakos É., Kovácsics D., Özvegy-Laczka C. The fluorescence-based competitive counterflow assay developed for organic anion transporting polypeptides 1A2, 1B1, 1B3 and 2B1 identifies pentamidine as a selective OATP1A2 substrate. *FASEB J.* 2023;37: e23223. doi: 10.1096/fj.202300530RR.
5. Franke R. M., Scherkenbach L. A., Sparreboom A. Pharmacogenetics of the organic anion transporting polypeptide 1A2. *Pharmacogenomics.* 2009;10:339–44. doi: 10.2217/14622416.10.3.339.
6. Lee W., Glaeser H., Smith L. H., et al. Polymorphisms in human organic anion-transporting polypeptide 1A2 (OATP1A2): implications for altered drug disposition and central nervous system drug entry. *J Biol Chem.* 2005;280: 9610–7. doi: 10.1074/jbc.M411092200.
7. Kalliokoski A., Niemi M. Impact of OATP transporters on pharmacokinetics. *Br J Pharmacol.* 2009;158:693–705. doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00430.x.
8. Hsiang B., Zhu Y., Wang Z. et al. A novel human hepatic organic anion transporting polypeptide (OATP2). Identification of a liver-specific human organic anion transporting polypeptide and identification of rat and human hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibitor transporters. *J Biol Chem.* 1999;274: 37161–37168. doi: 10.1590/1518-8345.1316.2800.
9. König J., Cui Y., Nies A. T., Keppler D. A novel human organic anion transporting polypeptide localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2000;278:156–164. doi: 10.1152/ajpgi.2000.278.1.G156.
10. Lee W., Ha J. M., Sugiyama Y. Post-translational regulation of the major drug transporters in the families of organic anion transporters and organic anion-transporting

- polypeptides. *J. Biol Chem.* 2020;295:17349–17364. doi: 10.1074/jbc.REV120.009132.
11. Svoboda M., Riha J., Wlcek K. et al. Organic anion transporting polypeptides (OATPs): regulation of expression and function. *Curr. Drug Metab.* 2022;12:139–53. doi: 10.2174/138920011795016863.
 12. Socco S., Bovee R., Palczewski M. et al. Epigenetics: the third pillar of nitric oxide signaling. *Pharmacol. Res.* 2017;121:52–58. doi: 10.1016/j.phrs.2017.04.011.
 13. Metelskaya V. A., Gumanova N. G. Screening-method for nitric oxide metabolites determination in human serum. *Clinical laboratory diagnostics.* 2005;6: 15–18. (In Russ.)
Метельская В. А., Гуманова Н. Г. Скрининг – метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке человека. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2005;6:15–18.
 14. Broniowska A. K., Diers A. R., Hogg N. S-Nitroso-glutathione. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA).* 2013;1830:3173–3181. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.02.004.
 15. Gaynullina D. K., Schubert R., Tarasova O. S. Changes in endothelial nitric oxide production in systemic vessels during early ontogenesis – a key mechanism for the perinatal adaptation of the circulatory system. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:1421. doi: 10.3390/ijms20061421.
 16. Yaguchi J., Yaguchi S. Evolution of nitric oxide regulation of gut function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019;116:5607–5612. doi: 10.1007/s00441–019–03093–9.
 17. Putintseva O. V., Kalaeva E. A., Artyukhov V. G., Gosteva E. V. S-nitrosoglutathion in high concentrations (75: 1) inhibits oxygen-binding function of human oxygemoglobin. *Bulletin of the Voronezh State University. Series: Chemistry. Biology. Pharmacy.* 2018;4:66–72. (In Russ.)
Путинцева О. В., Калаева Е. А., Артюхов В. Г., Гостева Е. В. S-нитрозоглутатион в высоких концентрациях (75:1) ингибирует кислородсвязывающую функцию оксигемоглобина человека. *Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация.* 2018;4:66–72.
 18. Jehle A., Garaschuk O. The interplay between cGMP and calcium signaling in Alzheimer's disease. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23: e:7048. doi: 10.3390/ijms23137048.
 19. Shchulkin A. V., Abalenikhina Y. V., Sudakova E. A., et al. Mechanisms of Regulation of the P-Glycoprotein Transporter Protein Functioning under the Action of Nitric Oxide. *Biochemistry (Mosc).* 2022;87:366–379. doi: 10.1134/S000629792204006X. (In Russ.)
Щулькин А. В., Абаленихина Ю. В., Судакова Е. А. и др. Механизмы регуляции функционирования белка-переносчика Р-гликопротеина под действием оксида азота. *Биохимия.* 2022;87:366–379. doi: 10.1134/S000629792204006X.
 20. Dawson P. A., Lan T., Rao A. Bile acid transporters. *J Lipid Res.* 2009; 50:2340–57. doi: 10.1194/jlr.R900012-JLR200.
 21. Alam K., Crowe A., Wang X., et al. Regulation of Organic Anion Transporting Polypeptides (OATP) 1B1- and OATP1B3-Mediated Transport: An Updated Review in the Context of OATP-Mediated Drug-Drug Interactions. *Int J Mol Sci.* 2018;19:855. doi: 10.3390/ijms19030855.