Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

На правах рукописи

Клюшова Любовь Сергеевна

Исследование влияния новых производных фенозановой кислоты и координационных соединений переходных металлов с N-донорными лигандами на жизнеспособность клеток в моделях *in vitro* с помощью многопараметрического скрининга

1.5.4. Биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН Вавилин Валентин Андреевич

Оглавление

BBE,	цение		4
Глава	а 1. ОБЗС	РР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1	Клето	очная визуализация в открытии лекарств	12
1	.1.1 Мно	гопараметрический скрининг	15
	1.1.1.1	Основные подходы многопараметрического скрининга	17
	1.1.1.2	Выбор клеточной модели	19
	1.1.1.3	Исследуемые соединения и флуоресцентные зонды	21
	1.1.1.4	Получение и анализ изображений	24
1.2	Анти	оксиданты в противоопухолевой терапии	25
1	.2.1 Mex	анизмы генерации активных форм кислорода в клетке	26
1	.2.2 Гоме	еостаз активных форм кислорода в клетке	28
1	.2.3 Роль	окислительного стресса в канцерогенезе	30
1	.2.4 Роль	антиоксидантов в противоопухолевой терапии	31
1	.2.5 Алкі	илированные фенолы как ингибиторы свободнорадикального окисления	33
1.3	Коор,	динационные соединения переходных металлов в противоопухолевой терапии	35
1.4	Роль	цитохромов P450 (CYP) в метаболизме ксенобиотиков	38
1	.4.1 Мет	аболизм ксенобиотиков	38
1	.4.2 Цито	охромы Р450	40
	1.4.2.1	Подсемейство СҮР2С	44
	1.4.2.2	Подсемейство СҮРЗА	46
1	.4.3 Осно	овные механизмы транскрипционной регуляция цитохромов Р450	47
	1.4.3.1	Гранскрипционная регуляция СҮР2С9	50
	1.4.3.2	Гранскрипционная регуляция СҮР2С19	54
	1.4.3.3	Гранскрипционная регуляция СҮРЗА4	56
Глава	a 2. MAT	ЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	67
2.1	Клето	очные линии	67
2.2	Услог	вия культивирования	67
2.3	Полу	чение 2D- и 3D-моделей	67
2.4	Иссле	едуемые соединения	67
2.5	Мног	опараметрический скрининг	73
2	2.5.1 Оце	нка влияния соединений на жизнеспособность клеток	73
2	2.5.2 Фен	отипический анализ фиксированных клеток на основе Hoechst и DiD	74
		нка влияния на жизнеспособность клеток в модели окислительного стресса, ванного пероксидом водорода	.76
2	2.5.4 Оце	нка влияния соединений на митохондриальный мембранный потенциал (ММП)	77
2	2.5.5 Оце	нка уровней мРНК СҮРЗА4, СҮР2С9, СҮР2С19	77

2	.5.6 Оценка уровня белка СҮРЗА4	77
	.5.7 Получение и анализ изображений	
2.6	ОТ-ПЦР анализ экспрессии <i>СҮРЗА4</i> с детекцией в реальном времени (ОТ-ПЦР РВ).	
2.7	Спектрофотометрическая оценка общей антиоксидантной активности (АОА)	
	.7.1 Анализ AOA на основе реакции восстановления железа(III)	
	.7.2 Анализ удаления радикалов DPPH.	
	.7.3 Анализ удаления радикалов ABTS '+	
	.7.4 Активность удаления радикалов	
2.8	Статистический анализ	
Глава	3. РЕЗУЛЬТАТЫ	
3.1	Влияние производных фенозановой кислоты на жизнеспособность клеток	81
	.1.1 Цитотоксическая и цитостатическая активности исследуемых соединений	
3.	.1.2 Общая антиоксидантная активность (АОА)	82
	3.1.2.1 AOA на основе реакции восстановления железа(III)	83
	3.2.2.2 Удаление радикалов DPPH и ABTS · +	84
	.1.3 Влияние исследуемых соединений на жизнеспособность клеток в модели кислительного стресса, индуцированного H ₂ O ₂	84
3. кл	.1.4 Влияние исследуемых соединений на мембранный митохондриальный потенциал леток	88
3.2	Влияние соединений переходных металлов на жизнеспособность клеток	89
3.	.2.1 Цитотоксическая и цитостатическая активности комплексов Cu(II), Mn(II) и Co(II)	89
3.	.2.2 Цитотоксическая и цитостатическая активности нитрозокомплексов рутения	95
3.3	Результаты фенотипического скрининга на основе красителей Hoechst и DiD	98
3.4	Влияние новых соединений на индукцию цитохромов Р450	104
Глава	4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	
	ІЮЧЕНИЕ	
	ОДЫ	
	ок сокращений и условных обозначений	
	ок литературы	

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Онкологические заболевания — серьезная проблема современной медицины. Согласно данным Международного агенства по изучению рака (Global Cancer Observatory, https://gco.iarc.fr/) только в 2020 году в России были зарегистрированы 312 122 смерти от рака (5-е место в мире) и 591 371 новый случай заболевания (7-е место в мире).

Во всем мире в решение задач профилактики, диагностики и лечения злокачественных новообразований вкладываются Поиск огромные ресурсы. разработка новых противоопухолевых препаратов является ключевым направлением деятельности многих фармацевтических компаний и научных групп. Учитывая значительные научно-технические достижения последних десятилетий в области методологии исследований, такие как введение высокопроизводительного скрининга (high throughput screening, HTS), можно было ожидать, что выход новых препаратов в клинику достигнет рекордно высокого уровня. Но фактически выпуск новых лекарств остается в значительной степени статичным. По данным Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, https://www.fda.gov/drugs/) с 2015 по 2021 год ежегодно регистрировалось в среднем 46 лекарственных препаратов, из которых доля противоопухолевых лекарств составляла от 23 до 32 % ежегодно. Это указывает на большое внимание, уделяемое исследованиям в данной области. Большинство новых зарегистрированных препаратов представляет собой малые молекулы с С1 и F в составе и моноклональные антитела. Преимущественно направлены меланомы, они на лечение мелкоклеточного немелкоклеточного рака легкого, рака крови и рака молочной железы.

Отчасти низкая продуктивность вывода новых лекарств в клинику связана с тем, что многие препараты не показывают эффективности на ранних стадиях разработки (на этапе первичного скрининга) по причине некорректно установленной терапевтической мишени и/или неправильно выбранной модели заболевания, а также из-за отсутствия дополнительной информации об эффектах тестируемого агента за пределами гипотезы о терапевтической мишени. Все это может происходить вследствие выбора неверной стратегии поиска новых лекарств, что приводит к необходимости формирования новых подходов при первичном скрининге (Berg, 2021; Moffat et al., 2017; Stahl, 2016; Swinney, 2021, 2013; Swinney and Lee, 2020; Vincent et al., 2022).

Технология многопараметрического скрининга на основе микроскопии (high content screening, HCS) позволяет выполнять большой объем исследований за короткое время и дает возможность оценивать как целевые гены, вовлеченные в патологический процесс, так и

выявлять возможные фенотипические изменения клеток, тем самым расширяя область поиска возможных эффектов соединений (Marwick et al., 2021; Masters, 2010; Thoumine et al., 1999; Zamanian and Chan, 2021). Специальное программное обеспечение для HCS позволяет получать количественную многопараметрическую информацию из изображений и характеризовать клеточные фенотипы в целом для тех или иных экспериментальных условий. Определение причинно-следственных связей между изменением функций мишеней и фенотипическими эффектами может открыть новые и неожиданные пути развития биологии опухоли и представляет собой наилучший способ обнаружения лекарств.

В связи с углублением понимания процессов канцерогенеза, появилось множество направлений в рациональном дизайне малых молекул в качестве потенциальных противоопухолевых агентов. Так, окислительный стресс является хорошо задокументированным явлением при канцерогенезе (Forman and Zhang, 2021; Waris and Ahsan, 2006). Было сделано предположение, что воздействие на антиоксидантную систему может значительно снизить заболеваемость и прогрессирование опухоли (Neha et al., 2019). Это привело поиску противоопухолевых агентов среди синтетических ингибиторов свободнорадикального окисления (Singh et al., 2018; Yun et al., 2015). Одними из наиболее известных антиоксидантов являются алкилированные фенолы, содержащие в качестве заместителей функциональные группы с двухвалентной серой, селеном или теллуром (Farzaliev et al., 1978; Meier et al., 1999; Viglianisi and Menichetti, 2019a). Однако такие соединения изучены недостаточно, информация об их эффективности противоречива.

Важное место среди малых молекул, как потенциальных противоопухолевых агентов, занимают комплексы переходных металлов (Gasser et al., 2011; Rafique et al., 2010; Zhang and Sadler, 2017). В природе металлы являются важными компонентами многих биологических систем. Это положило начало разработке препаратов на основе металлов. Их способность координировать лиганды трехмерным образом соответствии различными координационными числами и геометрией позволяет создавать уникальные молекулярные структуры, специально предназначенные для взаимодействия с определенными мишенями, что невозможно реализовать с помощью обычных молекул на основе углерода. Открытие цисплатина и его производных стало важным этапом развития этой области (Tsvetkova and Ivanova, 2022). В настоящее время активно ведутся разработки новых поколений химиотерапевтических средств на основе переходных металлов для преодоления серьезных нежелательных явлений, наряду с возникновением лекарственной устойчивости.

Решающее значение для предотвращения пагубных эффектов и предварительной оценки возможности межлекарственного взаимодействия имеет исследование потенциальных взаимодействий между новыми молекулами и цитохромами Р450 (СҮР) на ранних этапах

скрининга, так как ингибирование и индукция СҮР, в особенности СҮР 2С9, 2С19, 2D6 и 3A4, являются основными механизмами фармакокинетического взаимодействия лекарств (Esteves et al., 2021; Rendic and Guengerich, 2015; Zanger and Schwab, 2013).

Поскольку новые S- и Se-содержащие алкилфенолы и координационные соединения переходных металлов представляют фундаментальный интерес, а биологические эффекты, вызываемые этими соединениями, разнообразны, но слабо изучены, определение эффективной стратегии скрининга и изучение свойств данных соединений является актуальной задачей для современной биохимии.

Степень разработанности темы исследования

Поиск новых малых молекул, обладающих противоопухолевым действием, ведется во многих направлениях, в том числе в ряду фенольных халькогенсодержащих антиоксидантов и в ряду комплексов переходных металлов.

До недавнего времени в ряду фенольных антиоксидантов подавляющее большинство соединений обладало липофильными свойствами, а число водорастворимых форм было весьма ограничено. Однако разработки направленного синтеза позволили значительно расширить число гидрофильных соединений. Возможность их применения в различных областях биологии и медицины активно исследуется (Bernini et al., 2012; Liu et al., 2022).

Развивается координационная и медицинская химия разнолигандных комплексов переходных металлов. За последнее десятилетие появилось значительное количество новых соединений, обладающих биологической активностью и предположительно потенциалом в области медицины. Широко известна серия цитотоксичных комплексов Casiopeinas с общей формулой [Cu(олигопиридин)(H_2O)L] NO_3 , где L – аминокислота или ацетилацетонат, так как в настоящее время одно соединение этой серии проходит первую фазу клинических исследований (Masuri et al., 2021). Определенный успех Casiopeinas привел к появлению огромного количества новых соединений с заменой лиганда L в комплексах этой серии, а также координационных соединений других эссенциальных металлов (Мп, Со, Zn и т.д.) с олигопиридинами. Так как свойства координационных соединений сильно зависят как от природы металла, так и от его лигандного окружения, подобные замены могут приводить к существенным изменениям их биологических свойств. Еще одним ярким примером являются комплексы рутения НАМИ-А {(ImH)[транс-Ru(ДМСО)(Im)Cl4, Im – имидазол}, KP1019 {(IndH)[транс -Ru(Ind)₂Cl₄], Ind – индазол} и KP1339 {Na[транс-Ru(Ind)₂Cl₄]} (Alessio and Messori, 2019). Несмотря на структурное сходство биологические и фармакологические профили этих соединений сильно различаются. Что касается нитрозокомплексов рутения, то они в основном рассматриваются как переносчики NO, способные выделять NO после фотоактивации или восстановления (Tfouni et al., 2011).

Таким образом, очевидными становятся как интерес в научном мире к фенольным халькогенсодержащим соединениям и координационным соединениям переходных металлов, так и необходимость применения высокопроизводительных технологий в изучении их биологических эффектов.

К моменту начала данной работы научной группой кафедры химии НГПУ и сотрудниками ИНХ СО РАН были синтезированы и охарактеризованы новые соединения, потенциально обладающие противоопухолевой активностью: гидрофильные халькогенсодержащие фенольные антиоксиданты и координационные соединения переходных металлов с N-донорными лигандами. Однако исследование их биологических свойств не проводилось, либо ограничивалось отдельными биохимическими анализами.

Цель настоящей работы – исследовать цитотоксические и цитостатические свойства, а также влияние на индукцию цитохромов P450 2C и 3A новых производных фенозановой кислоты и координационных соединений переходных металлов с N-донорными лигандами в культурах опухолевых клеток человека методами многопараметрического скрининга.

Задачи:

- 1. Провести первичный скрининг новых соединений для изучения цитотоксической и цитостатической активности на 2D- и 3D-культурах опухолевых клеток человека (аденокарциномы молочной железы МСF-7, карциномы гортани Нер-2 и гепатоцеллюлярной карциномы НерG2) в сравнении с активностью на неопухолевых фибробластах человека МRC-5 и мезенхимальных стволовых клетках человека МСК.
- 2. Исследовать влияние гидрофильных производных фенозановой кислоты на жизнеспособность клеток Hep-2, HepG2, MCF-7 и MCK в модели окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 .
- 3. Определить влияние фотоиндуцирующего излучения на цитотоксическую и цитостатическую активности нитрозокомплексов рутения.
- 4. Сравнить фенотипические изменения в клеточных популяциях Нер-2 и МСF-7 при воздействии новых соединений с таковыми у соединений с известным механизмом действия, используя метод многопараметрического скрининга с красителями Hoechst и DiD.
- 5. Изучить на клетках HepG2 влияние координационных соединений переходных металлов на уровень мРНК и белка основных цитохромов P450, ответственных за метаболизм лекарственных препаратов: CYP3A4, CYP2C9 и CYP2C19.

Научная новизна работы

Впервые подробно исследованы цитотоксическая и цитостатическая активности новых соединений, представленных в данной работе, на 2D-культурах опухолевых клеток человека MCF-7, Hep-2, HepG2 и неопухолевых фибробластов MRC-5, а также 3D-культуре HepG2.

Показано, что селен- и серосодержащие производные фенозана калия проявляют низкие цитотоксическую и цитостатическую активности. Антиоксидантная активность фенозана калия и его Se- и S-содержащих производных подтверждена в модели окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 . Установлено, что исследованные халькогенсодержащие фенольные соединения способны усиливать клеточную гибель в концентрациях > 25 мкМ при дополнительной генерации активных форм кислорода (АФК) для некоторых типов клеток.

Показано, что среди координационных соединений меди(II), марганца (II) и кобальта(II) с олигопиридинами и производными тетразола комплексы меди(II) проявляют выраженную дозозависимую цитотоксическую активность, а комплексы марганца(II) — цитостатическую. Наличие производного тетразола оказывает существенное влияние на их селективность для разных типов клеток и цитостатическую и цитотоксическую активности для 3D-культуры.

Нитрозокомплексы рутения проявляют дозозависимые цитотоксическую и цитостатическую активности на 2D- и 3D-модели клеток, которая зависит как от фрагмента изоникотиновой или никотиновой кислот, так и от фрагмента метилового или этилового эфиров в структуре нитрозокомплекса рутения. Активность комплекса с у-пиколином соответствует активности соединения с метилизоникотинатом. Фотоиндуцирующее излучение (445 нм, 30 мВт, 30 мин) в два раза снижает цитотоксическую и усиливает цитостатическую активности комплекса с этилизоникотинатом.

Впервые исследовано влияние полученных оригинальных соединений на экспрессию основных цитохромов P450, ответственных за метаболизм лекарств. Показано, что комплексы $[Cu(L)_2]$, $[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$ и $\{[Cu(phen)(MT)_2]\cdot H_2O\}_n$ являются индукторами CYP3A4, для комплексов $[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$ и $\{[Cu(phen)(MT)_2]\cdot H_2O\}_n$ наблюдается тенденция к снижению экспрессии *CYP2C9*. Индуцирующее действие комплексов на CYP3A4 зависит как от производного тетразола, так и от олигопиридина.

Нитрозокомплексы рутения [RuNOCl₃(NicMe)₂], [RuNOCl₃(NicEt)₂], [RuNOCl₃(InicMe)₂] и [RuNOCl₃(InicEt)₂] оказывают индуцирующее действие на CYP3A4 и CYP2Cl9 и не влияют на экспрессию *CYP2C9*. Наличие фрагмента никотиновой/ изоникотиновой кислот в структуре комплекса влияет на экспрессию *CYP2Cl9*: комплексы с метилизоникотинатом и этилизоникотинатом индуцируют *CYP2Cl9* в более низких концентрациях по сравнению с комплексами с метилникотинатом и этелникотинатом, соответственно. Комплекс [RuNOCl₃(γ-Pic)₂] оказывает индуцирующий эффект на CYP3A4.

Показана возможность использования фенотипического скрининга на основе красителей Hoechst и DiD в *in vitro* модели, для выявления соединений, обладающих активностью, схожей с активностью соединений с известным механизмом действия. Выявлены фенотипические изменения клеток, характеризующие митотическую катастрофу.

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование биологических свойств новых соединений, потенциально обладающих противоопухолевой активностью, является существенным вкладом в фундаментальные знания в области медицинской биохимии. Установленные взаимосвязи «структура – активность» могут быть впоследствии использованы для направленного синтеза новых соединений с заданными функциональными свойствами. Ряд соединений, таких как исследованные нитрозокомплексы рутения, $[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$, $[Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4]$, комплексы марганца(II) и Se-содержащее производное фенозана калия можно использовать для дальнейших исследований в качестве потенциальных противоопухолевых агентов.

Методология и методы исследования

Диссертационное исследование проводилось с применением современной технологии многопараметрического скрининга, молекулярно-биологических и биохимических методов. Исследование влияния соединений на жизнеспособность клеток проводили на 2D- и 3D-клеточных моделях с помощью фенотипического скрининга. Антиоксидантная активность фенольных соединений дополнительно изучалась спектрофотометрическими методами. С помощью целевого скрининга исследовали влияние соединений на уровни мРНК и белка СҮР2С9, СҮР2С19 и СҮР3А4. Результаты индукции СҮРЗА4 подтверждали методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с детекцией в реальном времени.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1. Определены связь «структура цитотоксическая и цитостатическая активности» и дозовая зависимость цитотоксической и цитостатической активности для каждого ряда исследованных соединений.
- 2. Новые S- и Se-содержащие производные фенозана калия проявляют антиоксидантную активность в модели индуцированного H_2O_2 окислительного стресса, зависящую от типа клеток: в высоких концентрациях они способны усиливать клеточную гибель при дополнительной генерации активных форм кислорода.
- 3. Координационные соединения меди(II) с олигопиридинами и нитрозокомплексы рутения проявляют цитотоксическую активность сравнимую или превосходящую активность цисплатина и карбоплатина, соединения марганца(II) оказывают сильный

- цитостатический эффект. Фотоиндуцирующее излучение влияет на активность нитрозокомплекса рутения с этилизоникотинатом.
- 4. Соединения меди(II) оказывают индуцирующее действие на экспрессию *СҮРЗА4*. Нитрозокомплексы рутения индуцируют экспрессию *СҮР2С19* и *СҮРЗА4*.
- 5. Фенотипический скрининг на основе красителей Hoechst и DiD позволяет характеризовать фенотипы опухолевых клеток человека при воздействии новых соединений и сравнивать их с клеточными фенотипами, вызываемыми препаратами с известными механизмами действия.

Личный вклад соискателя

Автор принимал непосредственное участие в планировании экспериментов и лично выполнил весь блок исследований. Соединения для изучения были любезно предоставлены научными группами под руководством к.х.н. Лидер Е. В. и д.х.н., доцента Костина Г. А. (ИНХ СО РАН), а также научной группой под руководством д.х.н., профессора Кандалинцевой Н. В. (НГПУ). Совместно с научным руководителем и соавторами проводилась подготовка статей и тезисов докладов к публикации.

Апробация результатов

Результаты диссертационной работы были представлены на международных и всероссийских конференциях: Конгресс молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» (2018 г., г. Томск), 3-я Школа ADFLIM (Advanced Fluorescence Imaging Methods, 2018 г., г. Саратов), XX Зимняя молодежная школа ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии (2019 г., г. Гатчина), VI Съезд биофизиков России (2019 г., г. Сочи), Первая всероссийская школа для молодых ученых по медицинской химии МЕDCHEMSCHOOL2021 (2021 г., г. Новосибирск), Всероссийская конференция с международным участием «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (2022 г., г. Новосибирск).

Степень достоверности

Воспроизводимость полученных результатов и согласованность данных различных методов исследования подтверждают достоверность результатов. Публикации в рецензируемых журналах свидетельствуют о значимости полученных результатов и их признании научным сообществом.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 5 статей и 7 тезисов в журналах, индексируемых в базах научной литературы Web of Science и Scopus и входящих в список ВАК.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 153 страницах, содержит 43 рисунка и 17 таблиц. Работа состоит из введения, обзора литературы (гл.1), экспериментальной части (гл. 2), результатов (гл. 3) и их обсуждения (гл. 4), заключения, выводов, списка сокращений и списка литературы (374 наименования).

Диссертационная работа выполнена в Научно-исследовательском институте молекулярной биологии и биофизики — структурном подразделении Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» (НИИМББ ФИЦ ФТМ) с использованием оборудования ЦКП «Протеомный анализ» ФИЦ ФТМ, поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075-15-2021-691). Работа проводилась в рамках бюджетного научного проекта ФИЦ ФТМ № гос. регистрации АААА-А18-118012490236-3. Исследование было поддержано РФФИ в рамках научного проекта №19-34-90129 (руководитель Вавилин В.А.).

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Клеточная визуализация в открытии лекарств

Клеточная визуализация, ранее считавшаяся описательной наукой с низкой пропускной способностью, в настоящее время широко используется как инструмент в области фундаментальных и прикладных исследований, в том числе клеточной биологии, проверки безопасности соединений и открытии лекарств.

С конца 1960-х годов начался период быстрых разработок в области приборов и программного обеспечения для получения и обработки изображений (Taylor, 2006). Появлялись детекторы, способные регистрировать слабые сигналы флуоресценции (Reynolds, 1972; Reynolds and Taylor, 1980). В 1978 г. был создан первый автоматический микроскоп (Taylor, 2006), а в 1982 г. фирма Carl Zeiss представила первый лазерный сканирующий микроскоп (Masters, 2010). С 1999 г. в микроскопических исследованиях стали использовать микропланшеты (Thoumine et al., 1999). Появилась возможность сочетать флуоресцентный микроскоп с множеством детекторов: фотоэлектронными умножителями (ФЭУ), лавинными фотодиодами и камерами на основе прибора с зарядовой связью (ПЗС-матрицами) (Swedlow, 2012). Запись первых трехмерных (ЗD) изображений с помощью флуоресцентной оптической секционной микроскопии позволила определить трехмерную структуру хромосом в интактном ядре и специфические взаимодействия между хроматином и ядерной оболочкой (Agard and Sedat, 1983).

Параллельно с развитием аппаратуры появлялось новое программное обеспечение для анализа получаемых изображений (Thomas, 2009). Такие программы как Metamorph и MATLAB, появившиеся еще до 1996 г. и управляемые скриптом, требовали специальных знаний и обучения пользователей. Позднее были созданы так называемые законченные алгоритмы, которые позволили значительно ускорить и упростить анализ изображений. Их обновленные версии по-прежнему широко используются. Все эти новые технологии позволили внедрить флуоресцентную микроскопию во многие области биологических исследований (Farahani and Monteith, 2016).

Не менее важными являются достижения в области маркировки и обнаружения различных мишеней. Появление иммунофлоресцентной микроскопии, предложенной Куном и Капланом в 1950 г., стало первым критическим этапом современной эпохи флуоресцентной микроскопии (Coons and Kaplan, 1950; McNamara et al., 2005). Маркировка антигенов флуоресцентно мечеными антителами позволила создать контраст через молекулярную

специфичность и исследовать локализацию антигена в клетке, что дало возможность количественного анализа.

В начале 1990-х годов началась эпоха бурного развития реагентов на основе флуоресценции. Велась разработка ряда водорастворимых, ярких и стабильных флуоресцентных красителей (Petit et al., 1993). Были получены цианиновые красители с диапазоном излучения от синей до ближней инфракрасной области спектра. Теперь можно было сопоставлять множество клеточных параметров, получаемых от одних и тех же клеток (DeBiasio et al., 1987). Развитие флуоресцентных аналогов белков в конце 1970-х годов привело к созданию флуоресцентных биосенсоров, реагентов, которые предоставляли информацию о биохимических или молекулярных изменениях, а не только их распределении внутри клетки (Giuliano et al., 1995; Giuliano and Taylor, 1998).

Существующий на данный момент широкий спектр флуоресцентных молекулярных красителей, таких как Hoechst 33342 (визуализация хроматина), пропидий йодид (PI) или SYTOX (визуализация хроматина в некротических клетках), ТМRМ (визуализация изменений митохондриального мембранного потенциала), акридиновый оранжевый (визуализация ДНК/ РНК), СМ-DiI (визуализация клеточных мембран) (Herpers and van de Water, 2013) и флуоресцентных белков, таких как зеленый (GFP), синий (СFP), желтый (YFP), красный (RFP) (Sпарр, 2005), дает возможность для характеристики почти, если не всех, внутриклеточных структур, нуклеиновых кислот и белков.

По мере развития новых методов получения и обработки изображений появлялись и новые возможности их применения. В современном понимании, клеточная визуализация (cellular imaging) представляет собой использование системы/технологии, способной визуализировать клеточную популяцию, отдельные клетки или субклеточные структуры, в сочетании с инструментами анализа изображений (Lang et al., 2006). Такие системы обнаружения включают (но не ограничиваются ими) микроскопы, флуоресцентные детекторы и флуориметрические планшетные анализаторы (fluorometric imaging plate readers, FLIPR), в сочетании с ПЗС-камерами. Эти системы генерируют двумерный пиксельный массив информации (цифровое изображение), извлеченный из определенного биологического события. На данный момент разработаны различные инструменты анализа изображений для преобразования информации цифрового изображения в значимые параметры. Идеальная система визуализации должна позволять анализировать отдельные клетки с высоким разрешением, проводить высокопроизводительные и кинетические исследования живых клеток, она должна быть связана с эффективными системами хранения и сжатия данных и удобными программами анализа изображений.

Современные платформы визуализации позволяют быстро считывать микропланшеты, что позволяет тестировать большое количество условий в одном и том же эксперименте за короткое время. В дополнение к этому, автоматизированное получение, обработка и анализ изображений с удобными интерфейсами значительно способствовали интеграции современной клеточной визуализации.

Модели исследования in vitro обладают многими преимуществами по сравнению с моделями исследования in vivo. Клетки можно выделять из конкретного органа, обрабатывать и культивировать в соответствии с требованиями исследования (Chen et al., 2019; Kapałczyńska et аl., 2018). Относительные простота и низкая стоимость таких экспериментов привели к повсеместному применению 2D-культур в исследованиях клеточной биологии, развития тканей, механизмов развития заболеваний и разработке лекарств. Однако 2D-модели *in vitro* не могут имитировать нативную тканевую среду, что важно для изучения физиологии тканей. Поэтому были разработаны 3D-модели, такие как сфероиды, органоиды, системы динамических культур, микроткани, системы «орган-на-чипе» и другие, для культивирования клеток в более естественной среде, приближенной к условиям in vivo (Kapałczyńska et al., 2018; A. Lin et al., 2020). Многие исследователи переходят от традиционных 3D-моделей к 3D-моделям, созданным из биологических материалов (3D-биопечать), что способствует более точному и контролируемому воспроизведению сложной архитектуры тканей (Xiang et al., 2022). Однако в большинстве 3D-моделей отсутствуют другие факторы нативной ткани, такие как присутствие других типов клеток, а также сигнальных молекул из непосредственной и отдаленной среды (Kapałczyńska et al., 2018; A. Lin et al., 2020). Следовательно, для преодоления вышеупомянутых ограничений требуется проведение исследований in vivo. Типичное исследование in vivo заканчивается умерщвлением животного с последующим забором интересующего органа. Гистологический анализ дает информацию в одной статической точке, которая не может описать динамику происходящих клеточных процессов (Han et al., 2016). Помимо этого эксперименты *in vivo* в некоторых областях исследований, таких, например, как оценка межлекарственных взаимодействий, весьма трудоёмки из-за видовой специфичности, вызванной генетическими различиями, в конкретном примере, метаболических ферментов и ядерных рецепторов, у людей и животных (Martignoni et al., 2006).

Изучение клеток в контексте целого организма, вероятно, является самым адекватным способом понимания функций и физиологии клеток и патофизиологии. Разработка в 1990 г. двухфотонного лазерного микроскопа (Svoboda and Yasuda, 2006) стала одним из наиболее важных достижений в области интравитальной визуализации, обеспечивающей субклеточное разрешение в тканях и организмах. В результате применения двухфотонного микроскопа удалось добиться хорошей чувствительности, относительно низкого поглощения и получения

трехмерного изображения, по меньшей мере, 500 мкм ткани (Costanzo and Costanzo, 2022; Swedlow, 2012). Пока что достигнуть глубин более 2 мм довольно сложно из-за шума, получаемого при суммировании эффектов рассеяния и аберрации. Независимо от этого, многофотонный микроскоп произвел революцию во многих научных областях. С его помощью была показана структура и динамика отдельных синапсов в мозге живого млекопитающего (Svoboda and Yasuda, 2006).

Комбинация микроскопии и эндоскопии (так называемая микроэндоскопия) обеспечивает доступ к субклеточному разрешению в контексте живых тканей. Разработка новых флуоресцентных зондов и применение других микроскопических технологий также значительно повысила мощность интровитальной микроскопии (Pittet and Weissleder, 2011). Интровитальная микроскопия обеспечивает визуализацию клеточных событий в естественной тканевой среде в режиме реального времени и позволяет получать изображения от одного и того же животного, что дает полную картину сложных динамических процессов в целом. Интровитальная микроскопия используется во многих областях исследований, включая изучение нервных и стволовых клеток, развития репродуктивных, глазных, кожных, сердечнососудистых и инфекционных заболеваний (Vaghela et al., 2021).

Однако цель данного обзора заключается в выборе оптимальной стратегии и направления первичного скрининга *in vitro* для исследования биологических свойств новых синтезированных соединений, потенциально обладающих противоопухолевой активностью.

1.1.1 Многопараметрический скрининг

Многопараметрический скрининг (high content screening, HCS) представляет собой мощный инструмент для изучения внутриклеточных процессов. Он был разработан в основном для биомедицинских исследований и открытия лекарственных препаратов (Reynolds, 1972). Научные достижения (начиная с 1950 г.), уже рассмотренные выше, привели к появлению в 1997 г. и развитию данного метода (рис. 1).

Начиная с разработки системы формирования и анализа изображений со своим программным обеспечением Cellomics ArrayScan в конце 1990-х годов создавались различные платформы, на которых сегодня проводятся исследования HCS (Reynolds and Taylor, 1980).

Типичный многопараметрический скрининг включает окраску (флуоресцентными красителями, молекулярными зондами, антителами, индуцированной экспрессией флуоресцентных белков или репортерных генов) биологических образцов (образцов тканей, первичной культуры, клеточной линии) в соответствии с поставленными задачами, получение изображений с помощью автоматизированной микроскопии и извлечение количественной

многопараметрической информации (Reynolds, 1972). Рисунок 2 суммирует основные этапы HCS.

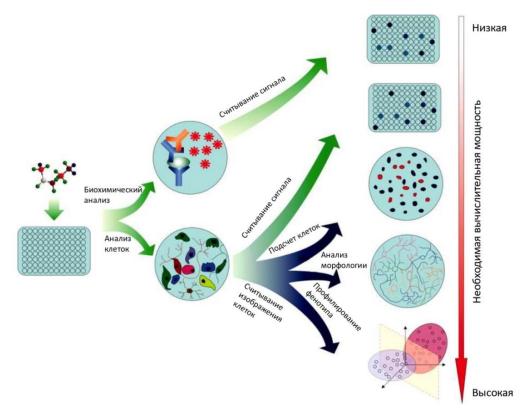


Рисунок 1. Скрининг химических соединений. Скрининг подразумевает автоматическое тестирование большого количества исследуемых соединений и может проводиться как на отдельных биохимических молекулах (высокопроизводительный скрининг, HTS), так и на клеточных культурах (высокопроизводительный и многопараметрический скрининги, HTS и HCS). В качестве параметров для оценки оказываемых эффектов используют различные измерения. Конкретно в HCS используются параметры, полученные из микроскопических изображений (синие стрелки) в отличие от HTS, в котором применяют также методы массспектрометрии и проточной цитометрии (Reynolds, 1972).

Современная полная автоматизация процесса (от раскапывания жидкостей до обработки данных) и использование микропланшетов позволяют проводить тысячи химических, генетических или фармакологических тестов. В настоящее время метод многопараметрического скрининга на основе флуоресценции находит широкое применение. С его помощью изучают внутриклеточные фенотипические изменения, такие как экспрессия белка или его транслокация, выявление и количественное определение клеточной гетерогенности (Reynolds, 1972), профилирование клеток (Reynolds and Taylor, 1980), ранняя оценка безопасности соединений (Donato and Tolosa, 2021). Получение морфометрических данных для

классификации возмущений в соответствии с изменениями формы и поведения клеток используется для тестирования лекарственных препаратов (Marwick et al., 2021; Masters, 2010; Thoumine et al., 1999; Zamanian and Chan, 2021). Далее подробнее рассмотрены основные ключевые моменты проведения многопараметрического скрининга.



Рисунок 2. Основные этапы многопараметрического скрининга. HCS включает в себя выбор подходящей тест-системы, инкубацию с исследуемыми соединениями в диапазоне концентраций, инкубацию с комбинацией флуоресцентных зондов, автоматическое получение изображений, анализ полученных изображений и управление данными.

1.1.1.1 Основные подходы многопараметрического скрининга

Текущие стратегии открытия лекарств включают как молекулярные, так и эмпирические подходы. Молекулярные подходы преимущественно основаны на гипотезах и называются целевыми (target-based drug discovery, TDD). Эмпирические подходы называются фенотипическими (phenotypic drug discovery, PDD), поскольку они основаны на фенотипических показателях реакции (Moffat et al., 2017).

Ранние лекарства были найдены благодаря эмпирическим наблюдениям, но по мере развития фундаментальных знаний в области биологии и медицины росло и стремление к более рациональному подходу в создании новых лекарств. TDD начинается с определенной молекулярной мишени. Мишенью обычно является один ген, белок или молекулярное событие, которое считается вовлеченным в этиологию заболевания. Хорошим примером, демонстрирующим полезность целевого скрининга, является идентификация пимавансерина

как обратного агониста рецептора 5HT2A (серотонин), ключевой молекулярной мишени, вовлеченной в психоз. После этого лекарство пимавансерин было одобрено Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для лечения психоза при болезни Паркинсона в 2016 году (Stahl, 2016).

Хотя TDD является выгодным с точки зрения производительности и затрат, он не привел к сопутствующему увеличению числа новых молекулярных объектов и открытию биологических продуктов.

Другой распространенной стратегией поиска лекарств является фенотипический (независимый от мишени) скрининг, при котором лекарства идентифицируются без предварительного знания конкретной молекулярной мишени. Вместо этого лекарства тестируются на предмет их фармакологического действия для достижения желаемого фенотипа. Таким образом, PDD дает возможность идентифицировать новые механизмы и молекулярные механизмы, которые нельзя было бы предсказать на основе имеющихся знаний. Хорошим примером лекарств, открытых с помощью PDD, являются антибиотики, поскольку в основном они были идентифицированы благодаря их способности ингибировать рост или убивать бактерии без знания их конкретного механизма действия (Testa and Johnson, 2012).

Анализ, проведенный Swinney и Anthony в 2011 году, подчеркнул значительный вклад PDD в открытие первых в своем классе лекарств (рис. 3), что в значительной степени вернуло интерес к этому подходу (Swinney, 2013).

Еще одной из сильных сторон PDD является перепрофилирование уже зарегистрированных лекарств для быстрого определения новых методов лечения. Это особенно важно для новых патогенов, таких как COVID-19. Так, проведя фенотипический скрининг уже одобренных соединений с широким спектром противовирусной активности, Wang и его коллеги показали, что ремдесивир и хлорохин высоко эффективны в борьбе с 2019-nCoV в условиях *in vitro* и предложили оценить их эффективность у пациентов, страдающих новым коронавирусным заболеванием (Wang et al., 2020).

Тем не менее, подходы PDD также имеют значительные проблемы, такие как проверка попадания и деконволюция цели.

В процессе сравнения двух ключевых подходов к поиску лекарств: целевого скрининга и фенотипического скрининга — проблем и возможностей каждого из них, научное сообщество пришло к выводу, что эти подходы должны рассматриваться не как альтернативные, а как взаимодополняющие стратегии, которые вместе могут повысить шансы открытия и разработки новых лекарств (Berg, 2021; Moffat et al., 2017; Swinney, 2021; Swinney and Lee, 2020; Vincent et al., 2022).

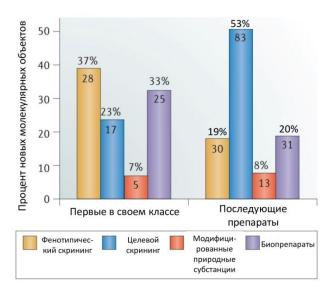


Рисунок 3. Распределение новых лекарств, открытых в период с 1999 по 2008 год, в соответствии со стратегией скрининга. На графике показано количество новых препаратов в каждой категории. Фенотипический скрининг был наиболее успешным подходом для первых в своем классе препаратов, тогда как скрининг на основе мишеней был наиболее успешным для последующих препаратов в период проведения этого анализа. Общее количество лекарств, обнаруженных с помощью фенотипических анализов, было одинаковым для первых и последующих лекарств — 28 и 30 соответственно. Общее количество лекарственных средств, обнаруженных в результате целевого скрининга, было почти в пять раз выше для последующих препаратов, чем для первых в своем классе (83 против 17, соответственно) (Swinney, 2013).

1.1.1.2 Выбор клеточной модели

В многопараметрическом скрининге используются различные модели *ex vivo* и *in vitro*, от первичных культур до сложных 3D-моделей (Kapałczyńska et al., 2018).

Разрабатываются различные модели культивирования клеток *in vitro* для проведения широкого круга исследований (фундаментальных, фармакологических, токсикологических и т.д.). Источник используемых клеток имеет решающее значение для таких моделей.

Исследование лекарств *ex vivo* в режиме реального времени позволяет адаптировать индивидуальную терапию на основе прогнозируемой реакции на лекарство. Jeong-Woo с коллегами провели многопараметрический скрининг для определения подходящих препаратов для конкретных пациентов с глиобластомой (Oh et al., 2021). Кроме того, в результате скрининга перепрофилирования лекарств, они определили ингибитор циклинзависимых киназ (CDK)4/6 абемациклиб как ингибитор рецептора тирозинкиназы с-МЕТ.

Первичные культуры клеток человека в настоящее время считаются золотым стандартом для модели *in vitro*, поскольку они напрямую отражают специфичность и функциональность

конкретных тканей человека (Zeilinger et al., 2016). Однако поддержание фенотипа *in vivo* в традиционной двумерной (2D) культуре выделенных клеток является сложной задачей, так как клетки в монослое претерпевают значительные изменения и быстро теряют свои функции (Kaur and Dufour, 2012; Schyschka et al., 2013).

Широко распространены линии иммортализованных клеток человека (Tolosa et al., 2012). Например, линии гепатоцитов, такие как HepG2 и HepaRG, широко используются в фармакологических и токсикологических исследованиях в качестве замены первичных гепатоцитов человека (primary human hepatocytes, PHH) при скрининге лекарств (O'Brien et al., 2006). Еще один вариант клеточного материала – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (induced pluripotent stem cells, iPS cells). Технология получения iPS была представлена в 2006 году учеными из Киотского университета Японии. Их получают перепрограммированием соматических клеток посредством введения нескольких генов из эмбриональных стволовых клеток (с факторами Oct3/4, Sox2, c-Myc, и Klf4) (Takahashi et al., 2007). Различные типы клеток, получаемые из iPS клеток, имеют основные функции первичных культур. Использование iPS позволяет решить основные проблемы, связанные с ограниченными ресурсами, коротким временем жизни первичных клеток in vitro и помогает разрешить этические вопросы, связанные с использованием стволовых клеток из эмбрионов (Rowe and Daley, 2019). Подход с использованием iPS клеток является ключом к персонализированной медицине, позволяя расширить круг исследований по изучению специфических реакций на лекарственные препараты у конкретных пациентов.

При использовании стандартных 2D-моделей *in vitro* не представляется возможным воссоздать такие критически значимые в биологии явления, как гетерогенность клеточных популяций, взаимодействие с микроокружением и организмом в целом. Модели *in vitro* с клетками, расположенными в трехмерной (3D) структуре, лучше имитируют ответы в ткани. Были разработаны 3D-модели, такие как сфероиды, органоиды, системы динамических культур, микроткани, системы «орган-на-чипе» и другие, для культивирования клеток в более естественной среде, приближенной к условиям *in vivo* (Kapałczyńska et al., 2018; A. Lin et al., 2020). Современная аппаратура позволяет проводить многопараметрический скрининг в 3D-моделях клеточных сфероидах (Sirenko et al., 2015; Wardwell-Swanson et al., 2020). Технологии получения сфероидов для исследования НСЅ являются критически важным моментом, так как могут оказать существенное влияние на последующую совместимость с методами 3D-визуализации. За последние несколько десятилетий были описаны многочисленные методы создания 3D-моделей сфероидов. Для получения некоторых моделей сфероидов используют каркасы для облегчения организации клеток. Однако некоторые материалы каркаса могут препятствовать визуализации, и их следует избегать. Например, использование каркаса из

гидрогеля препятствует автофокусировке из-за большого разброса по оси z, а каркас из толстых коллагеновых матриц понижает проникновение света и усиливает рассеяние.

1.1.1.3 Исследуемые соединения и флуоресцентные зонды

Второй этап многопараметрического скрининга включает инкубацию с исследуемыми соединениями (рис. 2). На этом этапе необходимо правильно выбрать соответствующие положительные и отрицательные контроли, чтобы гарантировать обнаружение желаемой конечной точки. Так же следует учитывать, что некоторые соединения могут быть автофлуоресцентными и могут мешать работе некоторых выбранных флуоресцентных зондов.

Многопараметрический скрининг позволяет мультиплексировать информацию, полученную в одном анализе, с помощью комбинации флуоресцентных зондов (Lang et al., 2006). В таблице 1 представлены примеры часто используемых в исследованиях молекулярных зондов.

Таблица 1. Флуоресцентные молекулярные зонды, используемые в биологических исследованиях.

Флуоресцентные зонды	Применение	Длины волн возбуждения/ излучения, нм	Ссылка
Ядро			
Hoechst 33342	Подсчет клеток,	361/497	(Solovieva et al.,
	морфология ядер, анализ		2016; Wills et al.,
	микроядер		2021)
DAPI	Подсчет клеток,	350/ 470	(Tarnowski et al.,
	морфология ядра		1991)
DRAQ5	Подсчет клеток,	655/ 730	(Smith et al., 2004)
	морфология ядра		
Пропидий йодид	Жизнеспособность	536/ 617	(Solovieva et al.,
(PI)			2016)
YO-PRO-1	Апоптоз	491/509	(Pena et al., 2005)
EthD-1	Жизнеспособность	528/ 617	(Pena et al., 2005)
TOTO-3	Жизнеспособность	642/660	(Chen et al., 2000)
SNARF-1	Изменение рН от 7 до 8	580/ 640	(Pena et al., 2005)
Image-iT DEAD	Жизнеспособность	488/ 515	(Coelho et al.,

Green			2012)
Митохондрия			
TMRM	Митохондриальный мембранный потенциал	549/ 576	(Petrat et al., 2003)
TMRE	Митохондриальный мембранный потенциал	550/ 576	(Mitra et al., 2009)
Mitotracker Deep	Локализация митохондрий	644/ 665 490/ 516	(Berg et al., 2019; Zhitomirsky et al.,
	······································	., 5, 515	2018)
MitoSOX Red	Продукция супероксида	510/580	(Johnson-Cadwell et al., 2007)
JC-1	Митохондриальный мембранный потенциал	514/529-590	(Sivandzade et al., 2019)
Цитоплазма			
Fluo-4 AM	Концентрация внутриклеточного кальция	494/ 516	(Rossi and Taylor, 2020)
Calcein AM	Жизнеспособность, множественная лекарственная устойчивость (МЛУ)	495/ 515	(Lebedeva et al., 2011)
BODIPY 493/503	Накопление нейтральных липидов	493/ 503	(Qiu and Simon, 2016)
LipidTOX Red	Накопление фосфолипидов	515/ 615	(Eggert et al., 2014)
Монохлорбиман (mBCl)	Уровень глугатиона	380/ 460	(Sebastià et al., 2003)
CellROX	Активные формы кислорода (АФК)	485/ 520	(Bromfield and Iacovides, 2017)
BODIPY 665	Перекисное окисление липидов	665/ 676	(Raudsepp et al., 2014)
CM-H2DCFDA	Образование пероксида водорода	495/ 527	(Ameziane El Hassani and Dupuy, 2013)

Клеточная мембрана			
CM-DiI:	Отслеживание меченых		(Weir et al., 2008)
DiA	клеток in vivo	491/613	
DiI		549/ 565	
DiD		644/ 663	
DiO		484/ 501	
Лизосома			
Lysotracker	Локализация лизосом	504/511	(Zhitomirsky et al.,
			2018)

Основные критические моменты при выборе флуоресцентных зондов: оптическая совместимость, ограничения системы визуализации, использование оптимальных длин волн возбуждения и излучения для регистрации сильного сигнала и совместимость флуоресцентных красителей с условиями эксперимента. Например, многие красители токсичны, и необходимо учитывать концентрационную и временную зависимости их воздействия на клетки.

В таблице 1 представлены далеко не все доступные флуоресцентные зонды для клеточных исследований. Часто один краситель, нацеленный на мечение определенной клеточной структуры, имеет несколько вариаций с разными длинами волн возбуждения/ излучения (такие как Mitotracker Deep и CM-DiI), что увеличивает количество возможных оптимальных сочетаний разных зондов в зависимости от поставленных задач.

Альтернативой молекулярным флуоресцентным зондам являются флуоресцентные белки, такие как GFP (зеленый), CFP (синий), YFP (желтый), RFP (красный) (Snapp, 2005). Они позволяют маркировать конкретные клеточные органеллы и отслеживать их динамику. Иммунофлуоресцентный анализ фиксированных клеток с помощью меченных моноклональных антител также позволяет более детально изучать различные процессы, включая изменения в локализации или экспрессии белка (Mancio-Silva et al., 2019).

Еще одним важным инструментом стала технология гибридизации *in situ* (Jensen, 2014). Этот метод используется для обнаружения нуклеотидных последовательностей в клетках, срезах тканей и даже в целых тканях. Он основан на комплементарном связывании нуклеотидного зонда, меченого флуоресцентным основанием, с определенной целевой последовательностью ДНК или РНК. Гибридизация *in situ* широко используется в исследованиях, а также в диагностических целях.

1.1.1.4 Получение и анализ изображений

После инкубации с флуоресцентными зондами выполняется автоматическое получение флуоресцентных изображений в отдельных каналах. На данный момент автоматизированные платформы клеточной визуализации, применимые для проведения HCS, от таких компаний, как Molecular Devices (https://www.moleculardevices.com/products/cellular-imaging-systems/high-content-imaging/) и Thermo Fisher Scientific (https://www.thermofisher.com/) широко представлены на рынке.

Качество микроскопии обычно оценивают по трем критериям: чувствительность, al., 2017). Невозможно разрешение скорость (Wright et иметь оптимальную производительность по каждому критерию, поэтому необходимо находить баланс между ними в зависимости от поставленных задач. Выбор объектива влияет на разрешение, поле зрения и чувствительность, и его следует учитывать при планировании HCS с учетом того, какие объекты будут визуализироваться: клеточные популяции, отдельные клетки или субклеточные компартменты. Кроме того, учитывая, что визуализация большого количества клеток для достижения высокой пропускной способности требует много времени, правильный фокус имеет решающее значение для правильной разработки и проведения многопараметрческого скрининга (Bougen-Zhukov et al., 2017). Методы автофокусировки прибора также влияют на его производительность, так автофокусировка на основе изображений медленнее, чем лазерная, но зато лучше подходит для получения изображений трехмерных структур (LIRON et al., 2006).

Из-за большого количества изображений, которые создаются при НСS, автоматическая обработка и анализ изображений имеют решающее значение. В настоящее время существует множество различных пакетов программного обеспечения для анализа изображений как с открытым исходным кодом (CellProfiler/CPA^{WML}, HCS-Analyser^{W)}, так и коммерческих (HCS Studio Cell Analysis^W (Thermo Fisher Scientific, США), IN Cell Investigator (GE Healthcare, Великобритания)) (S. Lin et al., 2020). Современное программное обеспечение позволяет сегментировать различные объекты и вычислять отдельные характеристики, такие как морфология (площадь, размер и форма), интенсивность флуоресценции и особенности текстуры для каждого объекта (например, клетки, ядра, цитоплазмы, локальных белковых агрегатов) в каждом флуоресцентном канале. Более того, использование визуализации живых клеток с временным разрешением дает такие характеристики, как динамика сигнала.

Анализ изображений включает в себя несколько этапов (S. Lin et al., 2020). Первый этап заключается в предварительной обработке изображений для уменьшения шума и коррекции фона. Следующим важным шагом является сегментация, проводимая для идентификации клеточных или субклеточных структур. Алгоритмы сегментации обычно основаны на свойствах

окрашивания, таких как размер или яркость флуоресцентных зондов. Последним этапом анализа изображения является извлечение признаков для выявления и/или количественной оценки изменений.

Интерпретация данных в решающей степени зависит от экспериментального контекста, и следует учитывать тот факт, что контекст часто меняется (Bray et al., 2017). Данные, полученные из изображения, могут быть классифицированы по группам на основе установления определенных пороговых значений, которые могут привести к классификации клеток.

Таким образом, многопараметрический скрининг представляет собой мощный инструмент для исследований в области изучения внутриклеточных процессов и разработки и открытия лекарственных препаратов. С его помощью можно проводить большой объем исследований и анализировать морфометрические данные, характеризующие клеточные фенотипы в различных экспериментальных условиях за короткое время. Так как с помощью НСЅ можно реализовать оба подхода к процессу открытия лекарств, как целевого, на основе знания молекулярной мишени, так и фенотипического, независимого от знания мишени, становится возможным определение причинно-следственных связей между фенотипическими эффектами и ингибированием конкретной мишени. Такая стратегия может открыть новые и неожиданные пути развития биологии опухоли и представляет собой наилучший способ обнаружения лекарств.

1.2 Антиоксиданты в противоопухолевой терапии

Окислительный стресс (ОС) представляет собой дисбаланс между генерацией активированных кислородных метаболитов (АКМ) (активных форм кислорода (А Φ K) и азота (А Φ A)) и их нейтрализацией антиоксидантной системой (Flohé, 2020).

АКМ представляют собой свободные радикалы (высокореакционные молекулы с неспаренными электронами), а также нерадикальные реакционноспособные производные, так называемые окислители. Свободные радикалы включают гидроксил ('OH), супероксид (O2'-), оксид азота (NO'), диоксид азота ('NO₂), пероксил (ROO') и пероксил липидов (LOO'). Пероксид водорода (H₂O₂), озон (O₃), синглетный кислород (¹O₂), хлорноватистая кислота (HOCl), азотистая кислота (HNO₂), пероксинитрит (ONOO-), триоксид диазота (N₂O₃), пероксид липидов (LOOH) являются окислителями и могут легко привести к свободнорадикальным реакциям в живых организмах. Радикалы менее стабильны, чем молекулы, их реакционная способность выше (Pham-Huy et al., 2008).

1.2.1 Механизмы генерации активных форм кислорода в клетке

Выделяют два типа источников АКМ в клетке: экзогенные (УФ-излучение, радиация, ксенобиотики и т.д.) и эндогенные (митохондрии, пероксисомы, цитохромы P450 и др.) (Waris and Ahsan, 2006). Во многих типах клеток главным эндогенным источником, продуцирующим АКМ, являются митохондрии, в свою очередь, основными участками генерации O_2^{\bullet} в митохондриях являются комплекс I дыхательной цепи (НАДН-убихиноноксидоредуктаза) и комплекс III (убихинол-цитохром с-оксидоредуктаза) (рис. 4).

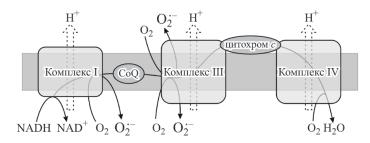


Рисунок 4. Главные участки образования O_2 в дыхательной цепи митохондрий (Зенков et al., 2019).

Основным механизмом производства супероксида (O_2) является одноэлектронное восстановление молекулярного кислорода (O_2) от убисемихинона в реакции 1 (Boveris et al., 1976) и в реакции, катализируемой НАДФН-оксидазами (NOX, реакция 2) (Lambeth, 2004), за счет утечки электронов из дыхательной цепи митохондрий:

$$QH^{\bullet-} + O_2 \leftrightarrow Q + O_2^{\bullet-} \tag{1},$$

$${\rm HAД}\Phi{\rm H} + 2{\rm O}_2 \rightarrow {\rm HAД}\Phi^+ + {\rm H}^+ + 2{\rm O}_2^{\bullet-}$$
 (2),

где $QH^{\bullet -}$ – убисемихинон, Q – убихинон (Novikov et al., 2014).

Супероксид может высвобождать Fe(II) из центров железо-серных дегидратаз и препятствовать повторной сборке железо-серных кластеров ферментов (Liochev, 1996), тем самым повышая количество свободного железа и способствуя образованию гидроксильного радикала (реакция 9). Однако основной вклад $O_2^{\bullet^-}$ в окислительный стресс заключается в том, что он является предшественником пероксида водорода (H_2O_2) и пероксинитрита (ONOO⁻), образующегося в реакции:

$$O_2^{\bullet -} + ON^{\bullet} \rightarrow ONOO^{-} \tag{3},$$

где ON* – оксид азота. Опасность окислительного стресса исходит от протонированной формы пероксинитрита, пероксиазотистой кислоты (ONOOH) (Flohé, 2020). Пероксиазотистая кислота является сильным окислителем, обладающим реакционной способностью промежуточных продуктов, образующихся при ее разложении:

$$HN00^- \leftrightarrow + {}^{\bullet}N0_2 + H0^{\bullet} \to N0_3^- + H^+$$
 (4),

где 'NO₂ — диоксид азота, HO' — гидроксильный радикал. Диоксид азота может отщеплять водород, как это делает HO' (реакция 11), а также присоединяться к некоторым молекулам, например тирозину в белках, и влиять на их функции. ONOO также может высвобождать железо из железо-серных белков (Castro et al., 2019), способствуя образованию гидроксильного радикала (реакция 9).

Пероксид водорода является важным окислительно-восстановительным метаболитом, участвующим в клеточной сигнализации и регуляции (Marinho et al., 2014). Преобладающим источником H_2O_2 является дисмутация $O_2^{\bullet -}$, быстрая реакция с константой скорости $\sim 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$, которая увеличивается до $2 \cdot 10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ с помощью супероксиддисмутаз (СОД) (Lambeth, 2004; Nisimoto et al., 2014):

$$2O_2^{\bullet -} + 2H^+ \to H_2O_2 + O_2$$
 (5).

Скорость производства H_2O_2 в значительной степени определяет процессы, протекающие в клетке: передачу сигналов окислительно-восстановительного потенциала, окислительный стресс или отсутствие необходимого окисления. H_2O_2 восстанавливается ферментами, в том числе каталазой:

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$
 (6),

пероксиредоксинами, использующими тиоредоксин (Trx(SH)₂), или глутатионпероксидазами и пероксиредоксином 6 (PRDX6), использующими глутатион (γ-глутамил-цистеинил-глицин, GSH) в качестве донора электронов:

$$H_2O_2 + 2Trx(SH)_2 \to TrxS_2 + 2H_2O$$
 (7),

$$H_2O_2 + 2GSH \rightarrow GSSG + 2H_2O$$
 (8),

где TrxS₂ – дисульфид тиоредоксина, а GSSG – дисульфид глутатиона (Flohé, 2020).

В условиях развития окислительного стресса пероксид водорода может генерировать гидроксильный радикал в результате реакции с переходными металлами, такими как железо, (реакция Фентона):

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^- + Fe^{3+} + HO^{\bullet}$$
 (9),

или гипогалоидные кислоты (HOX), образующиеся в реакции, катализируемой миелопероксидазами фагоцитирующих клеток:

$$H_2O_2 + X^- + H^+ \to HOX + H_2O$$
 (10),

где X^- может быть Cl^- , Br^- или SCN^- (Коррепоl, 1993). Гипогалоидные кислоты играют важную роль в повреждении тканей, связанном с воспалением, опосредованным фагоцитами (Pattison et al., 2012).

Гидроксильный радикал является сильным окислителем, который способен модифицировать белки, нуклеиновые кислоты, индуцировать перекисное окисление липидов (ПОЛ), которому наиболее подвержены полиненасыщенные жирные кислоты в составе липидов клеточных мембран. Цепная реакция перекисного окисления липидов:

$$LH + HO^{\bullet} \rightarrow L^{\bullet} + H_2O \tag{11},$$

$$L^{\bullet} + O_2 \to LOO^{\bullet} \tag{12},$$

$$L00^{\bullet} + LH \rightarrow L00H + L^{\bullet}$$
 (13),

где LH представляет собой липид с аллильными атомами водорода, присутствующими в полиненасыщенных жирных кислотах, включая арахидоновую кислоту (Flohé, 2020; Novikov et al., 2014). Такая цепная реакция в итоге приводит к повреждению клеточных мембран.

1.2.2 Гомеостаз активных форм кислорода в клетке

В физиологическом состоянии уровень клеточных АФК находится в динамическом равновесии, которое модулируется клеточными процессами, продуцирующими АФК и удаляющими их (рис. 5).

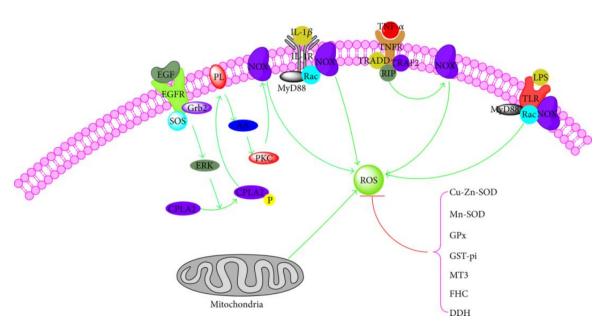


Рисунок 5. Гомеостаз внутриклеточных АФК. NOX — НАДФН-оксидазы; TNF- α — фактор некроза опухоли- α ; EGF — эпидермальный фактор роста; ИЛ- 1β — интерлейкин- 1β ; СОД — супероксиддисмутаза; GPх — глутатионпероксидаза; GST-рі — глутатион-S- трансфераза рі; МТЗ — металлотионеин-3; FHC — тяжелая цепь ферритина; DDH — дигидродиолдегидрогеназа; TNFR — рецептор фактора некроза опухоли; TRADD — белок, взаимодействующий с доменом смерти TNFRSF1A (член 1A надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли); MyD88 — миелоидный фактор дифференцировки 88; TLR — Toll-подобный рецептор; cPLA2 — цитозольные фосфолипазы A2 (Zhang et al., 2016).

При умеренных концентрациях АФК играют важную роль в качестве регуляторных медиаторов в процессах передачи сигналов (Dröge, 2002). Многие из реакций, опосредованных АФК, фактически защищают клетки от окислительного стресса и восстанавливают «окислительно-восстановительный гомеостаз». Однако высокие концентрации АФК опасны для живых организмов и повреждают все основные клеточные компоненты (Waris and Ahsan, 2006). Основной категорией антиоксидантных белков являются супероксиддисмутазы (СОД), которые содержат Сu-Zn-COД (СОД1) и Mn-COД (СОД2), глутатионпероксидаза (GPx), глутатион S-трансфераза рі (GST-рі), металлотионеин-3 (МТ3), тяжелая цепь ферритина (FHC) и дигидродиолдегидрогеназа (DDH) и другие (рис. 5).

На рисунке 6 показана роль пероксида водорода в передаче сигналов окислительновосстановительного потенциала, как центрального вторичного мессенджера.

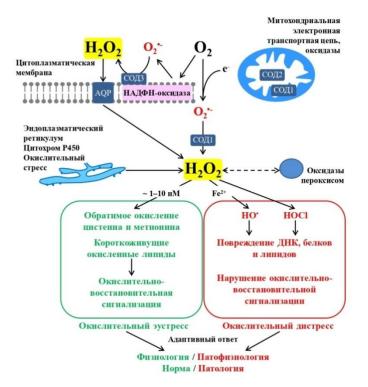


Рисунок 6. Роль пероксида водорода в окислительном стрессе. Вверху: Эндогенные источники Н2О2 включают НАДФН-оксидазы и другие оксидазы (связанные с мембраной или свободные), а также митохондрии. Супероксидный анион-радикал превращается в перекись водорода тремя супероксиддисмутазами (СОД 1, 2 и 3). Диффузия перекиси водорода через мембраны осуществляется некоторыми аквапоринами (AQP), известными пероксипорины. Внизу: цветом выделена окислительно-восстановительная зеленым сигнализация, включающая окислительный эустресс (физиологический окислительный стресс). Красным цветом выделен чрезмерный окислительный стресс, который приводит к окислительному повреждению биомолекул И нарушению передачи окислительновосстановительных сигналов (окислительный дистресс) (Sies, 2017).

1.2.3 Роль окислительного стресса в канцерогенезе

Окислительно-восстановительное равновесие играет ключевую роль в физиологических и патологических событиях клеток благодаря способности АФК активировать или деактивировать различные рецепторы, белки, ионы и другие сигнальные молекулы. Когда окислительно-восстановительное равновесие нарушается из-за избыточного накопления или истощения АФК, это влияет на многие клеточные сигнальные пути, что приводит к клеточной дисфункции и впоследствии к развитию различных патологий (Zhang et al., 2016). Окислительный стресс лежит в основе патогенетичеких механизмов широко ряда заболеваний и функциональных расстройств, в том числе развития опухолей (рис. 7) (Forman and Zhang, 2021; Waris and Ahsan, 2006).



Рисунок 7. Пути, иллюстрирующие источники АФК и их роль в канцерогенезе (Waris and Ahsan, 2006).

Опухолевые клетки обычно имеют более высокие метаболические потребности из-за их высокой пролиферативной активности (Amoêdo et al., 2013). Посредством стабилизации фактора транскрипции α, индуцируемого гепоксией (HIF-α) они адаптируются к условиям гипоксии и обеспечивают производство энергии преимущественно с помощью анаэробного гликолиза с последующим образованием молочной кислоты (эффект Варбурга) большинством опухолевых клеток (Зенков и др., 2019).

В опухолевых клетках наблюдается избыточное содержание тиоредоксиновой системы, включающей тиоредоксинредуктазу (TrxR), тиоредоксин (Trx) и НАДФН, которая имеет

решающее значение в процессах контроля клеточного роста, защиты от окислительного стресса, контроля апоптоза, таких, например, как активация ДНК-связывания факторов транскрипции и антиоксидантная защита клетки путем репарации белков, поврежденных окислением, восстановленным Trx (Arnér and Holmgren, 2006).

Накопление АФК в клетке приводит к накоплению обширных развернутых белков в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР), которое впоследствии вызывает стресс ЭР и, наконец, активирует сигнальный каскад каспаз, что приводит к клеточному апоптозу (Zeeshan et al., 2016). Повышенная продукция АФК может вызывать мутации митохондриальной ДНК и повреждать митохондриальную дыхательную цепь, проницаемость мембран, нарушать гомеостаз Ca²⁺ и митохондриальную защиту (Guo et al., 2013).

АФК могут напрямую повреждать и модифицировать ДНК, приводя к мутациям и генетической нестабильности, а также модулировать эпигенетические пути. Одним из наиболее распространенных продуктов клеточного окислительного стресса является окисленный гуанин или 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин (8-OHdG) (Cheng et al., 1992; Kuchino et al., 1987; Shigenaga et al., 1989). Повышенное содержание 8-OHdG в ДНК пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой связаны с повышенным окислительным стрессом, а исследования in vitro показали, что воздействие H₂O₂ (50–250 мкМ) увеличивает появление 8-OHdG и соответствует паттернам метилирования в промоторных областях генов-супрессоров измененным опухолевого роста (tumor suppressor gene, TSG) (Nishida et al., 2013). Пероксид водорода и хлорамины, продуцируемые фагоцитирующими иммунными клетками, могут подавлять активность ДНК-метилтрансферазы (ДНКМТ) (O'Connor et al., 2020). Было показано, что эпигеном Т-лимфомы Jurkat человека подвержен устойчивым изменениям метилирования ДНК после воздействия окислительного стресса во время клеточной репликации. Вызванные окислителями изменения метилирования ДНК могут быть унаследованы последующими поколениями клеток (Seddon et al., 2021).

Повышение стационарной концентрации АФК активирует эндогенные механизмы антиоксидантной защиты, такие как редокс-зависимая система антиоксидант-респонсивного элемента Keap1/Nrf2/ARE и аутофагию, что позволяет опухолевым клеткам выживать в условиях окислительного стресса и может лежать в основе устойчивости к радио- и химиотерапии (Зенков и др.., 2019).

1.2.4 Роль антиоксидантов в противоопухолевой терапии

Применение природных или синтетических антиоксидантов для профилактики и лечения заболеваний, сопровождающихся окислительным стрессом, является патогенетически обоснованной стратегией (Neha et al., 2019). Однако многочисленные рандомизированные

контролируемые исследования дали противоречивые результаты относительно эффективности их применения в профиликтике и лечении онкозаболеваний (прежде всего таких витаминов, как А, Е и С). Результаты таких исследований можно разделить на три группы, одна из которых свидетельствует о благотворном влиянии повышенного потребления пищевых антиоксидантов, вторая – об отсутствии эффективности, а третья – об отрицательном влиянии на здоровье. В исследовании 2005 г. было показано, что высокие дозы добавок витамина Е могут увеличить общую смертность, и их следует избегать (Miller et al., 2005). В метаанализе 2008 г. показано, что бета-каротин увеличивает заболеваемость и смертность от рака среди курильщиков, витамин Е не оказывает никакого эффекта, а добавки селена могут оказывать антиканцерогенное действие на мужчин и, таким образом, требуют дальнейших исследований (Bardia et al., 2008). Другой метаанализ, проведенный в 2018 г., не подтвердил эффективность антиоксидантов в снижении риска заболевания раком молочной железы и, более того, в работе сообшалось об отсутствии достаточных клинических данных, подтверждающих эффективность антиоксидантов при лечении (Moradi-Joo et al., 2018). В анализе 2019 г. исследователи пришли к выводу, что диета с высоким содержанием антиоксидантов может оказывать защитное действие против колоректального рака, рака желудка и эндометрия (Parohan et al., 2019). В анализе 2021 г. показано, что нет значимой связи между приемом пищевых антиоксидантов (витаминов А, С и/или Е) после диагностирования рака молочной железы или во время химиотерапии и общей выживаемостью пациентов (Y. Li et al., 2021). Результаты еще одного анализа 2021 г. свидетельствуют об отсутствии доказательств причинно-следственных связей между физиологическим уровнем циркулирующего витамина С и риском заболевания пяти наиболее распространенных видов рака (рак легких, молочной железы, простаты, толстой кишки и прямой кишки) в популяции европейцев (Fu et al., 2021), что согласуется с предыдущей работой.

В доклиническом исследовании было обнаружено, что введение в рацион N-ацетилцистеина (NAC) и витамина Е заметно увеличивает прогрессирование опухоли и снижает выживаемость в мышиных моделях рака легких (Volkan et al., 2014). Антиоксиданты способствовали отдаленному метастазированию меланомы у мышей линии NSG, в то время как ингибирование фолатного пути с помощью низких доз метотрексата, нокдаун ALDH1L2, или нокдаун MTHFD1 ингибировали отдаленные метастазы без значительного влияния на рост подкожных опухолей у тех же мышей. Таким образом, окислительный стресс ограничивал отдаленные метастазы клеток меланомы в естественных условиях (Piskounova et al., 2015). Было показано, что синтетические аналоги витамина Е (Мито-ХМ и Мито-ХМАк), нацеленные на митохондрии, ингибировали энергетический метаболизм клеток рака молочной железы и способствовали избирательной клеточной гибели, кроме того, Мито-ХМ избирательно

накапливался в опухолевой ткани и ингибировал рост перевиваемой опухоли у мышей (Cheng et al., 2013).

Подводя итог, можно сказать, что антиоксиданты оказывают различное влияние на разные стадии онкогенеза в зависимости от типа опухоли.

Генетические изменения позволяют опухолевым клеткам выживать при высоких уровнях АФК за счет повышения их антиоксидантного статуса (Hayes et al., 2020). Доклинические исследования показывают, что увеличение концентрации АФК в опухолевых индуцирующей АФК, клетках помощью терапии, может быть эффективной противоопухолевой стратегией (Van Loenhout et al., 2020). Антиоксиданты могут также усиливать цитотоксические эффекты противоопухолевых препаратов, снижать их токсичность по отношению к нормальным клеткам (Singh et al., 2018) и сами служить противоопухолевыми агентами (Yun et al., 2015). Такая ситуация, обычно объясняемая природной концентрационнозависимой инверсией антиоксидантного эффекта (превращением в прооксидантный) (Giordano et al., 2020; Lankin et al., 1999; Seo and Lee, 2002), делает актуальным исследовательский интерес к синтетическим ингибиторам свободнорадикальных процессов как перспективным средствам антиоксидантной терапии.

1.2.5 Алкилированные фенолы как ингибиторы свободнорадикального окисления

Среди синтетических ингибиторов свободнорадикального окисления одними из наиболее эффективных соединений являются алкилированные фенолы, содержащие в качестве заместителей функциональные группы с двухвалентной серой (Farzaliev et al., 1978; Meier et al., 1999). Высокая эффективность таких тиоалкилфенолов обусловлена синергетическим сочетанием антирадикальной активности ИХ гидроксиарильных фрагментов антиперекисноводородной активности серосодержащих групп. Липофильные производные серосодержащих фенольных антиоксидантов, описанные в литературе и используемые на практике в качестве антиоксидантов, многочисленны и разнообразны по строению (Amorati et al., 2010; Kemeleva et al., 2008; Viglianisi and Menichetti, 2019b). Ранее были проведены обширные исследования закономерностей изменения ингибирующей активности таких антиоксидантов в зависимости от их структуры (Alfieri et al., 2022; Viglianisi and Menichetti, 2019b). Полученные результаты позволили осуществить направленный синтез соединений с высокой антиоксидантной активностью и выраженными биоантиоксидантными свойствами: эффективно ингибировать перекисное окисление липидов in vitro, блокировать развитие окислительного стресса *in vivo*, оказывать защитное действие против различных свободнорадикально-ассоциированных патологий.

Селен- и теллурсодержащие алкилфенолы, по-видимому, также обладают ценными биоантиоксидантными свойствами (Amorati et al., 2013; Du et al., 2010; Poon et al., 2015; Singh et al., 2013; Weng et al., 2007), однако такие соединения изучены недостаточно, в литературе имеются данные об относительно небольшом числе классов исключительно липофильных соединений. В то же время гидрофильные антиоксиданты более привлекательны для применения в биологии, ветеринарии и медицине и характеризуются высокой биодоступностью, быстрым биологическим транспортом, удобством способов введения и дозирования, пригодностью для инфузионной терапии острых патологий (Giordano et al., 2020).

Традиционные применения фенольных антиоксидантов не требуют гидрофильных свойств, напротив, предпочтение отдается липофильности. В связи с этим неудивительно, что количество известных водорастворимых производных фенольных антиоксидантов весьма ограничено (водорастворимые производные токоферола, такие как Trolox, производные фенольных кислот, такие как натриевая или калиевая соли фенозановой кислоты и др.) (Coulter et al., 2000; Grisar et al., 1991; Petty et al., 1992; Smith et al., 2003; Zenkov et al., 2009, 2007). Одним из самых известных гидрофильных фенольных антиоксидантов в России является фенозан калия (ФК) (Kozlov et al., 2014; Palmina et al., 2012). ФК послужил прототипом множеству новых соединений, синтезированных и изученных на данный момент. Такие антиоксиданты создаются по единому принципу и состоят из алкилфенольного остова и полярного (обычно ионогенного) фрагмента, что делает соединение растворимым в водных средах. Подавляющее большинство этих производных являются монофункциональными антиоксидантами и ингибируют окислительный процесс только за счет взаимодействия с активными радикалами. Гидрофильные серосодержащие фенольные антиоксиданты, для которых следует ожидать более высокую антиоксидантную активность по сравнению с бессернистыми исходными химическими веществами (так же, как и для липофильных антиоксидантов), представлены лишь несколькими соединениями (Kandalintseva, 2017). Они существенно различаются по своему строению, а данные об их антиоксидантной активности отрывочны. Между тем, некоторые сравнительные исследования антиоксидантных свойств гидрофильных антиоксидантов различного строения свидетельствуют о том, что связи «структура – антиоксидантная активность», установленные ранее для их липофильных аналогов, вряд ли применимы (Bernini et al., 2012; Liu et al., 2022). Таким образом, представляется актуальным исследование новых гидрофильных антиоксидантов, способных более эффективно, чем существующие аналоги, ингибировать окислительные процессы в биологических системах.

Таким образом, окислительно-восстановительный гомеостаз играет ключевую роль в физиологических и патологических событиях в клетках благодаря способности активных форм кислорода активировать или деактивировать различные рецепторы, белки, ионы и другие сигнальные молекулы. Избыточное накопление или истощение АФК в результате нарушения окислительно-восстановительного равновесия оказывает влияние на многие клеточные сигнальные пути, приводит к клеточной дисфункции и к развитию различных патологий. Многие опухолевые клетки сильно зависят от своей антиоксидантной системы и уязвимы к дальнейшему окислительному нарушению, вызванному агентами, генерирующими активные формы кислорода (АФК). Следовательно, влияние потенциальных лекарственных препаратов на механизмы генерации АФК, регулирующих окислительно-восстановительные сигнальные пути, имеет важное значение для разработки инновационных и эффективных терапевтических стратегий.

1.3 Координационные соединения переходных металлов в противоопухолевой терапии

большой интерес последнее время вызывает возможность применения координационных соединений переходных металлов качестве потенциальных терапевтических агентов (Gasser et al., 2011; Rafique et al., 2010; Zhang and Sadler, 2017). Комплексы платины (II) давно используются в качестве противоопухолевых препаратов, среди них наиболее известны цисплатин и его производные карбоплатин и оксалиплатин, используемые во всем мире (Tsvetkova and Ivanova, 2022). Другие производные цисплатина: недаплатин, лобаплатин, гептаплатин и мириплатин – одобрены в определенных странах (Sun et аl., 2021). Основной механизм действия цисплатина и его производных заключается в индукции апоптоза опухолевых клеток в ответ на ковалентное связывание препаратов с ДНК. Проникая в клетку посредством диффузии и активного транспорта, цисплатин вызывает платинирование ДНК, включающее в себя межцепочечные и внутрицепочечные поперечные связи и образование ДНК-аддуктов, обычно через гуанин, что приводит к ингибированию репликации ДНК и клеточной гибели (Lee et al., 2002). Кроме того, ДНК-аддукты, образующиеся в результате действия цисплатина, служат сайтами связывания клеточных белков, таких как ферменты репарации, гистоны, факторы транскрипции и белки домена группы высокой мобильности (high mobility group domain, HMG) (Zamble and Lippard, 1995). Исследования показывают, что часть противоопухолевой эффективности химиотерапевтических препаратов платины может быть обусловлена механизмами иммунного потенцирования (Hato et al., 2014).

Помимо опухолевых клеток воздействию цисплатина и его производных подвергаются и другие быстро делящиеся клетки нормальных тканей: клетки волосяных фолликулов, костного мозга и слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта, что приводит к нежелательным

явлениям и общей токсичности (Barabas et al., 2008). К другим недостаткам цисплатина и его производных относятся приобретенная или врожденная лекарственная устойчивость, а также ограниченный спектр действия (Rabik and Dolan, 2007).

В настоящее время ведется поиск новых комплексов Pt(II) с улучшенными противоопухолевыми свойствами и новыми механизмами действия. Например, было показано, что комплексы Pt(II) с основаниями Шиффа (класс стабильных иминовых соединений с общей формулой (-R₁-C=NR₂-)) индуцируют апоптоз путем воздействия на теломеры, теломеразу и определенные промоторные гены, специфически связываясь с G-квадруплексом ДНК, и действуют через митохондриальные пути или пути стресса эндоплазматического ретикулума (Sun et al., 2021).

Платина — не единственный переходный металл, используемый при синтезе координационных соединений, обладающих противоопухолевой активностью. Широко рассматривается возможность применения координационных соединений на основе других переходных металлов, таких как рутений, золото, медь, железо для уменьшения общей токсичности и усиления противоопухолевого действия (Ndagi et al., 2017). Комплексы золота также проявляют противоопухолевую активность, но действуют по другому механизму в сравнении с комплексами платины. Так комплексы золота(III) с основаниями Шиффа являются потенциальными многоцелевыми противоопухолевыми агентами, которые действуют путем нацеливания на G-квадруплекс ДНК И тиолсодержащие ферменты, такие тиоредоксинредуктаза (TrxR) (Sun et al., 2021).

Тиоредоксинредуктаза является важным антиоксидантным ферментом, катализирующим НАДФН-зависимое восстановление тиоредоксина (Trx) и регулирующим окислительновосстановительный гомеостаз клетки (Bian et al., 2019). Комплексы металлов являются классическими ингибиторами TrxR, поскольку они связываются с высокореактивными остатками Sec на C-конце TrxR. Комплекс золота (I), содержащий производное олеаноловой кислоты, индуцирует апоптоз клеток рака яичников путем активации стресса эндоплазматического ретикулума (ЭР) и митохондриальной дисфункции, что приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу клеток, а также ингибирует рост перевиваемой опухоли у мышей, что сопровождается повышением уровня стресса ЭПР и снижением активности TrxR в опухолевых тканях (Bian et al., 2020).

Активно синтезируются и исследуются комплексы эссенциальных металлов, прежде все комплексов меди (II). Медь играет огромную роль в различных клеточных процессах, включая энергетический метаболизм, рост и развитие клетки (Hordyjewska et al., 2014). Ионы меди могут стимулировать клеточную пролиферацию и активировать некоторые проангиогенные факторы: фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор некроза опухоли-альфа (TNF-α), интерлейкин

1 (IL-1) и другие (Nasulewicz et al., 2004). Показано, что опухолевым клеткам требуется больше меди для их роста и метаболизма, чем нормальным покоящимся клеткам (Lelièvre et al., 2020). Повышенное содержание меди было определено в сыворотке пациентов с различными видами злокачественных опухолей, в том числе и с гепатоцеллюлярной карциномой (Fang et al., 2019). Поэтому соединения, влияющие на гомеостаз меди, представляют интерес для противоопухолевой терапии.

Наиболее известными соединениями среди комплексов меди(II) с общей формулой [Cu(олигопиридин)(H₂O)L]NO₃, где L – аминокислота или ацетилацетонат, стали соединения, запатентованные под названием Casiopeinas®. В настоящее время один из комплексов этой серии проходит первую фазу клинических исследований (Masuri et al., 2021). Этот успех привел к появлению огромного количества новых соединений меди(II) с заменой лиганда L в комплексах серии Casiopeinas. Маsuri с коллегами в своем обзоре, рассматривая противоопухолевые свойства смешанных комплексов Cu(II), содержащих замещенные или незамещенные лиганды на основе 1,10-фенантролина и различные классы неорганических и органических вспомогательных лигандов, смешанные комплексы Cu(II), пришли к выводу, что эти соединения могут быть нацелены на различные молекулярные пути и механизмы в опухолевых клетках (Masuri et al., 2021).

Ранние исследования комплексов рутения продемонстрировали ярко выраженные противоопухолевые свойства некоторых соединений, что в значительной степени способствовало повышению интереса к соединениям на основе рутения в качестве потенциальных противоопухолевых препаратов (Leijen et al., 2015). Наиболее известны комплексы рутения НАМИ-А {(ImH)[транс-Ru(ДМСО)(Im)Cl4, Im – имидазол}, KP1019 {(IndH)[транс -Ru(Ind)2Cl4], Ind – индазол} и KP1339 {Na[транс-Ru(Ind)2Cl4]}, находящиеся на стадии клинических испытаний. Несмотря на структурное родство эти соединения проявляют сильно различающиеся биологические и фармакологические профили (Alessio and Messori, 2019).

Нитрозокомплексы рутения способны выделять молекулы NO после фотоактивации или восстановления, чем вызывают особый интерес как неплатиновые противоопухолевые соединения (Stepanenko et al., 2022). В свою очередь, молекула NO участвует в канцерогенезе и ингибировании роста опухоли (Ridnour et al., 2008). Важно отметить, что даже небольшое изменение структуры нитрозокомплекса рутения может привести к изменению биологического эффекта, который можно дополнительно модулировать световым излучением (Восе́ et al., 2019).

Таким образом, переходные металлы занимают важное место в медицинской биохимии. Исследования показали значительный прогресс в использовании комплексов переходных металлов в качестве лекарств для лечения ряда заболеваний человека, таких как карциномы,

лимфомы, инфекционных, противовоспалительных, диабетических и неврологических расстройств. Способность переходных металлов проявлять различные степени окисления и взаимодействовать с отрицательно заряженными молекулами положила начало разработке препаратов на основе металлов с многообещающими уникальными терапевтическими возможностями.

1.4 Роль цитохромов Р450 (СҮР) в метаболизме ксенобиотиков

1.4.1 Метаболизм ксенобиотиков

Человек постоянно подвергается воздействию самых разных химических веществ, которые в большинстве своем не являются интермедиатами эндогенных путей метаболизма, необходимыми для поддержания нормальной жизнедеятельности. Такие соединения, или ксенобиотики, в конечном счете покидают организм, но на этом пути становятся участниками процессов абсорбции, распределения и перераспределения, метаболизма, взаимодействия с мишенями и экскреции, совокупность которых в англоязычной литературе определяется как disposition (возможные варианты перевода в контексте рассматриваемого материала – судьба, перемещение, пребывание) (Esteves et al., 2021). По ряду причин особое значение придают этапу метаболизма. Во-первых, в результате метаболизма ксенобиотики становятся менее гидрофобными, но более гидрофильными и полярными, что необходимо для экскреции. Вовторых, скорость процессов метаболизма уступает скорости транспортных процессов (абсорбции, распределения и экскреции), этот этап является скорость-лимитирующим, определяющим кинетику концентрационных изменений ксенобиотиков во внутренних средах организма с вытекающими отсюда следствиями для силы и продолжительности их биологических эффектов. В-третьих, в результате метаболизма определенных ксенобиотиков может возрастать их реакционноспособность, что приводит к повреждению важнейших биомакромолекул, а затем и клеток, и тканей с негативными последствиями для здоровья (Croom, 2012; Johnson et al., 2012). Поэтому, хотя общий баланс метаболизма множества ксенобиотиков складывается в пользу детоксикации, данный вариант метаболизма токсификация – особенно важен в отношении определенных субстратов-ксенобиотиков, прежде всего канцерогенов. Эти представления суммированы на рисунке 8.

Всасывание ксенобиотиков происходит за счет пассивного и активного транспортов. Пассивная диффузия является преобладающим механизмом проникновения лекарств в организм (Di and Kerns, 2016). Активный транспорт опосредован полипептидами, транспортирующими органические анионы (ОАТР), транспортерами органических анионов (ОАТ) и котранспортирующим полипептидом таурохолата натрия (NTCP) (Murray and Zhou,

2017). ОАТР включают шесть семейств, из которых наиболее важными для поглощения лекарств являются семейства ОАТР1A, ОАТР1B и ОАТР2B1 (Fenner et al., 2012).

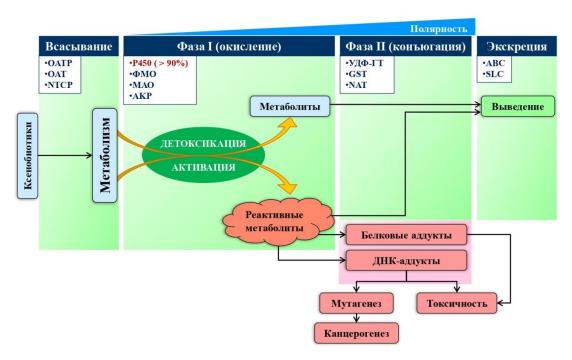


Рисунок 8. Метаболизм ксенобиотиков. После всасывания ксенобиотики подвергаются биотрансформации в фазах I и II под действием ферментов, метаболизирующих лекарства, и выводятся из клетки и организма. Более 90 % ферментативных реакций в фазе I катализируются цитохромами P450 (СҮР). В некоторых случаях СҮР производят реактивные метаболиты. В случае неэффективной детоксикации ферментами фазы II реактивные метаболиты образуют белковые или ДНК-аддукты, что приводит к цитотоксичности и/или мутациям. ОАТР – полипептиды, транспортирующие органические анионы; ОАТ – транспортеры органических анионов; NTCP – котранспортирующий полипептид таурохолата натрия; ФМО – флавинсодержащие монооксигеназы; МАО – моноаминоксидазы; АКР – альдокеторедуктаза; УДФ-ГТ – УДФ-глюкуронилтрансферазы; GST – глутатион-S-трансферазы; NAT – N-ацетилтрансферазы; ABC – АТФ-связывающие транспортные белки; SLC – транспортеры растворенных веществ.

Ферменты цитохрома Р450 (СҮР) являются наиболее важными ферментами, участвующими в фазе I метаболизма ксенобиотиков у человека (Zöllner et al., 2010). Метаболизм также включает флавинсодержащие монооксигеназы фазы $(\Phi MO),$ моноаминоксидазы (MAO), циклооксигеназы (ЦОГ), дигидродиолдегидрогеназы (DDH), НАДФН:хинон оксидоредуктазы (NQR), алкогольдегидрогеназы (алкоголь:НАД+-

оксидоредуктазы), альдегиддегидрогеназы (АДГ) (Stanley, 2017) и альдокеторедуктаза (АКР) (Rendic and Guengerich, 2015).

Фаза II метаболизма ксенобиотиков включает конъюгацию с гидрофильными фрагментами, что обычно приводит к более водорастворимым и, следовательно, более легко выводимым соединениям (Jancova, 2012). Семейства ферментов фазы II включают глутатион-S-трансферазы (GST), УДФ-глюкуронилтрансферазы (УДФ-ГТ), сульфотрансферазы (СТ) и N-ацетилтрансферазы (NAT). Эпоксидгидролазы (ЭГ), которые превращают эпоксиды в дигидродиолы, также классифицируются как ферменты фазы II, поскольку они действуют на продукты опосредованного цитохромами Р450 метаболизма фазы I (Almazroo et al., 2017; Stanley, 2017).

Экскреция представляет собой экспорт соединений из клеток с помощью энергозависимых переносчиков (Stanley et al., 2009). Особую роль здесь играют АТФ-связывающие транспортные белки семейства ABC (ATP-binding cassette transporters, ABC), которые включают в себя множество мембранных переносчиков, рецепторов и ионных каналов (Almazroo et al., 2017; Stanley, 2017) и транспортеры растворенных веществ SLC (solute carrier family) (Petzinger and Geyer, 2006).

1.4.2 Цитохромы Р450

Цитохромы P450 (СҮР) составляют основное семейство ферментов фазы I, способных катализировать окислительную биотрансформацию подавляющего большинства липофильных ксенобиотиков и эндогенных соединений (Esteves et al., 2021). Из оксидоредуктаз человека, участвующих в метаболизме лекарств, более 90 % ферментативных реакций катализируются цитохромами P450 (рис. 9 A) (Rendic and Guengerich, 2015). СҮР являются внутренними мембранными белками, расположенными в эндоплазматическом ретикулуме, которые опосредуют конечную стадию окисления микросомальной цепи переноса электронов, образуя реактивные интермедиаты, такие как эпоксиды (Munro et al., 2013). Чтобы катализировать монооксигеназную реакцию, СҮР необходимы электронодонорные белки цитохром b5 и НАДФН:СҮР оксидоредуктаза (Stanley, 2017). Монооксигенация необходима для детоксикации многих ксенобиотиков, однако в некоторых случаях ферменты СҮР производят промежуточные продукты, токсичнее исходного субстрата, и требуют детоксикации ферментами фазы II. В случае неэффективности этого процесса образуются белковые и ДНКаддукты, которые в конечном итоге приводят к цитотоксичности или канцерогенезу (рис. 8) (Esteves et al., 2021).

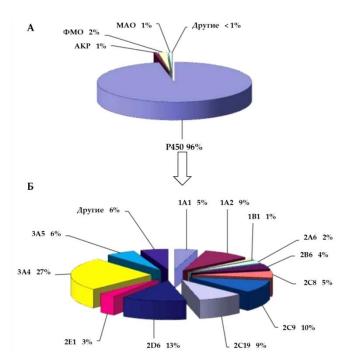


Рисунок 9. Оксидоредуктазы и ферменты цитохрома P450 человека, участвующие в метаболизме лекарств. Расчеты сделаны для разрабатываемых и продаваемых лекарств (всего 860 препаратов). А – оксидоредуктазы человека, участвующие в метаболизме лекарств, n = 4192 реакции. Б – ферменты цитохрома P450 человека в метаболизме лекарств, n = 4058 реакций (Rendic and Guengerich, 2015).

Цитохромы Р450 являются основным источником вариабельности фармакокинетики и ответа на воздействие лекарств. В настоящее время известно о существовании суперсемейства цитохромов Р450, включающего у человека 57 генов, кодирующих функциональные СҮР. Существенно, что из этого количества лишь 12 цитохромов, принадлежащих к семействам CYP1, 2 и 3, отвечают за биотрансформацию более 90 % лекарств (рис. 9 Б) (Rendic and Guengerich, 2015) и около 90 % химических веществ окружающей среды, включая 66 % реакций метаболизма химических канцерогенов (Rendic and Guengerich, 2012). Цитохромы P450 в основном экспрессируются в гепатоцитах, за ними следуют тонкий кишечник и почки (Gundert-Remy et al., 2014; Knights et al., 2013). Наиболее экспрессируемыми в печени являются СҮР 3А4, 2С9, 2С8, 2Е1 и 1А2, в то время как 2А6, 2D6, 2B6, 2С19 и 3А5 менее распространены, а СҮР 2Ј2, 1А1 и 1В1 в основном экспрессируются внепеченочно. Хотя метаболическая способность внепеченочных СҮР ниже печеночных, они влияют на локальную функцию тканей и биотрансформацию и биоактивацию лекарств в этих тканях. Кроме того, внепеченочные ферменты СҮР вносят вклад в системное воздействие ксенобиотиков с повышенной в результате метаболизма токсичностью (Chaudhary et al., 2009; Pavek and Dvorak, 2008). Поскольку метаболическая способность лекарств во внепеченочных тканях ограничена,

возможно, что внеклеточные везикулы, содержащие СҮР, секретируются из печени и других тканей, которые накапливаются в плазме и спинномозговой жидкости, циркулируют в организме и доставляются в отдаленные места (например, в клетки головного мозга), где они могут способствовать внепеченочному метаболизму лекарств, детоксикации, а также могут влиять на токсичность в этих тканях (Gerth et al., 2019).

На экспрессию каждого СҮР влияет уникальное сочетание механизмов и факторов, включая генетические полиморфизмы, индукцию ксенобиотиками, регуляцию цитокинами, гормонами, пол, возраст и другие (рис. 10).

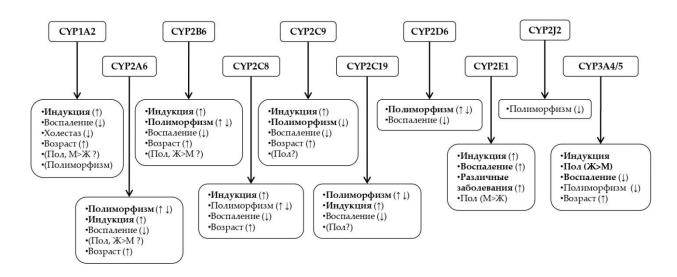


Рисунок 10. Факторы, влияющие на экспрессию цитохромов Р450. Важные факторы изменчивости выделены полужирным шрифтом с указанием возможных направлений влияния (↑ – повышенная активность, ↓ – пониженная активность, ↑↓ – повышенная и пониженная активность). Факторы спорного значения указаны в скобках (Zanger and Schwab, 2013).

Метилирование ДНК может привести к явлению, известному как дисбаланс экспрессии аллелей. Разница в уровнях экспрессии между двумя аллелями *CYP* обычно возникает из-за генетических полиморфизмов, однако эпигенетическое замалчивание аллеля (например, метилирование) также может привести к преимущественной экспрессии одного из двух аллелей (Wang et al., 2011). Мультиаллельные генетические полиморфизмы, зависящие от этнической принадлежности, играют важную роль в функции CYP 2D6, 2C19, 2C9, 2B6, 3A5 и 2A6 и приводят к различным фармакогенетическим фенотипам, называемым медленными/слабыми, промежуточными, нормальными, быстрыми/активными и сверхбыстрыми/сверхактивными метаболизаторами (Zanger and Schwab, 2013). У пациентов с промежуточным или медленным метаболизмом СYP лекарство, метаболизирующееся этим ферментом СYP, не будет

метаболизироваться так быстро, как у пациентов с нормальным метаболизмом. Таким образом, эффективная концентрация лекарственного средства останется высокой, а риск нежелательных явлений будет выше (рис. 11). Применение любого пролекарства, которое превращается в его активный метаболит ферментом СҮР, может стать неэффективным. Одним из таких примеров является клопидогрел, активный метаболит которого образуется с помощью СҮР2С19. Пациенты, несущие аллели СҮР2С19 с потерей функции (медленный метаболизатор), подвергаются повышенному риску тромбообразования (Tornio and Backman, 2018). В случае быстрых и сверхбыстрых метаболизаторов активный метаболит лекарственного препарата может попасть в область концентраций с токсическими эффектами.

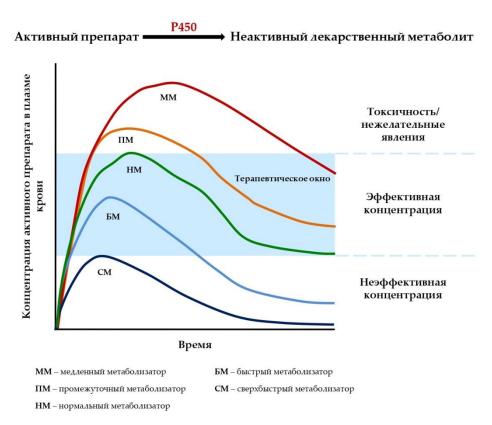


Рисунок 11. Влияние полиморфизмов P450 на метаболизм лекарств (Kathuria et al., 2021).

Прогнозирование действия препарата и последующей реакции у конкретного пациента все еще далеко от широкого применения в клинической практике. Объективно это обусловлено такими свойствами суперсемейства СҮР, как широкая и перекрывающаяся субстратная специфичность индивидуальных цитохромов. Однако несмотря на широкую и перекрывающуюся субстратную специфичность этих ферментов, в области клинически значимых концентраций многие лекарства метаболизируются только одним или несколькими ферментами, которые и определяют их фармакокинетику. Таким образом, знание внутренних и

внешних факторов, влияющих на экспрессию и функцию ферментов, осуществляющих метаболизм ксенобиотиков и лекарств, является необходимым условием для прогнозирования изменчивой фармакокинетики и ответа на лекарство. Ниже будут рассмотрены известные данные о подсемействах СҮР, вносящих основной вклад в метаболизм лекарств и ксенобиотиков.

1.4.2.1 Подсемейство СҮР2С

Подсемейство СУР2С человека включает четыре высоко гомологичных гена: СУР2С8, CYP2C9, CYP2C18 и CYP2C19, расположенных на хромосоме 10q24. Подсемейство СҮР2С составляет около 18% от общего содержания цитохромов Р450 в печени взрослых людей (Koukouritaki et al., 2004). CYP2C8, CYP2C9 и CYP2C19 имеют клиническое значение, так как метаболизируют более 20% всех терапевтических препаратов (рис. 9), при этом большая часть приходится на долю CYP2C9 и CYP2C19 (Zanger and Schwab, 2013). CYP2C9 метаболизирует широкий спектр лекарств, включая антикоагулянт варфарин, противодиабетические средства, такие как толбутамид, противосудорожные средства, такие как фенитоин, и нестероидные противовоспалительные препараты. Было показано, что различные ксенобиотики, такие как фенобарбитал, рифампицин, дексаметазон и гиперфорин, индуцируют экспрессию генов СҮР2С на уровне транскрипции в первичных гепатоцитах человека и повышают метаболизм субстратов СҮР2С in vivo у человека. Эта индукция может приводить к лекарственным взаимодействиям, лекарственной устойчивости и терапевтической неэффективности препаратов. Индуцируемость СҮР2С в печени в целом можно ранжировать как СҮР2С8 ≥ CYP2C9 > CYP2C19 (Chen and Goldstein, 2009).

Каждый ген подсемейства *CYP2C* полиморфен. Замена -806C>Т в регуляторном участке гена *CYP2C19* (аллель *CYP2C19*17*) приводит к усилению экспрессии гена (Goldstein and de Morais, 1994; Goldstein, 2001) и, как следствие, вызывает сверхбыстрый метаболизм лекарств, связанный с лекарственной реакцией на ингибиторы протонной помпы и антидепрессанты (Sim et al., 2006). Частота функциональных полиморфизмов CYP2C9 намного ниже, однако клинические последствия этих более редких полиморфизмов могут быть серьезными (Hirota et al., 2013). Показано, что однонуклеотидные полиморфизмы, являющиеся медленными метаболизаторами (аллели *CYP2C9*2* и *CYP2C9*3*), играют прямую защитную роль в онкогенезе, нарушая биосинтез эпоксиэйкозатриеновых кислот (EET) (Sausville et al., 2018). В настоящее время генетическое тестирование доступно для всех известных вариантов аллелей *CYP2C*.

Помимо участия в метаболизме лекарств, СҮР2С выполняют важные эндогенные функции. Они участвуют в биотрансформации нейротрансмиттеров (например,

гидрокситриптамина) (Fradette et al., 2004), стероидных гормонов (эстрогена, прогестерона, тестостерона) (Justenhoven et al., 2012) и полиненасыщенных жирных кислот (в том числе арахидоновой кислоты) (Westphal et al., 2015). CYP2C окисляют арахидоновую кислоту (АК) до эпоксиэйкозатриеновых кислот (ЕЕТ), а именно 5,6-ЕЕТ, 8,9-ЕЕТ, 11,12-ЕЕТ и 14,15-ЕЕТ. В свою очередь ЕЕТ участвуют во многих биологических процессах, таких как воспаление, митогенез, клеточная передача сигналов, регуляция тонуса сосудов и транспорт ионов. Эпоксиэйкозатриеновые кислоты могут служить лигандами для рецепторов, активируемых пролифератором пероксисом (PPAR) α и γ (рис. 12), и стимулировать связывание гетеродимера PPAR:RXR (ретиноидный X рецептор) с его респонсивным элементом (PPRE) (Ng et al., 2007). EET также участвуют в росте опухоли (Panigrahy et al., 2010), было показано, что EET, образующиеся в результате окисления АК СҮР2С9, вызывают пролиферацию эндотелиальных клеток и ангиогенез (Michaelis et al., 2005). Взаимодействия, возникающие с участием метаболизме подсемейства CYP2C эндогенных соединений ксенобиотиков, проиллюстрированы рисунком 12.

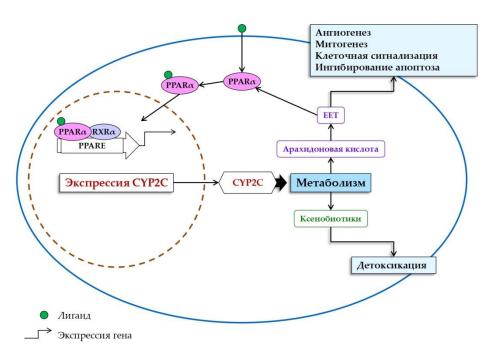


Рисунок 12. Упрощенная модель влияния рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом α (PPARα), на СҮР2С: активация PPARα приводит к экспрессии СҮР2С. СҮР2С превращают арахидоновую кислоту (АК) в ЕЕТ, которые обладают цитопротекторной функцией, а также могут служить лигандом PPARα, что приводит к механизму обратной связи. СҮР2С также метаболизируют ксенобиотики (Cizkova et al., 2012).

1.4.2.2 Подсемейство СҮРЗА

Подсемейство СҮРЗА человека включает четыре функциональных фермента: СҮРЗА4, СҮРЗА5, СҮРЗА7 и СҮРЗА43, гены которых расположены на хромосоме 7q21.1 (Chen et al., 2009). СҮРЗА играет доминирующую роль в метаболическом выведении лекарств. СҮРЗА4, основной член семейства СҮРЗА, наиболее выражен в печени и кишечнике взрослых людей (Thummel, 2007). Согласно данным масс-спектрометрического анализа, доля СҮРЗА4 от общего количества белка СҮРЗА в микросомальной фракции печени человека, составляет в среднем более 85 % (Ohtsuki et al., 2012). СҮРЗА5 является преобладающей формой в почках (Givens et al., 2003), СҮРЗА7 экспрессируется преимущественно в печени плода (Leeder et al., 2005) и внепеченочных тканях, таких как эндометрий и плацента (Schuetz et al., 1993), а СҮРЗА43 – в простате и яичках (Gellner et al., 2001).

СҮРЗА4 участвует в окислении приблизительно 27 % лекарственных препаратов и является основным ферментом Р450, участвующим в метаболизме лекарств (рис. 9). Активный центр СҮРЗА4 имеет достаточный размер и топографию для размещения либо одного большого, либо нескольких более мелких лигандов, что подтверждается гомотропной и гетеротропной кооперативностью фермента (Scott and Halpert, 2005). Способность вмещать субстраты различного размера и химической природы, а также способность катализировать различные химические реакции, такие как гидроксилирование алкильного углерода и ароматического кольца, О- и N -деалкилирование и эпоксидирование объясняет структурное разнообразие природы субстратов СҮРЗА4. СҮРЗА4 трансформирует широкий спектр эндогенных соединений. СҮРЗА4 участвует в метаболических путях холестерина, оксистерола и желчных кислот (Bodin et al., 2001; Honda et al., 2011; Kliewer and Willson, 2002), жирных кислот (Hu et al., 2014), стероидных гормонов (Niwa et al., 2020), и витамина D (Jurutka et al., 2005). Также СҮРЗА4 участвует в метаболизме этаноламида арахидоновой кислоты с образованием 5,6-ЕЕТ-этаноламида (ЕА), 8,9-ЕЕТ-ЕА, 11,12-ЕЕТ-ЕА и 14,15-ЕЕТ-ЕА в печени человека (Snider et al., 2007).

СҮРЗА4 метаболизирует огромное количество рецептурных препаратов, в том числе седативные средства, такие как мидазолам, триазолам и диазепам, антидепрессанты амитриптилин и имипрамин, антиаритмические средства амиодарон, хинидин, пропафенон и дизопирамид, антигистаминные средства терфенадин, астемизол и лоратидин, антагонисты кальциевых каналов, такие как дилтиазем и нифедипин, и различные противомикробные препараты и ингибиторы протеазы (Bibi, 2008a). Индукция и ингибирование СҮРЗА4, оказывают большое влияние на взаимодействие лекарств (Bibi, 2008b; G. Li et al., 2021; Rytkönen et al., 2020).

Экспрессия и активность СҮРЗА значительно различаются у разных людей, что связано с генетическими и негенетическими факторами, влияющими на дозировку и эффективность лекарств (рис. 10 и 11). Полиморфизм кодирующей области СҮРЗА4 встречается редко и объясняет лишь небольшую часть межиндивидуальной изменчивости метаболизма СҮРЗА. Недавние исследования выявили относительно распространенный регуляторный полиморфизм СҮРЗА4*22 с выраженным влиянием на экспрессию СҮРЗА4 в печени (Wang and Sadee, 2012).

Вследствие центральной роли СҮРЗА4 в метаболизме лекарств многие аспекты его катализа были тщательно изучены различными методами (спектроскопией поглощения, изотермической титрационной калориметрией, флуоресцентной спектроскопией, ЯМРспектроскопией и др.) (Sevrioukova and Poulos, 2015). В последние два десятилетия были разработаны и широко применены высокопроизводительные методы скрининга, в том числе флуоресцентные, люминесцентные и масс-спектрометрические, для оценки активности ферментов P450 (Ung et al., 2018). Уровень экспрессии СҮРЗА4 во многих случаях выше в опухолевых, чем в сопоставимых неопухолевых тканях (Lolodi et al., 2017). Это ставит вопрос о том, имеет ли СҮРЗА4 функции, которые влияют на развитие, пролиферацию и метастазирование злокачественных опухолей, что перспективной делает его противоопухолевой мишенью. Повышение уровня СҮРЗА4 при некоторых видах рака могут способствовать прогрессированию опухоли.

1.4.3 Основные механизмы транскрипционной регуляция цитохромов Р450

Экспрессия цитохромов Р450 регулируется как экзогенными, так и эндогенными субстанциями, посредством взаимодействия с транскрипционными факторами. Наиболее важными транскрипционными факторами, участвующими в регуляции экспрессии СҮР, являются арилуглеводородный рецептор (AhR) (Monostory et al., 2009), прегнановый X рецептор (PXR) (Wei et al., 2016), конститутивный андростановый рецептор (CAR) (Park et al., 2012), рецептор витамина D (VDR) (Fujino et al., 2021), фарнезоидный X рецептор (FXR) (Fujino et al., 2021; Pan et al., 2015), рецептор, активируемый пролифераторами пероксисом а (PPARa) (Cizkova et al., 2012; Thomas et al., 2013), печеночный X рецептор (LXRa) (Calkin and Tontonoz, 2012) и ретиноидный X-рецептор а (RXRa) (Cai et al., 2002).

Арилуглеводородный рецептор в неактивном состоянии находится в цитоплазме в комплексе с несколькими шаперонами (белком теплового шока 90 (HSP90), Хассоциированным белком 2 вируса гепатита В (ХАР2) и р23) (Monostory et al., 2009). При связывании лиганда с AhR цитозольный комплекс с шаперонами диссоциирует, связанный с лигандом AhR транслоцируется в ядро, где происходит связывание с ядерным транслокатором AhR (ARNT) в гетеродимер и взаимодействие активированного комплекса AhR:ARNT со

специфическими сайтами распознавания (response element, RE) в регуляторной области геновмишеней и, таким образом, регулирует транскрипцию генов-мишеней.

Индукция СҮР ксенобиотиками в значительной степени зависит от PXR, который регулирует экспрессию, связываясь в виде гетеродимера PXR:RXRa с соответствующими последовательностями в генах СҮР. PXR локализуется в цитоплазме до связывания с лигандом в форме комплекса с HSP90 или цитоплазматическим CAR-удерживающим белком (CCRP). После связывания с лигандом PXR высвобождается и перемещается в ядро, где образует гетеродимер с RXRa и связывается с респонсивным элементом ДНК и активирует транскрипцию гена (Squires et al., 2004). Активация транскрипции цитохромов P450 через CAR происходит аналогично активации через PXR, но в отличие от других лиганд-зависимых ядерных рецепторов, CAR конститутивно активен (Suino et al., 2004; Xu et al., 2004). VDR находится в цитозоле клеток в комплексе с HSP90 и после связывания с витамином D (1,25-D3) высвобождается и образует гетеродимер VDR:RXRa, который перемещается в ядро клетки, связывается с респонсивным элементом и запускает транскрипцию (Fujino et al., 2021). VDR, РХЯ и САЯ контролируют базальную и индуцируемую экспрессию нескольких генов СҮР посредством конкурентного взаимодействия с одним и тем же набором чувствительных элементов: АG(G/T)TCA-подобными прямыми повторами, разделенными 3 или 4 основаниями (DR3 и DR4, соответственно), и вывернутыми повторами разделенными 6 основаниями (ER6) (Drocourt et al., 2002a).

Было показано, что RXRα образует гетеродимер со многими ядерными рецепторами для регуляции ферментов, метаболизирующих лекарства, в том числе с FXR, LXRα (Istrate et al., 2010) и PPARα (Cizkova et al., 2012; Thomas et al., 2013).

ССААТ-энхансер-связывающие белки (ССААТ-enhancer-binding protein, С/ЕВР), являются ключевыми транскрипционными факторами, участвующими в конститутивной экспрессии нескольких генов цитохрома Р450 в печени (Cassel et al., 2000; Jover et al., 1998; Luc et al., 1996; Martínez-Jiménez et al., 2005; Pitarque et al., 2005; Wedel and Lömsziegler-Heitbrock, 1995). Выделено и охарактеризовано шесть членов семейства С/ЕВРз (С/ЕВРα-С/ЕВРζ) (Ramji and Foka, 2002). Гены С/ЕВРа и С/ЕВРβ могут продуцировать несколько изоформ, укороченных на N-конце в результате посттранскрипционной регуляции (An et al., 1996). С/ЕВРβ-активирующий транскрипцию белок печени (liver-enriched transcriptional inhibitory protein, LAP, ~35 кДа) является активатором транскрипции во многих системах, тогда как С/ЕВРβ-ингибирующий транскрипцию белок печени (liver-enriched inhibitory protein, LIP, ~20 кДа) считается функциональным антагонистом LAP (Descombes and Schibler, 1991; Welm et al., 1999). Поскольку низкомолекулярная изоформа LIP лишена большей части домена трансактивации, но содержит домены связывания ДНК и домены димеризации, предполагается,

что она действует как доминантно-негативный регулятор полноразмерного белка C/EBP и LAP (Huber et al., 2012; Raught et al., 1995; Zahnow et al., 2001). Соотношение LAP/LIP контролирует конститутивную и индуцибельную экспрессию СҮР и может вносить вклад в различные фенотипы СҮР в человеческой популяции (Martínez-Jiménez et al., 2005).

Ядерные факторы гепатоцитов (HNF) участвуют в регуляции экспрессии генов P450 путем ремоделирования хроматина. Наиболее значимыми для регуляции СYP являются HNF4 α (Hwang-Verslues and Sladek, 2010) и HNF3 γ (или FOXA3) (Cirillo et al., 2002).

Ядерные рецепторы гормонов представляют собой лиганд-активируемые факторы транскрипции, которые играют важную роль почти во всех аспектах развития и физиологии взрослых позвоночных (Aranda and Pascual, 2001). После связывания с лигандом они транслоцируются ядро И активируют транскрипцию генов-мишеней, привлекая специфические коактиваторы в виде комплексов к промоторным областям геновмишеней. Глюкокортикоидный рецептор (GR) и эстрогеновый рецептор (ERa) являются классическими ядерными рецепторами гормонов. Активированные лигандами GR и ERa представляют собой транскрипционные факторы, обычно связывающиеся со специфическими сайтами распознавания, называемыми GRE и ERE, соответственно, в регуляторной области генов-мишеней и, таким образом, регулирующие транскрипцию этих генов (Mwinyi et al., 2011a; Stellato et al., 2016). Эстрадиол является активатором CAR человека (но не PXR), тогда как прогестерон является активатором PXR (но не CAR) в концентрациях, достигаемых во время беременности (Choi et al., 2013). Так же было подтверждено, что в отсутствии лиганда ERα также участвует в регуляции экспрессии генов (D. Wang et al., 2019).

Максимальная индукция транскрипции генов СҮР достигается за счет координационных взаимодействий между ядерными рецепторами, реагирующими на эндогенные или экзогенные соединения, факторами печени и коактиваторами. Физиологические и патофизиологические факторы могут изменять экспрессию коактиваторов и корепрессоров и приводить к увеличению или снижению транскрипционной активности СҮР (Rigalli et al., 2021).

Ядерный фактор каппа В (NF-kB) является важным фактором транскрипции, который регулирует широкий спектр генов, включая цитохромы Р450. Было предложено три механизма, с помощью которых NF-kB может регулировать экспрессию и активность СҮР. Во-первых, NF-kB может напрямую регулировать экспрессию СҮР посредством связывания с промоторной областью этих генов, во-вторых, косвенно регулировать транскрипцию генов СҮР посредством взаимной репрессии с некоторыми ядерными рецепторами, которые участвуют в регуляции СҮР, такими как AhR, CAR, GR, PXR, RXR, PPAR, FXR и LXR. В-третьих, NF-kB может регулировать активность СҮР на посттранскрипционном уровне, индуцируя гемоксигеназу или влияя на стабильность белка СҮР. NF-kB может быть одним из звеньев между воспалением,

окислительным стрессом и регуляцией СҮР при многих состояниях, таких как воспалительные заболевания кишечника, ревматоидный артрит, психологический стресс, диабет, старение, рак, заболевания почек и застойная сердечная недостаточность. Это объясняет значительное изменение экспрессии и активности СҮР при этих заболеваниях (Zordoky and El-Kadi, 2009).

1.4.3.1 Транскрипционная регуляция СҮР2С9

Механизмы регуляции транскрипции гена *CYP2C9* включают несколько ядерных рецепторов, активируемых лигандами, включая CAR, PXR, VDR и GR, которые распознают респонсивные элементы в 5'-фланкирующей области *CYP2C9* (рис. 13).

На рисунке 14 суммирована вся основная информация о транскрипционной регуляции *СҮР2С9*, изложенная в этом разделе.

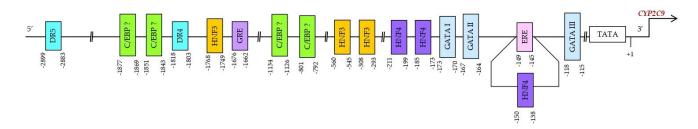


Рисунок 13. Сайты связывания транскрипционных факторов в 5'-фланкирующей области *CYP2C9*.

Сайты связывания с С/ЕВР были обнаружены в положениях -801/-792, -1134/-1126, -1851/-1843 и -1877/-1869 (Demorais et al., 1993), однако их функциональность дальнейшими исследованиями не подтверждалась. Тем не менее, было показано, что экспрессия функционального С/ЕВРα в клетках НерG2 до уровней экспрессии в здоровой печени сопровождалось одновременным увеличением мРНК нескольких членов семейства СҮР2 (2В6, 2С9 и 2D6), что свидетельствует о том, что этот транскрипционный фактор может играть важную роль в контроле транскрипции *СҮР2С9* в печени (Jover et al., 1998).

Белки GATA, принадлежащие к группе факторов транскрипции, содержащих «домены цинковых пальцев», и распознающие мотив ДНК (A/T)GATA(A/G), регулируют процесс эмбриогенеза, особенно развитие сердца и экспрессию детоксикационных ферментов и транспортеров. Сайты связывания GATA-4, основного белка GATA в печени, расположены в пределах первых 200 п.н. промотора *CYP2C9* в положениях -173/-170 (GATA I), -167/-164 (GATA II) и -118/-115 (GATA III). Мутации этих сайтов приводили к значительному ингибированию экспрессии CYP2C9 (Mwinyi et al., 2009).

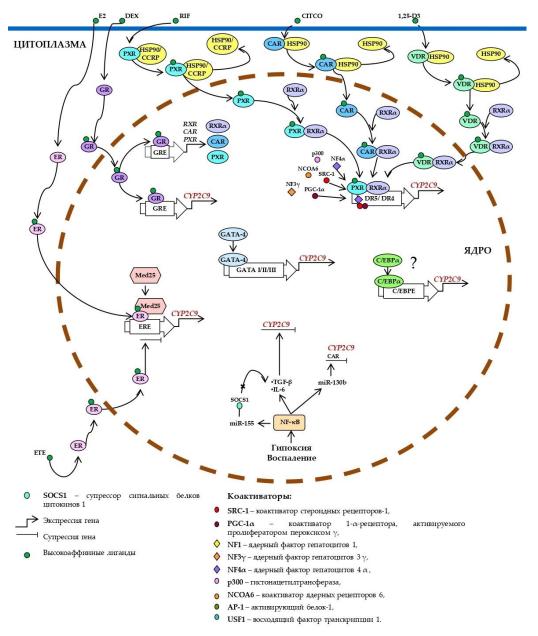


Рисунок 14. Транскрипционная регуляция *СҮР2С9*. РХR, CAR и VDR контролируют конститутивную и индуцируемую экспрессию *СҮР2С9* посредством конкурентного связывания с одним и тем же набором респонсивных элементов (DR4 и DR5). В отсутствии лигандов РХR, CAR и VDR локализуются в цитоплазме в форме комплексов с HSP90 или ССRР. После активации лигандами ядерные рецепторы высвобождаются. РХR и CAR транслоцируются в ядро, образуют гетеродимеры с RXRa, связываются с элементом ответа, привлекают коактиваторы и активируют транскрипцию *СҮР2С9*. VDR сначала образует гетеродимер с RXRa, а затем транслоцируется в ядро для активации экспрессии *СҮР2С9*. Фактор транскрипции GATA-4 активирует промотор *СҮР2С9*. Экспрессия функционального С/ЕВРa сопровождается одновременным увеличением мPHK CYP2C9. GR повышает экспрессию CYP2C9 как за счет повышения экспрессии CAR, RXRa, PXR, так и за счет прямой активации промотора *СҮР2С9*. Активированный лигандом ERa в зависимости от лиганда может как

активировать промотор *CYP2C9*, так и ингибировать его. Для ERα-опосредованной активации промотора *CYP2C9* необходим кооктиватор Медиатор 25. Гипоксия и воспаление индуцируют активность NF-кВ и способствуют высвобождению цитокинов, что приводит к ингибированию экспрессии *CYP2C9*. NF-кВ активирует miR-130b, которая снижает экспрессию CAR и CYP2C9, и miR-155, которая непосредственно нацеливается на супрессоры сигнальных белков цитокинов (особенно SOCS1) для ингибирования обязательной отрицательной обратной связи регуляции воспалительных реакций.

Несовершенный палиндромный глюкокортикоид-чувствительный элемент (GRE) был обнаружен в положении -1662/-1676, CAR/PXR-чувствительный элемент в положениях -1803/-1818 (DR4) (Gerbal-Chaloin et al., 2002) и -2899/-2883 (DR5) (Chen et al., 2004). Индукция СҮР2С9 рифампицином, по-видимому, опосредована главным образом мотивом DR4 в положении -1803/-1818 от начала транскрипции *СҮР2С9*. Второй дистальный САR/РХR-чувствительный элемент (DR5) в позиции -2899/-2883 может играть меньшую роль, однако оба элемента важны для конститутивной регуляции *СҮР2С9* (Ferguson et al., 2002). VDR также как РХR и CAR контролирует конститутивную и индуцируемую экспрессию *СҮР2С9* посредством конкурентного взаимодействия с DR4. По-видимому, связывание гетеродимера VDR:RXRα с элементом DR4 промотора СҮР2С9 имеет гораздо более низкую аффинность по сравнению со связыванием с другими элементами, чувствительными к РХR и CAR (ER6 и DR3 у СҮР3А4) (Drocourt et al., 2002b). Концентрация лиганда может непосредственно влиять на механизм регуляции. Например, дексаметазон в концентрациях выше 1 мкМ индуцирует СҮР2С9 через РХR, в то время как в концентрациях меньше 100 нМ индукция СҮР2С9 идет через глюкокортикоидный рецептор (GR) и CAR (Belic et al., 2010).

ЕRα и его лиганды играют важную роль в регуляции экспрессии CYP2C9 (Gruber et al., 2004). В присутствии лиганда рецептор эстрогена α (ERα) регулирует экспрессию *CYP2C9* через функционально значимый полусайт эстроген-чувствительного элемента (ERE) на позиции -149/-145 в промоторной области *CYP2C9* (Mwinyi et al., 2011а). Было показано, что лиганды ERα по разному могут влиять на экспрессию *CYP2C9*. Так селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов 4-гидрокситамоксифен (4-OHT) и ралоксифен (R) активируют промотор *CYP2C9*, в то время как 17α-этинилэстрадиол (ETE) и 17β-эстрадиол (E2) значительно или незначительно, соответственно, ингибируют его (Mwinyi et al., 2011b). Наблюдаемый трансактивирующий эффект селективных модуляторов эстрогеновых рецепторов на промотор *CYP2C9*, однако, не согласуется с результатами исследования *in vivo*, которое показало, что тамоксифен значительно ингибирует метаболизм лозартана, субстрата CYP2C9. Нельзя

исключать, что тамоксифен проявляет свой общий более сильный ингибирующий эффект посредством других, еще не изученных механизмов (Mwinyi et al., 2011a).

Для ЕRα-опосредованной транскрипционной активации промотора *CYP2C9* через взаимодействие с лигандами 17β-эстрадиолом (E2) (Shi et al., 2014) или бисфенолом А (Xu et al., 2017) необходим кооктиватор Медиатор 25 (Med25), вариабельный член многосубъединичного белкового комплекса Медиатор, являющегося ключевым регулятором транскрипции с помощью PHK-полимеразы II (Ansari and Morse, 2013; Belakavadi and Fondell, 2006). Также было показано, что Med25 участвует в HNF4α-зависимой активации транскрипции ряда генов, включая *CYP2C9* и *CYP3A4*, влияя на статус лизина 27 гистона 3 (H3K27) в области связывания HNF4α внутри промоторной области CYP2C9 через ассоциацию с HNF4α (Englert et al., 2015; Rana et al., 2011).

Идентифицированы три сайта связывания ядерного фактора гепатоцитов HNF4α в положении -150/-136, -185/-173 (Chen et al., 2005) и -211/-199 п.н. (Rana et al., 2010) проксимального промотора *CYP2C9*. Все три сайта вносят вклад в активацию гена *CYP2C9* с помощью HNF4α, который необходим для максимальной PXR-опосредованной индукции рифампицином, но не GR-опосредованной индукции дексаметазоном в клетках HepG2 (Chen et al., 2005).

Коактиватор ядерных рецепторов 6 (NCOA6) закрепляет стационарный комплекс кофакторов и действует как коактиватор транскрипции для определенных ядерных рецепторов. NCOA6 взаимодействует с HNF4α и обеспечивает платформу для рекрутирования других коактиваторов, соединяя сайты связывания HNF4α и CAR (Surapureddi et al., 2008) и/или PXR 2011) и (Surapureddi et al., обеспечивая активацию промотора. Однако, гепатоцеллюлярной карциномы человека Нер С2, демонстрирующие высокий уровень экспрессии HNF4α, экспрессируют низкие уровни P450. Было показано, что HNF4αопосредованная транскрипция СУР в клетках HepG2 нарушается из-за низкого уровня коактиватора 1-α-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом γ (РGС-1α), и коактиватора стероидных рецепторов-1 (SRC-1). Эти коактиваторы действуют через элементы ответа HNF4α. Трансфекция клеток PGC-1α, опосредованная аденовирусом, приводила к значительному дозозависимому увеличению экспрессии СҮР2С9, а также оказывала умеренное активирующее действие на СҮРЗА4. Аденовирусная трансфекция SRC-1 оказывала меньшее влияние на гены P450 (Martínez-Jiménez et al., 2006).

В целом, сравнение корегуляции *CYP2C9* с *CYP2B6* и *CYP3A4*, прототипными генамимишенями для CAR и PXR человека, с использованием культуры гепатоцитов человека, обработанных активаторами PXR и CAR показало, что *CYP2C9* демонстрирует профиль

индукции, более близкий к профилю *CYP3A4*, несмотря на наличие общих механизмов регуляции *CYP3A4* и *CYP2B6* (Sahi et al., 2009).

1.4.3.2 Транскрипционная регуляция СҮР2С19

Гомология между промоторами *CYP2C9* и *CYP2C19* составляет 93% в пределах первых 800 п.н. от старт-кодона и 88% для следующей 1000 п.н. (Arefayene et al., 2003). Для *CYP2C19* сообщалось о многих предполагаемых сайтах связывания факторов транскрипции. Однако функциональные сайты связывания факторов транскрипции были продемонстрированы только для сайтов CAR/PXR (мотив DR4 в положении -1891/-1876 п.н.), GR (GRE в положении -1750/-1736 п.н.) (Chen et al., 2003), HNF3γ (в положении -313/-298, -560/-545 и -623/-608 п.н.) (Bort et al., 2004), HNF4α (в положении -187/-175 и -152/-140 п.н.), GATA (в положении -165/-162 и -159/-156 п.н.) (Mwinyi et al., 2010b) и ERα (ERE, в положении -151/-147 п.н.) (Mwinyi et al., 2010a) в 5'-фланкирующей области *CYP2C19* (рис. 15).

На рисунке 16 суммирована вся основная информация о транскрипционной регуляции *СҮР2С19*, изложенная в этом разделе.

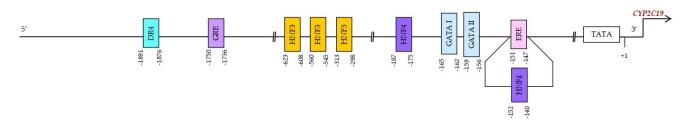


Рисунок 15. Сайты связывания транскрипционных факторов в 5'-фланкирующей области *СҮР2С19*.

Проксимальный элемент DR4, обнаруженный в *CYP2C19*, демонстрирует меньшее связывание с гетеродимером CAR:RXRα, чем в *CYP2C9* (Chen et al., 2003).

Факторы транскрипции GATA также участвуют в регуляции активности промотора *CYP2C19*. Транскрипционная активность *CYP2C19* в основном регулируется сайтом связывания GATA I. Специфический корегулятор FOG-2 (Friend of GATA-2) ингибирует GATA-4-зависимую активацию промотора *CYP2C19* (Mwinyi et al., 2010b).

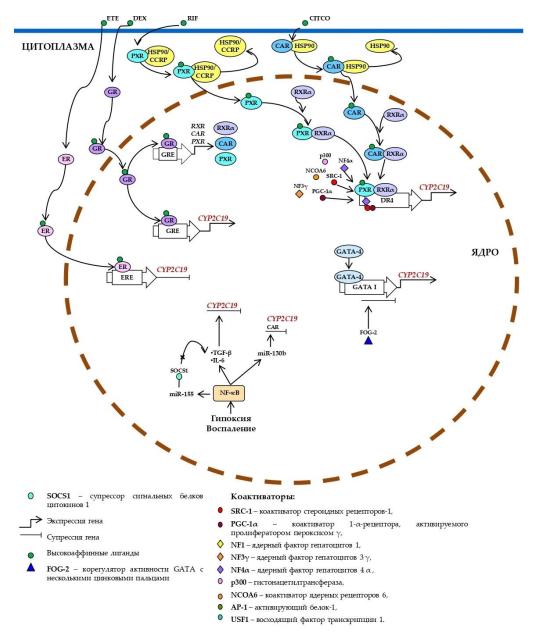


Рисунок 16. Транскрипционная регуляция *СҮР2С19*. PXR и CAR контролируют конститутивную и индуцируемую экспрессию *СҮР3А4* посредством конкурентного связывания с мотивом DR4. В отсутствии лигандов PXR и CAR локализуются в цитоплазме в форме комплексов с HSP90 или CCRP. После активации лигандами ядерные рецепторы высвобождаются, транслоцируются в ядро, образуют гетеродимеры с RXRα, связываются с элементом ответа, привлекают коактиваторы и активируют транскрипцию *СҮР2С19*. Фактор транскрипции GATA-4 активирует промотор *СҮР2С19*, а специфический корегулятор FOG-2 может ингибировать GATA-4-зависимую активацию. GR повышает экспрессию CYP2С19 как за счет повышения экспрессии CAR, RXRα, PXR, так и за счет прямой активации промотора *СҮР2С19*. Активированный лигандом ERα в зависимости ингибирует промотор *СҮР2С19*. Для ERα-опосредованной активации промотора *СҮР2С9* необходим коактиватор Медиатор 25. Гипоксия и воспаление индуцируют активность NF-кВ и способствуют высвобождению

цитокинов, что приводит к ингибированию экспрессии *CYP2C9*. NF-кВ активирует miR-130b, которая снижает экспрессию CAR и CYP2C9, и miR-155, которая непосредственно нацеливается на супрессоры сигнальных белков цитокинов (особенно SOCS1) для ингибирования обязательной отрицательной обратной связи регуляции воспалительных реакций.

Похоже, что ΕRα-зависимая регуляция транскрипции в подсемействе СΥР2С довольно консервативна. 17β-эстрадиол (Е2) и 17α-этинилэстрадиол (ЕТЕ) подавляют экспрессию СУР2С19 через рецептор эстрогена ERa, который взаимодействует с элементом ответа ERE (Mwinyi et al., 2010a). Однако, наряду со сходствами, существуют также небольшие различия между СҮР2С9 и СҮР2С19 с точки зрения их ER-опосредованной регуляции. В отличие от СҮР2С9, активность промотора СҮР2С19 значительно подавлялась как ЕТЕ, так и ЕЕ. Кроме того, селективные модуляторы эстрогеновых рецепторов были способны слегка трансактивировать промотор СҮР2С9, тогда как для СҮР2С19 таких эффектов обнаружено не было (Mwinyi et al., 2011a).

Воспалительные цитокины интерлейкин-6 (IL-6) и трансформирующий фактор роста β (ТGF-β) подавляют экспрессию CYP2C19 (Aitken and Morgan, 2007). Механизмы этого подавления *CYP2C19* на сегодняшний день не выяснены. МикроРНК miR-130b, уровень которой значительно повышен при воспалении, является потенциальным негативным регулятором метаболизма лекарств, прямо и/или косвенно влияющим на экспрессию нескольких генов *CYP*. Трансфекция клеток HepaRG миметиком miR-130b привела к значительному снижению экспрессии ядерных рецепторов CAR и FXR, а также CYP2C9 и CYP2C19. Кроме того, miR-130b отрицательно влияла на уровни активности P450 как минимум на 30 %. Анализы репортерного гена с использованием 3'-нетранслируемой области CYP2C9 (3'-UTR) подтвердили прямую регуляцию miR-130b (Rieger et al., 2015).

1.4.3.3 Транскрипционная регуляция СҮРЗА4

Лучше всего изучен молекулярный механизм регуляции *CYP3A4*. 5'-регуляторная область этого гена содержит сайты связывания транскрипционных факторов, инициирующих каскад событий, ведущих к его активации, либо репрессии. Можно выделить четыре основных цис-действующих модуля в 5'-фланкирующей области *CYP3A4*: проксимальный промотор (prP), дистальный промотор (dP), дистальный энхансерный модуль ответа на ксенобиотики (XREM) и дальний конститутивный энхансерный модуль (CLEM4) (рис. 17).

На рисунке 18 суммирована вся основная информация о транскрипционной регуляции *СҮРЗА4*, изложенная в этом разделе.

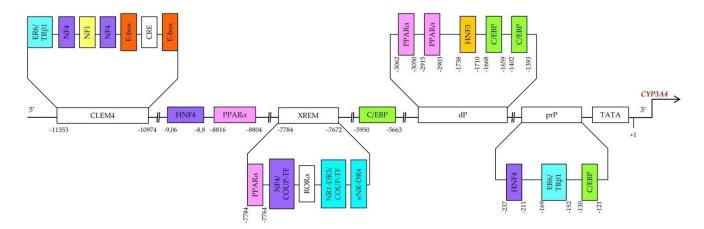


Рисунок 17. Сайты связывания транскрипционных факторов в 5'-фланкирующей области *CYP3A4*. prP — проксимальный промотор, dP — дистальный промотор, XREM — дистальный энхансерный модуль ответа на ксенобиотики, CLEM4 — дальний конститутивный энхансерный модуль.

Конститутивная экспрессия СҮРЗА4 модулируется факторами С/ЕВРα, С/ЕВРβ-LAP и С/ЕВРβ-LIP (Descombes and Schibler, 1991; Welm et al., 1999), а также ядерными факторами гепатоцитов (HNF). Соотношение LAP/LIP контролирует конститутивную и индуцибельную экспрессию СҮРЗА4 (рис. 18) и может вносить вклад в различные фенотипы СҮРЗА4 в человеческой популяции (Martínez-Jiménez et al., 2005). Функциональные сайты связывания С/ЕВР присутствуют в проксимальном промоторе СҮРЗА4 на позиции -121/-130 и в дистальном промоторе СҮРЗА4 на позициях -1393/-1402 и -1659/-1668 (Rodr´iguez et al., 2003) п.н.. Существует также дистальный энхансерный сайт связывания С/ЕВР в 5'-фланкирующей области гена СҮРЗА4 на позиции -5950/-5663 п.н.. Был выявлен сильный конкурентный эффект между LAP и LIP на дистальной последовательности СҮРЗА4, что приводит к модулированию экспрессии СҮРЗА4 как в печеночных, так и в непеченочных клетках (Martínez-Jiménez et al., 2005).

С/ЕВР-опосредованная трансактивация синергетически активируется в клетках печени с помощью ядерного фактора гепатоцитов 3γ (HNF- 3γ), сайт связывания которого находится в положении -1710/-1738 п.н. (Martínez-Jiménez et al., 2005). HNF3 γ облегчает присоединение других факторов транскрипции к их сайтам связывания посредством ремоделирования хроматина (Cirillo et al., 2002).

Индукция СҮРЗА4 ксенобиотиками в значительной степени зависит от РХR, который регулирует экспрессию *СҮРЗА4*, связываясь в виде гетеродимера РХR:RXRα с ER6 в проксимальном промоторе (Lehmann et al., 1998), DR3 в XREM (Goodwin et al., 1999), ER6 в

дальнем дистальном энхансерном модуле (Liu et al., 2008) и недавно идентифицированным мотивом DR4 (Frank et al., 2005; Liu et al., 2008; Toriyabe et al., 2009).

Рифампицин индуцирует взаимодействие РХR с HNF-4 α , которое коактивируется коактиватором 1- α -рецептора, активируемого пролифератором пероксисом γ (PGC-1 α) и коактиватором стероидных рецепторов-1 (SRC-1). Малый гетеродимерный партнер (SHP) способен ингибировать транскрипцию гена *CYP3A4*, блокируя взаимодействие РХR с HNF4 α и привлечение PGC-1 и SRC-1 на хроматин. Транскрипция гена *SHP* индуцируется HNF4 α , который связывается с мотивом DR1 в промоторе *SHP*. Рифампицин-активированный РХR ингибирует транскрипцию *SHP*, блокируя привлечение PGC-1 α на хроматин. Как следствие, экспрессия *SHP* снижается, а транскрипция *CYP3A4* максимизируется (Li and Chiang, 2006).

Дальний модуль, как и дистальный модуль, структурно сгруппирован элементом ответа РХК (ER6) и элементами, распознаваемыми НNF4α. Слияние дальнего модуля с проксимальным промотором СYP3A4 заметно увеличивает рифампицин-индуцированную репортерную активность. Увеличение синергетически усиливается, когда и дальний, и дистальный модули сливаются с проксимальным промотором. Интересно, что HNF4α повышает активность дистально-проксимального слитого промотора, но снижает активность дальне-проксимального слитого промотора (Liu et al., 2008). NCOA6 усиливает синергетическую активацию промоторной активности *СYP2C9* и *CYP3A4* с помощью РХК и HNF4α в присутствии рифампицина (Surapureddi et al., 2011).

Дексаметазон увеличивает экспрессию как RXR α , так и экспрессию мРНК PXR в культивируемых гепатоцитах человека, в то время как активаторы PXR, такие как рифампицин и клотримазол, этого не делают. Влияние дексаметазона на накопление мРНК PXR, связано с прямым действием на глюкокортикоидный рецептор (GR). Кроме того, дексаметазон индуцирует накопление белка RXR α и увеличивает ядерный уровень гетеродимера RXR α :PXR (Pascussi et al., 2000). Глюкокортикоиды повышают экспрессию PXR не только через активацию промотора гена *PXR*, но и через регуляцию 3'-нетранслируемой области (3'-UTR), которая, вероятно, включает подавление miR-18a-5p (Smutny et al., 2020).

VDR, PXR и CAR контролируют базальную и индуцируемую экспрессию нескольких генов *СYP*, в том числе и *CYP3A4*, посредством конкурентного взаимодействия с одним и тем же набором чувствительных элементов (ER6, DR3 и DR4) (Drocourt et al., 2002a).

Было показано, что все гетеродимеры RXRα с VDR, FXR, LXRα, CAR, TRα1 и TRβ1 связываются с сайтами связывания PXR ER6 в проксимальной области и DR3 в XREM. COUP-TFI связывается в виде гомодимера с обоими мотивами PXR, но преимущественно связывается с дистальным DR3. COUP-TFII, напротив, способен связываться только в виде гомодимера с дистальным элементом DR3. TRβ1 связывается исключительно с элементом ER6 в виде

гомодимера. Уровни белков ТRα1, ТRβ1 и COUP-TF влияют на экспрессию и индукцию СҮРЗА4. Репрессивная роль ТRα1 в регуляции СҮРЗА4 подтверждается тем, что соотношение РХR/ТRα1 коррелирует с базовой экспрессией СҮРЗА4. Интересно, что ТRα1 показал гораздо более сильный ингибирующий эффект по сравнению с COUP-TFI, COUP-TFII и TRβ1 как в присутствии, так и в отсутствие рифампина. ТRβ1 также может играть важную роль в репрессии экспрессии СҮРЗА4, поскольку он связывается с большей аффинностью, чем РХR, с обоими респонсивными элементами и демонстрирует значительную репрессию активности промотора СҮРЗА4. Однако значимой корреляции между отношением РХR/ТRβ1 и базовой экспрессией СҮРЗА4 не наблюдается. Так же показано, что COUP-TFII влияет на индукцию СҮРЗА4. СОUP-TFII способен связываться с дистальным респонсивным элементом РХR (DR3), что приводит к ингибированию активности промотора *СҮРЗА4*. Близкородственный СОUP-TFI, который показал аналогичные свойства связывания и ингибирования *in vitro* также может играть роль в РХR-опосредованной регуляции СҮРЗА4, однако значительной корреляции его экспрессии с индуцируемостью СҮРЗА4 не наблюдается (Istrate et al., 2010).

Гистондеацетилаза 1 (HDAC1) необходима для индуцированной карбамазепином экспрессии СҮРЗА4 в клетках НерG2. Карбамазепин (CBZ) ингибирует связывание HDAC1 с промотором СҮРЗА4 и индуцирует экспрессию СҮРЗА4 и РХК *in vitro*, но не способствует индуцированной CBZ экспрессии СҮРЗА4 *in vivo*, что свидетельствует о том, что, хотя РХК индуцируется CBZ, он может не вносить большого вклада в индуцированную CBZ экспрессию СҮРЗА4 (Wu et al., 2012). Ингибитор гистондеацетилазы стимулирует активность проксимального промотора *СҮРЗА4* в клетках НерG2. Ингибирование деацетилирования гистонов заметно увеличивает активность проксимального промотора *СҮРЗА4* и, таким образом, ремоделирование структуры хроматина может быть связано со стимуляцией *СҮРЗА4* в проксимальной области промотора. В заключение, ингибирование деацетилирования гистонов было необходимо для РХR-опосредованной стимуляции в проксимальной области промотора *СҮРЗА4*, когда рифампицин или PCN обрабатывали клетки HepG2 (Kim et al., 2004).

Рецептор α, активируемый пролифератором пероксисом (PPARα), важный фактор транскрипции, регулирующий гены, кодирующие эндо/ксенобиотические ферменты и ферменты, метаболизирующие липиды, связывается в виде гетеродимера PPARα/RXRα с мотивами DR1 и DR2 (прямые повторы полуучастка AG(G/T)TCA, разделенные 1 и 2 нуклеотидами, соответственно). PPARα/RXRα специфически связывались с тремя мотивами типа DR1 и с одним мотивом DR1/DR2 (PBR-I, -II и -III) на позициях -2915/-2903 и -3062/-3050, -7784/-7764 и -8816/-8804.

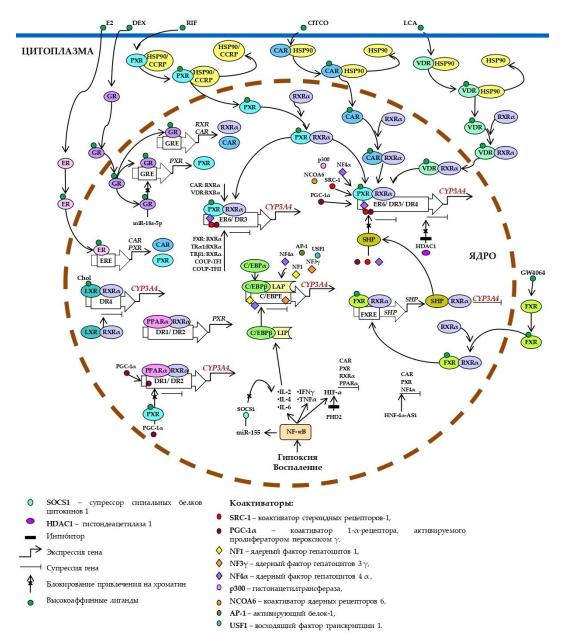


Рисунок 18. Транскрипционная регуляция *СҮРЗА4*. PXR, CAR и VDR контролируют конститутивную и индуцируемую экспрессию *СҮРЗА4* посредством конкурентного связывания с одним и тем же набором элементов ответа (ER6, DR3 и DR4). В отсутствии лигандов РХR, CAR и VDR локализуются в цитоплазме в форме комплексов с HSP90 или ССRР. Активированные лигандами эти ядерные рецепторы высвобождаются. РХR и CAR транслоцируются в ядро, образуют гетеродимеры с RXRα, связываются с респонсивным элементом, привлекают коактиваторы и активируют транскрипцию *СҮРЗА4*. VDR сначала образует гетеродимер с RXRα, а затем транслоцируется в ядро для активации экспрессии *СҮРЗА4*. ER и GR повышают экспрессию СҮРЗА4 за счет повышения экспрессии CAR, RXRα и РХR. Активируемый лигандом FXR повышает экспрессию SHP, который препятствует привлечению коактиваторов на хроматин и/или образует гетеродимеры с RXRα, тем самым ингибируя экспрессию *СҮРЗА4*. Ингибирование HDAC1 карбамазепином снижает экспрессию

СУРЗА4. Гетеродимер LXR:RXRα связывается с DR4 СУРЗА4, тем самым подавляя его экспрессию. После связывания лиганда с LXR или RXRα гетеродимер меняет конформацию, высвобождая корепрессоры и привлекая коактиваторы, что приводит к транскрипции генамишени. Гетеродимер PPARα:RXRα, связываясь с мотивами DR1 и DR2, повышает транскрипцию СУРЗА4 и РХR. Активируемый лигандом РХR подавляет PPARα-зависимую экспрессию генов путем ингибирования привлечения PGC-1α. Гипоксия и воспаление индуцируют активность NF-кВ и способствуют высвобождению цитокинов, которые повышают уровень транскрипции С/ЕВРβ и уровень трансляции С/ЕВРβ-LIP. С/ЕВРβ-LIP конкурирует с С/ЕВРα и С/ЕВРβ-LAP за связывание с респонсивными элементами ответа в промоторе СУРЗА4, снижая его экспрессию. NF-кВ активирует miR-155, которая непосредственно нацеливается на супрессоры сигнальных белков цитокинов (особенно SOCS1) для ингибирования обязательной отрицательной обратной связи регуляции воспалительных реакций.

РРАRα активирует экспрессию РХR посредством связывания с областью от -1514 до - 1321 п.н. Более того, форсированная сверхэкспрессия рецептора эстрогена α (ERα), а также GRα выявила положительный эффект на активность репортерной конструкции РХR, несущей проксимальную промоторную последовательность длиной 2,2 т.п.н. (Aouabdi et al., 2006; Gordon Gibson et al., 2006; Smutny et al., 2021). Активируемый лигандом РХR подавляет РРАRα-зависимую экспрессию генов путем ингибирования привлечения РGC-1α (Shizu et al., 2021).

Данные экспериментов предполагают избыточность, а также кооперативность по крайней мере трех функциональных РРАRα-зависимых сайтов в энхансере СҮРЗА4, которые опосредуют как конститутивную, так и индуцируемую трансактивацию. Предположительно, области связывания выше СҮРЗА4 постоянно заняты РРАRα, а окружение кофактора определяет репрессию или активацию транскрипции СҮРЗА4 после связывания с лигандом. Следовательно, добавление лиганда приводит не к усилению связывания, а скорее к усиленному высвобождению корепрессоров и, таким образом, к увеличению транскрипции (Thomas et al., 2013).

LXRα и LXRβ (X-рецепторы печени α и β) образуют гетеродимеры с RXRα и действуют как регуляторы транскрипции (Willy et al., 1995). LXRα экспрессируется в печени, кишечнике, жировой ткани, селезенке и макрофагах, тогда как LXRβ экспрессируется повсеместно (Repa and Mangelsdorf, 2000). Гетеродимеры LXR:RXRα связываются с респонсивным элементом ДНК, чувствительным к LXR, и подавляют экспрессию гена-мишени. После связывания лиганда с LXR или RXR гетеродимер меняет конформацию, что приводит к высвобождению корепрессоров и привлечению коактиваторов. Это приводит к транскрипции гена-мишени

(Calkin and Tontonoz, 2012). Точно так же фарнезоидный X-рецептор (FXR) образует гетеродимер с RXR и связывается с респонсивным элементом FXR (FXRE) в своих генах-мишенях, чтобы вызвать экспрессию гена.

Введение специфического для LXR лиганда GW3965 или специфического для PXR лиганда PCN оказывает тот же эффект, указывая на то, что лиганд-зависимая активация LXR и PXR, но не FXR, ответственна за повышенную экспрессию гена PPARα в тонком кишечнике мыши (Inoue et al., 2008).

Индуцируемый гипоксией фактор (HIF) связан с экспрессией СҮР, но основной механизм остается неясным. Стабилизация HIF- α, вызванная ингибиторами домена пролилгидроксилазы PHD2, приводит к снижению экспрессии CAR, PXR и RXRα и, как следствие, подавлению СҮР2В6 и СҮР3А4 (Takano et al., 2021). HIF также являются ключевыми супрессорами PPARα в печени (Li et al., 2017).

Гипоксия способствует развитию воспаления в том числе посредством активации и/или потенцирования NF-кВ, основного регулятора генов, участвующих во врожденном иммунитете, воспалении и апоптозе. Гипоксия индуцирует активность NF-кВ в клетках HeLa и способствует высвобождению цитокинов, включая IL-2, IL-4, IL-6 и интерферон γ (Oliver et al., 2009).

Интерлейкин 6 (IL-6) — основной регулятор острофазового ответа печени. Супрессия СҮРЗА4 с помощью IL-6 требует активации гликопротеинового рецептора gp130. IL-6 вызывает умеренную индукцию мРНК С/ЕВРβ и заметное увеличение трансляции С/ЕВРβ –LIP, что приводит к подавлению экспрессии СҮРЗА4 в следствие увеличения комплекса С/ЕВРβ-LIP, который конкурирует с конститутивными трансактиваторами С/ЕВР (Jover et al., 2002).

Биологическая функция FXR частично обеспечивается малым гетеродимерным партнером (SHP). Лиганд-активируемый FXR усиливает экспрессию SHP, а SHP, в свою очередь, подавляет активность множества факторов транскрипции. В гепатоцитах человека обработка GW4064, синтетическим агонистом FXR, приводит к снижению экспрессии мРНК СҮРЗА4 и снижению активности СҮРЗА4, что сопровождается увеличением экспрессии мРНК SHP. В клетках HepG2 SHP подавлял трансактивацию промотора *CYP3A4* PXR, CAR и GR (Zhang et al., 2015).

SHP активируется первичными желчными кислотами за счет активации их рецептора фарнезоидного X рецептора. SHP является мощным репрессором трансактивации РХR. Кроме того хенодезоксихолевая кислота (CDCA) и холевая кислота (CA), два лиганда фарнезоидного X-рецептора, индуцируют активацию SHP и вызывают репрессию РХR-опосредованной индукции СYP3A в гепатоцитах человека, а также *in vivo* у мышей. Эти результаты показывают сложный регуляторный каскад, жестко контролируемый SHP, как для поддержания продукции желчных кислот, так и для детоксикации в печени. На основании этих результатов заманчиво

предположить, что ингибирующий эффект SHP на транскрипционную активность PXR является результатом образования гетеродимера SHP:PXR, который не способен связывать PXR-чувствительный элемент. Однако, поскольку SHP способен взаимодействовать с RXR в отсутствие лиганда, этот ингибирующий эффект может быть просто результатом истощения RXR посредством образования гетеродимеров SHP:RXR и предотвращения связыванию гетеродимера PXR:RXR с элементом ER6 (Ourlin et al., 2003).

NF-кВ активирует miR-155, которая затем непосредственно нацеливается супрессоры сигнальных белков цитокинов (особенно SOCS1) для ингибирования обязательной отрицательной обратной связи регуляции воспалительных реакций, таким образом повышая регуляцию NF-кВ с образованием провоспалительных цитокинов, таких как IL-6 и TNF-α.

На экспрессию генов СҮР влияют эпигенетические факторы, включая модификации гистонов, метилирование ДНК и регуляцию с помощью некодирующих РНК (нкРНК, ncRNA) (Li et al., 2019).

Изменения модификаций гистонов способствуют опосредованной РХR индукции СҮРЗА4 рифампицином. Индукция мРНК СҮРЗА4 рифампицином в клетках LS174T связана с повышенным уровнем триметилирования лизина 4 гистона 3 (НЗК4тез) и ацетилирования НЗ, а также снижением уровня триметилирования лизина 27 гистона НЗ (НЗК27тез) в промоторе СҮРЗА4. Рифампицин усиливает привлечение на промотор СҮРЗА4 коактиватора ядерного рецептора 6 (NCOA6) и гистон-ацетилтрансферазы рЗ00 (рЗ00). Нокдаун NCOA6 или рЗ00 с помощью РНК с короткой шпилькой приводило к ингибированию индукции СҮРЗА4, а также к изменению уровней ацетилирования НЗК4тез, НЗК27тез или НЗ в промоторе СҮРЗА4. Нокдаун экспрессии прегнанового X-рецептора (РХR) не только подавлял привлечение NCOA6 и рЗ00, но также отменял вызванные рифампицином изменения уровней ацетилирования НЗК4тез, НЗК27тез и НЗ в промоторе СҮРЗА4. Более того, лечение рифампицином усиливало накопление в ядре и взаимодействие между РХR и NCOA6/рЗ00 (Yan et al., 2017b).

Индивидуальное метилирование CpG в регуляторной области CYP3A4 размером ~12 т.п.н. было исследовано в печени 72 взрослых, а также в печени 7 эмбрионов человека с использованием бисульфитного секвенирования. Обнаружены высоковариабельные сайты метилирования CpG в печени взрослых, которые соответствуют важным сайтам связывания фактора транскрипции CYP3A4, включая проксимальный промотор, XREM и CLEM4, а также в отдельных областях связывания C/EBP и HNF4α. Гиперметилирование CpG в этих регуляторных областях наблюдалось в печени плода по сравнению с печенью взрослых. Эти данные свидетельствуют о том, что элементы динамического метилирования ДНК, вероятно, связаны с ключевыми регуляторными промоторными областями СYP3A4 и потенциально могут

способствовать обычно наблюдаемой межиндивидуальной вариабельности экспрессии СҮРЗА4, а также сдвигу его экспрессии в процессе развития печени (Kacevska et al., 2012).

Установлено, что антисмысловая РНК 1 ядерного фактора 4α гепатоцитов (HNF-4α - AS1), антисмысловая длинная некодирующая РНК HNF-4α, является негативным регулятором базальной и рифампицин-индуцированной (RIF) экспрессии ядерных рецепторов и нижестоящих P450. В клетках Huh7 нокдаун HNF-4α-AS1 приводит к повышенной экспрессии HNF-4α, рецептора прегнана X (PXR) и P450 (включая СYP3A4) как в исходных условиях, так и в условиях их обработки RIF. Наоборот, сверхэкспрессия HNF4A-AS1 приводит к снижению базовой экспрессии конститутивного андростанового рецептора (CAR), арилгидрокарбонового рецептора, PXR и P450. Следует отметить, что значительно сниженные уровни индукции PXR и CYP1A2, 2C8, 2C19 и 3A4 с помощью RIF также наблюдались в клетках Huh7, трансфицированных плазмидой HNF-4α-AS1. Кроме того, отрицательная обратная связь HNF-4α на экспрессию генов, опосредованную HNF4A-AS1, была подтверждена с помощью эксперимента с потерей функции. Промотор *CYP3A4* способствует повышенной экспрессии этого гена после нокдауна HNF-4α -AS1. В целом, модификации гистонов способствуют негативной регуляции ядерных рецепторов и P450 с помощью HNF-4α-AS1 на базальном и индуцированном лекарствами уровнях (Wang et al., 2021).

МикроРНК (microRNA, miR) представляют собой некодирующие эндогенные одноцепочечные молекулы РНК и часто имеют размер 21–23 нуклеотида. Было идентифицировано более 2500 зрелых микроРНК человека (Kozomara et al., 2019). Считается, что микроРНК играют важную роль в посттранскрипционной регуляции матричных РНК (мРНК) (Friedman et al., 2009), включая гены, кодирующие ферменты, участвующие в распределении лекарств. МикроРНК соединяются с комплементарными мРНК, чтобы направлять деградацию мРНК и/или репрессию трансляции, таким образом, являясь негативными регуляторами экспрессии многих генов.

Некодирующие микроРНК (miPHK) могут прямо и косвенно контролировать посттранскрипционную и транскрипционную регуляцию *CYP3A4* путем нацеливания на 3'- нетранслируемые области (3'UTR) *CYP3A4* и факторов транскрипции, участвующих в экспрессии CYP3A4 (PXR, CAR, VDR, RXRα и PPARα). 3'-UTR участвует в подавлении экспрессии PXR и снижении опосредованной рифампицином активации *CYP3A4* (Smutny et al., 2020).

Методом сверхэкспрессии с репортерной системой люциферазы из 112 микроРНК, которые потенциально регулируют СҮРЗА4, из баз данных микроРНК *in silico*, было идентифицировано 14 микроРНК-кандидатов *in vitro*. Из них только четыре микроРНК значительно коррелировали с обратной эффективностью трансляции СҮРЗА4 в образцах

печени человека *in vivo*. Человеческий СҮРЗА4 посттранскрипционно регулируется hsa-miR-577, hsa-miR-1, hsa-miR-532-3p и hsa-miR-627 в печени (Wei et al., 2014).

Сообщалось о негативном влиянии на экспрессию PXR таких miRNA, как miR-18a-5p (Sharma et al., 2017), miR-148a (Takagi et al., 2008), miR-140-3p, miR-30c-1-3p и miR-877-5p. Как недавно выяснилось, длинные некодирующие PHK (lncRNAs), по-видимому, мешают экспрессии PXR. Наоборот, активация PXR регулирует экспрессию lncRNAs, таким образом, включая другой уровень действия PXR в дополнение к прямой трансактивации генов, кодирующих белок (Smutny et al., 2021).

Агонисты hPXR рифампин и рилпивирин являются супрессорами экспрессии miR-18a-5p (Sharma et al., 2017). miR-18a-5p участвует в подавлении экспрессии PXR своими лигандами и в усилении экспрессии мPHK PXR глюкокортикоидами в клетках печени, что было показано на 14 культурах гепатоцитов человека. Глюкокортикоиды повышают экспрессию PXR не только через активацию промотора гена PXR, но и через регуляцию 3'-UTR, которая, вероятно, включает подавление miR-18a-5p.

Сообщалось о том, что миРНК hsa-miR-148a влияет на экспрессию PXR в клетках HepG2 и в японских популяциях. Аналогичное корреляционное исследование в китайской популяции хань показало, что hsa-miR-148a не играет важной роли в регуляции экспрессии PXR или СYP3A4 в печени этой популяции (Wei et al., 2013).

Анализ уровней мРНК СҮРЗА4, а также PXR в клетках HepaRG после лечения рифампином показал, что уровень экспрессии мРНК СҮРЗА4 был значительно увеличен после лечения рифампином, но без существенных изменений в экспрессии PXR. Между тем, 65 микроРНК были значительно изменены при лечении рифампином. Среди этих микроРНК 47 были значительно снижены, а 18 повышены.

miR-628-3p и miR-641 могут непосредственно нацеливаться на CYP3A4 и негативно регулируются при индукции CYP3A4 рифампином (Yan et al., 2017a). miR-27b нацелен на 3'UTR VDR и CYP3A4 и отрицательно регулирует экспрессию мРНК и белков VDR и CYP3A4 (Pan et al., 2009). Исследования *in vitro* показали, что miR-27b может регулировать уровни мРНК СYP3A4, VDR и PPARα, а также экспрессию и активность белка CYP3A4. Однако при оценке экспрессии в образцах печени человека не было обнаружено связи между miR-27b печени и уровнями мРНК СYP3A4, VDR или PPARα (Ekström et al., 2015). Сверхэкспрессия и ингибирование miR-21 или miR-27b в клетках НиН7 значительно снижали и повышали уровень белка PPARα, соответственно, но не уровень мРНК PPARα. В печени человека уровни белка PPARα не коррелировали с мРНК PPARα, но обратно коррелировали с уровнями miR-21, что свидетельствует о существенном влиянии miR-21, хотя нельзя было исключить вклад miR-27b

(Kida et al., 2011). miR-27a может участвовать в регуляции экспрессии гена *CYP3A4* (Shi et al., 2015).

miR-34a отрицательно регулирует экспрессию RXRα в печени человека и влияет на экспрессию нижестоящих генов. Активация транскрипционного фактора p53 приводит к повышению уровня miR-34a и снижению уровня белка RXRα. В отличие от многих других микроРНК, элемент узнавания miR-34a был идентифицирован в кодирующей области мРНК RXRα. Зависимое от miR-34a подавление RXRα снижает активность промотора *CYP3A4* (Oda et al., 2014). Несколько сайтов связывания миРНК на RXRα (miR -130b-3p) и CYP3A4 (miR -224-5p) были подтверждены (Kugler et al., 2020).

Таким образом, ингибирование и индукция цитохромов Р450 являются основными механизмами, вызывающими фармакокинетическое взаимодействие лекарственных средств. Представители подсемейства СҮР2С и СҮР3А4 индуцируются многими препаратами и вносят основной вклад в фармакокинетику лекарственных средств. Поэтому изучение взаимодействий между вновь синтезированными соединениями и СҮР2С и СҮР3А4 должно быть включено в разработку лекарств. Выявление возможных ингибиторов и индукторов цитохромов Р450 на ранних стадиях разработки лекарств имеет решающее значение для предотвращения потенциальных взаимодействий между лекарственными средствами и нежелательных явлений.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Клеточные линии

Исследования проводили на клеточных линиях человека. Клеточные линии рака молочной железы МСГ-7, карциномы гортани Нер-2, гепатоцеллюлярной карциномы НерG2 и неопухолевых фибробластов легкого МRС-5 были приобретены в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор». Мезенхимальные стволовые клетки МСК, выделенные из костного мозга по описанной ранее методике (Baghaei et al., 2017), были взяты из банка культур НИИ клинической и экспериментальной лимфологии (КЭЛ), филиала Института цитологии и генетики СО РАН.

2.2 Условия культивирования

Клетки МСF-7, Hep-2 и HepG2 культивировали в среде IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Merk, США), фибробласты MRC-5 в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Merk, США), МСК в среде DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, Sigma Aldrich, Великобритания) с 10%-ным содержанием в них эмбриональной бычьей сыворотки (Fetal Bovine Serum, Cytiva, США) в стандартных условиях (влажная атмосфера, 5% CO₂ и 95% воздуха, 37°C).

2.3 Получение 2D- и 3D-моделей

Для получения 2D-модели клетки высевали на 96-луночные планшеты (3599, Corning, США) по 5^{\bullet} 10^3 клеток на лунку или на 12-луночные планшеты (3512, Corning, США) по 4^{\bullet} 10^4 клеток на лунку в соответствующей среде и культивировали в течение 24 часов до обработки контрольными и исследуемыми соединениями.

В качестве 3D-модели использовали сфероиды. Для получения сфероидов клетки HepG2 высевали на 96-луночные низкоадгезивные U-образные планшеты (174925, ThermoFisher, США) по 1,5° 10³ клеток на лунку (Sirenko et al., 2015). Обработку сфероидов исследуемыми соединениями проводили через 24 часа после посева. Для сравнения силы эффектов аналогичные процедуры проводили с разрешенными к терапевтическому применению препаратами.

2.4 Исследуемые соединения

Все исследуемые соединения и препараты сравнения представлены в таблицах 2 и 3, соответственно.

Фенозан калия, селен- и серосодержащие производные фенозановой кислоты (табл. 2, соединения **1–3а**) были получены и охарактеризованы научной группой кафедры химии Новосибирского государственного педагогического университета (НГПУ) под руководством д.х.н., профессора Кандалинцевой Н. В..

Комплексы меди(II), марганца(II) и кобальта(II) с производными енамина и тетразола (табл. 2, соединения **4–9**), а также комплекс [Cu(dmphen)(лейцинат)]NO₃ (Cas) из серии Casiopeinas были получены и охарактеризованы научной группой лаборатории металлорганических координационных полимеров Института неорганической химии им. А. В. Николаева (ИНХ СО РАН) под руководством к.х.н. Лидер Е. В..

Нитрозокомплексы рутения с метиловым/ этиловым эфирами никотиновой и изоникотиновой кислот, а также γ-пиколином (табл. 2, соединения **10–12**) были получены и охарактеризованы научной группой лаборатории химии редких платиновых металлов ИНХ СО РАН под руководством д.х.н., доцента Костина Г. А..

Соединения растворяли в воде, этаноле или ДМСО (Биолот, Россия) и готовили рабочие растворы методом серийных разведений соответствующей питательной средой. Клетки инкубировали с препаратами в выбранном диапазоне концентраций в течение 24, 48 и 72 часов. Конечная концентрация растворителя в среде не превышала 1 %.

Для дополнительного изучения фотоиндуцированных эффектов нитрозокомплексов рутения клетки подвергали воздействию светодиода (длина волны 445 нм, мощность 30 мВт) в течение 30 мин через 4 часа после добавления препаратов, затем снова помещали в СО₂-инкубатор.

Для оценки модулирующих эффектов на цитохромы P450 клетки HepG2 инкубировали с исследуемыми комплексами и классическими индукторами дексаметазоном (10, 100 мкМ) и рифампицином (25, 100 мкМ) в течение 48 часов с заменой среды и добавлением соединений каждые 24 часа.

Таблица 2. Список и структурные формулы исследуемых соединений.

Соединение		Структурная формула	Ссылка
1	C ₁₇ H ₂₅ KO ₃	Bu ^t Bu ^t	(Kholshin et al., 2019)
2	C ₁₂ H ₁₆ O ₃ S	Me HO Me S COOH	(Klyushova et al., 2022)

2a	$C_{12}H_{15}KO_3S$	Me	(Klyushova et al.,
		но	2022)
		Me COOK	,
3	$C_{20}H_{32}O_3Se$	Bu ^t	(Kholshin et al.,
		но	2019)
		ви	
3a	C ₂₀ H ₃₁ KO ₃ Se	Bu ^t I	(Kholshin et al.,
		HO Se	2019)
		ви	
4	[CuL ₂]	H ₃ C	(Eremina et al.,
		H ₃ C'	2020)
		Cu	
		CH ₃	
		,	
5	${[Cu(phen)(MT)_2] \cdot H_2O}_n$	H ₃ C _N	(J. A. Eremina et
		N N N	al., 2021)
		N-Cu N=N	
		N-N H ₃ C N	
		$\begin{bmatrix} & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \\ & & & & & \end{bmatrix}_n$	
6	$[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$	"	(J. A. Eremina et
	[Cu2(pnen/2(11)4]		al., 2021)
		N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	ui., 2021)
		N Cu Cu N N N	
		N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	
7	$[Cu2(bipy)2(\Phi T)4]$		(J. A. Eremina et
			al., 2021)
		N-Cu N-N	
		N-N N N	
		N N N	

6а	$[Cu_2(dmphen)_2(\Phi T)_4]$	H ₃ C N N N N N N N N CH ₃ CH ₃	(Julia A. Eremina et al., 2021)
7a	[Cu ₂ (dmbipy) ₂ (ΦT) ₄]	H ₃ C N Cu N CH ₃ N-N N CH ₃ CH ₃	(Смирнова и др, 2021)
6б	[Cu(phendione)(ΦT) ₂]		(Julia A. Eremina et al., 2021)
8	[Mn(H ₂ O) ₄ (phen)]·phen·(ΦT) ₂	$\begin{bmatrix} \mathbf{H_2O} & \mathbf{H_2O} \\ \mathbf{H_2O} & \mathbf{N} \\ \mathbf{H_2O} & \mathbf{OH_2} \end{bmatrix} \cdot \mathbf{phen} \cdot (\hat{O}\hat{O})_2$	(Julia A. Eremina et al., 2021)
8a	[Mn ₃ (phen) ₂ (ΦT) ₄ (OAc) ₂]	N N N N N N N N N N N N N N N N N N N	(Julia A. Eremina et al., 2021)

9	$[\text{Co}_3(\text{phen})_2(\Phi T)_6]$		(Julia A. Eremina
			et al., 2021)
			, ,
		N N N N N N	
		N CO N N CO N N CO	
Cas	[Cu(dmphen)(лейцинат)]NO ₃	CH ₃	(Ruiz Azuara,
		H ₃ C CI	1991; Голубева
		H ₃ C H ₂ ONO ₂	Ю.А., 2022)
		CH ₃	
10	[RuNOCl ₃ (NicMe) ₂]	OMe	(Rechitskaya et al.,
			2020)
		CI CI	
		ON CI	
		•	
		OMe	
10a	[RuNOCl ₃ (NicEt) ₂]	OEt	(Rechitskaya et al.,
		o	2020)
		CI OI	
		ON CI	
		0	
		OEt	
11	[RuNOCl ₃ (InicMe) ₂]	MeO O	(Rechitskaya et al.,
			2020)
		01 OI	
		ON CI	
		, N	
		O	
		O OMe	

11a	[RuNOCl ₃ (InicEt) ₂]	EtO	(Rechitskaya et al.,
			2020)
		CI CI	
		ON CI	
		N	
		O OEt	
12	[RuNOCl ₃ (γ-Pic) ₂]	CH₃	(Makhinya et al.,
			2019)
		CI CI	
		ON CI	
		, n	
		CH ₃	
		3113	

L — анион 2-анилинометилиден-5,5-диметилциклогексан-1,3-диона; Φ T — 5-фенилтетразолатанион; MT — 5-метилтетразолат-анион; bipy — 2,2'-бипиридин; phen— 1,10-фенантролин; dmphen — 4,7-диметил-1,10-фенантролин; dmbipy — 4,4'-диметил-2,2'-бипиридин, phendione — 1,10-фенантролин-5,6-дион, InicEt — этилизоникотинат, InicMe — метилизоникотинат, NicEt — этилиникотинат, NicMe — метилиникотинат, γ -Pic — γ -пиколин, OAc — ацетат анион.

Таблица 3. Список препаратов сравнения и их механизмов действия. Механизм действия указан на основе баз данных DrugBank (https://go.drugbank.com/drugs/) и PubChem (https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)

Соединение		инение	Механизм действия	
1	VER	Верапамил	Ингибитор кальциевых каналов	
2	VBL	Винбластин	Ингибирование митоза в метафазе за счет взаимодействия с тубулином	
3	VCR	Винкристин	Ингибирование митоза в метафазе за счет взаимодействия с тубулином	
4	VRL	Винорелбин	Ингибирование митоза в метафазе за счет взаимодействия с тубулином. Деполяризация микротрубочек, влияние на веретено деления	
5	DAC	Дакарбазин	Алкилирование нитей ДНК, ингибирование синтеза ДНК. Не специфичен для фазы клеточного цикла	
6	DEX	Дексаметазон	Ингибирование апоптоза, NF-кВ и других воспалительных факторов транскрипции	

7	DIC	Диклофенак	Ингибирование циклооксигеназы-1 и -2
8	DOX	Доксорубицин	Интеркаляция (сжатие между парами оснований), разрыв цепи ДНК и ингибирование активности топоизомеразы II
9	CARP	Карбоплатин	Алкилирование нитей ДНК
10	MTX	Метотрексат	Ингибирование ферментов, ответственных за синтез нуклеотидов
11	PTX	Паклитаксел	Гиперстабилизация микротрубочек
12	RIF	Рифампицин	Ингибирование ДНК-зависимой РНК-полимеразы, подавление синтеза РНК
13	CPA	Циклофосфамид	Алкилирование нитей ДНК, пролекарство
14	СР	Цисплатин	Алкилирование нитей ДНК
15	CDP-choline	Цитиколин	Донор холина в биосинтезе холинсодержащих фосфоглицеридов
16	ETP	Этопозид	Ингибирование ДНК-топоизомеразы II, нарушение синтеза ДНК на премитотической стадии клеточного деления и может привести к апоптозу раковой клетки. Воздействует главным образом на фазы S и G2 клеточного деления

2.5 Многопараметрический скрининг

2.5.1 Оценка влияния соединений на жизнеспособность клеток

Жизнеспособность, скорость деления клеток и уровень апоптоза оценивали методом двойного окрашивания Ноеchst 33342/ пропидий йодид (PI) (Solovieva et al., 2016). После инкубации с соединениями клетки окрашивали смесью флуоресцентных красителей Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Швейцария) и PI (Invitrogen, США) в течение 30 мин при 37 °С. На рисунке 19 представлены морфологические изменения ядер, по которым клетки классифицировали как живые (нормальные ядра – неконденсированный хроматин, равномерно распределенный по всему ядру), апоптотические (круглые клетки, конденсированный или фрагментированный хроматин) и мертвые (окрашенные РІ из-за повреждения клеточной мембраны).

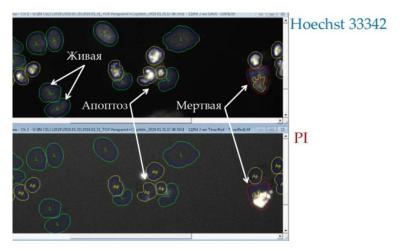


Рисунок 19. Репрезентативное изображение сегментации ядер клеток Нер-2 после 48 часов инкубации с 12,5 мкМ цисплатина. Клетки классифицировали как живые (нормальные ядра — неконденсированный хроматин, равномерно распределенный по всему ядру), апоптотические (круглые клетки, конденсированный или фрагментированный хроматин) и мертвые (окрашенные РІ из-за повреждения клеточной мембраны).

Цитотоксическую активность определяли как полумаксимальную летальную концентрацию (LC₅₀), рассчитанную после аппроксимации нелинейной функцией кривых экспериментальной зависимости живых клеток (%) от концентрации препарата (мкМ). Цитостатическую активность определяли как полумаксимальную ингибирующую концентрацию (IC_{50}), рассчитанную после аппроксимации нелинейной функцией кривой экспериментальной зависимости количества клеток (%) от концентрации (мкМ). Для сфероидов IC_{50} рассчитывали после аппроксимации нелинейной параметр функцией кривой экспериментальной зависимости площади сфероида (%) от концентрации соединения (мкМ).

2.5.2 Фенотипический анализ фиксированных клеток на основе Hoechst и DiD

Для оценки реакций на клинически одобренные препараты и исследуемые соединения использовали красители Hoechst 33342 (визуализация ядер) и DiD (ThermoFisher, США), флуоресцирующий при включении в клеточные мембраны.

После съемки для оценки жизнеспособности клетки промывали холодным фосфатносолевым буфером (PBS) и фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 10 мин при комнатной температуре. После фиксации клетки 2 раза промывали холодным PBS по 5 мин и проводили пермобилизацию 0,1% раствором TritonX100 с одновременным добавлением красителя DiD с конечной концентрацией в лунке 5 мкг/мл и инкубировали в течение 30 мин. При исследовании жизнеспособности клетки окрашивали Hoechst 33342, как описано выше, после фиксации краситель сохраняется в клетке, поэтому повторное добавление не требуется. После инкубации с DiD клетки промывали 2 раза холодным PBS и снимали.

Таблица 4. Список использованных параметров для классификации клеток, окрашенных Hoechst 33342 и DiD.

Hoechst 33342	Интенсивность сигнала
	Площадь ядра
	Форма ядра
	Текстура ядра
DiD	Интенсивность сигнала
	Площадь окраски
	Текстура окрашенной области

Таблица 5. Характеристика клеточных популяций, выявленных в результате фенотипического скрининга при окраске красителями Hoechst 33342 и DiD.

Клеточный	Характерные признаки
фенотип	
Контрольный	Ядро с неконденсированным хроматином, равномерно распределенным по
фенотип (КФ)	всему ядру; заданы размеры ядра, площади окраски и интенсивности
	сигнала DiD
Атипичный	Ядро с конденсированным или фрагментированным хроматином; площадь
фенотип 1 (АФ1)	окраски DiD клетки меньше, чем в контроле; интенсивность сигнала DiD
	выше, чем в контроле
Атипичный	Ядро с неконденсированным хроматином, равномерно распределенным по
фенотип 2 (АФ2)	всему ядру; площадь ядра и площадь окраски DiD соответствует
	контролю; интенсивность сигнала DiD выше, чем в контроле
Атипичный	Ядро с неконденсированным хроматином, равномерно распределенным по
фенотип 3 (АФ3)	всему ядру; площадь ядра и площадь окраски DiD клетки больше, чем в
	контроле; интенсивность сигнала DiD такая же, как в контроле

После обработки и анализа изображений в отрицательном контроле определяли диапазон параметров контрольного фенотипа (преобладающего более чем на 90%). Список используемых параметров приведен в таблице 4. После того, как параметры контрольных клеток были заданы, клетки, обработанные соединениями, проверяли на соответствие контрольному фенотипу и

выявляли атипичные популяции клеток (табл. 5). На рисунке 20 представлен пример сегментации и классификации клеток.

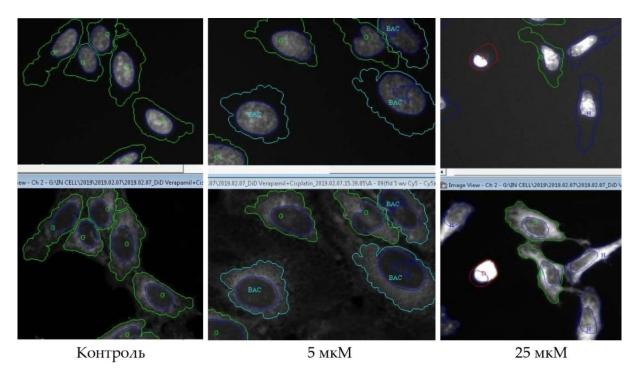


Рисунок 20. Репрезентативное изображение классификации клеток Hep-2 после 48 часов инкубации с цисплатином. Клетки классифицированы в соответствии с таблицей 5. Верхний ряд – Hoechst, нижний ряд – DiD.

2.5.3 Оценка влияния на жизнеспособность клеток в модели окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода

Для индукции окислительного стресса клетки обрабатывали свежеприготовленным раствором H_2O_2 (0,1–8,0 мМ) из 3 % стокового раствора в течение 4 часов в стандартных условиях культивирования (Ransy et al., 2020). После оценки жизнеспособности клеток методом двойного окрашивания Hoechst 33342/ PI, для каждой клеточной линии были выбраны концентрации пероксида водорода, снижающие количество живых клеток на 20 % и 40 % по сравнению с необработанным контролем. Для оценки антиоксидантной активности в условиях окислительного стресса клетки обрабатывали тестируемыми соединениями в течение 24 часов в концентрациях 1–75 мкМ, после чего подвергали воздействию H_2O_2 . Жизнеспособность клеток оценивали, как описано выше. Необработанные клетки и клетки, обработанные только H_2O_2 , использовали в качестве отрицательного и положительного контролей, соответственно.

2.5.4 Оценка влияния соединений на митохондриальный мембранный потенциал (ММП)

Влияние соединений на митохондриальный потенциал в стандартных условиях и в модели окислительного стресса, индуцированного H_2O_2 , оценивали с помощью метилового эфира тетраметилродамина (TMRM) (Creed and McKenzie, 2019). Клетки инкубировали с исследуемыми соединениями в течение 24 ч и добавляли H_2O_2 , с конечной концентрацией 1,5 мМ для HepG2 и 3 мМ для MCF-7, как описано в разделе 2.5.3. Клетки окрашивали 10 нМ раствором TMRM и Hoechst 33342 в течение 40 минут при 37°C. После инкубации меняли среду и добавляли 5 нМ раствор TMRM для поддержания равновесного состояния.

В качестве положительного контроля падения ММП использовали 10 мкМ карбонил цианида м-хлор фенил гидразон (СССР) и 10 мкМ ротенон.

2.5.5 Оценка уровней мРНК СҮРЗА4, СҮР2С9, СҮР2С19

Уровень мРНК СҮРЗА4, СҮР2С9, СҮР2С19 определяли с помощью набора ViewRNACellPlusAssayKit (Invitrogen, 88-19000-99, США) в соответствии с инструкциями производителя, мРНК СҮРЗА4, СҮР2С9 и СҮР2С19 детектировали с использованием флуоресцентных зондов ViewRNA типа 1 (СҮРЗА4, VA1-10196-VCP), типа 4 (СҮР2С9, VA4-3084099-VCP) и типа 6 (СҮР2С19, VA6-3169546-VCP). Ядра клеток окрашивали DAPI.

2.5.6 Оценка уровня белка СҮРЗА4

Уровень белка СҮРЗА4 оценивали с помощью иммунофлуоресцентного анализа (Mancio-Silva et al., 2019) с некоторыми изменениями. Клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 10 мин, пермобилизацию 0,1% раствором TritonX100 проводили в течение 15 мин. Блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином в течение 30 минут. Клетки инкубировали с первичными моноклональными антителами СҮРЗА4 (Invitrogen, MA5-17064) в течение 1 ч (1:200), с вторичными антителами (Invitrogen, A-10631), меченными Аlexa Fluor^{тм} 488, в течение 1 часа при комнатной температуре. За 5 мин до окончания инкубации с вторичными антителами добавляли Hoechst 33342 для визуализации ядер.

2.5.7 Получение и анализ изображений

Изображения в светлом поле и флуоресцентных каналах получали с помощью системы визуализации INCellAnalyzer 2200 (GEHealthcare, Великобритания). Обработку и анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения INCellInvestigator (GEHealthcare, Великобритания).

Для исследований на 2D-культуре получали изображения по 4 поля на лунку с увеличением 200х. Клетки сегментировали, подсчитывали и классифицировали по фенотипическим признакам.

Для **3D-модели** (Sirenko et al., 2015) получали z-стопки изображений сфероидов с увеличением 100х в светлом поле и флуоресцентных каналах (7–11 изображений, разделенных по оси z 15 мкм, начиная со дна). Отдельные z-плоскости сегментировали и анализировали как 2D-изображения для подсчета ядер живых/мертвых клеток, затем суммировали объекты, смещенные относительно друг друга в каждой плоскости (максимальное смещение ядер 5-10 мкм). На рисунке 23 представлены репрезентативные изображения отдельных z-плоскостей сфероидов HepG2.

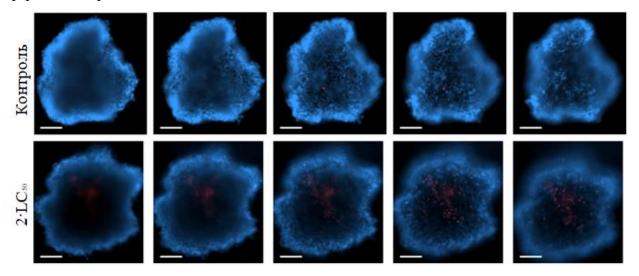


Рисунок 23. Репрезентативные изображения отдельных z-плоскостей (слева направо) сфероидов HepG2 после 48 часов инкубации с 40 мкМ [Cu₂(bipy)₂(ФТ)₄] **7**. Масштаб шкалы 100 мкм.

Для оценки влияния соединений на митохондриальный мембранный потенциал (ММП) съемку проводили в режиме «Time Points» каждые 20 минут в течение 2,5 часов.

2.6 ОТ-ПЦР анализ экспрессии *СҮРЗА4* с детекцией в реальном времени (ОТ-ПЦР РВ)

РНК выделяли с помощью набора RealBest Extraction 100 («Вектор-Бест», Россия) согласно инструкции производителя, обрабатывали ДНКазой (Promega, США) и осаждали. Затем РНК (1 мкг) подвергали обратной транскрипции с использованием олиго(dT)18 праймеров и обратной транскриптазы М-МиLV-RH (Биолабмикс, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Уровень мРНК оценивали в реакционной смеси BioMaster HS-qPCR SYBR Blue (2x) (Биолабмикс, Россия) на CFX96 (Bio-Rad Laboratories). В качестве генов домашнего хозяйства использовали GADPH и RPLP0. Образцы анализировали в трех повторах

(технические повторы) и в трех повторах эксперимента. Изменение количества мРНК CYP3A4 относительно генов GADPH и RPLP0 рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

праймеры: 5'-Использовали следующие CYP3A4 человека, CATTCCTCATCCCAATTCTTGAAGT-3' (прямой) и 5'-CCACTCGGTGCTTTTGTGTATCT-3' (обратный); GAPDH человека, 5'-CATGAGAAGTATGACAACAGCC-3' (прямой) 5'-AGTCCTTCCACGATACCAAAG-3' (обратный); RPLP0 5'человека. TCTACAACCCTGAAGTGCTTGAT-3' 5'-CAATCTGCAGACAGACACTGG-3' (йомкап) И (обратный).

2.7 Спектрофотометрическая оценка общей антиоксидантной активности (АОА)

Спектры поглощения растворов получали на спектрофотометре Agilent 8453 (Agilent Technologies, США) в кварцевых кюветах с длиной оптического пути 1 см.

В качестве эталонного антиоксиданта для сравнения общей АОА использовали аскорбиновую кислоту.

2.7.1 Анализ AOA на основе реакции восстановления железа(III)

Общую антиоксидантную способность оценивали по способности исследуемых соединений восстанавливать Fe(III) в присутствии 1,10-фенантролина (phen) (Berker et al., 2007). Реагент phen-Fe(III) готовили путем смешивания 0,198 г о-phen, 2 мл 1 М НСІ и 0,16 г NH₄Fe(SO₄)₂·12H₂O с последующим разбавлением водой до 100 мл. К реакционной смеси, содержащей 80 мкл раствора реагента phen-Fe(III), 380 мкл ЕtOH (96%) и 1,52 мл H₂O добавляли различные концентрации испытуемого антиоксиданта (20 мкл) и инкубировали при 50 °C в течение 30 мин. Поглощение измеряли при 510 нм. Измерения проводили в трех повторах, результат выражали в мкмоль эквивалента Fe(II) и рассчитывали по калибровочной кривой, построенной с помощью стандартов сульфата железа (FeSO₄•7H₂O) в диапазоне концентраций 20–100 мкМ.

2.7.2 Анализ удаления радикалов DPPH

К 2 мл 0,1 мМ раствора 2,2-ди(4-трет-октилфенил)-1-пикрилгидразил радикала (DPPH') в ЕtOH добавляли 20 мкл раствора исследуемого соединения в ЕtOH в диапазоне концентраций 2–20 мкМ (Tabrizi et al., 2019). Поглощение холостого раствора DPPH' и снижение DPPH' при воздействии исследуемых соединений контролировали по поглощению при 517 нм каждые 5 мин в течение 30 мин.

2.7.3 Анализ удаления радикалов АВТЅ'+

К раствору 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты) диаммониевой соли (АВТS) в фосфатном буфере (54,2 мг; 10 мл) добавляли 1,0 г MnO₂, получившуюся реакционную смесь встряхивали и инкубировали в течение 30 мин. Затем раствор центрифугировали 5 мин и фильтровали. Фильтрат разбавляли фосфатным буфером до достижения сигнала поглощения 0.70 ± 0.01 при 723 нм. Далее к 2 мл раствора AВТS ^{*+} добавляли различные концентрации (1–10 мкМ) тестируемого соединения (20 мкл) и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Снижение поглощения контролировали при 734 нм.

2.7.4 Активность удаления радикалов

Активность удаления радикалов (radical-scavenging activity, RSA) рассчитывали по следующему уравнению:

RSA (%) =
$$\left(1 - \frac{A}{A_0}\right) \times 100$$
,

где A_0 — оптическая плотность контроля, A — оптическая плотность испытуемого образца.

Концентрацию соединения, снижающую концентрацию радикалов на 50% (IC₅₀), рассчитывали по кривой, построенной путем построения RSA (%) в зависимости от концентрации соединения (мкМ).

2.8 Статистический анализ

Графики зависимости количества клеток, живых, апоптотических и мертвых клеток, а также графики распределения фенотипов строили в Microsoft Excel 2016. Значения LC₅₀ и IC₅₀ получали аппроксимацией нелинейной функцией кривых в Origin 8.0. Количественные данные выражены как среднее трех независимых экспериментов \pm среднеквадратическое отклонение (M \pm m). Статистическую значимость близко лежащих средних значений проверяли, применяя t-критерий Стьюдента, уровень значимости р < 0,05. Статистическая обработка данных экспрессии CYP проводилась с использованием программного пакета Statistica 8 (StatSoft Inc., США). Полученные результаты исследования представлены в виде медианы (Ме), верхнего и нижнего квартилей [Q₁–Q₃]. Статистическую значимость различий оценивали, применяя непараметрический критерий Манна — Уитни. Результаты считали статистически значимыми при достижении уровня значимости различий р < 0,05.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

В настоящей работе исследованы цитотоксические и цитостатические свойства и влияние на индукцию цитохромов Р450 2С и 3А новых соединений: S- и Se-содержащих производных фенозановой кислоты; комплексов меди(II), марганца(II), кобальта(II) с производными олигопиридина, енамина и тетразола; нитрозокомплексов рутения с метиловым/ этиловым эфирами никотиновой и изоникотиновой кислот, а также γ-пиколином.

3.1 Влияние производных фенозановой кислоты на жизнеспособность клеток

Изучены биологические свойства новых S- и Se-содержащих производных фенозана калия и проведено сравнение их активности с активностью фенозана калия и исходных гидрофобных кислот на модели *in vitro*.

Структура фенольных соединений, изученных в этом разделе, предполагает наличие у них антиоксидантных свойств. Влияние этих соединений на опухолевые клетки человека МСГ-7, Hep-2 и HepG2, а так же на мезенхимальные стволовые клетки человека МСК исследовали в широком диапазоне концентраций. Спектрофотометрическими методами была проведена оценка общей антиоксидантной активности (АОА), после чего изучено влияние гидрофильных соединений на жизнеспособность клеток в условиях окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода. Дополнительно было проведено исследование влияния соединений на мембранный митохондриальный потенциал клеток МСГ-7 и HepG2 в стандартных условиях и в условиях окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода.

3.1.1 Цитотоксическая и цитостатическая активности исследуемых соединений

Результаты исследования цитотоксического и цитостатического действия фенозана калия 1 и его S- и Se-содержащих производных 2a и 3a, соответственно, а также их исходных гидрофобных кислот 2 и 3, соответственно, на клеточные линии человека HepG2, Hep-2, MCF-7 и MCK после 48 часов инкубации представлены в таблицах 5 и 6.

Фенозан калия **1** и серосодержащие соединения **2** и **2а** оказывают цитотоксический и цитостатический эффект на все типы клеток в миллимолярном диапазоне концентраций, тогда как для селен-содержащих соединений **3** и **3а** значения LC₅₀ и IC₅₀ лежат в микромолярном диапазоне. Серосодержащие соединения **2** и **2а** менее активны по сравнению с **1**, **3** и **3а**. В целом активность фенольных соединений можно ранжировать в следующем порядке: Seсодержащие >> фенозан калия > S-содержащие.

По сравнению с другими типами клеток HepG2 чувствительнее к воздействию фенозана калия 1 и S-содержащих веществ 2 и 2a, Se-содержащие соединения 3 и 3a сильнее

воздействуют на клетки Hep-2 и MCK, чем на HepG2 и MCF-7. Следует отметить, что цитотоксическая активность Se-содержащей соли **3a** и исходной кислоты **3** сравнимы для всех типов клеток, а цитостатическая активность отличается: для опухолевых клеток активность соли **3a** выше, чем кислоты **3**, а для MCK активности веществ **3** и **3a** сравнимы.

Таблица 5. Цитотоксическая активность (LC₅₀) фенольных соединений для клеток HepG2, Hep-2, MCF-7 и MCK после 48 часов инкубации.

	Соединение	LC ₅₀ , мкМ					
	Соединение	HepG2 Hep-2		MCF-7	МСК		
1	$C_{17}H_{25}KO_3$	3899 ± 39	>5000	> 5000	3901 ± 39		
2	C ₁₂ H ₁₆ O ₃ S	5729 ± 58	> 5000	> 5000	> 5000		
2a	$C_{12}H_{15}KO_3S$	> 5000	> 5000	> 5000	> 5000		
3	C ₂₀ H ₃₂ O ₃ Se	338 ± 20	235 ± 18	375 ± 30	193 ± 19		
3a	C ₂₀ H ₃₁ KO ₃ Se	326 ± 4	190 ± 6	459 ± 28	201 ± 29		

Таблица 6. Цитостатическая активность (IC_{50}) фенольных соединений для клеток HepG2, Hep-2, MCF-7 и MCK после 48 часов инкубации.

	Соотимо	IC ₅₀ , мкМ					
	Соединение	HepG2 Hep-2		MCF-7	МСК		
1	C ₁₇ H ₂₅ KO ₃	964 ± 19	1911 ± 38	2628 ± 52	1652 ± 33		
2	C ₁₂ H ₁₆ O ₃ S	2672 ± 106	3478 ± 35	> 5000	3807 ± 115		
2a	$C_{12}H_{15}KO_3S$	3617 ± 72	3734 ± 37	5895 ± 59	4215 ± 85		
3	C ₂₀ H ₃₂ O ₃ Se	413 ± 12	224 ± 5	652 ± 54	166 ± 11		
3a	C ₂₀ H ₃₁ KO ₃ Se	237 ± 2	144 ± 11	265 ± 10	178 ± 19		

3.1.2 Общая антиоксидантная активность (АОА)

На основе химических реакций анализы общей антиоксидантной активности (АОА) условно можно разделить на две категории: анализы, основанные на реакции переноса атома водорода (hydrogen atom transfer, HAT) и анализы, основанные на реакции переноса одного электрона (electron transfer, ET) (Huang et al., 2005). Анализы на основе ET включают одну окислительно-восстановительную реакцию с окислителем в качестве индикатора конечной точки реакции, тогда как большинство анализов на основе HAT отслеживают кинетику конкурентной реакции. В данной работе для оценки АОА использовали анализы на основе ET.

3.1.2.1 AOA на основе реакции восстановления железа(III)

Результаты определения антиоксидантной способности на основе реакции восстановления Fe(III) до Fe(II) представлены в таблице 7 в виде мкмоль эквивалента Fe(II), рассчитанного по калибровочной кривой, представленной на рисунке 24. Аскорбиновую кислоту использовали в качестве эталонного антиоксиданта.

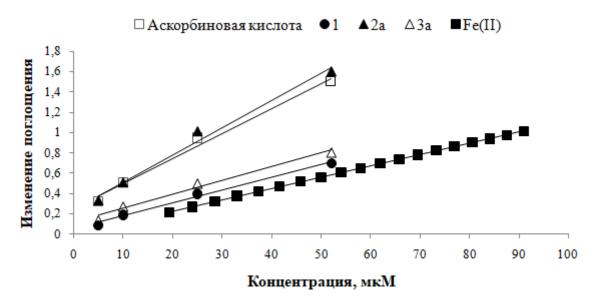


Рисунок 24. Линейная зависимость общей антиоксидантной способности фенозана калия **1**, его S- и Se-содержащих производных **2a** и **3a**, соответственно, и аскорбиновой кислоты. Fe(II) — калибровочная кривая, построенная по стандартам сульфата железа (FeSO₄•7H₂O).

Таблица 7. Активность исследуемых гидрофильных фенольных соединений и аскорбиновой кислоты по восстановлению ионов железа.

Соотиновно	1	2a	3a	Аскорбиновая
Соединение	C ₁₇ H ₂₅ KO ₃	$C_{12}H_{15}KO_3S$	$C_{20}H_{31}KO_3Se$	кислота
мкмоль Fe(II)/мг	3.9 ± 0.1	7.2 ± 0.2	3.0 ± 0.1	$12,2 \pm 0,3$
соединения ¹	3,7 ± 0,1	7,2 = 0,2	3,0 ± 0,1	12,2 = 0,5

Примечание: ¹Концентрация соединения, обладающего способностью восстанавливать phen-Fe(III), выраженная в мкмоль эквивалентов Fe(II).

Соединение с серой **2a** обладает общей антиоксидантной активностью, сравнимой с активностью аскорбиновой кислоты, и большей, чем у соединения с селеном **3a** и фенозана калия **1**. Так как аскорбиновая кислота, является двухэлектронным восстановителем, и имеет

стехиометрический фактор, равный 2 (одна молекула аскорбиновой кислоты эквивалентна двум ионам Fe(II)) (Berker et al., 2007), можно сделать вывод, что соединение **2a** также является двухэлектронным восстановителем, тогда как соединения **1** и **3a** – одноэлектронными (рис. 24).

3.2.2.2 Удаление радикалов DPPH и ABTS **

Результаты исследования способности соединений **1**, **2a** и **3a** удалять радикалы DPPH и ABTS $^{\cdot +}$, выраженные через параметр IC₅₀ (концентрация соединения, снижающая концентрацию радикалов на 50%), приведены в таблице 8.

Таблица 8. Антиоксидантная активность тестируемых соединений относительно удаления радикалов DPPH и ABTS · (RSA), выраженная через параметр IC₅₀.

Coordinate		IC ₅₀ (RSA), мкМ			
Соединение		DPPH.	ABTS ^{*+}		
1	C ₁₇ H ₂₅ KO ₃	> 20	$6,5 \pm 0,2$		
2a	C ₁₂ H ₁₅ KO ₃ S	22.9 ± 0.6	5,5 ± 0,1		
3a	C ₂₀ H ₃₁ KO ₃ Se	> 20	$3,2 \pm 0,1$		
Аскорби	иновая кислота	$13,6 \pm 0,4$	$11,5 \pm 0,4$		

По данным анализа DPPH антиоксидантная активность соединения с серой 2a выше, чем у фенозана калия 1 и его селен-содержащего производного 3a, но уступает активности аскорбиновой кислоты. Результаты анализа DPPH в целом согласуются с результатами анализа на основе ионов железа, порядок активности исследуемых соединений можно ранжировать в следующем порядке: аскорбиновая кислота $> 2a > 1 \sim 3a$.

В анализе удаления катион-радикала ABTS⁺ соединения **1**, **2a**, **3a** и аскорбиновая кислота проявляют более сильную активность, чем в тесте DPPH⁺: активность соединений **1** и **2a** сравнима и уступает активности соединения **3a**. Различия в порядке активности соединений между этими методами можно объяснить разной продолжительностью инкубации с антиоксидантами, реакционной средой и значениями рН (Huang et al., 2005).

Таким образом, не смотря на разный порядок активности удаления радикалов DPPH и ABTS ·+, исследуемые соединения являются антиоксидантами.

3.1.3 Влияние исследуемых соединений на жизнеспособность клеток в модели окислительного стресса, индуцированного H₂O₂

Для исследования антиоксидантной активности фенозана калия **1** и его S- и Sесодержащих производных **2a** и **3a**, соответственно, в модели окислительного стресса,

индуцированного пероксидом водорода, предварительно были подобраны концентрации H_2O_2 для каждого типа клеток (HepG2, Hep-2, MCF-7 и MCK), снижающие количество живых клеток на \sim 20 и 40%. На рисунке 25 представлена зависимость количества мертвых, живых и апоптотических клеток от концентрации пероксида водорода после 4 часов воздействия для каждой клеточной линии. Выбранные концентрации H_2O_2 для индукции клеточного стресса составили 0,9 и 1,5 мМ для клеток HepG2, 2 и 4 мМ для клеток Hep-2, 1,5 и 3 мМ для клеток MCF-7 и 250 и 500 мкМ для клеток MCK.

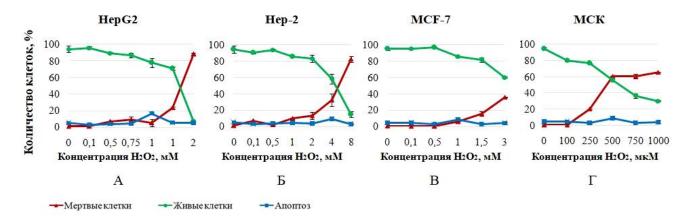


Рисунок 25. Зависимость количества (%) мертвых, живых и апоптотических клеток HepG2 (A), Hep-2 (Б), MCF-7 (В) и MCK (Г) от концентрации пероксида водорода (мкМ) после 4 часов воздействия.

Влияние соединений **1**, **2a** и **3a** на жизнеспособность клеток в модели окислительного стресса изучали в диапазоне концентраций, достижимых в условиях *in vivo* и не влияющих на рост и жизнеспособность клеток после 48 часов воздействия (1–75 мкМ). Клетки предварительно инкубировали с соединениями в течение 24 часов и подвергали воздействию пероксида водорода в течение 4 часов. Результаты исследования представлены на рисунках 26–29.

Показано, что предварительная обработка клеток HepG2 фенозаном калия 1 и S- и Sесодержащими солями 2a и 3a, соответственно, снижает клеточную гибель в результате воздействия 0,9 и 1,5 мМ H_2O_2 , в диапазоне концентраций от 25 до 75 мкМ. Исключением является соль 3a, которая не влияла на жизнеспособность клеток при воздействии 1,5 мМ пероксида водорода (рис. 26 Д).

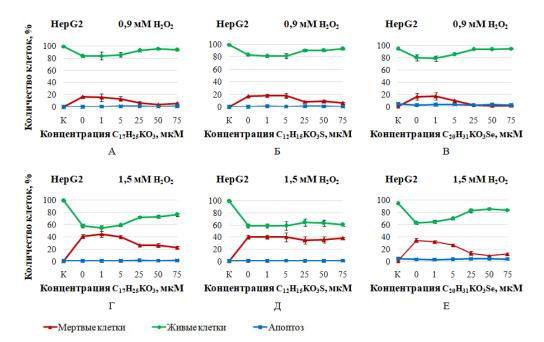


Рисунок 26. Влияние фенозана калия **1** (А и Г) и его S- и Se-содержащих производных **2a** (Б и Д) и **3a** (В и Е), соответственно, на жизнеспособность клеток HepG2 после 4 часов воздействия 0,9 мМ (верхний ряд) и 1,5 мМ (нижний ряд) пероксида водорода. Точка К – контрольные клетки без обработки пероксидом водорода и соединениями (отрицательный контроль).

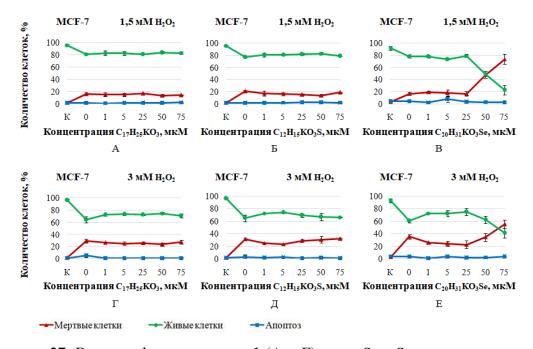


Рисунок 27. Влияние фенозана калия **1** (А и Г) и его S- и Se-содержащих производных **2a** (Б и Д) и **3a** (В и Е), соответственно, на жизнеспособность клеток МСF-7 после 4 часов воздействия 1,5 мМ (верхний ряд) и 3 мМ (нижний ряд) пероксида водорода. Точка К – контрольные клетки без обработки пероксидом водорода и соединениями (отрицательный контроль).

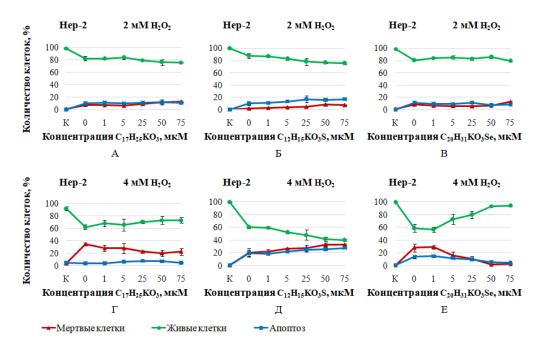


Рисунок 28. Влияние фенозана калия **1** (А и Г) и его S- и Se-содержащих производных **2а** (Б и Д) и **3а** (В и Е), соответственно, на жизнеспособность клеток Hep-2 после 4 часов воздействия 2 мМ (верхний ряд) и 4 мМ (нижний ряд) пероксида водорода. Точка К – контрольные клетки без обработки пероксидом водорода и соединениями (отрицательный контроль).

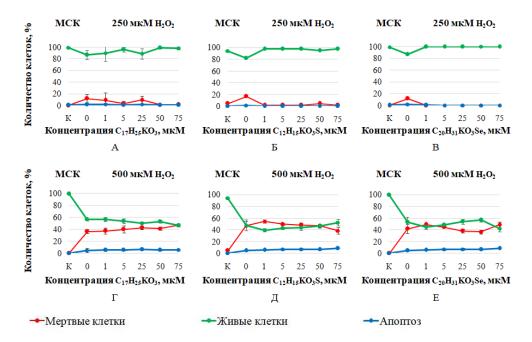


Рисунок 29. Влияние фенозана калия **1** (А и Γ) и его S- и Se-содержащих производных **2a** (Б и Д) и **3a** (В и Е), соответственно, на жизнеспособность клеток МСК после 4 часов воздействия 250 мкМ (верхний ряд) и 500 мкМ (нижний ряд) пероксида водорода. Точка К – контрольные клетки без обработки пероксидом водорода и соединениями (отрицательный контроль).

Предварительная обработка клеток MCF-7 соединениями **1** и **2a** не влияет на жизнеспособность клеток в модели окислительного стресса, индуцированного 1,5 и 3 мМ H_2O_2 , в концентрациях до 75 мкМ, тогда как **3a** статистически значимо (p < 0,05) снижает клеточную гибель MCF-7 в концентрациях от 1 до 25 мкМ (рис. 27 E) и приводит к усилению клеточной гибели в концентрациях 50 и 75 мкМ (рис. 28 B и E).

Предварительная обработка клеток Hep-2 фенозаном калия **1** не влияет на жизнеспособность клеток (рис. 29 A и Γ) в модели окислительного стресса, серосодержащая соль **2a** усиливает клеточную гибель (рис. 29 Б и Д), а **3a** статистически значимо (р < 0,05) снижает ее в концентрациях от 5 до 75 мкМ (рис. 29 В и Е).

Предварительная обработка клеток МСК фенозаном калия **1** не влияет на жизнеспособность клеток (рис. 29 A и Γ). Гибель клеток МСК, предварительно обработанных **2a** и **3a**, не наблюдается после 4 часов воздействия 250 мкМ пероксида водорода (рис. 29 Б и В), при воздействии более высокой концентрации H_2O_2 подобный защитный эффект отсутствует (рис. 29 Д и Е).

3.1.4 Влияние исследуемых соединений на мембранный митохондриальный потенциал клеток

Результаты исследования влияния фенозана калия **1** и его серо- и селенсодержащих производных **2a** и **3a**, соответственно, на мембранный митохондриальный потенциал (ММП) клеток HepG2 и MCF-7 после 24 часов воздействия в стандартных условиях и в модели окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода, представлены на рисунках 30 и 31.

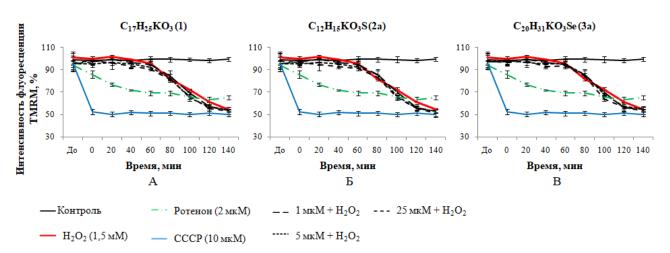


Рисунок 31. Влияние фенозана калия **1** (A) и его S- и Se-содержащих производных **2a** (Б) и **3a** (В), соответственно, на митохондриальный мембранный потенциал клеток HepG2. До – интенсивность флуоресценции тетраметилродамина (ТМRМ) до добавления H₂O₂, ротенона и СССР. Ротенон и СССР использовали в качестве положительного контроля падения ММП.

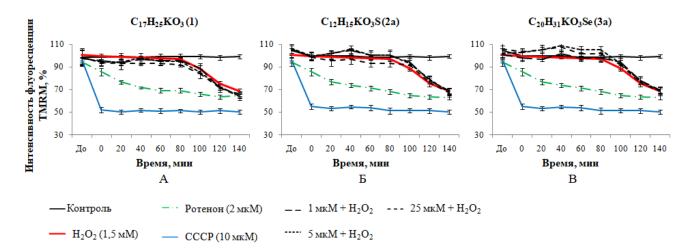


Рисунок 32. Влияние фенозана калия **1** (A) и его S- и Se-содержащих производных **2a** (Б) и **3a** (В), соответственно, на митохондриальный мембранный потенциал клеток МСF-7. До – интенсивность флуоресценции тетраметилродамина (ТМRМ) до добавления пероксида водорода, ротенона и СССР. Ротенон и СССР использовали в качестве положительного контроля падения ММП.

Как для клеток HepG2, так и для MCF-7 нет статистически достоверной разницы между значением митохондриального потенциала контрольных клеток и клеток, предварительно обработанных фенольными соединениями **1**, **2a** и **3a**, в стандартных условиях и в условиях окислительного стресса. Следует отметить, что клетки MCF-7 устойчивее к воздействию пероксида водорода по сравнению с клетками HepG2.

3.2 Влияние соединений переходных металлов на жизнеспособность клеток

3.2.1 Цитотоксическая и цитостатическая активности комплексов Cu(II), Mn(II) и Co(II)

Результаты оценки цитотоксических и цитостатических эффектов комплексов Cu(II), Mn(II) и Co(II) с производными олигопиридинов, енамина и тетразола **4**–**9** на опухолевые клетки человека MCF-7, Hep-2 и HepG2, а также неопухолевые фибробласты MRC-5 в 2D-модели после 48 часов инкубации представлены в таблицах 9 и 10. Клинические препараты карбоплатин и цисплатин, а также комплекс [Cu(dmphen)(лейцинат)]NO₃, представляющий собой одно из соединений серии Casiopeinas®, были использованы в качестве препаратов сравнения активности новых соединений.

Из всех исследованных комплексов только соединение [CuL $_2$] **4** с производным енамина не оказывает существенного влияния на жизнеспособность клеток. Остальные соединения

проявляют цитостатический эффект и вызывают дозозависимую клеточную гибель в концентрациях, достижимых в условиях *in vivo*.

Таблица 9. Цитотоксическая активность комплексов Cu(II), Mn(II) и Co(II) с производными олигопиридинов, енамина и тетразола, выраженная через параметр LC_{50} , для 2D-культур MCF-7, Hep-2, HepG2 и MRC-5 после 48 ч инкубации.

	Соединение		LC ₅₀ ,	мкМ		
Сосдинение		MCF-7	Hep-2	HepG2	MRC-5	
4	[CuL ₂]	> 50	> 50	> 50	> 50	
5	$\{[Cu(phen)(MT)_2]\cdot H_2O\}_n$	$3,1 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$	
6	$[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$	$11,7 \pm 3,1$	$5,3 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,2$	$0,60 \pm 0,01$	
7	$[Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4]$	> 50	$3,2 \pm 0,1$	$21,7 \pm 0,4$	$27,2 \pm 0,5$	
6a	$[Cu_2(dmphen)_2(\Phi T)_4]$	$1,11 \pm 0,01$	$0,98 \pm 0,01$	$0,76 \pm 0,02$	$0,79 \pm 0,04$	
7a	$[Cu_2(dmbipy)_2(\Phi T)_4]$	$18,1 \pm 0,3$	$23,0 \pm 2,8$	$13,1 \pm 0,1$	$9,5 \pm 0,2$	
6б	[Cu(phendione)(ΦT) ₂]	0.89 ± 0.04	$1,7 \pm 0,6$	$0,70 \pm 0,04$	$0,43 \pm 0,01$	
8	$[Mn(H_2O)_4(phen)]\cdot phen\cdot (\Phi T)_2$	> 50	> 50	> 50	> 50	
8a	$[Mn3(phen)2(\Phi T)4(OAc)2]$	> 50	> 50	34,8 ± 1,8	$0,43 \pm 0,01$	
9	$[\text{Co}_3(\text{phen})_2(\Phi T)_6]$	> 50	> 50	> 50	> 50	
	Карбоплатин	$33,7 \pm 1,8$	$9,2 \pm 0,5$	$32,2 \pm 2,1$	$35,7 \pm 0,3$	
	Цисплатин	$38,9 \pm 2,0$	$16,8 \pm 0,2$	$33,0 \pm 5,4$	>50	
Cas	[Cu(dmphen)(лейцинат)]NO ₃	$1,6 \pm 0,1$	$0,67 \pm 0,04$	$1,5 \pm 0,1$	-	

Соединение { $[Cu(phen)(MT)_2] \cdot H_2O$ }_n **5** с 5-метилтетразолат анионом (MT), в отличие от соединений с 5-фенилтетразолат анионом (Φ T), проявляет токсичность в отношении всех типов клеток с близкими значениями LC₅₀ (табл. 9). Однако цитостатическая активность комплекса **5** избирательна: наименьшее влияние он оказывает на рост клеток HepG2, наиболее активен для MCF-7 и Hep-2 (значения IC₅₀ для этих двух линий статистически неразличимы).

Соединение [Cu₂(phen)₂(Φ T)₄] **6** с 1,10-фенантролином (phen) на порядок токсичнее для неопухолевых фибробластов MRC-5, чем для опухолевых клеток, и в два раза токсичнее для клеток Hep-2 и HepG2, чем для MCF-7. Наибольший цитостатический эффект комплекс **6** оказывает на фибробласты MRC-5, а среди опухолевых клеток — на HepG2. Активность, как цитотоксическая, так и цитостатическая, комплексов [Cu₂(dmphen)₂(Φ T)₄] **6a** и [Cu(phendione)(Φ T)₂] **66** с производными phen выше, чем активность комплекса **6** для опухолевых клеток, однако для MRC-5 цитотоксическая активность комплекса **6** выше, чем комплекса **6а**.

Цитотоксическая и цитостатическая активности комплекса [$Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4$] **7** с 2,2′-бипиридином (bipy) и комплекса [$Cu_2(dmbipy)_2(\Phi T)_4$] **7а** с производным bipy сильно зависят от типа опухолевых клеток и трудно выделить какую-либо закономерность их активности. Однако существенным является то, что для неопухолевых фибробластов MRC-5 активность комплекса **7** с bipy ниже, чем для опухолевых клеток, тогда как активность **7а** с dmbipy выше для MRC-5, чем для опухолевых клеток. Хотя цитотоксический эффект соединения **7** на MCF-7 существенно слабее, чем на MRC-5, его цитостатический эффект на опухолевых клетках в два раза сильнее. Для комплексов с phen **6** и его производными **6а** и **66** подобная закономерность не прослеживается.

Таблица 10. Цитостатическая активность комплексов Cu(II), Mn(II) и Co(II) с производными олигопиридинов, енамина и тетразола, выраженная через параметр IC_{50} , для 2D-культур MCF-7, Hep-2, HepG2 и MRC-5 после 48 ч инкубации.

	Соодинация	IC ₅₀ , mkM				
Соединение		MCF-7	Hep-2	HepG2	MRC-5	
4	[CuL ₂]	> 50	> 50	> 50	$53,1 \pm 0,5$	
5	${[Cu(phen)(MT)_2] \cdot H_2O}_n$	$1,5 \pm 0,1$	$1,7 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,1$	
6	$[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$	$4,3 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,2$	$0,98 \pm 0,06$	0.31 ± 0.01	
7	$[Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4]$	14.8 ± 0.1	$17,2 \pm 0,3$	$10,2 \pm 4$	$27,2 \pm 0,5$	
6a	$[Cu_2(dmphen)_2(\Phi T)_4]$	$2,3 \pm 0,2$	$0,49 \pm 0,01$	$0,59 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01$	
7a	$[Cu_2(dmbipy)_2(\Phi T)_4]$	$20,8 \pm 0,6$	$22,5 \pm 0,7$	$9,8 \pm 0,1$	$7,5 \pm 0,1$	
66	[Cu(phendione) $(\Phi T)_2$]	$0,27 \pm 0,03$	0.33 ± 0.03	$0,37 \pm 0,01$	$0,23 \pm 0,01$	
8	$[Mn(H_2O)_4(phen)]\cdot phen\cdot (\Phi T)_2$	$6,2 \pm 0,1$	$0,69 \pm 0,04$	$3,1 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,2$	
8a	$[Mn3(phen)2(\Phi T)4(OAc)2]$	$3,5 \pm 0,1$	0.83 ± 0.03	$2,9 \pm 0,1$	$0,91 \pm 0,01$	
9	$[\text{Co}_3(\text{phen})_2(\Phi T)_6]$	$38,4 \pm 0,3$	$15,2 \pm 0,3$	$29,6 \pm 0,6$	$19,6 \pm 0,5$	
	Карбоплатин	$3,1 \pm 0,2$	$3,5 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,2$	$6,0 \pm 0,3$	
	Цисплатин	$3,2 \pm 0,1$	$3,8 \pm 0,2$	$3,6 \pm 0,2$	$5,8 \pm 0,2$	
Cas	[Cu(dmphen)(лейцинат)]NO ₃	$0,60 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,01$	-	

Цитотоксический эффект комплексов марганца(II) и кобальта(II) слабее по сравнению с цитотоксическими эффектами комплексов меди(II) 5–66. Комплекс [Mn₃(phen)₂(Φ T)₄(OAc)₂] 8a с ацетат анионом (OAc) токсичен для HepG2 и на порядок токсичнее для MRC-5 (табл. 9), для остальных значения LC₅₀ > 50 мкМ. В тоже время соединения марганца(II) и кобальта(II) оказывают сильный цитостатический эффект, сравнимый с эффектами цитотоксичных

комплексов меди(II) и клиническими препаратами цисплатином и карбоплатином. Они также избирательны относительно разных типов клеток. Стоит отметить, что цитотоксическая активность комплекса [Mn(H_2O)₄(phen)]·phen·(Φ T)₂ **8** для карциномы гортани Hep-2 на порядок выше, чем для фибробластов MRC-5.

Чтобы проверить, приводит ли цитостатическое действие, оказываемое комплексами марганца(II), к клеточной гибели, было проведено исследование динамики роста клеток HepG2 в течение 72 часов. Цитостатическая активность комплексов 8 и 8а для HepG2 одинакова (табл. 10). Результаты, представленные на рисунке 33, показывают, что 8 и 8а останавливают деление клеток, что приводит к их гибели через 72 часа. Существенно, что для обоих комплексов на токсичных концентрациях наблюдается апоптоз (рис. 33 Б, В, Д и Е).

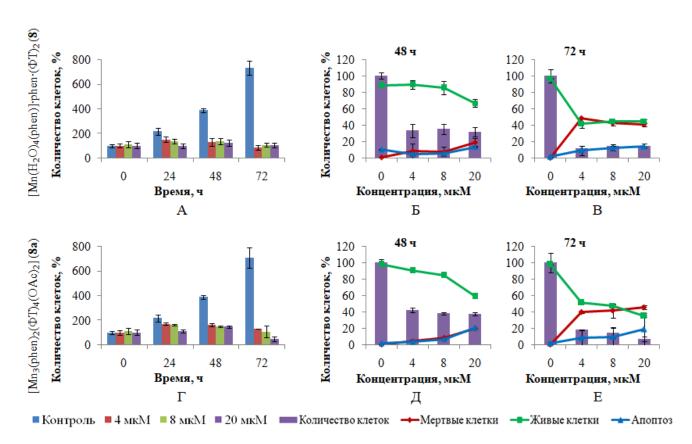


Рисунок 33. Влияние [Mn(H₂O)₄(phen)]·phen·(Φ T)₂ **8** и [Mn₃(phen)₂(Φ T)₄(OAc)₂] **8а** на жизнеспособность клеток HepG2 в 2D-модели. А и Γ – динамика роста клеток в течение 72 часов при воздействии комплексов **8** и **8а**, соответственно. Б и В – концентрационная зависимость влияния комплекса **8** на жизнеспособность клеток после 48 и 72 часов воздействия, соответственно. Д и Е – концентрационная зависимость влияния комплекса **8а** на жизнеспособность клеток после 48 и 72 часов воздействия, соответственно.

Аналогичное исследование динамики роста клеток HepG2 в течение 72 часов было проведено для комплексов меди(II) [Cu₂(phen)₂(Φ T)₄] **6** и [Cu₂(bipy)₂(Φ T)₄] **7**, результаты представлены на рисунках 34 и 35, соответственно. Показано, что концентрация 1 мкМ комплекса меди(II) с phen **6** и концентрация 10 мкМ комплекса с bipy **7**, равные IC₅₀ (табл. 10), не приводят к клеточной гибели через 72 часа (рис. 34 Б и В, рис. 35 Б) в отличие от комплексов марганца(II). Клетки HepG2 при воздействии концентрации $2 \cdot IC_{50}$ комплекса меди(II) **6** продолжают делиться в течение 24 часов (рис. 34 А), после чего клеточный рост останавливается и клетки погибают (рис. 34), тогда как комплексы марганца(II) **8** и **8а** полностью останавливают клеточный рост в концентрациях $\sim 2 \cdot IC_{50}$, что в итоге приводит к клеточной гибели (табл. 10, рис. 33).

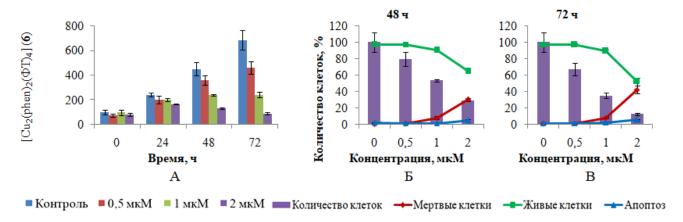


Рисунок 34. Влияние $[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$ **6** на жизнеспособность клеток HepG2 в 2D-модели. А — динамика роста клеток в течение 72 часов при воздействии комплекса **6**. Б и В — концентрационная зависимость влияния комплекса **6** на жизнеспособность клеток после 48 и 72 часов воздействия, соответственно.

Результаты оценки влияния комплексов Cu(II), Mn(II) и Co(II) с производными олигопиридинов, енамина и тетразола 4–9 на жизнеспособность опухолевых клеток человека НерG2 в 2D- и 3D-моделях после 48 часов инкубации представлены в таблице 11. В качестве 3D-модели использовали сфероиды. Клинические препараты карбоплатин и цисплатин были использованы в качестве препаратов сравнения активности новых соединений.

Комплексы **4** и **9** не оказывают цитотоксического и цитостатического действия на сфероиды HepG2, что вполне ожидаемо, так как эти соединения показали низкую активность и на 2D-модели (табл. 9 и 10).

Координационное соединение кобальта(II) наименее активно и не оказывает такого сильного цитостатического или цитотоксического действия (рис. 36).

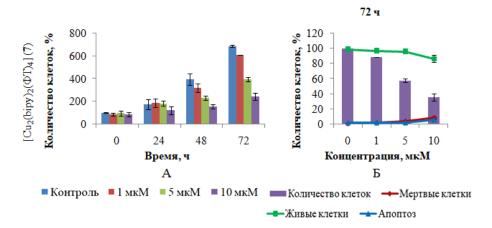


Рисунок 35. Влияние $[Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4]$ **7** на жизнеспособность клеток HepG2 в 2D-модели. А — динамика роста клеток в течение 72 часов при воздействии комплекса **7**. Б — концентрационная зависимость влияния комплекса **7** на жизнеспособность клеток после 72 часов воздействия.

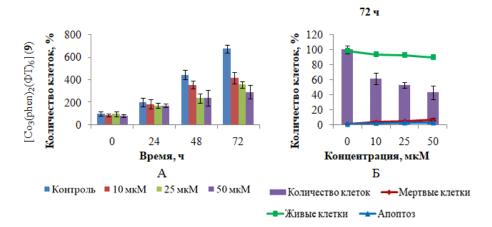


Рисунок 36. Влияние $[Co_3(phen)_2(\Phi T)_6]$ **9** на жизнеспособность клеток HepG2 в 2D-модели. А — динамика роста клеток в течение 72 часов при воздействии комплекса **9**. Б — концентрационная зависимость влияния комплекса **9** на жизнеспособность клеток после 72 часов воздействия.

Активность комплекса меди (II) **5** с 5-метилтетразолат анионом выше для сфероидов HepG2, чем для 2D-культуры. Среди комплексов с 5-фенилтетразолат анионом активность соединений с bipy **7** и с dmbipy **7a** для сфероидов уступает активности для 2D-культуры. Комплексы **6** с phen и **66** с phendione одинаково активны как для 2D-модели, так и для сфероидов, а комплекс **6a** с dmphen активнее для 3D-модели. Значение IC₅₀ для **66** рассчитать не удалось, так как сфероиды под его воздействием разрушались в результате клеточной гибели.

Цитостатическая активность комплексов марганца(II) **8** и **8а** для 3D-модели уступает активности этих соединений для 2D-модели, однако воздействие комплекса **8** на сфероид в течение 48 часов приводит к более быстрой клеточной гибели по сравнению с 2D-культурой.

Таблица 11. Цитотоксическая (LC_{50}) и цитостатическая (IC_{50}) активности комплексов Cu(II), Mn(II) и Co(II) с производными олигопиридинов, енамина и тетразола для 2D- и 3D-культуры (сфероидов) HepG2 после 48 ч инкубации.

	Соодинация	LC50,	мкМ	IC50,	IС50, мкМ	
Соединение		2D HepG2	3D HepG2	2D HepG2	3D HepG2	
4	[CuL ₂]	> 50	> 50	> 50	> 50	
5	${[Cu(phen)(MT)_2] \cdot H_2O}_n$	$3,2 \pm 0,1$	1,7 ± 0,1*	$3,7 \pm 0,2$	2,4 ± 0,1*	
6	$[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$	$5,0 \pm 0,2$	$6,4 \pm 0,8$	$0,98 \pm 0,06$	$0,88 \pm 0,06$	
7	$[Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4]$	$43,4 \pm 0,8$	> 50	$10,2 \pm 4$	> 50	
6a	[Cu ₂ (dmphen) ₂ (ΦT) ₄]	$0,76 \pm 0,02$	$0,49 \pm 0,01*$	$0,59 \pm 0,02$	$0,22 \pm 0,01*$	
7a	[Cu ₂ (dmbipy) ₂ (ΦT) ₄]	$13,1 \pm 0,1$	$22,5 \pm 0,7*$	$9,8 \pm 0,1$	$17,5 \pm 0,2*$	
66	[Cu(phendione)(ΦT) ₂]	$0,70 \pm 0,04$	0.83 ± 0.03	$0,37 \pm 0,01$	-	
8	$[Mn(H_2O)_4(phen)]\cdot phen\cdot (\Phi T)_2$	> 50	$38,6 \pm 1,4$	$3,1 \pm 0,1$	9,3 ± 0,2*	
8a	$[Mn3(phen)2(\Phi T)4(OAc)2]$	$34,8 \pm 1,8$	36,8 ± 1,5*	$2,9 \pm 0,1$	6,9 ± 0,3*	
9	$[\text{Co}_3(\text{phen})_2(\Phi T)_6]$	> 50	> 50	$29,6 \pm 0,6$	> 50	
	Карбоплатин	$32,2 \pm 2,1$	>50	$3,8 \pm 0,2$	10,6 ± 0,3*	
	Цисплатин	$33,0 \pm 5,4$	49,0 ± 1,3*	$3,6 \pm 0,2$	$11,6 \pm 0,2*$	

Примечание: * – отклонение значений для 3D-модели статистически значимо по отношению к 2D-культуре (p < 0,05).

3.2.2 Цитотоксическая и цитостатическая активности нитрозокомплексов рутения

Результаты оценки влияния нитрозокомплексов рутения с метиловым/ этиловым эфиром никотиновой/ изоникотиновой кислоты и γ-пиколином 10–12 на жизнеспособность опухолевых клеток человека Hep-2 и HepG2, а также неопухолевых фибробластов MRC-5 в 2D-модели после 48 часов инкубации представлены в таблицах 12 и 13. Клинические препараты карбоплатин и цисплатин были использованы в качестве препаратов сравнения активности новых соединений.

Все исследованные соединения рутения проявляют цитостатический эффект и вызывают дозозависимую клеточную гибель в концентрациях, достижимых в условиях *in vivo*. Комплекс

[RuNOCl₃(γ -Pic)₂] **12** с производным пиридина не оказывает избирательного цитотоксического воздействия на все исследованные клеточные линии, однако его цитостатическая активность для HepG2 на порядок ниже, чем для Hep-2 и MRC-5. В целом активность этого комплекса такая же, как у [RuNOCl₃(InicMe)₂] **11** за исключением цитотоксического эффекта на фибробласты MRC-5, для которых соединение **11** токсичнее (значения LC₅₀ статистически различимы, р < 0,05).

Таблица 12. Цитотоксическая активность (LC₅₀) нитрозокомплексов рутения для 2D-культур после 48 ч инкубации.

		LC50, MKM					
Соединение		без	после фотоактивации				
		MRC-5	Hep-2	HepG2	HepG2		
10	[RuNOCl ₃ (NicMe) ₂]	> 25	$7,1 \pm 1,3$	$12,8 \pm 0,3$	$14,2 \pm 0,7$		
10a	[RuNOCl ₃ (NicEt) ₂]	$24,7 \pm 0,5$	$17,8 \pm 0,8$	$13,2 \pm 2,5$	$17,1 \pm 1,0$		
11	[RuNOCl ₃ (InicMe) ₂]	$1,8 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,6$	$3,6 \pm 0,3$	$3,8 \pm 0,2$		
11a	[RuNOCl ₃ (InicEt) ₂]	$10,0 \pm 0,2$	1.8 ± 0.4	$2,9 \pm 0,2$	$6.5 \pm 0.4*$		
12	[RuNOCl ₃ (γ-Pic) ₂]	$2,8 \pm 0,2$	$3,0 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,2$	$4,2 \pm 0,3$		
	Карбоплатин	$35,7 \pm 0,3$	$9,2 \pm 0,5$	$32,2 \pm 2,1$	-		
	Цисплатин	>50	16.8 ± 0.2	$33,0 \pm 5,4$	-		

Примечание: * – отклонение значений LC₅₀ для HepG2 после воздействия фотоиндуцирующего излучения (длина волны 445 нм, мощность 30 мВт, время воздействия 30 мин) статистически значимо по отношению к значениям для HepG2 без дополнительного воздействия (p < 0,05).

Как цитотоксическая, так и цитостатическая активность комплексов с метиловым/ этиловым эфиром изоникотиновой кислоты [RuNOCl₃(InicMe)₂] **11** и [RuNOCl₃(InicEt)₂] **11а** выше, чем активность комплексов с метиловым/ этиловым эфиром никотиновой кислоты [RuNOCl₃(NicMe)₂] **10** и [RuNOCl₃(NicEt)₂] **10а**. Комплексы **10** и **10а** одинаково воздействуют на HepG2 и MRC-5, однако на клетки Hep-2 воздействие комплекса **10** с фрагментом метилового эфира сильнее, чем комплекса **10а** с фрагментом этилового эфира в структуре. Аналогично цитотоксическая активность соединений рутения **11** и **11а** одинакова для всех типов клеток, за исключением фибробластов MRC-5, для них комплекс **11** с фрагментом метилового эфира токсичнее, чем комплекс **11а** с фрагментом этилового эфира в структуре;

цитостатическая активность комплекса **11** больше для всех типов клеток по сравнению с активностью комплекса **11**а.

Так как активность нитрозокомплексов рутения можно дополнительно модулировать фотоиндуцирующим излучением (подробно Гл.1, раздел 1.2), такая возможность была изучена на клеточной линии HepG2, результаты также представлены в таблицах 12 и 13. Из всех исследованных соединений только активность [RuNOCl₃(InicEt)₂] **11a** меняется при воздействии фотоиндуцирующего излучения почти в 2 раза, при этом цитостатическая активность усиливается, а цитотоксическая ослабевает. Это может быть связано с непосредственным взаимодействием клетки со свободной молекулой NO, с взаимодействием фотопродуктов комплекса рутения с содержимым клетки или с наложением того и другого эффектов (Yakovlev et al., 2021).

Таблица 13. Цитостатическая активность (IC₅₀) нитрозокомплексов рутения для 2D-культур после 48 ч инкубации.

		IС50, мкМ					
Соединение		без	после фотоактивации				
		MRC-5	Hep-2	HepG2	HepG2		
10	[RuNOCl ₃ (NicMe) ₂]	$5,9 \pm 0,1$	$3,3 \pm 0,1$	$8,7 \pm 0,2$	$7,1 \pm 0,3$		
10a	[RuNOCl ₃ (NicEt) ₂]	$6,8 \pm 0,1$	$10,0 \pm 0,1$	$10,2 \pm 0,6$	$9,8 \pm 0,3$		
11	[RuNOCl ₃ (InicMe) ₂]	$0,42 \pm 0,04$	$0,44 \pm 0,03$	3.8 ± 0.3	$3,9 \pm 0,4$		
11a	[RuNOCl ₃ (InicEt) ₂]	$3,7 \pm 0,1$	$5,8 \pm 0,1$	$7,4 \pm 0,3$	2,9 ± 0,2*		
12	[RuNOCl ₃ (γ-Pic) ₂]	$0,45 \pm 0,04$	$0,50 \pm 0,03$	$3,3 \pm 0,3$	$3,6 \pm 0,3$		
	Карбоплатин	$6,0 \pm 0,3$	$3,5 \pm 0,3$	3.8 ± 0.2	-		
	Цисплатин	$5,8 \pm 0,2$	3.8 ± 0.2	$3,6 \pm 0,2$	-		

Примечание: * — отклонение значений IC_{50} для HepG2 после воздействия фотоиндуцирующего излучения (длина волны 445 нм, мощность 30 мВт, время воздействия 30 мин) статистически значимо по отношению к значениям для HepG2 без дополнительного воздействия (p < 0.05).

Результаты исследования влияния нитрозокомлексов рутения **10–12** на жизнеспособность опухолевых клеток человека HepG2 в 2D-культуре и сфероидах после 48 часов инкубации представлены в таблице 14.

Активность комплекса **12**, как цитотоксическая, так и цитостатическая меньше в два раза для сфероидов, чем для 2D-культуры HepG2. Цитотоксическая активность соединений **11** и **11a**

с фрагментом метилового/ этилового эфира изоникотиновой кислоты и соединения **10a** с фрагментом этилового эфира никотиновой кислоты в структуре так же слабее для сфероидов, чем для 2D-модели, но при этом цитостатическая активность этих комплексов сохраняется. Комплекс **10** с метиловым эфиром никотиновой кислоты выделяется из всей серии изученных рутениевых комплексов, так как его активность для сфероидов выше, чем для 2D-культуры HepG2.

Таблица 14. Цитотоксическая (LC₅₀) и цитостатическая (IC₅₀) активности нитрозокомлексов рутения **7–9** с метиловым/ этиловым эфиром никотиновой/ изоникотиновой кислот и γ -пиколином для 2D-культур и 3D-модели (сфероидов) HepG2 после 48 ч инкубации.

Соединение		LC50,	LC ₅₀ , мкМ		IC50, мкМ	
	Соединение	2D HepG2	3D HepG2	2D HepG2	3D HepG2	
10	[RuNOCl ₃ (NicMe) ₂]	$12,8 \pm 0,3$	8,0 ± 0,2*	$8,7 \pm 0,2$	7,3 ± 0,4*	
10a	[RuNOCl ₃ (NicEt) ₂]	$13,2 \pm 2,5$	38,8 ± 1,5*	$10,2 \pm 0,6$	$10,8 \pm 0,3$	
11	[RuNOCl ₃ (InicMe) ₂]	$3,6 \pm 0,3$	$7,4 \pm 0,1*$	3.8 ± 0.3	$4,8 \pm 0,3$	
11a	[RuNOCl ₃ (InicEt) ₂]	$2,9 \pm 0,2$	$9,2 \pm 0,2*$	$7,4 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,2$	
12	[RuNOCl ₃ (γ-Pic) ₂]	$3,5 \pm 0,2$	$7,0 \pm 0,2*$	$3,3 \pm 0,3$	$6,6 \pm 0,2*$	
	Карбоплатин	$32,2 \pm 2,1$	>50	3.8 ± 0.2	$10,6 \pm 0,3*$	
	Цисплатин	$33,0 \pm 5,4$	49,0 ± 1,3*	$3,6 \pm 0,2$	$11,6 \pm 0,2*$	

Примечание: * — отклонение значений для 3D-модели статистически значимо по отношению к 2D-культуре (р < 0.05).

3.3 Результаты фенотипического скрининга на основе красителей Hoechst и DiD

Фенотипический скрининг (PDD) не требует предварительного знания конкретной молекулярной мишени. Вместо этого лекарства тестируются на предмет их фармакологического действия для достижения желаемого фенотипа (Подробно Гл. 1, раздел 1.1). Таким образом, важной задачей данного исследования стало проведение фенотипического скрининга соединений с известным механизмом действия для выявления возможных популяционных фенотипов, образующихся в результате их воздействия. Определив эти изменения как «контрольные» точки, можно оценить действие новых исследуемых соединений.

Флуоресцентный карбоцианиновый краситель 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'- тетраметилиндодикарбоцианина перхлорат (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate, DiD), флуоресцирующий при включении в клеточные

мембраны, как правило, используют для интравитальной визуализации цитоплазматической мембраны клеток (подробно Гл. 1, раздел 1.1.1.3). Изменение процедуры окраски, а именно окраска фиксированных клеток одновременно с процедурой пермобилизации (подробно Гл. 2, раздел 2.5.2) позволила визуализировать внутриклеточные мембранные структуры для введения дополнительных параметров фенотипического скрининга соединений на клеточных линиях Нер-2 и МСГ-7. Репрезентативные изображения клеток Нер-2, окрашенных Ноесhst и DiD, представлены на рисунке 37.

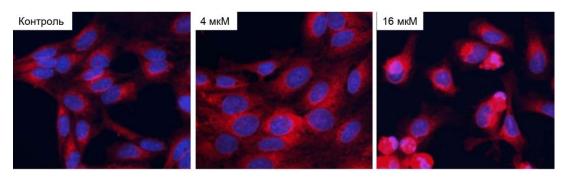


Рисунок 37. Мультиплексное одновременное детектирование сигналов Hoechst (синий) и DiD (красный) в клетках Hep-2 после воздействия цисплатина.

Соединения с известным механизмом действия, исследуемые в данной работе, представлены в таблице 3 (Гл. 2, раздел 2.4). Цитотоксическую и цитостатическую активности этих соединений для клеток Hep-2 и MCF-7 после 48 часов инкубации в выбранных диапазонах концентраций предварительно оценивали методом двойного окрашивания Hoechst/ PI как для новых соединений (подробно Гл. 2, раздел 2.5.1). Результаты представлены в таблице 15.

Таблица 15. Цитотоксическая (LC_{50}) и цитостатическая (IC_{50}) активности соединений с известным механизмом действия для клеток Hep-2 и MCF-7 после 48 ч инкубации.

Соединение	${ m LC}_{50}$, мк ${ m M}$		IC ₅₀ , мкМ		
Соединение	Hep-2	MCF-7	Hep-2	MCF-7	
Верапамил	164 ± 2	196 ± 4	484 ± 5	245 ± 2	
Винбластин	< 0,02 нМ	> 5 нМ	$0,\!46 \pm 0,\!6$ нМ	4,1 ± 0,6 нМ	
Винкристин	> 5 нМ	> 5 нМ	> 5 нМ	$1,2 \pm 0,1$ нМ	
Винорелбин	$4,3 \pm 0,1$ нМ	$6,4 \pm 0,5$ нМ	$6,5 \pm 0,3$ нМ	$5,2 \pm 0,2$ нМ	
Дакарбазин	169 ± 4	191 ± 5	155 ± 5	147 ± 2	
Дексаметазон	> 100	> 100	> 100	> 100	
Диклофенак	164 ± 3	183 ± 5	234 ± 2	381 ± 5	
Доксорубицин	$3,1 \pm 0,5$	$3,4 \pm 0,3$	$4,9 \pm 0,5$	$4,4 \pm 0,6$	

Карбоплатин	$9,2 \pm 0,5$	$33,7 \pm 1,8$	$3,5 \pm 0,3$	$3,1 \pm 0,2$
Метотрексат	> 1000	$3,6 \pm 0,2$	> 1000	$3,9 \pm 0,3$
Паклитаксел	$4,0 \pm 0,1$ нМ	2,5 ± 0,1 нМ	> 4 HM	$5,1 \pm 0,1$ нМ
Рифампицин	> 100	> 100	> 100	> 100
Циклофосфамид	> 400	$65,6 \pm 0,6$	> 400	$73,6 \pm 0,2$
Цисплатин	$16,8 \pm 0,2$	$38,9 \pm 2,0$	$3,8 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,1$
Цитиколин	> 4000	> 4000	> 4000	> 4000
Этопозид	$2,9 \pm 0,1$	$8,1 \pm 1,3$	$1,2 \pm 0,1$	$7,8 \pm 0,3$

В результате фенотипического скрининга на основе красителей Hoechst и DiD были получены концентрационные распределения 4 фенотипов клеток Hep-2 и MCF-7 (контрольного фенотипа (К Φ), атипичного фенотипа 1 (А Φ 1), атипичного фенотипа 2 (А Φ 2) и атипичного фенотипа 3 (А Φ 3) (подробно Гл. 2, раздел 2.5.2)) при воздействии соединений с известным механизмом действия (Гл. 2, раздел 2.4, табл. 3). Результаты представлены на рисунках 38 – 40.

Для исследованных соединений с известным механизмом действия выделены «фенотипические ландшафты», т.е. характерное распределение фенотипов в клеточных популяциях в зависимости от концентрации. Всего было выделено 4 фенотипических ландшафта (ФЛ), подробно описанных ниже.

Фенотипический ландшафт 1 (ФЛ1). В популяции преобладает контрольный фенотип (КФ), соединение не влияет на рост клеток. Данный фенотипический ландшафт в исследованных диапазонах концентраций имеют соединения: винкристин (клетки Hep-2), дексаметазон, рифампицин и цитиколин. Как видно из таблицы 15, эти соединения не влияют на жизнеспособность клеток Hep-2 и MCF-7. Таким образом, можно сделать вывод, что соединения, демонстрирующие ФЛ1, в выбранном диапазоне концентраций не влияют на жизнеспособность клеток.

Фенотипический ландшафт 2 (ФЛ2). С увеличением концентрации препарата % содержания контрольного фенотипа снижается, начинает преобладать АФ2, в высоких концентрациях появляется АФ1, количество клеток снижено по сравнению с контролем. Данный фенотипический ландшафт демонстрирует паклитоксел.

Фенотипический ландшафт 3 (ФЛ3). С увеличением концентрации препарата % содержания контрольного фенотипа снижается, начинает преобладать АФ3, в высоких концентрациях препарата преобладает АФ2, в еще более высоких АФ1, количество клеток снижено по сравнению с контролем. ФЛ3 демонстрируют карбоплатин, метотрексат, цисплатин и этопозид.

Фенотипический ландшафт 4 (ФЛ4). С увеличением концентрации препарата % содержания контрольного фенотипа снижается, преобладает АФ1, количество клеток снижено по сравнению с контролем. ФЛ4 демонстрируют верапамил, винбластин, винкристин (МСF-7), винорелбин, дакарбазин, диклофенак, доксорубицин и циклофосфамид.

Среди новых исследованных соединений **1–12** фенотипический ландшафт производных фенозановой кислоты **1–3а** в диапазоне концентраций 1–75 мкМ, а также соединений меди(II) с производным енамина **4** и кобальта(II) **9** соответствовал ФЛ1, комплексов меди(II) с 2,2′-бипиридином **7** и его производным **7а** – ФЛ2, комплексов марганца(II) **8** и **8а** – ФЛ3, производных фенозановой кислоты **1–3а** в диапазоне концентраций 0,1–5 мМ, комплексов меди(II) с 1,10-фенантролином и его производными **5**, **6**, **6а** и **66**, а также нирозокомплексов **10**–**12** – ФЛ4. Примеры полученных ФЛ для новых соединений представлены на рисунке 41.

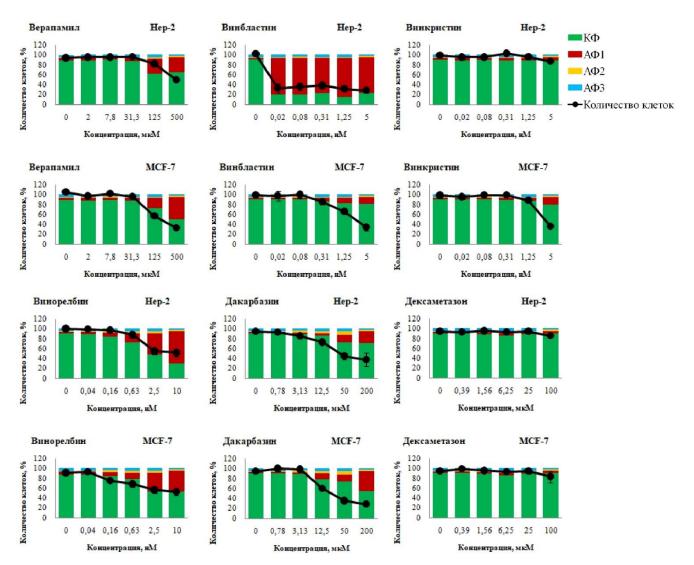


Рисунок 38. Дозозависимое изменение фенотипов клеток Hep-2 и MCF-7 под действием верапамила, винбластина, винкристина, винорелбина, дакарбазина и дексаметазона.

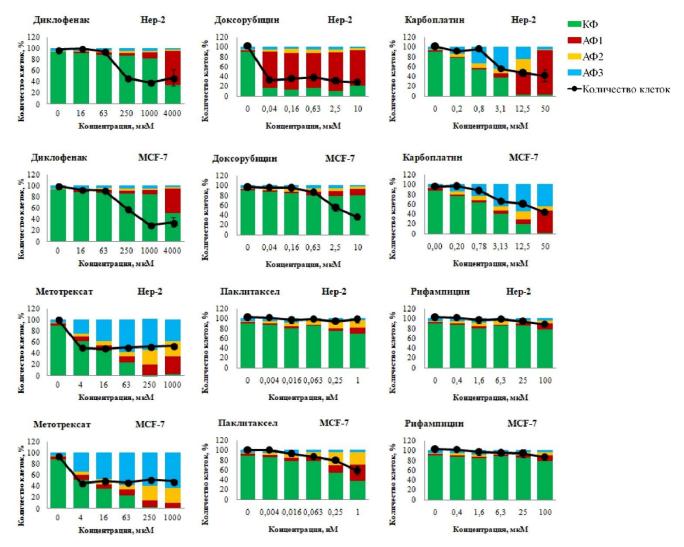


Рисунок 39. Дозозависимое изменение фенотипов клеток Hep-2 и MCF-7 под действием диклофенака, доксорубицина, карбоплатина, метотрексата, паклитаксела и рифампицина.

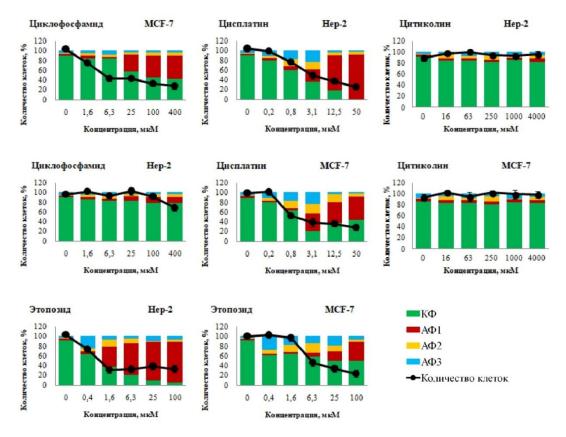


Рисунок 40. Дозозависимое изменение фенотипов клеток Hep-2 и MCF-7 под действием циклофосфамида, цитиколина, цисплатина и этопозида.

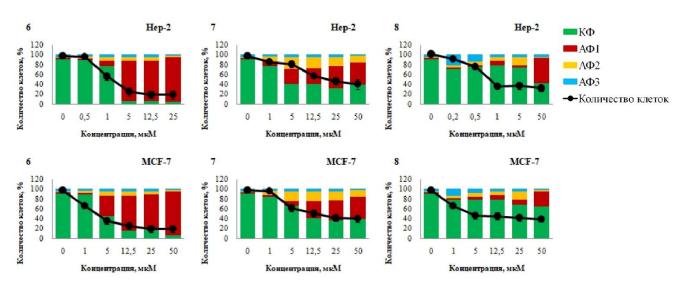


Рисунок 41. Дозозависимое изменение фенотипов клеток Hep-2 и MCF-7 под действием комплексов [$Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4$] **6**, [$Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4$] **7** и [$Mn(H_2O)_4(phen)$]·phen·(ΦT)₂ **8**.

3.4 Влияние новых соединений на индукцию цитохромов Р450

В данной работе было исследовано влияние новых координационных комплексов 4. ${[Cu(phen)(MT)_2]\cdot H_2O}_n$ 5, переходных металлов: $[CuL_2]$ $[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$ $[Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4]$ 7, $[RuNOCl_3(NicMe)_2]$ 10, $[RuNOCl_3(NicEt)_2]$ 10a, $[RuNOCl_3(InicMe)_2]$ 11, [RuNOCl₃(InicEt)₂] **11a** и [RuNOCl₃(γ-Pic)₂] **12** на уровни мРНК *CYP3A4*, *CYP2C9*, *CYP2C19* и белка СҮРЗА4 в 2D-модели гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 в концентрациях, не влияющих на жизнеспособность клеток (подробно Гл. 3, разделы 3.1.1 и 3.1.2). Рифампицин (RIF) в концентрациях 25 и 100 мкМ и дексаметазон (DEX) в концентрациях 10 и 100 мкМ использовали в качестве положительного контроля индукции. Репрезентативные изображения одновременной детекции мРНК методом гибридизации in situ в клетках HepG2 представлены на рисунке 42. Результаты оценки уровней мРНК СҮРЗА4, СҮР2С9, СҮР2С19 и белка СҮРЗА4 представлены в таблице 16. Результаты экспрессии СҮРЗА4, полученные методом гибридизации *in situ*, были подтверждены методом ОТ-ПЦР РВ (табл. 17).

Как видно из таблиц 16 и 17 среди комплексов меди(II) только комплекс [Cu₂(bipy)₂(ФТ)₄] **7** с 2,2'-бипиридином не оказывает модулирующее действие на *CYP2C9*, *CYP2C19* и *CYP3A4*. Комплекс [CuL₂] **4** с производным енамина индуцирует экспрессию *CYP3A4* и не влияет на экспрессию *CYP2C9* и *CYP2C19*. Его активность в целом ниже активности других соединений (подробно Гл. 3, раздел 3.1.1). Комплексы с 1,10-фенантролином {[Cu(phen)(MT)₂]·H₂O₃_n **5** и [Cu₂(phen)₂(ФТ)₄] **6** индуцируют *CYP3A4* и не влияют на экспрессию *CYP2C19*. Для комплексов **5** и **6** также наблюдается тенденция к ингибированию экспрессии *CYP2C9*, хотя уровень статистической значимости не достигнут. Комплекс **5** с 5-метилтетразолат анионом активнее комплекса **6** с 5-фенилтетразолат анионом: он индуцирует экспрессию *CYP3A4* на более низкой концентрации по сравнению с комплексом **6**.

Среди нитрозокомплексов рутения **10–12** комплекс с производным пиридина $[RuNOCl_3(\gamma-Pic)_2]$ **12** слабо индуцирует *CYP3A4* на уровне мРНК (p < 0,05) в отличие от других комплексов рутения, хотя его влияние на жизнеспособность клеток сравнимо с влиянием комплекса $[RuNOCl_3(InicMe)_2]$ **11** (подробно Γ л. 3, раздел 3.1.2). Комплекс **12** не влияет на экспрессию *CYP2C9* и *CYP2C19*.

Комплексы [RuNOCl₃(NicMe)₂] **10**, [RuNOCl₃(NicEt)₂] **10a**, [RuNOCl₃(InicMe)₂] **11** и [RuNOCl₃(InicEt)₂] **11a** индуцируют СҮРЗА4 и *СҮР2С19*, при этом индуцируемость *СҮР2С19* комплексами **11** и **11a** с фрагментом изоникотиновой кислоты выше, чем комплексами **10** и **10a** с фрагментом никотиновой кислоты в структуре: комплексы **11** и **11a** индуцируют *СҮР2С19* на

более низких концентрациях (1 мкМ) по сравнению с комплексами **10** и **10a** (5 мкМ). Ни один из исследованных нитрозокомплексов рутения не влиял на экспрессию *CYP2C9*.

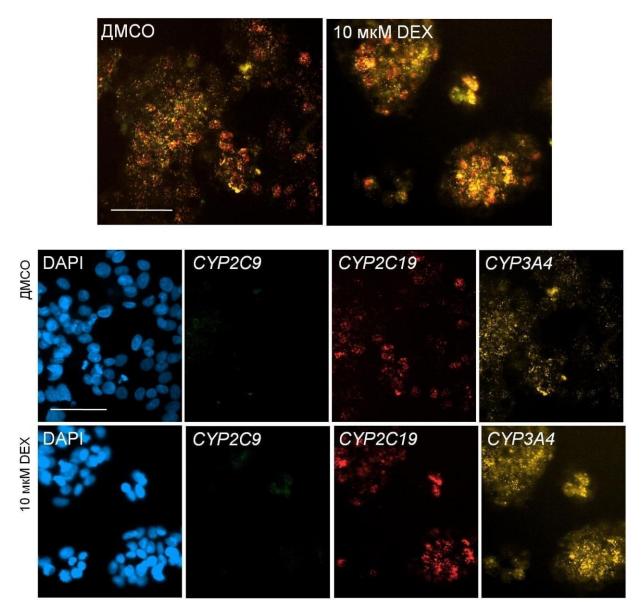


Рисунок 42. Мультиплексное одновременное обнаружение мРНК в клетках HepG2 с использованием набора для анализа ViewRNACellPlus. мРНК *CYP3A4*, *CYP2C9* и *CYP2C19* детектировали с использованием флуоресцентных зондов ViewRNA типа 1 (желтый, *CYP3A4*), типа 4 (зеленый, *CYP2C9*) и типа 6 (красный, *CYP2C19*). Ядра окрашивали DAPI (синий). Масштаб шкалы 100 мкм.

Таблица 16. Кратное изменение интенсивности флуоресценции мРНК *СҮРЗА4*, *СҮР2С9* и *СҮР2С19* и белка СҮРЗА4 в клетках HepG2 после 48 ч инкубации, ME [Q₁- Q₃].

		Кра	тное изменен	ие интенсивн	ости
C	Концентрация,	флуоресценции			
Соединение	мкМ	мРНК			Белок
		CYP2C9	CYP2C19	CYP3A4	CYP3A4
	10	1,93*	4,20*	5,73*	-
Haveaversanov (DEV)		[1,57–2,16]	[3,82–4,70]	[4,95–6,30]	
Дексаметазон (DEX)	100	2,10*	5,25*	5,50*	1,75*
		[1,92–3,26]	[4,43–6,05]	[3,43–6,45]	[1,48–2,24]
	25	0,89	3,98*	2,90*	-
Dr. L. Commune (DIF)		[0,76–1,04]	[3,06–4,17]	[2,51–3,49]	
Рифампицин (RIF)	100	2,05*	6,26*	5,51*	1,84*
		[1,80–2,39]	[4,49–7,79]	[4,69–6,63]	[1,49–2,48]
	5	1,05	1,44	1,36	-
[CvI .1 4		[0,97–1,23]	[0,90–1,77]	[1,07–1,63]	
[CuL ₂] 4	25	0,97	1,35	1,97*	1,77*
		[0,64–1,25]	[0,91–1,62]	[1,48–2,29]	[1,47–1,86]
$\{[Cu(phen)(MT)_2]\cdot H_2O\}_n$	0,2	0,56	1,12	2,25*	-
5		[0,47–0,76]	[0,96–1,45]	[2,05–2,81]	
	1	0,44	1,00	2,62*	1,95*
		[0,36–0,66]	[0,76–1,19]	[1,96–3,43]	[1,89–2,32]
	0,2	0,79	1,03	0,84	-
$[Cu2(phen)2(\Phi T)4] 6$		[0,67–1,09]	[0,74–1,30]	[0,67–1,13]	
$[Cu_2(pnen)_2(\Psi 1)_4]$ 0	1	0,62	0,80	3,10*	1,87*
		[0,55–0,66]	[0,62–1,21]	[2,26–3,87]	[1,67–2,25]
	0,2	0,80	1,30	1,03	-
$[Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4]$ 7		[0,69–1,20]	[1,01–1,75]	[0,67–1,25]	
$[Cu_2(Olpy)_2(\Phi T)_4]T$	1	1,12	1,92	1,04	1,03
		[0,74–1,24]	[0,84–1,03]	[0,89–1,32]	[0,88–1,16]
[RuNOCl ₃ (NicMe) ₂] 10	1	0,98	1,27	2,25*	-
		[0,79–1,27]	[1,01–1,47]	[2,05–2,81]	
	5	1,11	1,55*	1,93*	1,95*
		[0,83–1,50]	[1,28–1,85]	[1,81–2,95]	[1,89–2,32]

	1	0,73	1,02	1,65*	-
[RuNOCl ₃ (NicEt) ₂] 10a		[0,53–1,27]	[0,72–1,50]	[1,45–2,03]	
	5	1,16	1,49*	2,09*	1,96*
		[1,05–1,36]	[1,31–2,06]	[1,47–2,90]	[1,88–2,12]
[RuNOCl ₃ (InicMe) ₂] 11	0,1	1,15	1,24	1,36	-
		[1,01–1,28]	[0,77–1,43]	[1,05–1,96]	
	1	1,05	1,58*	2,49*	1,93*
		[0,72–1,23]	[1,50–1,76]	[2,03–3,01]	[1,68–2,16]
	0,1	1,00	1,07	1,13	-
[RuNOCl ₃ (InicEt) ₂] 11a		[0,66–1,16]	[0,92–1,26]	[0,92–1,36]	
	1	1,16	1,44*	2,01*	1,79*
		[0,90–1,39]	[1,27–1,72]	[1,81–2,19]	[1,45–1,96]
	0,1	0,68	0,96	1,06	-
[RuNOCl ₃ (γ-Pic) ₂] 12		[0,51–1,27]	[0,67–1,51]	[0,79–1,40]	
[1011000() 110/2] 12	1	0,75	0,98	1,62*	1,35
		[0,66–1,17]	[0,81–1,24]	[1,28–2,18]	[1,15–1,49]

Примечание: * – отклонение статистически значимо по отношению к контролю (р < 0,05).

Таблица 17. Кратное изменение экспрессии мРНК *СҮРЗА4* в клетках HepG2 после 48 ч инкубации по результатам ОТ-ПЦР РВ, МЕ [Q₁- Q₃].

Соединение		Концентрация, мкМ	Кратное изменение экспрессии мРНК <i>СҮРЗА4</i>		
DEX	Дексаметазон	10	5,82* [4,55–6,50]		
DEA		100	6,20* [5,28–6,55]		
RIF	Рифампицин	25	3,82* [2,55–4,20]		
KIF		100	6,58* [5,28–8,13]		
4	[CuL ₂]	5	1,20 [0,83–1,28]		
4		25	2,13* [1,73–2,28]		
_	$\{[Cu(phen)(MT)_2]\cdot H_2O\}_n$	0,2	2,20* [1,75–2,83]		
5		1	2,57* [2,16–3,12]		
	$[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$	0,2	1,04 [0,87–1,33]		
6		1	2,59* [2,16–3,56]		
7	$[Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4]$	0,2	1,13 [0,78–1,35]		

		1	0,94 [0,69–1,52]
10	[RuNOCl ₃ (NicMe) ₂]	1	1,95* [1,75–2,51]
		5	2,33* [1,92–2,75]
10a	[RuNOCl ₃ (NicEt) ₂]	1	2,05* [1,65–2,83]
104		5	2,19* [1,64–2,89]
11	[RuNOCl ₃ (InicMe) ₂]	0,1	0,96 [0,85–1,76]
11		1	2,37* [1,93–3,41]
11a	[RuNOCl ₃ (InicEt) ₂]	0,1	1,15 [0,92–1,45]
114		1	2,01* [1,71–2,39]
12	[RuNOCl ₃ (γ-Pic) ₂]	0,1	1,15 [0,87–1,59]
		1	1,71* [1,58–2,73]

Примечание: * – отклонение статистически значимо по отношению к контролю (р < 0,05).

Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Онкологические заболевания остаются серьезной проблемой современной медицины. Несмотря на внедрение новых методов лечения злокачественных опухолей, таких, например, как терапия стволовыми клетками и генная терапия, химиотерапия по-прежнему является одним из основных подходов к лечению онкологических заболеваний (Debela et al., 2021; Pucci et al., 2019). Практически все химиотерапевтические агенты повреждают здоровые клетки, особенно быстро делящиеся клетки. За последние два десятилетия в лечении рака произошел огромный сдвиг от цитотоксических препаратов широкого спектра действия к таргетным препаратам, которые могут целенаправленно воздействовать на опухолевые клетки, не затрагивая нормальные (Zhong et al., 2021).

Активные формы кислорода способны повреждать ДНК и другие биомакромолекулы, такие как липиды и белки (подробно Гл. 1, раздел 1.2). Опухолевые клетки характеризуются высоким уровнем АФК и сильно зависят от своей антиоксидантной системы, поэтому дополнительная генерация АФК в опухолевой клетке и/ или воздействие на ее антиоксидантную систему является одним из основных направлений в поиске методов профилактики и лечения злокачественных опухолей.

Фенозановая кислота (фенозан) является фенольным антиоксидантом с выраженной биологической активностью, в том числе противоопухолевой (Bespalov et al., 2016). S- и Seсодержащие производные фенозана могут превосходить фенозан по антиоксидантной активности благодаря наличию халькогенов в структуре, что успешно продемонстрировано для фенольных соединений, содержащих сульфидные группы (Kandalintseva et al., 2011). Калиевая соль фенозановой кислоты (фенозан калия) так же как и фенозан является перспективным фармакологически активным веществом для использования в биологии и медицинской химии (Kozlov et al., 2014; Palmina et al., 2012). В связи с этим гидрофильные Se- и S-содержащие производные фенозана калия, также могут обладать ценными биологическими свойствами (Kholshin et al., 2019).

В данной работе было исследовано влияние S- и Se-содержащих производных фенозана калия 2а и 3а, их исходных гидрофобных кислот 2 и 3, соответственно, и фенозана калия 1 на жизнеспособность опухолевых клеток человека HepG2 (гепатоцеллюлярная карцинома), Hep-2 (карцинома гортани) и МСF-7 (аденокарцинома молочной железы), а также мезенхимальных стволовых клеток человека МСК в стандартных условиях и в модели окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода. Показано, что соединения селена наиболее активны, особенно в отношении клеток Нер-2. Цитостатическая активность Se-содержащей соли 3а оказалась выше, чем у кислоты 3. Цитостатические и цитотоксические эффекты были

сопоставимы между серосодержащими соединениями 2 и 2a. В целом влияние солей на жизнеспособность клеток можно представить в следующем порядке: 3a >> 1 > 2a.

Предварительно общую антиоксидантную активность солей 1, 2а и 3а исследовали с помощью трех спектрофотометрических анализов (реакция на основе восстановления Fe(III), удаление радикалов DPPH и ABTS +). Анализ на основе ионов железа показал, что соединение серы 2а обладает антиоксидантной активностью, сравнимой с активностью аскорбиновой кислоты, и выше, чем активность соединения селена За и фенозана калия 1. Аскорбиновая кислота является двухэлектронным восстановителем (Berker et al., 2007), и можно предположить, что соединение 2а также является двухэлектронным восстановителем, тогда как соединения 3а и фенозан калия 1 – одноэлектронными. По данным анализа DPPH соединение 2а обладает наиболее сильной антиоксидантной активностью по сравнению с 3а и 1, хотя и более слабой по сравнению с аскорбиновой кислотой. Соединения проявляют более сильную активность по удалению радикалов в тесте ABTS⁺, чем в тесте DPPH⁺: активность соединений 1 и 2a сравнима и уступает активности соединения 3a. Ингибирование активности ABTS⁺ в образце антиоксиданта сильно коррелирует со способностью DPPH поглощать радикалы, поскольку оба радикала могут принимать электроны и Н' от антиоксидантных соединений, присутствующих в образцах. Различия в порядке активности соединений, полученные этими методами, можно объяснить разной продолжительностью инкубации с антиоксидантами, реакционной средой и значениями pH (Huang et al., 2005).

Оценка антиоксидантной активности фенольных соединений в модели окислительного стресса показала, что активность Se-содержащего производного фенозановой кислоты 3а значительно превышает активность фенозана калия 1 и S-содержащего производного 2а. В целом, добавление в культуральную среду антиоксидантов в диапазоне концентраций до 100 мкМ не влияло на рост и жизнеспособность клеток в течение 48 ч инкубации по данным анализа цитотоксической и цитостатической активности. В то же время негативное влияние на клеточную линию аденокарциномы молочной железы МСГ-7 наблюдается после добавления пероксида водорода: при концентрациях 3а выше 25 мкМ воздействие H₂O₂ приводит к большему уровню клеточной гибели, чем при воздействии только H₂O₂. Для серосодержащей соли 2а подобный эффект наблюдается на клетках Hep-2. Ранее проведенное исследование соединения 2а (в работе обозначен как ТФ-7) в условиях *in vivo* с целью определения фармакологической активности, показало, что высокие дозы 2а при лечении злокачественной мышиной лимфомы RLS одновременно с полихимиотерапией приводит к увеличению смертности животных (Кандалинцева, 2020), что в целом согласуется с нашими результатами.

Причина негативного действия селен- и серосодержащих солей на клетки МСF-7 и Нер-2, соответственно, остается невыясненной. Согласно нашим результатам, Se-содержащая соль За обладает хорошим потенциалом для того, чтобы оказывать влияние на метаболизм опухолевых клеток посредством восстановления Fe(III) до Fe(II) в многочисленных клеточных металлоферментах. Этот процесс может усилить окислительный стресс через реакцию Фентона, которая в сочетании с дополнительной генерацией АФК может вызывать клеточную гибель. Среди переходных металлов Fe известно как наиболее важный прооксидант с точки зрения окисления липидов из-за высокой реакционной способности этого металла (Manz et al., 2016). Метаболизм Fe представляет особый интерес для выяснения потенциальной уязвимости опухолевых клеток к агентам, которые изменяют окислительно-восстановительный баланс. Многие типы опухолей связаны с аберрантной регуляцией экспортера железа, называемого ферропортином (FPN-1) (Cockfield and Schafer, 2019). Известно, что FPN-1 значительно снижен в клетках рака молочной железы, рака предстательной железы и гепатоцеллюлярной карциномы по сравнению с нормальными клетками (Pinnix et al., 2010). Изменение метаболизма в опухолевых клетках МСF-7 Se-содержащей солью За может быть полезным само по себе и усиливать активность химиотерапевтических препаратов, повышающих концентрацию АФК.

Митохондрии являются наиболее важным источником АФК в большинстве клеток млекопитающих. Митохондриальная дисфункция, сопровождающаяся изменением мембранного потенциала, может привести к апоптозу. Опухолевые клетки обладают высоким мембранным потенциалом по сранению с нормальными клетками одной и той же ткани, поэтому митохондрии рассматривают как мишень для противоопухолевой терапии (Wen et al., 2013). В данной работе также было изучено влияние соединений 1, 2a и 3a на митохондриальный мембранный потенциал (ММП) клеток HepG2 и МСF-7 в стандартных условиях и в модели окислительного стресса. Показано, что данные соединения не влияют на ММП.

Основное направление поиска лекарственных препаратов опирается на знание определенной молекулярной мишени, которая, как предполагается, играет важную роль в заболевании (подробно Гл. 1, раздел 1.1). Вместе с тем в последние годы наблюдается повышение интереса к фенотипическим подходам открытия лекарств. Методы PDD сосредоточены на поиске соединений, вызывающих наблюдаемые физические изменения во всей биологической системе, моделирующей заболевание, такой как животные или клетки, и не требуют знания конкретной мишени и ее роли в патогенезе (подробно Гл. 1, раздел 1.1). Кроме того, помимо поиска целевых эффектов представляет сложность и наличие возможных нежелательных явлений. Корректная оценка таких явлений на ранних этапах исследования может увеличить выход соединений, обладающих высокой клинической эффективностью. Таким образом, возникла необходимость в создании методов оценки возможных дополнительных явлений на этапе первичного скрининга тестируемых веществ.

Многопараметрический скрининг (HCS) представляет собой мощный инструмент для изучения внутриклеточных процессов и поиска новых лекарств (подробно Гл. 1, раздел 1.1). В настоящее время существует множество методов фенотипического скрининга для тестирования различных эффектов, оказываемых препаратами. DiD представляет собой аналог люминесцентных липофильных карбоцианиновых красителей (DiI), флуоресцирующих при включении в клеточные мембраны (подробно Гл. 1, раздел 1.1.1.3). Простая процедура окрашивания, структурное сходство с фосфолипидами клеточных мембран и длительное сохранение в клетках являются одними из преимуществ DiD для скрининговых технологий.

В данной работе было сделано предположение, что выявление фенотипических изменений липофильных структур, окрашиваемых данным красителем, одновременно с оценкой морфологии клеточного ядра может быть использовано для мониторинга клеточных реакций на возможное действие соединения, не детектируемое стандартным методом двойного окрашивания Hoechst/PI для оценки цитотоксического и цитостатического эффектов (подробно Гл. 2, раздел 2.5.1). Дополнительное введение параметров может помочь оценить изменения внутриклеточных структур с помощью флуоресцентной окраски и выявить незначительные изменения в морфологии клеток на нетоксичном уровне.

В настоящем исследовании проведена оценка влияния 16 терапевтических препаратов с известным механизмом действия на опухолевые клетки Нер-2 и МСF-7 методом фенотипического скрининга с использованием красителей Ноеchst и DiD. В результате выделено 4 фенотипа: контрольный фенотип, преобладающий в необработанном контроле, и 3 атипичных фенотипа, отличающихся по разным сочетаниям параметров (подробно Гл. 2, раздел 2.5.2, табл. 4 и 5). Получены концентрационные распределения 4 фенотипов клеток Нер-2 и МСF-7 при воздействии соединений с известным механизмом действия (рис. 38 – 40) и выделены 4 «фенотипических ландшафта», т.е. 4 характерных распределения фенотипов в клеточных популяциях в зависимости от концентрации препарата.

Самым интересным является фенотипический ландшафт 3 (ФЛ3), в котором присутствует клеточная популяция с аномально большим размером клетки. Подобная морфология обычно наблюдается при митотической катастрофе (МК), способе гибели клеток, возникающем в результате преждевременного или ненадлежащего вступления клеток в митоз (Vakifahmetoglu et al., 2008). К митотической катастрофе приводит обработка агентами, влияющими на стабильность микротрубочек и вызывающими дефектны в контрольных точках клеточного цикла. МК не является отдельным способом гибели клеток, а скорее «предстадией» последующей гибели клеток посредством некроза или апоптоза.

Таким образом, фенотипический скрининг на основе красителей Hoechst и DiD позволил выявить две новых фенотипических популяции клеток, которые отсутствуют в необработанном

контроле. Детекция этих популяций во время первичного скрининга соединений может помочь в дополнительной оценке влияния новых агентов на жизнеспособность клеток.

Исследование цитотоксической и цитостатической активности новых комплексов переходных металлов на 2D- и 3D-культурах опухолевых клеток человека и нормальных фибробластов, выявило связь между структурой комплексов и их активностью. Комплексы рутения и четыре комплекса меди(II) были отобраны для исследования их влияния на экспрессию цитохромов P450.

Цитохромы Р450 являются основными ферментами, отвечающими за биотрансформацию ксенобиотиков, в том числе лекарственных препаратов. При этом СҮР2С9, СҮР2С19 и СҮР3А4 участвуют в биотрансформации порядка 46 % всех лекарств, метаболизируемых цитохромами Р450. Ингибирование и индукция СҮР являются основными механизмами, приводящими к фармакокинетическому взаимодействию лекарств (подробно Гл. 1, раздел 1.3.2). Поэтому оценка лекарственного взаимодействия является важным этапом в процессе открытия и разработки лекарственных средств, а потенциальные взаимодействия между новыми молекулами и цитохромами Р450 регулярно изучаются на ранних этапах скрининга соединений (Lu and Di, 2020).

В данной работе было изучено модулирующее действие девяти новых соединений (четырех комплексов меди(II) и пяти нитрозокомплексов рутения), потенциально обладающих противоопухолевой активностью, на уровень мРНК и белка СҮРЗА4, СҮР2С9 и СҮР2С19 как основных изоферментов Р450, ответственных за метаболизм лекарств. Исследование проводилось на 2D-культуре клеточной линии гепатоцеллюлярной карциномы человека НерG2. В качестве положительного контроля индукции СҮР использовали классические индукторы дексаметазон и рифампицин. Транскрипционные механизмы индукции СҮР2С9, СҮР 2С19 и СҮРЗА4 дексаметазоном и рифампицином пересекаются и представлены на рисунке 42 (подробно Гл. 1, раздел 1.3.3).

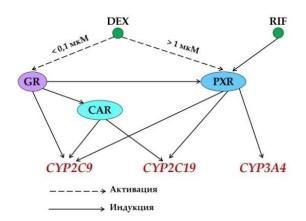


Рисунок 43. Схема пересечения механизмов индукции СҮР2С9, СҮР 2С19 и СҮР3А4 дексаметазоном (DEX) и рифампицином (RIF).

Линия клеток HepG2 является широко распространенной клеточной моделью для исследований специфических метаболических путей, связанных с опухолями печени, а так же тестирования кандидатов в противоопухолевые препараты, в том числе для оценки индуцирующего действия на СҮР. При этом отмечается, что клетки HepG2 могут быть менее чувствительными к воздействию индукторов цитохромов Р450 по сравнению с первичными гепатоцитами человека (РНН) (Choi et al., 2015). Результаты исследования уровней транскрипции CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 и 3A4 с помощью количественной ПЦР подтвердили их присутствие в клетках НерG2, однако уровни мРНК большинства СҮР значительно ниже, чем в РНН (Westerink and Schoonen, 2007). Содержание Р450 в образцах опухолей гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) у европейских пациентов европеоидной расы снижен по сравнению с окружающей их неопухолевой (эталонной) тканью (Nekvindova et al., 2020). Действительно, СҮР2С9, СҮР2С19 и СҮР3А4, в основном локализующиеся в печени, являются диагностическими маркерами ГЦК (Shen et al., 2021; X. Wang et al., 2019; Yan et al., 2020). В частности, показано, что низкая экспрессия генов СУР2С9 и СҮР2С19 связана с неблагоприятным прогнозом развития гепатоцеллюлярной карциномы (Wang et al., 2018), а подавление СҮРЗА4 является предиктором её раннего рецидива (Ashida et al., 2017).

Показано, что воздействие лигандов РХR и САR на клетки НерG2 в течение 24 часов индуцирует СYP1A1, 1A2, 2B6 и 3A4 в клетках НерG2 на уровне первичных гепатоцитов человека и не влияет на уровни экспрессии СYP2C8, 2D6 и 2E1, при этом минимальная концентрация рифампицина, статистически значимо повышающая уровень экспрессии *CYP3A4* (~3,5 раза), составляет 10 мкМ (Westerink and Schoonen, 2007). Экспрессия *CYP2C9*, *CYP2C19* и *CYP3A4* в первичных гепатоцитах человека повышается при воздействие 25 мкМ рифампицина и 10 мкМ дексаметазона в течении 48 часов, при этом уровень индукции CYP3A4 (в ~ 8-9 раз) был существенно выше, по сравнению с уровнем индукции CYP2C9 и CYP2C19 (в ~ 2-3 раза) (Raucy et al., 2002). Индукция дексаметазоном в концентрациях больше 1 мкМ опосредована прегнановым X рецептором (рис. 43). Хотя индуцируемость СYP2C в печени в целом можно ранжировать как CYP2C9 > CYP2C19 (Chen and Goldstein, 2009), индуцируемость СYP в PHH можно расположить в порядке CYP3A4 > CYP2C9 ~ CYP2C19 (Raucy et al., 2002).

В настоящем исследовании воздействие дексаметазона и рифампицина приводило к статистически значимому повышению уровня мРНК СҮР2С9, СҮР2С19 и СҮР3А4 (Гл. 3, раздел 3.4), что в целом согласуется с литературными данными, но индуцируемость СҮР, оцененную методом гибридизации *in situ*, ранжируется в порядке СҮР3А4 ~ СҮР2С19 > СҮР2С9, что может быть результатом измененной экспрессии *СҮР* в опухолевых клетках.

В данном исследовании показано, что из 4 исследованных координационных соединений меди(II) ([CuL₂] **4**, {[Cu(phen)(MT)₂]·H₂O}_n **5**, [Cu₂(phen)₂(Φ T)₄] **6** и [Cu₂(bipy)₂(Φ T)₄] **7**) 3 соединения оказывают модулирующее действие на CYP3A4 (**4**, **5** и **6**) и CYP2C9 (**5** и **6**) в клетках HepG2 после 48 часов воздействия.

Индуцируемость СҮРЗА4 соединением **4** ниже в сравнении с индуцируемостью классическими индукторами DEX и RIF. Хотя исследование влияния [CuL₂] на жизнеспособность клеток показало, что цитотоксическая и цитостатическая активности этого соединения существенно ниже по сравнению с другими исследованными соединениями, данный комплекс все же влияет на уровень экспрессии CYP3A4. Это следует учитывать при дальнейших исследованиях и поиске его возможного применения.

Соединения $[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$ 5 и $\{[Cu(phen)(MT)_2]\cdot H_2O\}_n$ 6 индуцируют СҮРЗА4 в клетках HepG2 в концентрациях на порядок и на два порядка, соответственно, ниже, чем дексаметазон и рифампицин. Активность комплекса 6 с 5-метилтетразолат анионом выше, чем комплекса 5 с 5-фенилтетразолат анионом. Помимо индукции СҮРЗА4, для комплексов 5 и 6 наблюдается тенденция к снижению уровня экспрессии СҮР2С9, при этом влияние на СҮР2С19 не обнаружено. Учитывая особенности транскрипционной регуляции этих СҮР (подробно Гл. 1, раздел 1.3.3), можно предположить, что изученные комплексы могут оказывать влияние на экспрессию СҮР посредством воздействия на коактиваторы транскрипции. Так, например, HNF4α является ключевым фактором транскрипции для конститутивной экспрессии цитохромов P450 в печени. Однако клетки HepG2, экспрессирующие $HNF4\alpha$ на высоком уровне, имеют низкий уровень экспрессии *СҮР*, что связано с нарушением HNF4αопосредованной транскрипции P450 в HepG2 из-за низкого уровня коактиваторов PGC-1α и SRC-1 (Martínez-Jiménez et al., 2006). Эти коактиваторы действуют через респонсивные элементы HNF4 а и существенно влияют на экспрессию CYP2C9 и в гораздо меньшей степени на экспрессию СҮРЗА4. Другой коактиватор NCOA6 отвечает за синергическую активацию СУР2С9 с помощью HNF4α и PXR в присутствии лиганда. NCOA6 по-разному регулирует экспрессию генов СҮР2С9 и СҮР3А4 (подавление NCOA6 отменяет синергетическую активацию и индукцию CYP2C9 посредством PXR и HNF4α, но не CYP3A4), хотя оба регулируются одними и теми же ядерными рецепторами (Surapureddi et al., 2011).

Согласно данным литературы, изменения уровней экспрессии *CYP3A4* могут модулировать активность CYP2C9 *in situ* в гепатоцитах человека посредством белок-белковых взаимодействий (Ramsden et al., 2014). Эти две изоформы могут напрямую взаимодействовать через свои N-концы таким образом, что активность CYP2C9 снижается до 84% (Subramanian et al., 2010). Таким образом, повышение уровня экспрессии *CYP3A4* комплексами меди(II) с 1,10-фенантролином **5** и **6** может приводить к одновременному ингибированию CYP2C9 и

снижению его активности, что в свою очередь может привести к негативным последствиям в случае ГЦК, так как низкий уровень экспрессии *CYP2C9* является предиктором неблагоприятного прогноза ГЦК (Wang et al., 2018).

Все пять исследованных нитрозокомплекса рутения, [RuNOCl₃(NicMe)₂] 10, [RuNOCl₃(NicEt)₂] 10a, [RuNOCl₃(InicMe)₂] 11, [RuNOCl₃(InicEt)₂] 11a и [RuNOCl₃(γ-Pic)₂] 12, являются индукторами СҮР. Комплекс 12 незначительно, но статистически значимо (р < 0,5) повышает уровень мРНК СҮРЗА4 и не влияет на уровни мРНК СҮР2С9 и СҮР2С19. Остальные 4 комплекса индуцировали СҮР2С19 и СҮРЗА4. При этом комплексы 11 и 11a, содержащие в структуре фрагмент изоникотиновой кислоты, индуцируют СҮР2С19 в более низких концентрациях по сравнению с комплексами 10 и 10a с фрагментом никотиновой кислоты в структуре. Индуцируемость СҮР нитрозокомплексами рутения ранжируется в порядке СҮРЗА4 > СҮР2С19. Учитывая, что индуцируемость СҮР2С9 дексаметазоном и рифампицином была ниже индуцируемости СҮР2С19, можно было бы предположить, что более высокие концентрации соединений привели бы к индукции СҮР2С9, однако это маловероятно, так как исследования проводились в максимальных концентрациях, не влияющих на жизнеспособность клеток НерС2 после 48 часов воздействия.

Таким образом, на 2D-культуре гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 в качестве модели печени *in vitro* было изучено модулирующее действие новых комплексов меди(II) и нитрозокомплексов рутения. Было показано, что некоторые из них влияют на экспрессию *CYP2C9*, *CYP2C19* и *CYP3A4*, что необходимо учитывать при дальнейших исследованиях этих соединений как потенциальных противоопухолевых препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе с помощью многопараметрического скрининга на основе флуоресцентной визуализации были изучены биологические свойства новых синтезированных соединений, потенциально обладающих противоопухолевой активностью: координационных соединений меди(II), марганца (II) и кобальта(II) с олигопиридинами и производными енамина и тетразола, нитрозокомплексов ругения с производными пиридина, а также селен- и серосодержащих производных фенозановой кислоты.

Методом двойного окрашивания клеток флуоресцентными красителями Hoechst/PI изучены цитотоксическая и цитостатическая активности новых соединений на 2D-культурах клеточных линий человека: карциномы гортани Hep-2, аденокарциномы молочной железы MCF-7 и гепатоцеллюлярной карциномы HepG2.

Селен- и серосодержащие производные фенозановой кислоты и фенозан калия оказывают цитотоксический и цитостатический эффекты на 2D-культуры Hep-2, MCF-7, HepG2 и MRC-5 в диапазоне высоких концентраций. Значения параметров LC_{50} и IC_{50} для Se_{-} содержащих соединений лежат в микромолярном диапазоне концентраций, для фенозана калия и S-содержащих соединений – в милимолярном диапазоне. В целом, активность фенольных соединений можно ранжировать в следующем порядке: Se-содержащие >> фенозан калия > Sсодержащие. Результаты спектрофотометрического исследования общей антиоксидантной активности (АОА) гидрофильных соединений на основе реакций восстановления ионов железа(III) и удаления радикалов DPPH и ABTS но показали, что исследуемые соединения являются антиоксидантами. Исследование влияния селен- и серосодержащих производных фенозана жизнеспособность модели калия на клеток в окислительного индуцированного H₂O₂, показало, что Se-содержащая соль оказывает антиоксидантное действие в отношении Н₂О₂-индуцированной цитотоксичности, сравнимое с антиоксидантным действием фенозана калия на клетках HepG2 и превышающее его на клетках Hep-2. На клетки MCF-7 Seсодержащее соединение также оказывает антиоксидантное действие в низком диапазоне концентраций, но в концентрациях >25 мкМ резко усиливает клеточную гибель. Соединение серы обладает меньшей биологической активностью по сравнению с фенозаном калия и Seсодержащим соединением и усиливает клеточную гибель Нер-2 в модели окислительного стресса. Исследование влияния соединений на митохондриальный мембранный потенциал (ММП) в стандартных условиях и в модели окислительного стресса, как возможного механизма антиоксидантной или прооксидантной активности этих соединений, показало, что фенозан калия и его серо- и селен-содержащие производные не влияют на ММП.

Таким образом, дальнейшее исследование действия Se-содержащей соли, приводящей к усилению клеточной гибели опухолевых клеток МСF-7 после дополнительной генерации АФК является перспективным. Комбинация противоопухолевой терапии с Se-содержащим производным фенозана калия может усилить активность химиотерапевтических препаратов, повышающих концентрацию АФК, и обеспечить терапевтические преимущества при лечении рака молочной железы.

Исследование цитотоксического и цитостатического действия комплексов Cu(II), Mn(II) и Co(II) на 2D-культурах опухолевых клеток Hep-2, MCF-7 и HepG2 показало, что разнолигандные комплексы меди(II) обладают выраженной ярко дозозависимой цитотоксической активностью. Значения параметров LC50 для наиболее токсичных комплексов находятся в диапазоне концентраций 0,60-12,3 мкМ, значения IC_{50} – в диапазоне 0,11-17,4мкМ, что свидетельствует о большей активности новых соединений, чем у клинически одобренных препаратов цисплатина и карбоплатина. Установлено, что производное тетразола оказывает существенное влияние на селективность комплексов и цитостатическую активность. Наибольшей цитостатической активностью обладают соединения с марганцем (II): они полностью останавливают деление клеток на концентрациях ~ 4 мкМ. Комплекс марганца(II) $[Mn(H_2O)_4(phen)]$ -рhen· $(\Phi T)_2$ является перспективным для дальнейших исследований, так как его цитостатическая активность для опухолевых клеток Нер-2 выше, чем для других опухолевых клеток и неопухолевых фибробластов MRC-5.

Среди изученных комплексов меди(II) наиболее перспективными с точки зрения потенциальных противоопухолевых соединений являются комплекс $[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$ и Соединение комплекс $[Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4].$ $[Cu_2(phen)_2(\Phi T)_4]$ проявляет дозозависимую цитотоксическую активность в отношении изученных клеточных линий, зависящую от типа клеток, но следует отметить, что этот эффект не является специфичным для опухолевых линий и выше для неопухолевых фибробластов MRC-5. Активность комплекса [Cu₂(phen)₂(ФТ)₄] выше, чем у цисплатина и карбоплатина и сохраняется на 3D-модели HepG2. Комплекс индуцирует СҮРЗА4 на уровне мРНК и белка, не влияет на экспрессию СҮР2С19, для него наблюдается тенденция к снижению экспрессии CYP2C9. Соединение [Cu₂(phen)₂(Φ T)₄] можно использовать как основу для создания противоопухолевого соединения, но необходима дальнейшая модификация структуры для повышения селективности к опухолевым клеткам или же необходима разработка средства/ способа направленной доставки (например, липосомы) с той же целью.

Комплекс $[Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4]$ проявляет дозозависимую активность в отношении изученных клеточных линий, зависящую от типа клеток, его цитотоксическая активность для опухолевых клеток Hep-2 на порядок выше, чем для опухолевых клеток MCF-7 и HepG2 и

неопухолевых фибробластов MRC-5. Цитостатическая активность этого комплекса также выше для опухолевых клеток, чем для фибробластов. Данное соединение не влияет на экспрессию CYP3A4, CYP2C9 и CYP2C19. Таким образом, необходимы дальнейшие исследования комплекса [$Cu_2(bipy)_2(\Phi T)_4$] в качестве потенциального противоопухолевого агента.

Нитрозокомплексы рутения проявляют дозозависимые цитотоксическую цитостатическую активности в отношении опухолевых 2D-моделей клеток Hep-2, MCF-7 и HepG2 в диапазоне концентраций от 1 до 50 мкМ, которая в значительной степени зависит от фрагмента изоникотиновой или никотивой кислот, и в меньшей от фрагментов метилового и этилового эфиров. Значения параметров LC₅₀ лежат в диапазоне 2,9–17,1 мкМ, значения IC₅₀ – в диапазоне 2,9-10,2 мкМ, что также сравнимо, либо превышает активность клинически одобренных препаратов цисплатина и карбоплатина. Фрагмент метилового или этилового эфиров в структуре нитрозокомплекса рутения оказывает существенное влияние на активность комплексов на 2D-модели MRC-5 и 3D-модели HepG2. Нитрозокомплекс рутения с метилникотинатом [RuNOCl₃(NicMe)₂] является наиболее перспективным с точки зрения потенциальных противоопухолевых соединений среди всех изученных нитрозокомплексов рутения. Он проявляет дозозависимую цитотоксическую активность, которая выше, чем у цисплатина и карбоплатина, и специфична для опухолевых клеточных линий. Однако, следует отметить, что антипролиферативная активность для опухолевых клеток сравнима с таковой для нормальных фибробластов MRC-5. Фотоактивация не влияет на активность этого комплекса, соединение одинаково эффективно как на 2D-, так и на 3D-культуре HepG2. Комплекс индуцирует СҮРЗА4 на уровне мРНК и белка, СҮР2С19 на уровне мРНК и не влияет на экспрессию СҮР2С9.

Методом фенотипического скрининга на основе красителей Hoechst и DiD выявлены фенотипические изменения в опухолевых клетках человека под воздействием соединений с известным механизмом действия. Выделены популяционные фенотипы, образующиеся при действии противоопухолевых препаратов. Эти изменения были определены как «контрольные» точки для оценки действия новых соединений.

Таким образом, данное исследование позволило охарактеризовать биологическую активность новых соединений, определить взаимосвязь «структура – биологическая активность» и обозначить ряд соединений для дальнейших исследований.

выводы

- 1. Цитотоксическая и цитостатическая активности Se-содержащего производного фенозана калия на порядок выше, чем у фенозана калия и его S-содержащего производного. В условиях окислительного стресса, индуцированного пероксидом водорода, Se-содержащая соль оказывает антиоксидантное действие на клетки Hep-2, HepG2 и MCK в диапазоне концентраций от 1 до 75 мкМ; на клетки MCF-7 в диапазоне концентраций до 25 мкМ она также оказывает антиоксидантное действие, а в концентрациях выше 25 мкМ усиливает клеточную гибель MCF-7. Гидрофильные производные фенозановой кислоты не влияют на митохондриальный мембранный потенциал 2D-культур HepG2 и MCF-7 как в стандартных условиях, так и в модели окислительного стресса, индуцированного H₂O₂.
- 2. Среди координационных соединений меди(II), марганца (II) и кобальта(II) с олигопиридинами и производными енамина и тетразола комплексы меди(II) проявляют выраженную дозозависимую цитотоксическую активность, а комплексы марганца(II) и кобальта(II) цитостатическую. Соединение с 5-метилтетразолат анионом не селективно для разных типов клеток, тогда как соединения с 5-фенилтетразолат анионом селективны. Для 3D-культуры HepG2 комплексы с 5-метилтетразолат анионом активнее, чем для 2D-культуры HepG2. Среди комплексов с 5-фенилтетразолат анионом комплексы с 2,2'-бипиридином и его производным менее активны на 3D-культуре HepG2, активность комплексов с 1,10-фенантролином сохраняется.
- 3. Модулирующее действие координационных соединений меди(II) на экспрессию цитохромов P450 в большей степени зависит от олигопиридина в структуре комплекса. Комплекс с 1,10-фенатролином [Cu₂(phen)₂(ФТ)₄] индуцирует экспрессию *CYP3A4*, тогда как комплекс с 2,2'-бипиридином [Cu₂(bipy)₂(ФТ)₄] не оказывает модулирующего действия на CYP2C9, CYP2C19 и CYP3A4, а комплекс с производным енамина [Cu(L)₂] индуцирует CYP3A4 (мРНК и белок) в концентрациях на порядок выше по сравнению с комплексами с 1,10-фенантролином. Комплекс с 5-метилтетразолат анионом {[Cu(phen)(MT)₂]·H₂O}_n является более сильным индуктором CYP3A4 по сравнению с комплексом с 5-фенилтетразолат анионом [Cu₂(phen)₂(ФТ)₄].
- 4. Нитрозокомплексы рутения оказывают дозозависимый цитотоксический и цитостатический эффект в 2D-модели Hep-2 и HepG2, который в большей степени зависит от производного пиридина и в меньшей степени от фрагмента метилового или этилового эфиров. Однако фрагмент метилового или этилового эфиров оказывает существенное влияние на активность комплексов в 2D-модели MRC-5 и 3D-модели HepG2. Фотоиндуцирующее

излучение (445 нм, 30 мВт, 30 мин) в 2 раза снижает цитотоксическую и усиливает цитостатическую активности комплекса с этилизоникотинатом [RuNOCl₃(InicEt)₂].

- 5. Нитрозокомплексы рутения индуцируют СҮРЗА4 (мРНК и белок), СҮР2С19 (мРНК) и не влияют на экспрессию *СҮР2С9*. Наличие фрагмента никотиновой/ изоникотиновой кислоты в структуре комплекса влияет на экспрессию *СҮР2С19*: комплексы с изоникотинатом индуцируют СҮР2С19 в более низких концентрациях по сравнению с комплексами с никотинатом. Комплекс с γ-пиколином [RuNOCl₃(γ-Pic)₂] оказывает индуцирующий эффект на СҮРЗА4 и не влияет на экспрессию *СҮР2С9* и *СҮР2С19*.
- 6. Фенотипический скрининг на основе красителей Hoechst и DiD позволяет выявить характерные изменения в клеточных популяциях опухолевых клеток Hep-2 и MCF-7 при воздействии соединений с известным механизмом действия, которые воспроизводятся при воздействии на клетки новых исследованных соединений.

Список сокращений и условных обозначений

3'-UTR – 3'-нетранслируемая область

8-OHdG – 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозин

АВС – АТФ-связывающие транспортные белки семейства АВС

ABTS⁺ – катион-радикал 2,2'-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфокислоты)

AhR – арилуглеводородный рецептор

АКР – альдокеторедуктаза

ALDH1L2 – член L2 семейства альдегидрогеназы 1

AQP – аквапорин

bipy - 2,2'-бипиридин

С/ЕВР – ССААТ-энхансер-связывающие белки

СА – холевая кислота

CAR – конститутивный андростановый рецептор

CCRP – цитоплазматический CAR-удерживающий белок

CDCA – хенодезоксихолевая кислота

CLEM4 – дальний конститутивный энхансерный модуль

СОUР-ТFI и СОUР-ТFI I – куриный овальбумин перед промотором фактора транскрипции I и II, соответственно

cPLA2 – цитозольные фосфолипазы A2

СҮР – цитохром Р450

DDH – дигидродиолдегидрогеназа

DiD – 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндодикарбоцианина перхлорат

dmbipy - 4,4'-диметил-2,2'-бипиридин

dmphen - 4,7-диметил-1,10-фенантролин

dP – дистальный промотор

DPPH — 2,2-ди(4-трет-октилфенил)-1-пикрилгидразил радикал

DR1, DR2, DR3, DR4, DR5 – AG(G/T)TCA-подобные прямые повторы, разделенные 1,2,

3, 4 или 5 основаниями, соответственно

 $E2 - 17\beta$ -эстрадиол

ЕЕТ – эпоксиэйкозатриеновые кислоты

EGF – эпидермальный фактор роста

ER – эстрогеновый рецептор

ER6 – обратные повторы разделенные 6 основаниями

ERE – сайт связывания с эстрогеновым рецептором

ЕТЕ – 17α-этинилэстрадиол

FHC – тяжелая цепь ферритина

FOG-2 – специфический корегулятор GATA-2

FXR – фарнезоидный X рецептор

GATA — факторы транскрипции, содержащие «домены цинковых пальцев» и распознающие мотив ДНК (A/T)GATA(A/G)

GPx – глутатионпероксидаза

GR – глюкокортикоидный рецептор

GRE – сайт связывания с глюкокортикоидным рецептором

GSH – глутатион (ү-глутамил-цистеинил-глицин)

GSSG – дисульфид глутатиона

GST – глутатион-S-трансферазы

GST-рі – глутатион-S-трансфераза рі

GW4064 – 3-(2,6-дихлорфенил)-4-(3'-карбокси-2-хлорстильбен-4-ил)-оксиметил-5-изопропилизоксазол, избирательный агонист FXR

Н3К27 – лизин 27 гистона 3

Н3К27те3 – триметилирование лизина 27 гистона Н3

Н3К4те3 – триметилирование лизина 4 гистона 3 ацетилирование Н3

HCS – high content screening, многопараметрический скрининг

HDAC1 – гистондеацетилаза 1

Нер-2 – карцинома гортани человека

HepG2 – гепатоцеллюлярная карцинома человека

HIF – фактор, индуцируемый гипоксией

HNF – ядерные факторы гепатоцитов

HNF-4α -AS1- антисмысловая РНК 1 ядерного фактора 4α гепатоцитов

HSP90 – белок теплового шока 90

HTS – high throughput screening, высокопроизводительный скрининг

 IC_{50} — концентрация соединения, при которой количество клеток (2D-культура) или площадь сфероида (3D-модель) снижены на 50% по сравнению с контролем.

IL-2, 4 или 6 – интерлейкин-2, 4 или 6

INFу – интерферон у

InicEt – этилизоникотинат

InicMe – метилизоникотинат

L – анион 2-анилинометилиден-5,5-диметилциклогексан-1,3-диона

LAP – активирующий транскрипцию белок печени

 LC_{50} – концентрация соединения, при которой количество живых клеток снижено на 50% по сравнению с контролем.

LIP – ингибирующий транскрипцию белок печени

lncRNAs – длинные некодирующие РНК

LXR – печеночный X рецептор

MCF-7 – аденокарцинома молочной железы человека

Med25 — Медиатор 25, вариабельный член многосубъединичного белкового комплекса Медиатор

MRC-5 – неопухолевые фибробласты человека

MyD88 – миелоидный фактор дифференцировки 88

NAC – N-ацетилцистеин

NAT – N-ацетилтрансферазы

NCOA6 – коактиватор ядерных рецепторов 6

NF-kB – ядерный фактор каппа В

NicEt – этилникотинат

NicMe – метилникотинат

NOX – НАДФН-оксидаза

NQR – НАДФН:хинон оксидоредуктазы

NTCP – котранспортирующий полипептид таурохолата натрия

ОАс – ацетат анион

ОАТ – транспортеры органических анионов

ОАТР – полипептиды, транспортирующие органические анионы

р300 – ацетилтрансфераза гистонов

р53 - транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл

PBS – фосфатно-солевой буфер

PDD – phenotypic drug discovery, открытие лекарств с помощью фенотипического скрининга (не требует знания молекулярной мишени)

 $PGC-1\alpha$ – коактиватор 1- α -рецептора, активируемого пролифератором пероксисом γ

PHD2 – домен пролилгидроксилазы 2

phen - 1,10 фенантролин

phendione – 1,10-фенантролин-5,6-дион

PI – пропидий йодид

PPAR – рецептор, активируемый пролифератором пероксисом

PPRE – респонсивным элементом

PRDX6 – пероксиредоксин 6

prP – проксимальный промотор

РХR – прегнановый X рецептор

RXR – ретиноидный X рецептор

SHP – малый гетеродимерный партнер

SLC – транспортеры растворенных веществ

SOCS1 – супрессор сигнальных белков цитокинов 1

SRC-1 – коактиватор стероидных рецепторов-1

TDD – target-based drug discovery, открытие лекарств с помощью целевого скрининга (на основе знания молекулярной мишени)

ТGF-β – трансформирующий фактор роста β

TLR – Toll-подобный рецептор

TMRM – тетраметилродамин

TNF- α — фактор некроза опухоли- α

TNFR – рецептор фактора некроза опухоли

TRADD – белок, взаимодействующий с доменом смерти TNFRSF1A (член 1A надсемейства рецепторов фактора некроза опухоли)

 $Trx(SH)_2$ – тиоредоксин

TrxR – тиоредоксинредуктаза

TrxS₂ – дисульфид тиоредоксина

 $TR\alpha 1$ и $TR\beta 1$ – рецептор гормона щитовидной железы $\alpha 1$ и $\beta 1$, соответственно

TSG – гены-супрессоры опухолевого роста

VDR – рецептор витамина D

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов

VRL – винорелбин

XREM – дистальный энхансерный модуль ответа на ксенобиотики

γ-Ріс – γ-пиколин

АДГ – альдегиддегидрогеназы

АК – арахидоновая кислота

АКМ – активированные кислородные метаболиты

АОА – антиоксидантная активность

АОА –антиоксидантная активность

АФА – активные формы азота

АФК – активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДНКМТ – ДНК-метилтрансфераза

 $ИЛ-1\beta$ — интерлейкин- 1β

МАО – моноаминоксидазы

ММП – митохондриальный мембранный потенциал

МСК – мезенхимальные стволовые клетки человека

МТ – 5-метилтетразолат анион

МТ3 – металлотионеин-3

НАДФН – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

НОХ – гипогалоидные кислоты

ОС – окислительный стресс

РНК – рибонуклеиновая кислота

СТ – сульфотрансферазы

СОД – супероксиддисмутаза

СССР – карбонил цианида м-хлор фенил гидразон

УДФ-ГТ – УДФ-глюкуронилтрансферазы

ФМО – флавинсодержащие монооксигеназы

ФК – фенозан калия

 $\Phi T - 5$ -метилтетразолат анион

ЦОГ – циклооксигеназа

ЭГ – эпоксидгидролазы

ЭР – эндоплазматический ретикулум

Список литературы

- 1. Agard D.A., Sedat J.W. Three-dimensional architecture of a polytene nucleus // Nature. 1983. Vol. 302, № 5910. P. 676–681.
- 2. Aitken A.E., Morgan E.T. Gene-specific effects of inflammatory cytokines on cytochrome P450 2C, 2B6 and 3A4 mRNA levels in human hepatocytes // Drug Metab. Dispos. 2007/06/18. 2007. Vol. 35, № 9. P. 1687–1693.
- 3. Alessio E., Messori L. NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry // Molecules . 2019. Vol. 24, N 10.
- 4. Alfieri M.L. et al. Role of Sulphur and Heavier Chalcogens on the Antioxidant Power and Bioactivity of Natural Phenolic Compounds // Biomolecules. MDPI, 2022. Vol. 12, № 1.
- 5. Almazroo O.A., Miah M.K., Venkataramanan R. Drug Metabolism in the Liver // Clin. Liver Dis. 2017. Vol. 21, № 1. P. 1–20.
- 6. Ameziane El Hassani R., Dupuy C. Detection of Intracellular Reactive Oxygen Species (CM-H2DCFDA) // BIO-PROTOCOL. 2013. Vol. 3.
- 7. Amoêdo N.D. et al. How does the metabolism of tumour cells differ from that of normal cells // Biosci. Rep. Portland Press Ltd., 2013. Vol. 33, № 6. P. e00080.
- 8. Amorati R. et al. Multi-faceted reactivity of alkyltellurophenols towards peroxyl radicals: Catalytic antioxidant versus thiol-depletion effect // Chem. A Eur. J. 2013. Vol. 19, N 23. P. 7510–7522.
- 9. Amorati R. et al. Organochalcogen substituents in phenolic antioxidants // Org. Lett. 2010. Vol. 12, № 10. P. 2326–2329.
- 10. An M.R. et al. Evidence for Posttranscriptional Regulation of C/EBP and C/EBP Isoform Expression during the Lipopolysaccharide-Mediated Acute-Phase Response † // Mol Cell Biol. 1996. Vol. 16, № 5. P. 2295–2306.
- 11. Ansari S.A., Morse R.H. Mechanisms of Mediator complex action in transcriptional activation // Cell. Mol. Life Sci. 2013. Vol. 70, № 15. P. 2743–2756.
- 12. Aouabdi S., Gibson G., Plant N. Transcriptional regulation of the PXR gene: identification and characterization of a functional peroxisome proliferator-activated receptor alpha binding site within the proximal promoter of PXR // Drug Metab. Dispos. 2006. Vol. 34, № 1. P. 138.
- 13. Aranda A., Pascual A. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression // Physiol. Rev. American Physiological Society, 2001. Vol. 81, № 3. P. 1269–1304.
- 14. Arefayene M. et al. Sequence diversity and functional characterization of the 59-regulatory region of human CYP2C19 // Pharmacogenetics. Lippincott Williams & Wilkins

- Pharmacogenetics, 2003. Vol. 13. P. 199-206.
- 15. Arnér E.S.J., Holmgren A. The thioredoxin system in cancer // Semin. Cancer Biol. 2006. Vol. 16, № 6. P. 420–426.
- 16. Ashida R. et al. CYP3A4 Gene Is a Novel Biomarker for Predicting a Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma // Cancer Genomics Proteomics. International Institute of Anticancer Research, 2017. Vol. 14, № 6. P. 445–453.
- 17. Baghaei K. et al. Isolation, differentiation, and characterization of mesenchymal stem cells from human bone marrow // Gastroenterol. Hepatol. from bed to bench. Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, 2017. Vol. 10, № 3. P. 208–213.
- 18. Barabas K. et al. Cisplatin: a review of toxicities and therapeutic applications // Vet. Comp. Oncol. John Wiley & Sons, Ltd, 2008. Vol. 6, № 1. P. 1–18.
- 19. Bardia A. et al. Efficacy of Antioxidant Supplementation in Reducing Primary Cancer Incidence and Mortality: Systematic Review and Meta-analysis // Mayo Clin. Proc. 2008. Vol. 83, № 1. P. 23–34.
- 20. Belakavadi M., Fondell J.D. Role of the Mediator complex in nuclear hormone receptor signaling // Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology / ed. Amara S.G. et al. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2006. P. 23–43.
- 21. Belic A. et al. Investigation of the CYP2C9 Induction Profile in Human Hepatocytes by Combining Experimental and Modelling Approaches // Curr. Drug Metab. 2010. Vol. 10. P. 1066–1074.
- 22. Berg D.A. et al. A Common Embryonic Origin of Stem Cells Drives Developmental and Adult Neurogenesis // Cell. 2019. Vol. 177, № 3. P. 654-668.e15.
- 23. Berg E.L. The future of phenotypic drug discovery // Cell Chem. Biol. 2021. Vol. 28, № 3. P. 424–430.
- 24. Berker K.I. et al. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents // Talanta. 2007. Vol. 72, № 3. P. 1157–1165.
- 25. Bernini R. et al. Synthesis and Structure/Antioxidant Activity Relationship of Novel Catecholic Antioxidant Structural Analogues to Hydroxytyrosol and Its Lipophilic Esters // J. Agric. Food Chem. American Chemical Society, 2012. Vol. 60, № 30. P. 7408–7416.
- 26. Bespalov V. et al. Antioxidant, Inhibits the Development of Spontaneous Tumors in Rats and Mice // Drug Res. 2016. Vol. 66, № 9. P. 489–494.
- 27. Bian M. et al. A Gold(I) Complex Containing an Oleanolic Acid Derivative as a Potential Anti-Ovarian-Cancer Agent by Inhibiting TrxR and Activating ROS-Mediated ERS // Chem. A Eur. J. John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 26, № 31. P. 7092–7108.

- 28. Bian M. et al. Targeting the Thioredoxin System as a Strategy for Cancer Therapy // J. Med. Chem. 2019. Vol. 62, № 16. P. 7309–7321.
- 29. Bibi Z. Role of cytochrome P450 in drug interactions // Nutr. Metab. (Lond). BioMed Central, 2008. Vol. 5. P. 27.
- 30. Bibi Z. Role of cytochrome P450 in drug interactions // Nutr. Metab. (Lond). 2008. Vol. 5, № 1. P. 27.
- 31. Bocé M. et al. Effect of trans(NO, OH)-[RuFT(Cl)(OH)NO](PF6) ruthenium nitrosyl complex on methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis // Sci. Rep. 2019. Vol. 9, № 1. P. 4867.
- 32. Bodin K. et al. Antiepileptic Drugs Increase Plasma Levels of 4β-Hydroxycholesterolin Humans: evidence for involmenent of cytochrome P450 3A4* // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, № 42. P. 38685–38689.
- 33. Bort R. et al. Role of hepatocyte nuclear factor 3γ in the expression of human CYP2C genes // Arch. Biochem. Biophys. 2004. Vol. 426, № 1. P. 63–72.
- 34. Bougen-Zhukov N. et al. Large-scale image-based screening and profiling of cellular phenotypes // Cytom. Part A. John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 91, № 2. P. 115–125.
- 35. Boveris A., Cadenas E., Stoppani A.O. Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide // Biochem. J. 1976. Vol. 156, № 2. P. 435–444.
- 36. Bray M.-A., Carpenter A. et al. Advanced Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening and Analysis. 2017. URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK126174/.
- 37. Bromfield J.J., Iacovides S.M. Evaluating lipopolysaccharide-induced oxidative stress in bovine granulosa cells // J. Assist. Reprod. Genet. 2017/09/02. Springer US, 2017. Vol. 34, № 12. P. 1619–1626.
- 38. Cai Y. et al. The role of hepatocyte RXRα in xenobiotic-sensing nuclear receptor-mediated pathways // Eur. J. Pharm. Sci. 2002. Vol. 15, № 1. P. 89–96.
- 39. Calkin A.C., Tontonoz P. Transcriptional integration of metabolism by the nuclear sterol-activated receptors LXR and FXR // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2012. Vol. 13, № 4. P. 213–224.
- 40. Cassel T.N., Gustafsson J.-Å., Nord M. CYP2B1 Is Regulated by C/EBPα and C/EBPδ in Lung Epithelial Cells // Mol. Cell Biol. Res. Commun. 2000. Vol. 3, № 1. P. 42–47.
- 41. Castro L. et al. Aconitases: Non-redox Iron–Sulfur Proteins Sensitive to Reactive Species // Acc. Chem. Res. American Chemical Society, 2019. Vol. 52, № 9. P. 2609–2619.
- 42. Chaudhary K.R., Batchu S.N., Seubert J.M. Cytochrome P450 enzymes and the heart // IUBMB Life. John Wiley & Sons, Ltd, 2009. Vol. 61, № 10. P. 954–960.
- 43. Chen L. et al. Self-Assembled Human Adipose-Derived Stem Cell-Derived Extracellular Vesicle-Functionalized Biotin-Doped Polypyrrole Titanium with Long-Term Stability

- and Potential Osteoinductive Ability // ACS Appl. Mater. Interfaces. American Chemical Society, 2019. Vol. 11, № 49. P. 46183–46196.
- 44. Chen R. et al. A functional angiotensin II receptor-GFP fusion protein: evidence for agonist-dependent nuclear translocation // Am. J. Physiol. Physiol. American Physiological Society, 2000. Vol. 279, № 3. P. F440–F448.
- 45. Chen X. et al. Molecular population genetics of human CYP3A locus: signatures of positive selection and implications for evolutionary environmental medicine // Environ. Health Perspect. 2009/06/18. National Institute of Environmental Health Sciences, 2009. Vol. 117, № 10. P. 1541–1548.
- 46. Chen Y. et al. Identification of Constitutive Androstane Receptor and Glucocorticoid Receptor Binding Sites in the CYP2C19 Promoter // Mol. Pharmacol. 2003. Vol. 64, № 2. P. 316.
- 47. Chen Y. et al. Induction of Human CYP2C9 by Rifampicin, Hyperforin, and Phenobarbital Is Mediated by the Pregnane X Receptor // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004. Vol. 308. P. 495–501.
- 48. Chen Y. et al. The nuclear receptors constitutive androstane receptor and pregnane X receptor cross-talk with hepatic nuclear factor 4α to synergistically activate the human CYP2C9 promoter // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005. Vol. 314, N_2 3. P. 1125–1133.
- 49. Chen Y., Goldstein J.A. The transcriptional regulation of the human CYP2C genes // Curr. Drug Metab. 2009/07/15. 2009. Vol. 10, № 6. P. 567–578.
- 50. Cheng G. et al. Mitochondria-targeted vitamin E analogs inhibit breast cancer cell energy metabolism and promote cell death // BMC Cancer. BioMed Central, 2013. Vol. 13. P. 285.
- 51. Cheng K.C. et al. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions. // J. Biol. Chem. 1992. Vol. 267, № 1. P. 166–172.
- 52. Choi J.M. et al. HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics // Arch. Pharm. Res. 2015. Vol. 38, № 5. P. 691–704.
- 53. Choi S.-Y., Koh K.H., Jeong H. Isoform-Specific Regulation of Cytochromes P450 Expression by Estradiol and Progesterone // Drug Metab. Dispos. 2013. Vol. 41, № 2. P. 263.
- 54. Cirillo L.A. et al. Opening of Compacted Chromatin by Early Developmental Transcription Factors HNF3 (FoxA) and GATA-4 // Mol. Cell. 2002. Vol. 9, № 2. P. 279–289.
- 55. Cizkova K. et al. Peroxisome proliferator-activated receptors in regulation of cytochromes P450: new way to overcome multidrug resistance? // J. Biomed. Biotechnol. 2012/10/21. Hindawi Publishing Corporation, 2012. Vol. 2012. P. 656428.
- 56. Cockfield J.A., Schafer Z.T. Antioxidant Defenses: A Context-Specific Vulnerability of Cancer Cells // Cancers (Basel). MDPI, 2019. Vol. 11, № 8. P. 1208.
 - 57. Coelho C. et al. Analysis of cell cycle and replication of mouse macrophages after in

- vivo and in vitro Cryptococcus neoformans infection using laser scanning cytometry // Infect. Immun. 2012/01/17. American Society for Microbiology, 2012. Vol. 80, № 4. P. 1467–1478.
- 58. Coons A.H., Kaplan M.H. Localization of antigen in tissue cells; improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody // J. Exp. Med. The Rockefeller University Press, 1950. Vol. 91, № 1. P. 1–13.
- 59. Costanzo V., Costanzo M. Intravital Imaging with Two-Photon Microscopy: A Look into the Kidney // Photonics. MDPI, 2022. Vol. 9, № 294. P. 1–15.
- 60. Coulter C. V et al. Mitochondrially targeted antioxidants and thiol reagents // Free Radic. Biol. Med. 2000. Vol. 28, № 10. P. 1547–1554.
- 61. Creed S., McKenzie M. Measurement of mitochondrial membrane potential with the fluorescent dye tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) // Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc., 2019. Vol. 1928. P. 69–76.
- 62. Croom E. Chapter Three Metabolism of Xenobiotics of Human Environments // Progress in Molecular Biology and Translational Science / ed. Hodgson E. Academic Press, 2012. Vol. 112. P. 31–88.
- 63. Debela D.T. et al. New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives // SAGE Open Med. SAGE Publications, 2021. Vol. 9. P. 205031212110343.
- 64. DeBiasio R. et al. Five-parameter fluorescence imaging: wound healing of living Swiss 3T3 cells // J. Cell Biol. The Rockefeller University Press, 1987. Vol. 105, № 4. P. 1613–1622.
- 65. Demorais S.M.F. et al. Gene Structure and Upstream Regulatory Regions of Human CYP2C9 and CYP2C18 // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1993. Vol. 194, № 1. P. 194–201.
- 66. Descombes P., Schibler U. A liver-enriched transcriptional activator protein, LAP, and a transcriptional inhibitory protein, LIP, are translated from the sam mRNA // Cell. 1991. Vol. 67, № 3. P. 569–579.
- 67. Di L., Kerns E.H. Chapter 9 Transporters // Drug-Like Properties (Second Edition) / ed. Di L., Kerns E.H. Boston: Academic Press, 2016. P. 113–140.
- 68. Donato M., Tolosa L. High-Content Screening for the Detection of Drug-Induced Oxidative Stress in Liver Cells // Antioxidants. MDPI, 2021. Vol. 10, № 1. P. 106.
- 69. Drocourt L. et al. Expression of CYP3A4, CYP2B6, and CYP2C9 is regulated by the vitamin D receptor pathway in primary human hepatocytes // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277, № 28. P. 25125–25132.
- 70. Drocourt L. et al. Expression of CYP3A4, CYP2B6, andCYP2C9 Is Regulated by the Vitamin D Receptor Pathway in Primary Human Hepatocytes* // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277, № 28. P. 25125–25132.
 - 71. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function // Physiol. Rev.

- American Physiological Society, 2002. Vol. 82, № 1. P. 47–95.
- 72. Du Y. et al. Oligonucleotide-selenide conjugate: Synthesis and its inducible sequence-specific alkylation of DNA // Bioorg. Med. Chem. 2010. Vol. 18, № 11. P. 4149–4153.
- 73. Eggert D. et al. Visualization and Analysis of Hepatitis C Virus Structural Proteins at Lipid Droplets by Super-Resolution Microscopy // PLoS One. 2014. Vol. 9. P. e102511.
- 74. Ekström L. et al. miRNA-27b levels are associated with CYP3A activity in vitro and in vivo // Pharmacol. Res. Perspect. John Wiley and Sons Inc., 2015. Vol. 3, № 6. P. e00192–e00192.
- 75. Englert N.A. et al. Epigenetic modification of histone 3 lysine 27: Mediator subunit MED25 is required for the dissociation of polycomb repressive complex 2 from the promoter of cytochrome P450 2C9 // J. Biol. Chem. American Society for Biochemistry and Molecular Biology Inc., 2015. Vol. 290, № 4. P. 2264–2278.
- 76. Eremina J.A. et al. Cu(II), Co(II), Mn(II) complexes with 5-phenyltetrazole and polypyridyl ligands: Synthesis, characterization and evaluation of the cytotoxicity and antimicrobial activity // Polyhedron. Elsevier Ltd, 2021. Vol. 206.
- 77. Eremina J.A. et al. Synthesis and crystal structures of cytotoxic mixed-ligand copper(II) complexes with alkyl tetrazole and polypyridine derivatives // Inorganica Chim. Acta. Elsevier S.A., 2021. Vol. 516.
- 78. Eremina J.A. et al. Synthesis, crystal structures, spectroscopic, and cytotoxicity study of Cu(II), Co(II), Ni(II) and Pd(II) complexes with 2-anilinomethylidene-5,5-dimethylcyclohexane-1,3-dione // Polyhedron. 2020. Vol. 178.
- 79. Esteves F., Rueff J., Kranendonk M. The Central Role of Cytochrome P450 in Xenobiotic Metabolism—A Brief Review on a Fascinating Enzyme Family // J. Xenobiotics. MDPI AG, 2021. Vol. 11, № 3. P. 94–114.
- 80. Fang A.P. et al. Serum copper and zinc levels at diagnosis and hepatocellular carcinoma survival in the Guangdong Liver Cancer Cohort // Int. J. Cancer. Wiley-Liss Inc., 2019. Vol. 144, № 11. P. 2823–2832.
- 81. Farahani N., Monteith C.E. The coming paradigm shift: A transition from manual to automated microscopy // J. Pathol. Inform. Medknow Publications & Media Pvt Ltd, 2016. Vol. 7. P. 35.
- 82. Farzaliev V.M., Fernando W.S.E., Scott G. Mechanisms of antioxidant action: Autosynergistic behaviour of sulphur-containing phenols // Eur. Polym. J. 1978. Vol. 14, № 10. P. 785–788.
- 83. Fenner K.S. et al. The evolution of the OATP hepatic uptake transport protein family in DMPK sciences: From obscure liver transporters to key determinants of hepatobiliary clearance // Xenobiotica. Informa Healthcare, 2012. Vol. 42, № 1. P. 28–45.

- 84. Ferguson S.S. et al. Regulation of Human CYP2C9 by the Constitutive Androstane Receptor: Discovery of a New Distal Binding Site // Mol. Pharmacol. 2002. Vol. 62, № 3. P. 737.
- 85. Flohé L. Looking Back at the Early Stages of Redox Biology // Antioxidants (Basel, Switzerland). MDPI, 2020. Vol. 9, № 12. P. 1254.
- 86. Forman H.J., Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy // Nat. Rev. Drug Discov. 2021. Vol. 20, № 9. P. 689–709.
- 87. Fradette C., Yamaguchi N., Du Souich P. 5-Hydroxytryptamine is biotransformed by CYP2C9, 2C19 and 2B6 to hydroxylamine, which is converted into nitric oxide // Br. J. Pharmacol. 2004/01/12. 2004. Vol. 141, № 3. P. 407–414.
- 88. Frank C. et al. Identification of Pregnane X Receptor Binding Sites in the Regulatory Regions of Genes Involved in Bile Acid Homeostasis // J. Mol. Biol. 2005. Vol. 346, № 2. P. 505–519.
- 89. Friedman R.C. et al. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs // Genome Res. 2008/10/27. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2009. Vol. 19, № 1. P. 92–105.
- 90. Fu Y. et al. Circulating vitamin C concentration and risk of cancers: a Mendelian randomization study // BMC Med. BioMed Central, 2021. Vol. 19, № 1. P. 171.
- 91. Fujino C., Sanoh S., Katsura T. Variation in Expression of Cytochrome P450 3A Isoforms and Toxicological Effects: Endo- and Exogenous Substances as Regulatory Factors and Substrates // Biol. Pharm. Bull. 2021. Vol. 44, № 11. P. 1617–1634.
- 92. Gasser G., Ott I., Metzler-Nolte N. Organometallic Anticancer Compounds // J. Med. Chem. American Chemical Society, 2011. Vol. 54, № 1. P. 3–25.
- 93. Gellner K. et al. Genomic organization of the human CYP3A locus: identification of a new, inducible CYP3A gene // Pharmacogenet. Genomics. 2001. Vol. 11, № 2.
- 94. Gerbal-Chaloin S. et al. Transcriptional Regulation of CYP2C9 Gene: Role of Glucocorticoid Receptor and Constitutive Androstane Receptor // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277, № 1. P. 209–217.
- 95. Gerth K. et al. Circulating extracellular vesicles containing xenobiotic metabolizing CYP enzymes and their potential roles in extrahepatic cells via cell–cell interactions // Int. J. Mol. Sci. MDPI AG, 2019. Vol. 20, № 24.
- 96. Giordano M.E., Caricato R., Lionetto M.G. Concentration dependence of the antioxidant and prooxidant activity of trolox in hela cells: Involvement in the induction of apoptotic volume decrease // Antioxidants. MDPI AG, 2020. Vol. 9, № 11. P. 1–12.
- 97. Giuliano K.A. et al. Fluorescent Protein Biosensors: Measurement of Molecular Dynamics in Living Cells // Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. Annual Reviews, 1995. Vol. 24, № 1. P. 405–434.
 - 98. Giuliano K.A., Taylor D.L. Fluorescent-protein biosensors: New tools for drug

- discovery // Trends Biotechnol. 1998. Vol. 16, № 3. P. 135–140.
- 99. Givens R.C. et al. CYP3A5 genotype predicts renal CYP3A activity and blood pressure in healthy adults // J. Appl. Physiol. American Physiological Society, 2003. Vol. 95, № 3. P. 1297–1300.
- 100. Goldstein J., de Morais S. Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C subfamily // Pharmacogenetics. 1994. Vol. 4, № 6. P. 285–299.
- 101. Goldstein J.A. Clinical relevance of genetic polymorphisms in the human CYP2C subfamily // Br. J. Clin. Pharmacol. 2001. Vol. 52, № 4. P. 349–355.
- 102. Goodwin B., Hodgson E., Liddle C. The Orphan Human Pregnane X Receptor Mediates the Transcriptional Activation of CYP3A4 by Rifampicin through a Distal Enhancer Module // Mol. Pharmacol. 1999. Vol. 56, № 6. P. 1329.
- 103. Gordon Gibson G. et al. Transcriptional Regulation of the Human Pregnane-X Receptor // Drug Metab. Rev. Taylor & Francis, 2006. Vol. 38, № 1–2. P. 31–49.
- 104. Grisar J.M. et al. A cardioselective, hydrophilic N,N,N-trimethylethanaminium .alpha.-tocopherol analog that reduces myocardial infarct size // J. Med. Chem. American Chemical Society, 1991. Vol. 34, № 1. P. 257–260.
- 105. Gruber C.J. et al. Anatomy of the estrogen response element // Trends Endocrinol. Metab. 2004. Vol. 15, № 2. P. 73–78.
- 106. Gundert-Remy U. et al. Extrahepatic metabolism at the body's internal-external interfaces // Drug Metab. Rev. Informa Healthcare, 2014. Vol. 46, № 3. P. 291–324.
- 107. Guo C. et al. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases // Neural Regen. Res. Medknow Publications & Media Pvt Ltd, 2013. Vol. 8, № 21. P. 2003–2014.
- 108. Han S.S. et al. Histological analysis of in vitro co-culture and in vivo mice cotransplantation of stem cell-derived adipocyte and osteoblast // Tissue Eng. Regen. Med. Kluwer Academic Publishers, 2016. Vol. 13, № 3. P. 227–234.
- 109. Hato S. V et al. Molecular pathways: The immunogenic effects of platinum-based chemotherapeutics // Clin. Cancer Res. 2014. Vol. 20, № 11. P. 2831–2837.
- 110. Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T., Tew K.D. Oxidative Stress in Cancer // Cancer Cell. 2020/07/09. 2020. Vol. 38, № 2. P. 167–197.
- 111. Herpers B., van de Water B. High Content Imaging-Based Screening for Cellular Toxicity Pathways // High-Throughput Screening Methods in Toxicity Testing. 2013. P. 143–157.
- 112. Hirota T., Eguchi S., Ieiri I. Impact of Genetic Polymorphisms in CYP2C9 and CYP2C19 on the Pharmacokinetics of Clinically Used Drugs // Drug Metab. Pharmacokinet. 2013. Vol. 28, № 1. P. 28–37.
 - 113. Honda A. et al. Cholesterol 25-hydroxylation activity of CYP3A // J. Lipid Res. 2011.

- Vol. 52, № 8. P. 1509–1516.
- 114. Hordyjewska A., Popiołek Ł., Kocot J. The many "faces" of copper in medicine and treatment // Biometals. 2014/04/20. Springer Netherlands, 2014. Vol. 27, № 4. P. 611–621.
- 115. Hu N. et al. Increased Levels of Fatty Acids Contributed to Induction of Hepatic CYP3A4 Activity Induced by Diabetes In Vitro Evidence From HepG2 Cell and Fa2N-4 Cell Lines // J. Pharmacol. Sci. 2014. Vol. 124, № 4. P. 433–444.
- 116. Huang D., Ou B., Prior R.L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays // J. Agric. Food Chem. American Chemical Society, 2005. Vol. 53, № 6. P. 1841–1856.
- 117. Huber R. et al. Regulation of C/EBP β and resulting functions in cells of the monocytic lineage // Cell. Signal. 2012. Vol. 24, No 6. P. 1287–1296.
- 118. Hwang-Verslues W.W., Sladek F.M. HNF4α--role in drug metabolism and potential drug target? // Curr. Opin. Pharmacol. 2010. Vol. 10, № 6. P. 698–705.
- 119. Inoue J. et al. PPARalpha gene expression is up-regulated by LXR and PXR activators in the small intestine // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2008. Vol. 371, № 4. P. 675–678.
- 120. Istrate M.A. et al. Regulation of CYP3A4 by pregnane X receptor: The role of nuclear receptors competing for response element binding // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2010. Vol. 393, № 4. P. 688–693.
 - 121. Jancova P. Phase II Drug Metabolism // Top. Drug Metab. InTech. 2012. P. 35–60.
- 122. Jensen E. Technical Review: In Situ Hybridization // Anat. Rec. John Wiley & Sons, Ltd, 2014. Vol. 297, № 8. P. 1349–1353.
- 123. Johnson C.H. et al. Xenobiotic metabolomics: Major impact on the metabolome // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2012. Vol. 52. P. 37–56.
- 124. Johnson-Cadwell L.I. et al. 'Mild Uncoupling' does not decrease mitochondrial superoxide levels in cultured cerebellar granule neurons but decreases spare respiratory capacity and increases toxicity to glutamate and oxidative stress // J. Neurochem. John Wiley & Sons, Ltd, 2007. Vol. 101, № 6. P. 1619–1631.
- 125. Jover R. et al. Down-regulation of human CYP3A4 by the inflammatory signal interleukin-6: molecular mechanism and transcription factors involved. // FASEB J. 2002. Vol. 16, № 13. P. 1799–1801.
- 126. Jover R. et al. Re-expression of C/EBPα induces CYP2B6, CYP2C9 and CYP2D6 genes in HepG2 cells // FEBS Lett. John Wiley & Sons, Ltd, 1998. Vol. 431, № 2. P. 227–230.
- 127. Jurutka P.W. et al. Molecular and functional comparison of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and the novel vitamin D receptor ligand, lithocholic acid, in activating transcription of cytochrome P450 3A4 // J. Cell. Biochem. John Wiley & Sons, Ltd, 2005. Vol. 94, № 5. P. 917–943.
 - 128. Justenhoven C. et al. The postmenopausal hormone replacement therapy-related breast

- cancer risk is decreased in women carrying the CYP2C19*17 variant // Breast Cancer Res. Treat. 2012. Vol. 131, № 1. P. 347–350.
- 129. Kacevska M. et al. DNA methylation dynamics in the hepatic CYP3A4 gene promoter // Biochimie. 2012. Vol. 94, № 11. P. 2338–2344.
- 130. Kandalintseva N. V, Trubnikova Y.N., Prosenko A.E. New Approaches to the Development of Biologically Active Water-Soluble Antioxidants // Chem. Sustain. Dev. 2011. № 19. P. 545–555.
- 131. Kandalintseva N. V. Poliyfunctional hydrophilic antioxidants from molecular design to particular application // Acta Biomed. Sci. Scientific Center for Family Problems and Human Reproduction, 2017. Vol. 1, № 3. P. 150–154.
- 132. Kapałczyńska M. et al. 2D and 3D cell cultures a comparison of different types of cancer cell cultures // Arch. Med. Sci. 2016/11/18. Termedia Publishing House, 2018. Vol. 14, № 4. P. 910–919.
- 133. Kathuria A., Roosan M., Sharma A. CYP2C9 Polymorphism and Use of Oral Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. 2021.
- 134. Kaur G., Dufour J.M. Cell lines: Valuable tools or useless artifacts // Spermatogenesis. Landes Bioscience, 2012. Vol. 2, № 1. P. 1–5.
- 135. Kemeleva E.A. et al. New promising antioxidants based on 2,6-dimethylphenol // Russ. J. Bioorganic Chem. 2008. Vol. 34, № 4. P. 499–509.
- 136. Kholshin S. V et al. Synthesis of new selenium-containing analogs of phenozan acid // Izv. Akad. Nauk. Seriya Khimicheskaya. 2019. Vol. 68, № 12. P. 2374–2376.
- 137. Kida K. et al. PPAR α Is Regulated by miR-21 and miR-27b in Human Liver // Pharm. Res. 2011. Vol. 28, No 10. P. 2467–2476.
- 138. Kim J.Y. et al. Histone Deacetylase Inhibitor Stimulate CYP3A4 Proximal Promoter Activity in HepG2 Cells // Arch Pharm Res. 2004. Vol. 27, № 4. P. 407–414.
- 139. Kliewer S.A., Willson T.M. Regulation of xenobiotic and bile acid metabolism by the nuclear pregnane X receptor // J. Lipid Res. 2002. Vol. 43, № 3. P. 359–364.
- 140. Klyushova L.S., Kandalintseva N. V., Grishanova A.Y. Antioxidant Activity of New Sulphur- and Selenium-Containing Analogues of Potassium Phenosan against H2O2-Induced Cytotoxicity in Tumour Cells // Curr. Issues Mol. Biol. 2022. Vol. 44, № 7. P. 3131–3145.
- 141. Knights K.M., Rowland A., Miners J.O. Renal drug metabolism in humans: the potential for drug-endobiotic interactions involving cytochrome P450 (CYP) and UDP-glucuronosyltransferase (UGT) // Br. J. Clin. Pharmacol. Blackwell Science Inc, 2013. Vol. 76, № 4. P. 587–602.
 - 142. Koppenol W.H. The centennial of the Fenton reaction // Free Radic. Biol. Med. 1993.

- Vol. 15, № 6. P. 645–651.
- 143. Koukouritaki S.B. et al. Developmental Expression of Human Hepatic CYP2C9 and CYP2C19 // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004. Vol. 308, № 3. P. 965.
- 144. Kozlov S.S. et al. Effects of low concentrations of synthetic antioxidant phenosan potassium salt on the thermoinduced structural transitions in the protein component of plasma membranes // Dokl. Biochem. Biophys. Maik Nauka Publishing / Springer SBM, 2014. Vol. 459, № 1. P. 190–193.
- 145. Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function // Nucleic Acids Res. 2019. Vol. 47, № D1. P. D155–D162.
- 146. Kuchino Y. et al. Misreading of DNA templates containing 8-hydroxydeoxyguanosine at the modified base and at adjacent residues // Nature. 1987. Vol. 327, № 6117. P. 77–79.
- 147. Kugler N., Klein K., Zanger U.M. MiR-155 and other microRNAs downregulate drug metabolizing cytochromes P450 in inflammation // Biochem. Pharmacol. 2020. Vol. 171. P. 113725.
- 148. Lambeth J.D. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen // Nature Reviews Immunology. Nature Publishing Group, 2004. Vol. 4, № 3. P. 181–189.
- 149. Lang P. et al. Cellular imaging in drug discovery // Nat. Rev. Drug Discov. Nature Publishing Group, 2006. Vol. 5, № 4. P. 343–356.
- 150. Lankin V.Z. et al. Concentration-dependent inversion of antioxidant and prooxidant effects of β-carotene in tissuesin vivo // Bull. Exp. Biol. Med. 1999. Vol. 128, № 3. P. 930–932.
- 151. Lebedeva I. V, Pande P., Patton W.F. Sensitive and specific fluorescent probes for functional analysis of the three major types of mammalian ABC transporters // PLoS One. 2011/07/22. Public Library of Science, 2011. Vol. 6, № 7. P. e22429–e22429.
- 152. Lee K.-B. et al. Transcription-coupled and DNA damage-dependent ubiquitination of RNA polymerase II in vitro // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2002/03/19. National Academy of Sciences, 2002. Vol. 99, № 7. P. 4239–4244.
- 153. Leeder J.S. et al. Variability of CYP3A7 Expression in Human Fetal Liver // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005. Vol. 314, № 2. P. 626.
- 154. Lehmann J.M. et al. The Human Orphan Nuclear Receptor PXR Is Activated by Compounds That Regulate CYP3A4 Gene Expression and Cause Drug Interactions nuclear receptor orphan receptor transcription factor cytochrome P450 3A drug interactions // J. Clin. Invest. 1998. Vol. 102, № 5. 1016–1023 p.
- 155. Leijen S. et al. Phase I/II study with ruthenium compound NAMI-A and gemcitabine in patients with non-small cell lung cancer after first line therapy // Invest. New Drugs. 2015. Vol. 33, № 1. P. 201–214.
 - 156. Lelièvre P. et al. The Multifaceted Roles of Copper in Cancer: A Trace Metal Element

- with Dysregulated Metabolism, but Also a Target or a Bullet for Therapy // Cancers (Basel). MDPI, 2020. Vol. 12, № 12. P. 3594.
- 157. Li D. et al. Hepatic hypoxia-inducible factors inhibit PPAR α expression to exacerbate acetaminophen induced oxidative stress and hepatotoxicity // Free Radic. Biol. Med. 2017. Vol. 110. P. 102–116.
- 158. Li D. et al. Regulation of cytochrome P450 expression by microRNAs and long noncoding RNAs: Epigenetic mechanisms in environmental toxicology and carcinogenesis // J. Environ. Sci. Health. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 2019/07/15. 2019. Vol. 37, № 3. P. 180–214.
- 159. Li G. et al. Effect of CYP3A4 Inhibitors and Inducers on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Saxagliptin and Active Metabolite M2 in Humans Using Physiological-Based Pharmacokinetic Combined DPP-4 Occupancy // Front. Pharmacol. 2021. Vol. 12.
- 160. Li T., Chiang J.Y.L. Rifampicin induction of CYP3A4 requires pregnane X receptor cross talk with hepatocyte nuclear factor 4alpha and coactivators, and suppression of small heterodimer partner gene expression // Drug Metab. Dispos. 2006. Vol. 34, № 5. P. 756–764.
- 161. Li Y. et al. Post-Diagnosis use of Antioxidant Vitamin Supplements and Breast Cancer Prognosis: A Systematic Review and Meta-Analysis // Clin. Breast Cancer. 2021. Vol. 21, № 6. P. 477–485.
- 162. Lin A. et al. 3D cell culture models and organ-on-a-chip: Meet separation science and mass spectrometry // Electrophoresis. John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 41, № 1–2. P. 56–64.
- 163. Lin S. et al. Image-based high-content screening in drug discovery // Drug Discov. Today. 2020. Vol. 25, № 8. P. 1348–1361.
- 164. Liochev S.I. Commentary: The Role of Iron-Sulfur Clusters in in vivo Hydroxyl Radical Production // Free Radic. Res. Taylor & Francis, 1996. Vol. 25, № 5. P. 369–384.
- 165. Liron Y. et al. Laser autofocusing system for high-resolution cell biological imaging // J. Microsc. John Wiley & Sons, Ltd, 2006. Vol. 221, № 2. P. 145–151.
- 166. Liu F.J. et al. The far and distal enhancers in the CYP3A4 gene co-ordinate the proximal promoter in responding similarly to the pregnane X receptor but differentially to hepatocyte nuclear factor- 4α // Biochem. J. 2008. Vol. 409, No 1. P. 243–250.
- 167. Liu T. et al. Two Novel Lipophilic Antioxidants Derivatized from Curcumin // Antioxidants. 2022. Vol. 11, № 4. P. 796.
- 168. Lolodi O. et al. Differential Regulation of CYP3A4 and CYP3A5 and its Implication in Drug Discovery // Curr. Drug Metab. 2017. Vol. 18, № 12. P. 1095–1105.
- 169. Lu C., Di L. In vitro and in vivo methods to assess pharmacokinetic drug- drug interactions in drug discovery and development // Biopharmaceutics and Drug Disposition. John Wiley

- and Sons Ltd, 2020. Vol. 41, № 1–2. P. 3–31.
- 170. Luc P.-V.T. et al. Transcriptional regulation of the CYP2B1 and CYP2B2 genes by C/EBP-related proteins // Biochem. Pharmacol. 1996. Vol. 51, № 3. P. 345–356.
- 171. Makhinya A.N. et al. Cytotoxicity and Crystal Structures of Nitrosoruthenium Complexes mer-[Ru(NO)Py2Cl3] and mer-[Ru(NO)(γ-Pic)2Cl3] // ChemistrySelect. 2019. Vol. 4, № 19.
- 172. Mancio-Silva L. et al. Improving Drug Discovery by Nucleic Acid Delivery in Engineered Human Microlivers // Cell Metab. Cell Press, 2019. Vol. 29, № 3. P. 727-735.e3.
- 173. Manz D.H. et al. Iron and cancer: recent insights // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2016/02/18. 2016. Vol. 1368, № 1. P. 149–161.
- 174. Marinho H.S. et al. Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors // Redox Biol. Elsevier, 2014. Vol. 2. P. 535–562.
- 175. Martignoni M., Groothuis G.M.M., de Kanter R. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction // Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. Taylor & Francis, 2006. Vol. 2, № 6. P. 875–894.
- 176. Martínez-Jiménez C.P. et al. Transcriptional activation of CYP2C9, CYP1A1, and CYP1A2 by hepatocyte nuclear factor 4alpha requires coactivators peroxisomal proliferator activated receptor-gamma coactivator 1alpha and steroid receptor coactivator 1 // Mol. Pharmacol. 2006. Vol. 70, № 5. P. 1681.
- 177. Martínez-Jiménez C.P. et al. Transcriptional regulation of the human hepatic CYP3A4: Identification of a new distal enhancer region responsive to CCAAT/enhancer-binding protein β isoforms (liver activating protein and liver inhibitory protein) // Mol. Pharmacol. 2005. Vol. 67, No 6. P. 2088–2101.
- 178. Marwick J.A. et al. Application of a High-Content Screening Assay Utilizing Primary Human Lung Fibroblasts to Identify Antifibrotic Drugs for Rapid Repurposing in COVID-19 Patients // SLAS Discov. Adv. life Sci. R D. 2021/06/02. SAGE Publications, 2021. Vol. 26, № 9. P. 1091–1106.
 - 179. Masters B. The Development of Fluorescence Microscopy. 2010.
- 180. Masuri S. et al. Copper(II) Phenanthroline-Based Complexes as Potential AntiCancer Drugs: A Walkthrough on the Mechanisms of Action // Molecules. MDPI, 2021. Vol. 27, № 1. P. 49.
- 181. McNamara G., Difilippantonio M.J., Ried T. Microscopy and image analysis // Curr. Protoc. Hum. Genet. 2005. Vol. Chapter 4. P. Unit-4.4.
- 182. Meier H. et al. Reactions of sulfur containing phenolic antioxidants for elastomers // Phosphorus, Sulfur Silicon Relat. Elem. Taylor and Francis Ltd., 1999. Vol. 153–154. P. 275–300.
 - 183. Michaelis U.R. et al. Cytochrome P4502C9-Derived Epoxyeicosatrienoic Acids Induce

- the Expression of Cyclooxygenase-2 in Endothelial Cells // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. American Heart Association, 2005. Vol. 25, № 2. P. 321–326.
- 184. Miller E.R. et al. Meta-Analysis: High-Dosage Vitamin E Supplementation May Increase All-Cause Mortality // Ann. Intern. Med. American College of Physicians, 2005. Vol. 142, № 1. P. 37–46.
- 185. Mitra K. et al. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009/07/15. National Academy of Sciences, 2009. Vol. 106, № 29. P. 11960–11965.
- 186. Moffat J. et al. Opportunities and challenges in phenotypic drug discovery: An industry perspective // Nat. Rev. Drug Discov. 2017. Vol. 16.
- 187. Monostory K. et al. Hormonal regulation of CYP1A expression // Drug Metab. Rev. Taylor & Francis, 2009. Vol. 41, № 4. P. 547–572.
- 188. Moradi-Joo M. et al. Antioxidant supplements and breast cancer: A systematic review and meta-analysis // Int. J. Cancer Manag. KOWSAR Medical Publishing Company, 2018. Vol. 11, № 4. P. 1–11.
- 189. Munro A.W. et al. What makes a P450 tick? // Trends Biochem. Sci. 2013. Vol. 38, № 3. P. 140–150.
- 190. Murray M., Zhou F. Trafficking and other regulatory mechanisms for organic anion transporting polypeptides and organic anion transporters that modulate cellular drug and xenobiotic influx and that are dysregulated in disease // Br. J. Pharmacol. 2017/04/24. John Wiley and Sons Inc., 2017. Vol. 174, № 13. P. 1908–1924.
- 191. Mwinyi J. et al. New Insights into the Regulation of CYP2C9 Gene Expression: The Role of the Transcription Factor GATA-4 // Drug Metab. Dispos. 2009. Vol. 38. P. 415–421.
- 192. Mwinyi J. et al. Regulation of CYP2C19 Expression by Estrogen Receptor α : Implications for Estrogen-Dependent Inhibition of Drug Metabolism // Mol. Pharmacol. 2010. Vol. 78, N_{\odot} 5. P. 886.
- 193. Mwinyi J. et al. The ligands of estrogen receptor α regulate cytochrome P4502C9 (CYP2C9) expression // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2011. Vol. 338, № 1. P. 302–309.
- 194. Mwinyi J. et al. The Ligands of Estrogen Receptor α Regulate Cytochrome P4502C9 (CYP2C9) Expression // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2011. Vol. 338, № 1. P. 302.
- 195. Mwinyi J. et al. The transcription factor GATA-4 regulates cytochrome P4502C19 gene expression // Life Sci. 2010. Vol. 86, № 19. P. 699–706.
- 196. Nasulewicz A., Mazur A., Opolski A. Role of copper in tumour angiogenesis—clinical implications // J. Trace Elem. Med. Biol. 2004. Vol. 18, № 1. P. 1–8.
 - 197. Ndagi U., Mhlongo N., Soliman M.E. Metal complexes in cancer therapy an update

- from drug design perspective // Drug Des. Devel. Ther. Dove Medical Press, 2017. Vol. 11. P. 599–616.
- 198. Neha K. et al. Medicinal prospects of antioxidants: A review // Eur. J. Med. Chem. 2019. Vol. 178. P. 687–704.
- 199. Nekvindova J. et al. Hepatocellular carcinoma: Gene expression profiling and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochromes P450 // Biochem. Pharmacol. 2020. Vol. 177. P. 113912.
- 200. Ng V.Y. et al. Cytochrome P450 Eicosanoids are Activators of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α // Drug Metab. Dispos. 2007. Vol. 35, № 7. P. 1126.
- 201. Nishida N. et al. Reactive Oxygen Species Induce Epigenetic Instability through the Formation of 8-Hydroxydeoxyguanosine in Human Hepatocarcinogenesis // Dig. Dis. 2013. Vol. 31, N_{\odot} 5–6. P. 459–466.
- 202. Nisimoto Y. et al. Nox4: a hydrogen peroxide-generating oxygen sensor // Biochemistry. 2014/08/01. American Chemical Society, 2014. Vol. 53, № 31. P. 5111–5120.
- 203. Niwa T. et al. Comparison of steroid hormone hydroxylation mediated by cytochrome P450 3A subfamilies // Arch. Biochem. Biophys. 2020. Vol. 682. P. 108283.
- 204. Novikov V.E., Levchenkova O.S., Pozhilova Y.V. Role of reactive oxygen species in cell physiology and pathology and their pharmacological regulation // Rev. Clin. Pharmacol. Drug Ther. 2014. Vol. 12, № 4. P. 13–21.
- 205. O'Brien P.J. et al. High concordance of drug-induced human hepatotoxicity with in vitro cytotoxicity measured in a novel cell-based model using high content screening // Arch. Toxicol. 2006. Vol. 80, № 9. P. 580–604.
- 206. O'Connor K.M. et al. Inhibition of DNA methylation in proliferating human lymphoma cells by immune cell oxidants // J. Biol. Chem. 2020. Vol. 295, № 23. P. 7839–7848.
- 207. Oda Y. et al. Retinoid X receptor α in human liver is regulated by miR-34a // Biochem. Pharmacol. 2014. Vol. 90, № 2. P. 179–187.
- 208. Oh J.-W. et al. High-Content Analysis-Based Sensitivity Prediction and Novel Therapeutics Screening for c-Met-Addicted Glioblastoma // Cancers (Basel). MDPI, 2021. Vol. 13, № 3. P. 372.
- 209. Ohtsuki S. et al. Simultaneous Absolute Protein Quantification of Transporters, Cytochromes P450, and UDP-Glucuronosyltransferases as a Novel Approach for the Characterization of Individual Human Liver: Comparison with mRNA Levels and Activities // Drug Metab. Dispos. 2012. Vol. 40, № 1. P. 83.
- 210. Oliver K.M. et al. Hypoxia activates NF-κB-dependent gene expression through the canonical signaling pathway // Antioxidants Redox Signal. 2009. Vol. 11, № 9. P. 2057–2064.
 - 211. Ourlin J.C. et al. The small heterodimer partner interacts with the pregnane X receptor

- and represses its transcriptional activity // Mol. Endocrinol. 2003. Vol. 17, № 9. P. 1693–1703.
- 212. Palmina N.P. et al. Dose dependences of lipid microviscosity of biological membranes induced by synthetic antioxidant potassium phenosan salt // Dokl. Biochem. Biophys. 2012. Vol. 443, N_2 1. P. 100–104.
- 213. Pan X., Lee Y.-K., Jeong H. Farnesoid X Receptor Agonist Represses Cytochrome P450 2D6 Expression by Upregulating Small Heterodimer Partner // Drug Metab. Dispos. 2015/04/29. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2015. Vol. 43, № 7. P. 1002–1007.
- 214. Pan Y.-Z., Gao W., Yu A.-M. MicroRNAs Regulate CYP3A4 Expression via Direct and Indirect Targeting // Drug Metab. Dispos. 2009. Vol. 37, № 10. P. 2112.
- 215. Panigrahy D. et al. Cytochrome P450-derived eicosanoids: the neglected pathway in cancer // Cancer Metastasis Rev. Springer US, 2010. Vol. 29, № 4. P. 723–735.
- 216. Park Y.J. et al. Opposing regulation of cytochrome P450 expression by CAR and PXR in hypothyroid mice // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2012. Vol. 263, № 2. P. 131–137.
- 217. Parohan M. et al. Dietary total antioxidant capacity and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis on observational studies // Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2019. Vol. 138. P. 70–86.
- 218. Pascussi J.-M. et al. Dexamethasone Induces Pregnane X Receptor and Retinoid X Receptor-α Expression in Human Hepatocytes: Synergistic Increase of CYP3A4 Induction by Pregnane X Receptor Activators // Mol. Pharmacol. 2000. Vol. 58, № 2. P. 361.
- 219. Pattison D.I., Davies M.J., Hawkins C.L. Reactions and reactivity of myeloperoxidase-derived oxidants: Differential biological effects of hypochlorous and hypothiocyanous acids // Free Radic. Res. Taylor & Francis, 2012. Vol. 46, № 8. P. 975–995.
- 220. Pavek P., Dvorak Z. Xenobiotic-Induced Transcriptional Regulation of Xenobiotic Metabolizing Enzymes of the Cytochrome P450 Superfamily in Human Extrahepatic Tissues // Curr. Drug Metab. 2008. Vol. 9. P. 129–143.
- 221. Pena F.J. et al. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen–thawed boar spermatozoa // Int. J. Androl. John Wiley & Sons, Ltd, 2005. Vol. 28, № 2. P. 107–114.
- 222. Petit J.-M., Denis-Gay M., Ratinaud M.-H. Assessment of fluorochromes for cellular structure and function studies by flow cytometry // Biol. Cell. John Wiley & Sons, Ltd, 1993. Vol. 78, № 1–2. P. 1–13.
- 223. Petrat F. et al. "Mitochondrial" photochemical drugs do not release toxic amounts of 1O2 within the mitochondrial matrix space // Arch. Biochem. Biophys. 2003. Vol. 412, № 2. P. 207–215.

- 224. Petty M.A., Grisar J.M., De Jong W. Protective effects of an α-tocopherol analogue against myocardial reperfusion injury in rats // Eur. J. Pharmacol. 1992. Vol. 210, № 1. P. 85–90.
- 225. Petzinger E., Geyer J. Drug transporters in pharmacokinetics // Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol. 2006. Vol. 372, № 6. P. 465–475.
- 226. Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health // Int. J. Biomed. Sci. Master Publishing Group, 2008. Vol. 4, № 2. P. 89–96.
- 227. Pinnix Z.K. et al. Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis // Sci. Transl. Med. 2010. Vol. 2, № 43. P. 43–56.
- 228. Piskounova E. et al. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells // Nature. 2015/10/14. 2015. Vol. 527, № 7577. P. 186–191.
- 229. Pitarque M. et al. Transcriptional Regulation of the Human CYP2A6 Gene // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005. Vol. 313, № 2. P. 814.
 - 230. Pittet M.J., Weissleder R. Intravital imaging // Cell. 2011. Vol. 147, № 5. P. 983–991.
- 231. Poon J.F. et al. Regenerable antioxidants Introduction of chalcogen substituents into tocopherols // Chem. A Eur. J. Wiley-VCH Verlag, 2015. Vol. 21, № 6. P. 2447–2457.
- 232. Pucci C., Martinelli C., Ciofani G. Innovative approaches for cancer treatment: Current perspectives and new challenges // ecancermedicalscience. ecancer Global Foundation, 2019. Vol. 13.
- 233. Qiu B., Simon M.C. BODIPY 493/503 Staining of Neutral Lipid Droplets for Microscopy and Quantification by Flow Cytometry // Bio-protocol. 2016. Vol. 6, № 17. P. e1912.
- 234. Rabik C.A., Dolan M.E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents // Cancer Treat. Rev. 2007. Vol. 33, № 1. P. 9–23.
- 235. Rafique S. et al. Transition metal complexes as potential therapeutic agent // Biotechnol. Mol. Biol. Rev. 2010. Vol. 5. P. 38–45.
- 236. Ramji D.P., Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation // Biochem. J. 2002. Vol. 365, № Pt 3. P. 561–575.
- 237. Ramsden D. et al. Altered CYP2C9 activity following modulation of CYP3A4 levels in human hepatocytes: an example of protein-protein interactions // Drug Metab. Dispos. 2014/08/25. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2014. Vol. 42, № 11. P. 1940–1946.
- 238. Rana R. et al. Hepatocyte nuclear factor 4{alpha} regulates rifampicin-mediated induction of CYP2C genes in primary cultures of human hepatocytes // Drug Metab. Dispos. 2010/01/19. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2010. Vol. 38, № 4. P. 591–599.
- 239. Rana R. et al. Med25 is required for RNA polymerase II recruitment to specific promoters, thus regulating xenobiotic and lipid metabolism in human liver // Mol. Cell. Biol.

- 2010/12/06. American Society for Microbiology (ASM), 2011. Vol. 31, № 3. P. 466–481.
- 240. Ransy C., Vaz C., Lombès A., Bouillaud F. Use of H₂O₂ to Cause Oxidative Stress, the Catalase Issue. Int. J. Mol. Sci. 2020. Vol. 21, № 23. P. 9149.
- 241. Raucy J. et al. Expression and Induction of CYP2C P450 Enzymes in Primary Cultures of Human Hepatocytes // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002. Vol. 302. P. 475–482.
- 242. Raudsepp P., Brüggemann D.A., Andersen M.L. Detection of radicals in single droplets of oil-in-water emulsions with the lipophilic fluorescent probe BODIPY665/676 and confocal laser scanning microscopy // Free Radic. Biol. Med. 2014. Vol. 70. P. 233–240.
- 243. Raught B., Liao W.S., Rosen J.M. Developmentally and hormonally regulated CCAAT/enhancer-binding protein isoforms influence beta-casein gene expression. // Mol. Endocrinol. 1995. Vol. 9, № 9. P. 1223–1232.
- 244. Rechitskaya E.D. et al. Tuning of cytotoxic activity by bio-mimetic ligands in ruthenium nitrosyl complexes // J. Mol. Struct. 2020. Vol. 1219.
- 245. Rendic S., Guengerich F.P. Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism // Chem. Res. Toxicol. 2012/05/10. 2012. Vol. 25, № 7. P. 1316–1383.
- 246. Rendic S., Guengerich F.P. Survey of Human Oxidoreductases and Cytochrome P450 Enzymes Involved in the Metabolism of Xenobiotic and Natural Chemicals // Chem. Res. Toxicol. 2014/12/19. American Chemical Society, 2015. Vol. 28, № 1. P. 38–42.
- 247. Repa J.J., Mangelsdorf D.J. The Role of Orphan Nuclear Receptors in the Regulation of Cholesterol Homeostasis // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. Annual Reviews, 2000. Vol. 16, № 1. P. 459–481.
- 248. Reynolds G.T. Image intensification applied to biological problems // Q. Rev. Biophys. 1972. Vol. 5, № 3. P. 295–347.
- 249. Reynolds G.T., Taylor D.L. Image Intensification Applied to Light Microscopy // Bioscience. [American Institute of Biological Sciences, Oxford University Press], 1980. Vol. 30, № 9. P. 586–592.
- 250. Ridnour L.A. et al. Molecular mechanisms for discrete nitric oxide levels in cancer // Nitric oxide Biol. Chem. 2008/04/22. 2008. Vol. 19, № 2. P. 73–76.
- 251. Rieger J.K. et al. Inflammation-Associated MicroRNA-130b Down-Regulates Cytochrome P450 Activities and Directly Targets CYP2C9 // Drug Metab. Dispos. 2015. Vol. 43, № 6. P. 884.
- 252. Rigalli J.P. et al. Regulation of PXR Function by Coactivator and Corepressor Proteins: Ligand Binding Is Just the Beginning // Cells. MDPI, 2021. Vol. 10, № 11. P. 3137.
- 253. Rodr'iguez C. et al. Transcriptional Regulation of Human CYP3A4 Basal Expression by CCAAT Enhancer-Binding Protein and Hepatocyte Nuclear Factor-3. 2003.

- 254. Rossi A.M., Taylor C.W. Reliable measurement of free Ca(2+) concentrations in the ER lumen using Mag-Fluo-4 // Cell Calcium. 2020/03/06. Elsevier, 2020. Vol. 87. P. 102188.
- 255. Rowe R.G., Daley G.Q. Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery // Nat. Rev. Genet. 2019. Vol. 20, № 7. P. 377–388.
- 256. Ruiz Azuara L. Preparation of new mixed copper aminoacidate complexes fromphenanthrolines and their alkyl derivatives to be used as anticancerigenic agents: pat. 458 USA. USA: 35, 1991. P. 10.
- 257. Rytkönen J. et al. Physiologically based pharmacokinetic modelling of oxycodone drug-drug interactions // Biopharm. Drug Dispos. John Wiley & Sons, Ltd, 2020. Vol. 41, № 1–2. P. 72–88.
- 258. Sahi J. et al. Regulation of cytochrome P450 2C9 expression in primary cultures of human hepatocytes // J. Biochem. Mol. Toxicol. John Wiley & Sons, Ltd, 2009. Vol. 23, № 1. P. 43–58.
- 259. Sausville L.N. et al. The Cytochrome P450 Slow Metabolizers CYP2C9*2 and CYP2C9*3 Directly Regulate Tumorigenesis via Reduced Epoxyeicosatrienoic Acid Production // Cancer Res. 2018/07/16. 2018. Vol. 78, № 17. P. 4865–4877.
- 260. Schuetz J.D., Kauma S., Guzelian P.S. Identification of the fetal liver cytochrome CYP3A7 in human endometrium and placenta // J. Clin. Invest. 1993. Vol. 92, № 2. P. 1018–1024.
- 261. Schyschka L. et al. Hepatic 3D cultures but not 2D cultures preserve specific transporter activity for acetaminophen-induced hepatotoxicity // Arch. Toxicol. 2013. Vol. 87, № 8. P. 1581–1593.
- 262. Scott E.E., Halpert J.R. Structures of cytochrome P450 3A4 // Trends Biochem. Sci. 2005. Vol. 30, № 1. P. 5–7.
- 263. Sebastià J. et al. Evaluation of fluorescent dyes for measuring intracellular glutathione content in primary cultures of human neurons and neuroblastoma SH-SY5Y // Cytom. Part A. John Wiley & Sons, Ltd, 2003. Vol. 51A, № 1. P. 16–25.
- 264. Seddon A.R. et al. Genome-wide impact of hydrogen peroxide on maintenance DNA methylation in replicating cells // Epigenetics Chromatin. 2021. Vol. 14, № 1. P. 17.
- 265. Seo M.-Y., Lee S.-M. Protective effect of low dose of ascorbic acid on hepatobiliary function in hepatic ischemia/reperfusion in rats // J. Hepatol. 2002. Vol. 36, № 1. P. 72–77.
- 266. Sevrioukova I.F., Poulos T.L. Current Approaches for Investigating and Predicting Cytochrome P450 3A4-Ligand Interactions // Adv. Exp. Med. Biol. 2015. Vol. 851. P. 83–105.
- 267. Sharma D. et al. Negative Regulation of Human Pregnane X Receptor by MicroRNA-18a-5p: Evidence for Suppression of MicroRNA-18a-5p Expression by Rifampin and Rilpivirine // Mol. Pharmacol. 2017. Vol. 92, № 1. P. 48.

- 268. Shen H. et al. A novel four-gene of iron metabolism-related and methylated for prognosis prediction of hepatocellular carcinoma // Bioengineered. Taylor & Francis, 2021. Vol. 12, № 1. P. 240–251.
- 269. Shi Y. et al. Hsa-miR-27a is involved in the regulation of CYP3A4 expression in human livers from Chinese Han population // Pharmacogenomics. Future Medicine, 2015. Vol. 16, № 12. P. 1379–1386.
- 270. Shi Z. et al. Med25 is required for estrogen receptor alpha (ERα)-mediated regulation of human CYP2C9 expression // Biochem. Pharmacol. 2014. Vol. 90, № 4. P. 425–431.
- 271. Shigenaga M.K., Gimeno C.J., Ames B.N. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1989. Vol. 86, № 24. P. 9697–9701.
- 272. Shizu R. et al. PXR Suppresses PPARα-Dependent HMGCS2 Gene Transcription by Inhibiting the Interaction between PPARα and PGC1α // Cells. MDPI, 2021. Vol. 10, № 12. P. 3550.
- 273. Sies H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress // Redox Biol. 2017/01/05. Elsevier, 2017. Vol. 11. P. 613–619.
- 274. Sim S.C. et al. A common novel CYP2C19 gene variant causes ultrarapid drug metabolism relevant for the drug response to proton pump inhibitors and antidepressants // Clin. Pharmacol. Ther. John Wiley & Sons, Ltd, 2006. Vol. 79, № 1. P. 103–113.
- 275. Singh K. et al. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity Exploring the armoury of obscurity // Saudi Pharm. J. SPJ Off. Publ. Saudi Pharm. Soc. 2017/12/19. Elsevier, 2018. Vol. 26, № 2. P. 177–190.
- 276. Singh V.P., Poon J.F., Engman L. Catalytic antioxidants: Regenerable tellurium analogues of vitamin e // Org. Lett. 2013. Vol. 15, № 24. P. 6274–6277.
- 277. Sirenko O. et al. High-Content Assays for Characterizing the Viability and Morphology of 3D Cancer Spheroid Cultures // Assay Drug Dev. Technol. Mary Ann Liebert Inc., 2015. Vol. 13, No. 7. P. 402–414.
- 278. Sivandzade F., Bhalerao A., Cucullo L. Analysis of the Mitochondrial Membrane Potential Using the Cationic JC-1 Dye as a Sensitive Fluorescent Probe // Bio-protocol. Bio-Protocol, 2019. Vol. 9, № 1. P. e3128.
- 279. Smith P.J., Wiltshire M., Errington R.J. DRAQ5 Labeling of Nuclear DNA in Live and Fixed Cells // Curr. Protoc. Cytom. John Wiley & Sons, Ltd, 2004. Vol. 28, № 1. P. 7.25.1-7.25.11.
- 280. Smith R.A.J. et al. Delivery of bioactive molecules to mitochondria in vivo // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2003/04/15. The National Academy of Sciences, 2003. Vol. 100, № 9. P. 5407–5412.
 - 281. Smutny T. et al. The 3'-untranslated region contributes to the pregnane X receptor

- (PXR) expression down-regulation by PXR ligands and up-regulation by glucocorticoids // Acta Pharm. Sin. B. 2020. Vol. 10, № 1. P. 136–152.
- 282. Smutny T. et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of the pregnane X receptor: a rationale for interindividual variability in drug metabolism // Arch. Toxicol. 2021. Vol. 95, N_{\odot} 1. P. 11–25.
- 283. Snapp E. Design and use of fluorescent fusion proteins in cell biology // Curr. Protoc. cell Biol. 2005. Vol. Chapter 21. P. 21.4.1-21.4.13.
- 284. Snider N.T. et al. Anandamide Metabolism by Human Liver and Kidney Microsomal Cytochrome P450 Enzymes to Form Hydroxyeicosatetraenoic and Epoxyeicosatrienoic Acid Ethanolamides // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2007. Vol. 321, № 2. P. 590.
- 285. Solovieva A.O. et al. Cellular internalisation, bioimaging and dark and photodynamic cytotoxicity of silica nanoparticles doped by {Mo6I8}4+ metal clusters // J. Mater. Chem. B. Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 4, № 28. P. 4839–4846.
- 286. Squires E.J., Sueyoshi T., Negishi M. Cytoplasmic Localization of Pregnane X Receptor and Ligand-dependent Nuclear Translocation in Mouse Liver* // J. Biol. Chem. 2004. Vol. 279, № 47. P. 49307–49314.
- 287. Stahl S.M. Mechanism of action of pimavanserin in Parkinson's disease psychosis: targeting serotonin 5HT2A and 5HT2C receptors // CNS Spectr. 2016/08/09. Cambridge University Press, 2016. Vol. 21, № 4. P. 271–275.
- 288. Stanley L.A. Chapter 27 Drug Metabolism // Pharmacognosy / ed. Badal S., Delgoda R. Boston: Academic Press, 2017. P. 527–545.
- 289. Stanley L.A. et al. Drug transporters: Gatekeepers controlling access of xenobiotics to the cellular interior // Drug Metab. Rev. 2009. Vol. 41, № 1. P. 27–65.
- 290. Stellato C. et al. The "busy life" of unliganded estrogen receptors // Proteomics. Wiley-VCH Verlag, 2016. Vol. 16, № 2. P. 288–300.
- 291. Stepanenko I. et al. Ruthenium-nitrosyl complexes as NO-releasing molecules, potential anticancer drugs, and photoswitches based on linkage isomerism // Dalt. Trans. The Royal Society of Chemistry, 2022. Vol. 51, № 14. P. 5367–5393.
- 292. Subramanian M. et al. CYP2C9-CYP3A4 protein-protein interactions: role of the hydrophobic N terminus // Drug Metab. Dispos. 2010/03/09. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2010. Vol. 38, № 6. P. 1003–1009.
- 293. Suino K. et al. The Nuclear Xenobiotic Receptor CAR: Structural Determinants of Constitutive Activation and Heterodimerization // Mol. Cell. 2004. Vol. 16, № 6. P. 893–905.
- 294. Sun Y. et al. Pt(II) and Au(III) complexes containing Schiff-base ligands: A promising source for antitumor treatment // Eur. J. Med. Chem. 2021. Vol. 211. P. 113098.

- 295. Surapureddi S. et al. Nuclear receptor coactivator 6 mediates the synergistic activation of human cytochrome P-450 2C9 by the constitutive androstane receptor and hepatic nuclear factor- 4α // Mol. Pharmacol. 2008. Vol. 74, No 3. P. 913–923.
- 296. Surapureddi S., Rana R., Goldstein J.A. NCOA6 differentially regulates the expression of the CYP2C9 and CYP3A4 genes // Pharmacol. Res. 2011. Vol. 63, № 5. P. 405–413.
- 297. Svoboda K., Yasuda R. Principles of Two-Photon Excitation Microscopy and Its Applications to Neuroscience // Neuron. 2006. Vol. 50, № 6. P. 823–839.
- 298. Swedlow J.R. Innovation in biological microscopy: current status and future directions // Bioessays. 2012/03/12. WILEY-VCH Verlag, 2012. Vol. 34, № 5. P. 333–340.
- 299. Swinney D.C. Chapter 1 Phenotypic Drug Discovery: History, Evolution, Future. The Royal Society of Chemistry, 2021. P. 1–19.
- 300. Swinney D.C. Phenotypic vs. Target-based drug discovery for first-in-class medicines // Clinical Pharmacology and Therapeutics. 2013. Vol. 93, № 4. P. 299–301.
- 301. Swinney D.C., Lee J.A. Recent advances in phenotypic drug discovery // F1000Research. F1000 Research Limited, 2020. Vol. 9. P. F1000 Faculty Rev-944.
- 302. Tabrizi L., Dao D.Q., Vu T.A. Experimental and theoretical evaluation on the antioxidant activity of a copper(ii) complex based on lidocaine and ibuprofen amide-phenanthroline agents // RSC Adv. The Royal Society of Chemistry, 2019. Vol. 9, № 6. P. 3320–3335.
- 303. Takagi S. et al. Post-transcriptional Regulation of Human Pregnane X Receptor by Micro-RNA Affects the Expression of Cytochrome P450 3A4* // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283, № 15. P. 9674–9680.
- 304. Takahashi K. et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors // Cell. 2007. Vol. 131, № 5. P. 861–872.
- 305. Takano H. et al. Downregulation of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 in Human Hepatocytes by Prolyl Hydroxylase Domain 2 Inhibitors via Hypoxia-Inducible Factor-α Stabilization // Drug Metab. Dispos. 2021. Vol. 49, № 1. P. 20–30.
- 306. Tarnowski B. 1, Spinale F.G., Nicholson J.H. DAP1 as a Useful Stain for Nuclear Quantitation // Biotech Histochem. 1991. Vol. 66, № 6. P. 297–302.
- 307. Taylor D.L. Past, Present, and Future of High Content Screening and the Field of Cellomics // High Content Screening: A Powerful Approach to Systems Cell Biology and Drug Discovery / ed. Taylor D.L., Haskins J.R., Giuliano K.A. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. P. 3–18.
- 308. Testa C.A., Johnson L.J. A whole-cell phenotypic screening platform for identifying methylerythritol phosphate pathway-selective inhibitors as novel antibacterial agents // Antimicrob. Agents Chemother. 2012/07/09. American Society for Microbiology, 2012. Vol. 56, № 9. P. 4906–4913.

- 309. Tfouni E. et al. Biological activity of ruthenium nitrosyl complexes // Nitric Oxide. 2011. Vol. 26. P. 38–53.
- 310. Thomas M. et al. Direct transcriptional regulation of human hepatic cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) by peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARα) // Mol. Pharmacol. 2013. Vol. 83, № 3. P. 709.
- 311. Thomas N. Review Article: High-Content Screening: A Decade of Evolution // J. Biomol. Screen. SAGE Publications Inc STM, 2009. Vol. 15, № 1. P. 1–9.
- 312. Thoumine O. et al. Microplates: a new tool for manipulation and mechanical perturbation of individual cells // J. Biochem. Biophys. Methods. 1999. Vol. 39, № 1. P. 47–62.
- 313. Thummel K.E. Gut instincts: CYP3A4 and intestinal drug metabolism // J. Clin. Invest. American Society for Clinical Investigation, 2007. Vol. 117, № 11. P. 3173–3176.
- 314. Tolosa L. et al. Development of a Multiparametric Cell-based Protocol to Screen and Classify the Hepatotoxicity Potential of Drugs // Toxicol. Sci. 2012. Vol. 127, № 1. P. 187–198.
- 315. Toriyabe T. et al. Unveiling a New Essential Cis Element for the Transactivation of the CYP3A4 Gene by Xenobiotics // Mol. Pharmacol. 2009. Vol. 75, № 3. P. 677.
- 316. Tornio A., Backman J.T. Chapter One Cytochrome P450 in Pharmacogenetics: An Update // Advances in Pharmacology / ed. Brøsen K., Damkier P. Academic Press, 2018. Vol. 83. P. 3–32.
- 317. Tsvetkova D., Ivanova S. Application of Approved Cisplatin Derivatives in Combination Therapy against Different Cancer Diseases // Molecules. 2022. Vol. 27, № 8. P. 2466.
- 318. Ung Y.T., Ong C.E., Pan Y. Current High-Throughput Approaches of Screening Modulatory Effects of Xenobiotics on Cytochrome P450 (CYP) Enzymes // High-throughput. MDPI, 2018. Vol. 7, № 4. P. 29.
- 319. Vaghela R. et al. Actually Seeing What Is Going on Intravital Microscopy in Tissue Engineering // Front. Bioeng. Biotechnol. Frontiers Media S.A., 2021. Vol. 9.
- 320. Vakifahmetoglu H., Olsson M., Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe // Cell Death Differ. 2008. Vol. 15, № 7. P. 1153–1162.
- 321. Van Loenhout J. et al. Oxidative Stress-Inducing Anticancer Therapies: Taking a Closer Look at Their Immunomodulating Effects // Antioxidants (Basel, Switzerland). MDPI, 2020. Vol. 9, № 12. P. 1188.
- 322. Viglianisi C., Menichetti S. Chain Breaking Antioxidant Activity of Heavy (S, Se, Te) Chalcogens Substituted Polyphenols // Antioxidants (Basel, Switzerland). MDPI, 2019. Vol. 8, № 10. P. 487.
- 323. Vincent F. et al. Phenotypic drug discovery: recent successes, lessons learned and new directions // Nat. Rev. Drug Discov. 2022.

- 324. Volkan I. et al. Antioxidants Accelerate Lung Cancer Progression in Mice // Sci. Transl. Med. American Association for the Advancement of Science, 2014. Vol. 6, № 221. P. 221–221.
- 325. Wang D. et al. Functional evaluation of genetic and environmental regulators of p450 mRNA levels // PLoS One. 2011/10/05. Public Library of Science, 2011. Vol. 6, № 10. P. e24900–e24900.
- 326. Wang D. et al. Ligand-Free Estrogen Receptor α (ESR1) as Master Regulator for the Expression of CYP3A4 and Other Cytochrome P450 Enzymes in the Human Liver // Mol. Pharmacol. 2019. Vol. 96, \mathbb{N} 4. P. 430.
- 327. Wang D., Sadee W. The Making of a CYP3A Biomarker Panel for Guiding Drug Therapy // J. Pers. Med. MDPI, 2012. Vol. 2, № 4. P. 175–191.
- 328. Wang M. et al. Remdesivir and chloroquine effectively inhibit the recently emerged novel coronavirus (2019-nCoV) in vitro // Cell Res. 2020. Vol. 30, № 3. P. 269–271.
- 329. Wang P. et al. The Long Noncoding RNA Hepatocyte Nuclear Factor 4α Antisense RNA 1 Negatively Regulates Cytochrome P450 Enzymes in Huh7 Cells via Histone Modifications // Drug Metab. Dispos. 2021. Vol. 49, № 5. P. 361–368.
- 330. Wang X. et al. Identification of prognostic biomarkers for patients withhepatocellular carcinoma after hepatectomy // Oncol. Rep. Spandidos Publications, 2019. Vol. 41, № 3. P. 1586–1602.
- 331. Wang X. et al. The prognostic value of CYP2C subfamily genes in hepatocellular carcinoma // Cancer Med. 2018/02/26. John Wiley and Sons Inc., 2018. Vol. 7, № 4. P. 966–980.
- 332. Wardwell-Swanson J. et al. A Framework for Optimizing High-Content Imaging of 3D Models for Drug Discovery // SLAS Discov. Elsevier, 2020. Vol. 25, № 7. P. 709–722.
- 333. Waris G., Ahsan H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions // J. Carcinog. BioMed Central, 2006. Vol. 5. P. 14.
- 334. Wedel A., Lömsziegler-Heitbrock H.W. The C/EBP Family of Transcription Factors // Immunobiology. 1995. Vol. 193, № 2. P. 171–185.
- 335. Wei Y. et al. A Molecular Aspect in the Regulation of Drug Metabolism: Does PXR-Induced Enzyme Expression Always Lead to Functional Changes in Drug Metabolism? // Curr. Pharmacol. Reports. 2016. Vol. 2, № 4. P. 187–192.
- 336. Wei Z. et al. No Correlation of hsa-miR-148a with Expression of PXR or CYP3A4 in Human Livers from Chinese Han Population // PLoS One. Public Library of Science, 2013. Vol. 8, № 3. P. e59141-.
- 337. Wei Z. et al. The Effect of microRNAs in the Regulation of Human CYP3A4: a Systematic Study using a Mathematical Model // Sci. Rep. 2014. Vol. 4, № 1. P. 4283.
 - 338. Weir C. et al. Mesenchymal Stem Cells: Isolation, Characterisation and In Vivo

- Fluorescent Dye Tracking // Heart. Lung Circ. 2008. Vol. 17. P. 395–403.
- 339. Welm A.L., Timchenko N.A., Darlington G.J. C/EBPalpha regulates generation of C/EBPbeta isoforms through activation of specific proteolytic cleavage // Mol. Cell. Biol. American Society for Microbiology, 1999. Vol. 19, № 3. P. 1695–1704.
- 340. Wen S., Zhu D., Huang P. Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach // Future Medicinal Chemistry. 2013. Vol. 5, № 1. P. 53–67.
- 341. Weng X. et al. Synthesis and biological studies of inducible DNA cross-linking agents // Angew. Chemie Int. Ed. 2007. Vol. 46, № 42. P. 8020–8023.
- 342. Westerink W.M.A., Schoonen W.G.E.J. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells // Toxicol. Vitr. 2007. Vol. 21, № 8. P. 1581–1591.
- 343. Westphal C., Konkel A., Schunck W. Cytochrome p450 enzymes in the bioactivation of polyunsaturated Fatty acids and their role in cardiovascular disease // Adv Exp Med Biol. 2015. Vol. 851. P. 151–187.
- 344. Wills J.W. et al. Inter-laboratory automation of the in vitro micronucleus assay using imaging flow cytometry and deep learning // Arch. Toxicol. 2021. Vol. 95, № 9. P. 3101–3115.
- 345. Willy P.J. et al. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway // Genes Dev. 1995. Vol. 9, № 9. P. 1033–1045.
- 346. Wright G.D. et al. Pushing the boundaries of high content imaging // Cytom. Part A. John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 91, № 2. P. 113–114.
- 347. Wu Y. et al. Histone deacetylase 1 is required for Carbamazepine-induced CYP3A4 expression // J. Pharm. Biomed. Anal. 2012. Vol. 58. P. 78–82.
- 348. Xiang Y. et al. 3D bioprinting of complex tissues in vitro: state-of-the-art and future perspectives // Arch. Toxicol. 2022. Vol. 96, № 3. P. 691–710.
- 349. Xu J.Y. et al. Upregulation of human CYP2C9 expression by Bisphenol A via estrogen receptor alpha (ERα) and Med25 // Environ. Toxicol. John Wiley and Sons Inc., 2017. Vol. 32, № 3. P. 970–978.
- 350. Xu R.X. et al. A Structural Basis for Constitutive Activity in the Human CAR/RXRα Heterodimer // Mol. Cell. 2004. Vol. 16, № 6. P. 919–928.
- 351. Yakovlev I.A. et al. Nitric oxide release and related light-induced cytotoxicity of ruthenium nitrosyls with coordinated nicotinate derivatives // Dalt. Trans. Royal Society of Chemistry, 2021. Vol. 50, № 38. P. 13516–13527.
- 352. Yan J. et al. Prognostic Score-based Clinical Factors and Metabolism-related Biomarkers for Predicting the Progression of Hepatocellular Carcinoma // Evol. Bioinform. Online. SAGE Publications, 2020. Vol. 16. P. 1176934320951571–1176934320951571.

- 353. Yan L. et al. Alterations of Histone Modifications Contribute to Pregnane X Receptor-Mediated Induction of CYP3A4 by Rifampicin // Mol. Pharmacol. 2017/05/25. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2017. Vol. 92, № 2. P. 113–123.
- 354. Yan L. et al. Suppression of miR-628-3p and miR-641 is involved in rifampin-mediated CYP3A4 induction in HepaRG cells // Pharmacogenomics. Future Medicine Ltd., 2017. Vol. 18, № 1. P. 57–64.
- 355. Yun J. et al. Vitamin C selectively kills KRAS and BRAF mutant colorectal cancer cells by targeting GAPDH // Science. 2015/11/05. 2015. Vol. 350, № 6266. P. 1391–1396.
- 356. Zahnow C. et al. A Role for CCAAT/Enhancer Binding Protein b-Liver-enriched Inhibitory Protein in Mammary Epithelial Cell Proliferation 1 // Cancer Res. 2001. Vol. 61, № 1. P. 261–269.
- 357. Zamanian M., Chan J.D. High-content approaches to anthelmintic drug screening // Trends Parasitol. 2021. Vol. 37, № 9. P. 780–789.
- 358. Zamble D.B., Lippard S.J. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy // Trends Biochem. Sci. 1995. Vol. 20, № 10. P. 435–439.
- 359. Zanger U.M., Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: Regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation // Pharmacol. Ther. 2013. Vol. 138, № 1. P. 103–141.
- 360. Zeeshan H.M.A. et al. Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS // Int. J. Mol. Sci. MDPI, 2016. Vol. 17, № 3. P. 327.
- 361. Zeilinger K. et al. Cell sources for in vitro human liver cell culture models // Exp. Biol. Med. (Maywood). 2016/07/05. SAGE Publications, 2016. Vol. 241, № 15. P. 1684–1698.
- 362. Zenkov N.K. et al. Antioxidant and antiinflammatory activity of new water-soluble sulfur-containing phenolic compounds // Biochem. 2007. Vol. 72, № 6. P. 644–651.
- 363. Zenkov N.K. et al. Structural and Functional Characteristics for the Antiinflammatory Effect of New Water-Soluble Sulfur-Containing Phenol Antioxidants // Eksp. Biol. i Meditsiny. 2009. Vol. 147, № 5. P. 521–524.
- 364. Zhang J. et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling // Oxid. Med. Cell. Longev. / ed. Egea J. Hindawi Publishing Corporation, 2016. Vol. 2016. P. 4350965.
- 365. Zhang P., Sadler P.J. Advances in the design of organometallic anticancer complexes // J. Organomet. Chem. 2017. Vol. 839. P. 5–14.
- 366. Zhang S., Pan X., Jeong H. GW4064, an Agonist of Farnesoid X Receptor, Represses CYP3A4 Expression in Human Hepatocytes by Inducing Small Heterodimer Partner Expression // Drug Metab. Dispos. 2015. Vol. 43, № 5. P. 743.
 - 367. Zhitomirsky B., Farber H., Assaraf Y.G. LysoTracker and MitoTracker Red are

transport substrates of P-glycoprotein: implications for anticancer drug design evading multidrug resistance // J. Cell. Mol. Med. 2018/01/26. John Wiley and Sons Inc., 2018. Vol. 22, № 4. P. 2131–2141.

- 368. Zhong L. et al. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives // Signal Transduct. Target. Ther. 2021. Vol. 6, № 1. P. 201.
- 369. Zöllner A. et al. Production of human phase 1 and 2 metabolites by whole-cell biotransformation with recombinant microbes // Bioanalysis. 2010. Vol. 2, № 7. P. 1277–1290.
- 370. Zordoky B., El-Kadi A. Role of NF-kappa B in the Regulation of Cytochrome P450 Enzymes // Curr. Drug Metab. 2009. Vol. 10. P. 164–178.
- 371. Голубева Ю.А. Разнолигандные комплексные соединения меди(II), кобальта(II), никеля(II) и марганца(II) с олигопиридинами и производными тетразола и изотиазола: синтез, строение и цитотоксическая активность. Дис. канд. Хим. наук: 1.4.1: защищена: 22.06.2022. Новосибирск, 2022. С. 152.
- 372. Зенков Н.К. и др. Особенности редокс-регуляции в опухолевых клетках // Сибирский научный медицинский журнал. Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, 2019. Vol. 39, № 2. Р. 11–26.
- 373. Кандалинцева Н.В. Гидрофильные халькогенсодержащие производные алкилированных фенолов: синтез, свойства, антиокислительная и биологическая активность. дис. д-р хим. наук: 02.00.03: защищена. Новосибирск, 2020. С. 401.
- 374. Смирнова К.С., Голубева Ю.А., Лидер Е.В. Структурные особенности комплекса Cu(II) с 5-фенилтетразолат-анионом и 4,4'-диметил-2,2'-бипиридином // Кристаллография. 2021. Vol. 67, № 4. P. 617–622.