

**УДК 576.08**

**DOI: 10.18522/2308-9709-2024-49-7**

**Анализ экспрессии генов каскада NFE2L2/AP-1 в клетках HeLa после воздействия генераторов монооксида азота**

Харченко Е.Ю.<sup>1</sup>, Золотухин П.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Россия;  
jenua.xarchenko@yandex.ru

<sup>2</sup> Bioinnlabs, Ростов-на-Дону, Россия; p.zolotukhin@bioinn.ru

*Аннотация*

Оксид азота (NO) — это плейотропная сигнальная молекула, участвующая в регуляции сосудов, нейронов и метаболизма. Она оказывает множество физиологических эффектов, в том числе снижает кровяное давление, повышает работоспособность и устраняет метаболический синдром. NO представляет собой неорганическую молекулу, которая вырабатывается эндогенно у прокариот и эукариот из L-аргинина и L-цитруллина с помощью семейства ферментов синтаз оксида азота. У эукариот существуют три изоформы NOS: нейронная (nNOS, NOS1), индуцибельная (iNOS, NOS2) и эндотелиальная (eNOS, NOS3). Кроме того, существует ферментативный способ синтеза NO с помощью экзогенных доноров. В данной работе была исследована способность соединений бензофуроксанового ряда, синтезированные и предоставленные несколькими коллективами химиков-синтетиков (Курбатов С.В. и коллеги, ЮФУ, г. Ростов-на-Дону), являющихся новыми синтезированными генераторами оксида азота, вызывать индукцию композитного каскада NFE2L2/AP1 в клетках HeLa. Исходя из полученных данных, был сделан вывод, что в использованных условиях тестирования исследуемое вещество не вызывает выраженной активации композитного каскада NFE2L2/AP1 и не оказывает значительного влияния на экспрессию регулятора - NFE2L2.

*Ключевые слова:* новые генераторы оксида азота, HeLa, каскад NFE2L2/AP-1

**DOI: 10.18522/2308-9709-2024-49-7**

**Analysis of the NFE2L2/AP-1 pathway and gene expression HeLa cells after exposure to nitrogen monoxide generators**

Kharchenko E.Y.<sup>1</sup>, Zolotukhin P.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Southern Federal University, Rostov-on-Don, Russia

<sup>2</sup> Bioinnlabs, Rostov-on-Don, Russia; p.zolotukhin@bioinn.ru

*Abstract*

Nitric oxide (NO) is a pleiotropic signaling molecule involved in the regulation of blood vessels, neurons, and metabolism. It has many physiological effects, including lowering blood pressure, increasing performance, and eliminating metabolic syndrome. NO is an inorganic molecule that is produced endogenously in prokaryotes and eukaryotes from L-arginine and L-citrulline by the nitric oxide synthase enzyme family. Eukaryotes have three NOS isoforms: neuronal (nNOS, NOS1), inducible (iNOS, NOS2), and endothelial (eNOS, NOS3). In addition, there is a non-enzymatic way of synthesizing NO using exogenous donors. In this work, the ability of benzofuroxan series compounds synthesized and provided by several teams of synthetic chemists (Kurbatov S.V. et al., SFedU, Rostov-on-Don), which are new synthesized nitric oxide generators, to cause the induction of the NFE2L2/AP1 composite pathway in HeLa cells was investigated. Based on the data obtained, it was concluded that under the testing conditions used, the test substance does not cause pronounced activation of the NFE2L2/AP1 composite pathway and does not have a significant effect on the expression of the regulator - NFE2L2.

*Keywords:* new nitric oxide generators, HeLa, NFE2L2/AP-1 pathway

**Введение.** Известно, что моноксид азота (NO) является мультимодальным регулятором множества физиологических и патологических процессов в организме человека. NO - ключевая сигнальная

молекула, регулирующая сосудистые, нейронные, воспалительные и иммунные реакции. NO выполняет такие функции, как расширение сосудов и нейромедиацию, а также обладает противомикробными и противоопухолевыми свойствами, участвует в нейротоксичности, связанной с инсультом и нейродегенеративными заболеваниями и др. Эндогенная противомикробная активность в значительной степени обусловлена высокими локальными концентрациями NO, вырабатываемого индуцибельной синтазой оксида азота, а также производными реактивных форм оксида азота, включая пероксинитрит и S-нитрозотиолы (Bath et al., 2021, Nasyrova et al., 2020). Моноксид азота может образовываться либо ферментативно – с помощью семейства NO-синтаз (NOS) из аргинина, либо неферментативно – с помощью экзогенных доноров NO (Sodano et al., 2022; da Silva et al., 2021, Granik, 2002). Выделяют три разновидности NOS: эндотелиальная NOS (eNOS), индуцибельная NOS (iNOS) и нейронная NOS (nNOS). Недостаточное количество NO связывают с развитием ряда заболеваний, таких как диабет и гипертония, а также с тяжестью атеросклероза, избыточное количество NO может вызывать окислительный стресс в клетках. В то же время физиологический уровень NO необходим для поддержания нормального функционирования клеток (Man et al., 2022). В связи с высокой степенью вовлеченности оксида азота в различные пути регуляции метаболизма в настоящее время ведется поиск его новых генераторов, которые в последствии могли бы стать эффективными лекарственными средствами. Один из основных вопросов, обязательных к изучению при разработке любых фармакологических препаратов, связан с оценкой вероятности развития побочных эффектов. Такие исследования, как правило, проводятся на достаточно сложных биологических моделях - животных, но несмотря на это информативность обычно оказывается недостаточной. При этом такой тип исследования трудоемок и затратен, и поэтому требует дополнительных методов, позволяющих упростить процесс

тестирования веществ и удешевить его. В связи с этим нами использован комбинированный подход, заключающийся в применении стандартного метода оценки выживаемости эукариотических клеток одновременно с исследованием состояния высоко информативного репортерного клеточного каскада - NFE2L2/AP-1. В таком случае оценка общей выживаемости клеток позволяет обозначить непосредственные риски приема нового препарата для человека, а изучение состояния клеточного каскада позволяет определить спектр нарушений в работе сигнальных клеточных систем высшего уровня и риски развития резистентности к терапии.

**Цель исследований** – исследовать способность соединений бензофуроксанового ряда, являющихся новыми синтезированными генераторами оксида азота, вызывать индукцию композитного каскада NFE2L2/AP1 в клетках HeLa.

**Материалы и методы исследования.** В нашей работе были исследованы соединения бензофуроксанового ряда, синтезированные и предоставленные несколькими коллективами химиков-синтетиков: серия соединений «t» - Курбатов С.В. и соавт. (ЮФУ, г. Ростов-на-Дону) (производные нитробензоксадиазолов, содержащие  $\pi$ -избыточные гетероциклы) – 15t, 92t, 93t. Исследования выполнены на клетках рака шейки матки человека линии HeLa (получены из банка клеток ЮНЦ РАН ФАНО). Клетки культивировались в культуральной среде Gibco DMEM (Thermo Fisher Scientific, США) с 10 % термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (GE Healthcare, Великобритания) и 0.05 мкг/мл гентамицина (ОАО «Биохимик», Россия). Использовался культуральный пластик различных форматов в зависимости от стадии культуральных работ - флаконы T75, T25 и двадцати четырёх-луночные планшеты (SPL Lifesciences, Южная Корея). Клетки культивировались в углекислотном инкубаторе Sanyo MCO-18AC (Panasonic, Япония) при 37 °C, и 5 % углекислого газа. Наблюдение за состоянием культуры проводилось с использованием инвертированного

микроскопа Premiere MIS-9000 (C&A Scientific, Китай). Обработка клеток проводилась в 24-луночных планшетах с последующим выделением РНК и в 96-луночных планшетах с последующей оценкой выживаемости. Каждая группа образцов для выделения РНК была представлена 6 биореplikатами. Для оценки выживаемости клетки высевались из расчета достижения 50-70 % конфлюэнтности в день заливки тестируемых веществ и контроля. Оценка выживаемости проводилась с помощью метода исключения трипанового синего.

Выделение РНК проводилось с помощью лизирующего реагента Qiazol (Qiagen, Голландия) согласно стандартной фенол-лизисной модификации протокола кислородного метода выделения РНК по Хомчински (Chomczynski, Sacchi, 2006).

Целостность РНК оценивалась с помощью неденатурирующего электрофореза в 1 % агарозном геле (Amresco, США; ООО НПФ «Литех», Россия; ООО «Хеликон», Россия) с помощью электрофоретической системы «Эльф-4» (ООО «ДНК-технология», Россия). Визуализация геля проводилась методом пред-окраски бромистым этидием (ООО НПФ «Литех», Россия) и с помощью системы гель-документации GelDoc XR (Bio-Rad, США). Все образцы имели выраженные бэнды рРНК. Чистота выделения РНК оценивалась по соотношению  $A_{230}/A_{280}$  и  $A_{260}/A_{280}$  с помощью спектрофотометра Nanodrop-1000 (Thermo Fisher Scientific, США). После проведения оценки чистоты и целостности РНК и ДНКазной обработки проводилась обратная транскрипция образцов с помощью набора ОТ-1 (НПФ «Синтол», Россия), использовались олиго-(дТ)-праймеры. Обратная транскрипция проводилась при 39 °С в течение 1 часа, фермент термоинактивировался при 92 °С. Образцы кДНК хранились при -20 °С, образцы РНК - при -80 °С.

Для решения задач исследования в качестве анализируемых РНК были выбраны транскрипты генов FTH1, HMOX1, CBR3, NQO1 (тотальная

транскрипция). Также анализировалась тотальная экспрессия NFE2L2 (анализируемый регулятор), JUN (анализируемый регулятор), TBP (референс-ген), POLR2C (референс-ген). Количественная ПЦР (ПЦР в реальном времени; кПЦР) проводилась с помощью набора для кПЦР с красителем EvaGreen (НПФ «Синтол», Россия) в 96-луночных планшетах (Bio-Rad, США) на амплификаторе с возможностью ПЦР-РВ CFX96 (Bio-Rad, США). Кривые кПЦР и эффективность реакции анализировались в среде программной среде CFX96 (Bio-Rad, США). Порог квантификационного цикла устанавливался по началу или ранней логарифмической зоне кривых, единым образом между постановками. Для статистических расчетов использовался параметр  $\Delta Ct$ , рассчитываемый как разность между квантификационными циклами исследуемого и референсного генов, а также как разность между квантификационными циклами гена-мишени и гена-регулятора. Расчет велся для обоих референс-генов индивидуально, а также для их среднего геометрического. Статистические расчеты проводились в среде SPSS 22 (IBM, США).

**Результаты исследования и их обсуждение.** Вещество 92t, давшее максимальный эффект в опытах на бактериях, было исследовано на клетках человека. Так как вещества, имеющие, по данным химического и бактериального тестирования, заявленные целевые свойства, могут иметь побочные эффекты (как явные и тяжелые, так и отсроченные), нами было проведено тестирование вещества 92t на активацию композитного каскада NFE2L2/AP1 в клетках HeLa, адекватно отражающих риск индукции данного каскада в нормальных клетках человека.

Один из основных вопросов при разработке фармакологических препаратов связан с оценкой вероятности развития побочных эффектов. Такие исследования, как правило, проводятся на достаточно сложных биологических моделях - животных, но, несмотря на это, информативность обычно оказывается недостаточной. При этом такой тип исследования

трудоемок и затратен, и поэтому требует дополнительных методов, позволяющих упростить процесс тестирования веществ и удешевить его. Поэтому нами использован комбинированный подход, заключающийся в применении стандартного метода оценки выживаемости эукариотических клеток одновременно с исследованием состояния высоко информативного репортерного клеточного каскада - NFE2L2/AP-1. В таком случае оценка общей выживаемости клеток позволяет обозначить непосредственные риски приема нового препарата для человека, а изучение состояния клеточного каскада позволяет определить спектр нарушений в работе сигнальных клеточных систем высшего уровня и риски развития резистентности к терапии.

Результаты оценки выживаемости клеток после воздействия тестируемых веществ в концентрации 0,2 мг/мл представлены в таблице 1.

*Таблица 1 - Влияние разработанных веществ на жизнеспособность клеток HeLa после воздействия в течение 24 часов*

Группа	Жизнеспособность (среднее доли±СО)	Уровень статистической значимости (критерий Манна-Уитни)
2 % ДМСО (контроль)	0,79±0,08	-
15t, 0,2 мг/мл	0,45±0,13	0,029
92t, 0,2 мг/мл	0,18±0,17	0,057
93t, 0,2 мг/мл	0,64±0,09	0,029

Как видно из приведенных результатов, все протестированные вещества, имеющие наилучшие характеристики по генерации монооксида азота, в той или иной степени продемонстрировали негативные эффекты на жизнеспособность клеток при концентрации 0,2 мг/мл. При этом вещества 15t и 92t чрезвычайно сильно снижают жизнеспособность культуры, а вещество 93t оказывает влияние лишь на границе статистической

значимости. Исходя из полученных данных, вещество 93t является выгодным кандидатом, так как не является непосредственно опасным для эукариотических клеток, тогда как соединения 15t и 92t являются высокотоксичными. Однако при интерпретации полученных данных следует учитывать, что тестирование проводилось на раковых клетках, система сигнализации с участием монооксида азота, исходя из литературных данных (Pavlidis et al., 2012), в них нарушена, а значит, эффекты веществ 15t и 92t могут быть обусловлены в первую очередь их влиянием на клетки HeLa именно как продукторов монооксида азота, высокотоксичного соединения. Особенно это справедливо для вещества 92t, наиболее мощного продуктора NO. В связи с этим соединение 92t необходимо исследовать как потенциальное противораковое лекарство.

С другой стороны, вещество 93t демонстрировало в предыдущих экспериментах сходные с 15t характеристики генерации монооксида азота, а значит, токсические эффекты соединений 15t и 92t могут не быть обусловленными в первую очередь продукцией монооксида азота, а могут быть связаны с нарушениями сигнализации.

Результаты тестирования состояния композитного каскада NFE2L2/AP-1 при воздействии разработанных и синтезированных веществ приведены в таблице 2. Такие данные не были получены для вещества 92t из-за его высокой токсичности для использованных клеток в конечной концентрации 0,2 мг/мл - технически анализ был осложнен пониженным количеством РНК, которое можно выделить из оставшихся клеток. Однако и в этом случае были выявлены особенности состояния каскада NFE2L2/AP-1, которые будут рассмотрены ниже.

Таблица 2 - Экспрессия анализируемых генов каскада NFE2L2/AP-1 при воздействии веществ 15t и 93t и в контроле

Вещество	Нормализованная экспрессия генов, о.е. (m±SD)											
	<i>FTH1</i>	p	<i>HMOX1</i>	p	<i>NQO1</i>	p	<i>CBR3</i>	p	<i>JUN</i>	p	<i>NFE2L2</i>	p
Нормализация по <i>TBP</i>												
DMSO	1,6±0,2	-	0,02±0,01	-	5,2±2,0	-	0,04±0,01	-	0,02±0,02	-	9,1±1,8	-
15t	2,1±0,37	0,041	0,09±0,03	0,002	7,1±1,1	0,065	0,08±0,03	0,004	0,16±0,06	0,002	14,2±3,2	0,015
93t	1,6±0,45	0,7	0,09±0,05	0,041	4,5±3,5	0,7	0,09±0,06	0,009	0,47±0,45	0,009	31,3±2,6	0,002
Нормализация по <i>POLR2C</i>												
DMSO	6,5±6,0	-	0,05±0,02	-	15,3±2,6	-	0,14±0,09	-	0,07±0,04	-	36,7±3,4	-
15t	5,0±0,93	0,39	0,2±0,05	0,002	17,0±2,6	0,48	0,17±0,03	0,108	0,38±0,13	0,002	34,6±1,0	0,24
93t	11,2±7,2	0,13	0,53±0,35	0,002	25,9±18,7	0,48	0,55±0,39	0,009	2,9±2,8	0,002	217±17,2	0,009
Нормализация по среднему квантификационному циклу <i>POLR2C</i> и <i>TBP</i>												
DMSO	3,0±0,9	-	0,03±0,01	-	8,5±1,9	-	0,07±0,01	-	0,04±0,03	-	16,6±5,4	-
15t	3,2±0,27	0,18	0,13±0,04	0,002	10,8±1,0	0,009	0,11±0,03	0,004	0,24±0,08	0,002	21,8±4,7	0,18
93t	4,1±1,7	0,31	0,21±0,13	0,009	10,2±6,4	0,94	0,22±0,15	0,004	1,15±1,1	0,002	79±60	0,009

Как видно из приведенных данных, вещества 15t и 93t изменяют активность каскада NFE2L2/AP-1 - они повышают ее. Во-первых, в случае 15t повышается экспрессия JUN и одновременно - экспрессия генов-мишеней NFE2L2, в том числе HMOX1. В использованной клеточной модели согласно полученным нами ранее данным это означает, что при действии этого вещества замыкается JUN-зависимая ветка суб-каскада AP-1,

контролирующего часть антиоксидантной системы человека, а также каскады контроля выживаемости клеток, пролиферации и модификации работы широкого спектра транскрипционных факторов клетки. С другой стороны, эти же данные свидетельствуют о явной активации и NFE2L2-зависимой ветви каскада, а это означает, что вещество 15t в исследуемой концентрации с высокой вероятностью активирует экспрессию ABC-насосов множественной лекарственной устойчивости. Похожее, но не абсолютно идентичные эффекты на эукариотическую клетку оказывает вещество 93t - оно также в общем активирует каскад NFE2L2/AP-1, но дополнительно сильно активирует еще и экспрессию фактора NFE2L2, то есть влияние 93t на клетку еще сильнее, чем у 15t. При этом в обоих случаях наблюдается активация NMOX1, а экспрессия FTH1 не меняется. Учитывая особенности клеток HeLa, это свидетельствует о том, что несмотря на активацию экспрессии JUN, этот процесс еще не блокирует активность NFE2L2. С одной стороны, это позитивно с точки зрения разработки фармпрепарата, т.к. гиперактивация AP-1 - чрезвычайно опасное и про-канцерогенное явление, и чем оно слабее, тем безопаснее препарат. С другой стороны, полная или практически полная активация NFE2L2 угрожает резким повышением экспрессии ABC-насосов. Особенно опасная ситуация наблюдается при действии вещества 93t, при котором наблюдается значимый рост экспрессии NFE2L2 (примерно в 5 раз), что может быть сопряжено как раз с гиперактивацией AP-1, выражено контролирующего в HeLa экспрессию NFE2L2 и замыкающего один из самых опасных в фармакологии контуров положительных обратных связей. Однако такой рост экспрессии NFE2L2 может объясняться и компенсаторным противодействием возросшей активности AP-1, что принципиально никак не является более желательным сценарием последствий действия вещества 93t на клетку.

Еще более активным, не только с точки зрения жизнеспособности клеток, является вещество 92t. В исследуемой концентрации оно значительно

осложняет каскадный анализ, однако даже при высокой сложности выделения РНК и постановки кПЦР группа биореplikатов, обработанных этим веществом, демонстрирует повышенную экспрессию JUN (экспрессия других генов вообще не выявлена).

Дальнейший характер работы каскада NFE2L2/AP-1 проводился нами путем расчета соотношения мишень/контролер. Результаты этого анализа приведены в таблице 3.

*Таблица 3 - Соотношения мишень/контролер в клетках HeLa, обработанных веществами 15t и 93t*

Вещест во	Экспрессия генов относительно NFE2L2, о.е. (m±SD)							
	<i>FTH1</i>	p	<i>HMOX1</i>	p	<i>NQO1</i>	p	<i>CBR3</i>	p
DMSO	0,18±0,0 4	-	0,002±0,000 8	-	0,6±0,2	-	0,004±0,0 01	-
15t	0,15±0,0 4	0,09	0,006±0,003	0,002	0,52±0,15	0,48	0,005±0,0 01	0,18
93t	0,07±0,0 3	0,002	0,004±0,002	0,18	0,3±0,3	0,13	0,003±0,0 01	0,13

Данные в таблице 3 подтверждают сделанные ранее выводы и позволяют разрешить противоречия в интерпретации предыдущих данных.

Во-первых, для вещества 15t показан эффект увеличения соотношения HMOX1/NFE2L2, что свидетельствует о ненасыщенности каскада, так как HMOX1 имеет мощный кластерный сайт связывания NFE2L2. С другой стороны, аналогичные соотношения для NQO1 и CBR3 выражено не меняются, а значит, экспрессия самого NFE2L2, видимо, все же нарастает (как видно для варианта его нормализации по TBP в таблицах 2, 3), то есть каскад находится в левой части куполообразной кривой активации экспрессии NFE2L2. Это значит, что вещество 15t в концентрации 0.2 мг/мл еще активирует экспрессию NFE2L2, а не уже подавляет ее. Соотношение FTH1/NFE2L2 и уровень экспрессии FTH1 (см. таблицы 2, 3, нормализация

по ТВР) свидетельствуют, о том, что и этот фактор находится в условиях контроля со стороны NFE2L2/AP-1, и в этом случае уже регистрируется супрессия активации NFE2L2 со стороны JUN, так как FTH1 является фактором, выражено зависимым от соотношения активностей NFE2L2 и JUN.

Вещество 92t было введено в субконфлюэнтную (70 %) культуру клеток сразу после замены им среды, через сутки было определено влияние произведенного воздействия на экспрессию факторов, отражающих вместе активацию композитного каскада NFE2L2/AP1. Результаты экспрессионного анализа представлены в таблице 4 (приведены средние значения нормализованных уровней экспрессии или соотношений экспрессии анализируемых факторов).

*Таблица 4 - Результаты тестирования влияния вещества 92t на экспрессию генов компонентов каскада NFE2L2*

Фактор	Группа	N	Среднее	Стандартное отклонение
NFE2L2	control	4	15.767	12.961
	test	4	18.417	16.038
HMOX1	control	4	0.104	0.062
	test	4	0.682	0.809
HMOX1/NFE2L2	control	4	0.010	0.005
	test	4	0.092	0.141
BACH1	control	4	0.224	0.133
	test	4	4.979	6.517
BACH1/NFE2L2	control	4	0.023	0.018
	test	4	0.700	1.139
NQO1	control	4	0.724	0.977
	test	4	1.707	1.846
NQO1/NFE2L2	control	4	0.040	0.022
	test	4	0.218	0.339

Расчеты непараметрическими и параметрическими методами согласовались: выраженных отличий между группами контроля и тестируемого вещества выявлено не было (в т.ч. по показателям экспрессии BACH1tv2 (MW p=0.1) и соотношения BACH1tv2/NFE2L2 (MW p=0.3),

продемонстрировавших высокую дисперсию данных и наибольшие отличия рангов и средних).

**Заключение.** Исходя из полученных данных, при тестировании концентрации 0,2 мг/мл, для веществ 15t и 93t характерны эффекты, активирующие (хоть и разными путями и с разной сигнатурой) каскад NFE2L2/AP-1 так, что повышается риск изменения состояния клеточного цикла и экспрессии насосов множественной лекарственной устойчивости. Эти данные не указывают на непосредственную невозможность применения этих веществ в клинике, а лишь свидетельствуют о тех побочных эффектах, которые будут развиваться при превышении пороговой концентрации, которую далее следует установить в ходе доклинических испытаний, если таковые будут проводиться с учетом полученных нами данных. При этой работе важно также учитывать, что у всех трех веществ разная сигнатура нарушения работы каскада NFE2L2/AP-1, а это свидетельствует об изменениях общего сигнального фона клетки.

Также исходя из полученных данных, в использованных условиях тестирования исследуемое вещество 92t не вызывает выраженной активации композитного каскада NFE2L2/AP1 и не оказывает значительного влияния на экспрессию регулятора - NFE2L2. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что в данной концентрации и в протестированных условиях исследуемое вещество не демонстрирует свойств, связанных с АФК-сопряженной цитотоксичностью и рисками активации систем лекарственной устойчивости.

### **Список литературы**

Bath PM, Coleman CM, Gordon AL, Lim WS, Webb AJ. Nitric oxide for the prevention and treatment of viral, bacterial, protozoal and fungal infections // F1000Res. – 2021. – Vol. 10. – P. 536.

Chomczynski P, Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on // *Nat Protoc.* – 2006. – Vol. 1(2). – P. 581-5.

da Silva GM, da Silva MC, Nascimento DVG, Lima Silva EM, Gouvêa FFF, de França Lopes LG, Araújo AV, Ferraz Pereira KN, de Queiroz TM. Nitric Oxide as a Central Molecule in Hypertension: Focus on the Vasorelaxant Activity of New Nitric Oxide Donors // *Biology (Basel).* – 2021. – Vol.10(10). – P. 1041.

Granik V.G., Grigor"ev N.B. Exogenous donors of nitric oxide (a chemical aspect) // *Russian Chemical Bulletin.* – 2002. – Vol. 51. - P. 1375–1422

Man MQ, Wakefield JS, Mauro TM, Elias PM. Role of nitric oxide in regulating epidermal permeability barrier function // *Exp Dermatol.* – 2022. – Vol. 31(3). – P. 290-298.

Nasyrova RF, Moskaleva PV, Vaiman EE, Shnayder NA, Blatt NL, Rizvanov AA. Genetic Factors of Nitric Oxide's System in Psychoneurologic Disorders // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21(5). – P. 1604.

Pavlidis S, Vera I, Gandara R, Sneddon S, Pestell RG, Mercier I, Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP. Warburg meets autophagy: cancer-associated fibroblasts accelerate tumor growth and metastasis via oxidative stress, mitophagy, and aerobic glycolysis // *Antioxid Redox Signal.* – 2012. – Vol. 16(11). – P. 1264-84.

Sodano F, Gazzano E, Fruttero R, Lazzarato L. NO in Viral Infections: Role and Development of Antiviral Therapies // *Molecules.* – 2022. – Vol. 27(7). – P. 2337.

Статья поступила в редакцию 27 июня 2024 г.

Поступила после доработки 16 сентября 2024 г.

Принята к печати 20 сентября 2024 г.

Received 27, June, 2024

Revised 16, September, 2024

Accepted 20, September, 2024