

УДК 576.315.4:547.918

Ю. С. КАНАШ

АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ-ТРАНСПОРТЕРОВ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ДЕЙСТВИИ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА

*Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси, Минск, Беларусь,
e-mail: jurakanash@rambler.ru*

Установлено, что при оценке экспорта конъюгатов глутатиона из эритроцитов при действии N-ацетил-L-цистеина (НАС) наблюдается незначительное увеличение активности ABCC1 и RLIP76. Последний, по-видимому, вносит определенный вклад в GSH-независимый транспорт ксенобиотиков из эритроцитов. С помощью флуоресцентного красителя кальцеина показано, что транспортная активность MRP1 в процессе детоксикации ксенобиотиков, конъюгированных с глутатионом, в малой степени зависит от пула свободного глутатиона.

Ключевые слова: белки-транспортёры ксенобиотиков, кальцеин, N-ацетилцистеин, глутатион, эритроциты человека.

J. S. KANASH

ACTIVITY PROTEIN TRANSPORTERS IN HUMAN ERYTHROCYTES UNDER N-ACETYL-L-CYSTEINE ACTION

*Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences, Minsk, Belarus,
e-mail: jurakanash@rambler.ru*

It was established that in assessing transport glutathione conjugates from erythrocytes by the action N-acetylcysteine there is tendency to increase activity both ABCC1 and RLIP76. The latter, apparently, seems to make a certain contribution to the GSH-independent transport of xenobiotics from the erythrocytes. Using the fluorescent dye calcein was shown that transport activity of MRP1 during detoxification of xenobiotics, conjugated with glutathione, does not depend on the pool of free glutathione.

Keywords: proteins xenobiotic transporters, calcein, N-acetylcysteine, glutathione, human erythrocytes.

Введение. Выведение глутатионовых конъюгатов является завершающей стадией защиты клетки от чужеродных веществ. Конъюгаты глутатиона с ксенобиотиками менее реакционноспособны и токсичны, чем исходные вещества, и выводятся из клеток с помощью различных транспортных систем. Ввиду отсутствия некоторых ферментов, обеспечивающих дальнейший метаболизм конъюгатов глутатиона, эритроциты человека представляют собой удобную модель для изучения особенностей процессов детоксикации ксенобиотиков из клеток крови [1, 2]. Известно, что глутатион (γ -глутамил-цистеинил-глицин, GSH) – распространенный клеточный тиол и низкомолекулярный трипептид, в эритроцитах человека его концентрация составляет примерно 2 мМ. Он способен предотвращать окисление SH-групп и восстанавливать дисульфидные связи, инактивировать свободные радикалы и участвовать в процессах выведения ксенобиотиков из клеток [2, 3]. Одним из предшественников GSH является антиоксидант N-ацетил-L-цистеин (НАС), который может достаточно быстро накапливаться в клетках и диацетилироваться. Это приводит к значительному увеличению концентрации GSH [3].

Антиоксиданты, включая НАС, наряду с цитостатиками являются модификаторами биологических реакций и используются в онкологии. Действие таких препаратов направлено как на опухолевые клетки, так и на различные регуляторные системы организма, восстановление или стимуляцию противоопухолевой резистентности, усиление антибластомной эффективности

терапии и ослабление ее токсического действия на организм. К настоящему времени существуют две различные точки зрения относительно роли мембранных белков-транспортёров в процессах выведения конъюгатов глутатиона из клеток. С одной стороны, считается, что конъюгаты глутатиона транспортируются из клеток с помощью АТФ-зависимых мембранных белков семейства ABCС (MRP) [4]. С другой стороны, некоторые исследователи связывают транспорт большинства (около 70 %) конъюгатов глутатиона с активностью динитрофенил-S-глутатион АТФазы (DNP-SG АТФазы), известной также как 76 кДа белок (RLIP76). Последний обнаружен практически во всех клетках различных организмов, в том числе в эритроцитах человека [5–8].

Ранее нами показано [9], что при действии на эритроциты человека NAC в концентрации 0,1–10 мМ в течение 60 мин выход конъюгатов глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом (DNP-SG-конъюгатов) из клеток уменьшается в среднем на 10–20 %. Однако при более длительной инкубации эритроцитов с NAC (в течение 24 ч) в концентрации 0,1 мМ был получен противоположный эффект [10]. В работе [10] также установлено, что воздействие NAC в концентрации 5–10 мМ на эритроциты в течение 60 мин статистически значимо увеличивает выход DNP-SG-конъюгатов в среднем на 10–20 % по отношению к интактным клеткам.

Цель данной работы – выявление особенностей функционирования транспортных мембранных белков семейства MRP и RLIP76 в эритроцитах человека при действии N-ацетилцистеина *in vitro*.

Материалы и методы исследования. В работе использована периферическая кровь условно здоровых доноров, полученная из ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» МЗ РБ. В качестве консерванта использован гепарин. Выделение эритроцитов из периферической крови доноров проводили по методу [5].

О транспортной активности белков семейства MRP и RLIP76 судили по кинетике выхода конъюгатов глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом (CDNB) (DNP-SG-конъюгатов) [1]. Для этого отмытые от плазмы эритроциты ресуспензировали в буфере А (138 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 6,4 мМ Na₂HPO₄, 1 мМ NaH₂PO₄, pH 7,45), содержащем CDNB в концентрации 0,3 мМ. Суспензию эритроцитов (1 %-ный гематокрит) инкубировали в течение 40 мин при 37 °С, после чего трижды отмывали в течение 5 мин (2000 g, 4 °С). Затем проводили инкубацию клеток с NAC или HCl в течение 60 и 180 мин при 37 °С в буфере А, содержащем 5,6 мМ глюкозы, после чего собирали супернатант, осаждали его 10 %-ной трихлоруксусной кислотой и измеряли поглощение раствора при $\lambda = 340$ нм (D_{340}), по величине которого судили о степени выхода DNP-SG-конъюгатов. Следует отметить, что инкубацию эритроцитов с CDNB и NAC проводили последовательно, так как установлено, что NAC способен реагировать с 1-хлор-2,4-динитробензолом с образованием гемоглобин-цистеин-DNB-аддуктов даже в системах, не содержащих ферментов, а глутатионтрансферазы могут утилизировать наряду с GSH также NAC и γ -глутамилцистеин [3]. Концентрацию GSH определяли по методу Элмана [9].

Функциональную активность транспортного белка MRP1 определяли по остаточному удержанию флуоресцентного красителя кальцеина-АМ (CAL) [11]. Для этого суспензию интактных эритроцитов в буфере А нагружали кальцеином-АМ в течение 45 мин при 37 °С, отмывали 5 мин (2000 g, 4 °С) и ресуспензировали в исходном буфере. Затем клетки инкубировали с исследуемыми концентрациями NAC или HCl по протоколу, описанному выше, и незамедлительно проводили цитофлуориметрический анализ.

Эстеразную активность эритроцитов контролировали по интенсивности флуоресценции кальцеина-АМ, используя метод [8]. Для этого эритроциты, предварительно обработанные NAC или HCl, инкубировали в буфере А с кальцеином-АМ в конечной концентрации 1 мкМ в течение 45 мин при 37 °С и проводили цитофлуориметрический анализ на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD, США). Спектрометрические измерения проводили на спектрофотометре Specord M40 (Германия). Различия между группами оценивали с помощью непараметрических критериев Вилкоксона и Манна–Уитни в программе Statistica v.6.0. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$. На рис. 1–3 представлены медианные значения из 4–10 независимых экспериментов.

Результаты и их обсуждение. Известно, что функциональная активность большинства транспортных белков находится в узких пределах концентрации ионов водорода (физиологические значения), соответствующей для животных клеток, pH 6,0–8,0. В работе [12] показано, что если pH внешней среды находится в нейтральном диапазоне (7,0–7,7), то цитозольный pH отличается на $\pm 0,05$. При значительных отклонениях pH инкубационной среды от физиологических значений белки могут подвергаться конформационным изменениям, приводящим к потере активности из-за денатурации или изменения зарядов их молекул. Также установлено, что изменение pH среды влияет на степень ионизации и физико-химическое состояние кислотных и основных групп в структуре транспортных белков (COOH-группы дикарбоновых аминокислот, SH-группы цистеина, имидазольного азота гистидина, NH₂-группы лизина и др.) [13]. Кроме того, следует отметить, что на функционирование транспортных белков оказывает влияние суммарный заряд субстратов и кофакторов (например, GSH для MRP1).

Во многих работах, посвященных исследованию различных клеточных систем *in vitro* с использованием NAC в качестве антиоксиданта, не учитывается его свойство сдвигать pH инкубационной суспензии в кислую область при добавлении в миллимолярных концентрациях [14, 15]. Нами установлено, что добавление NAC в концентрации 100 мкМ в буфер А (pH 7,45) практически не изменяет значение pH среды, в то время как NAC в концентрации 1 мМ снижает pH буфера А до $7,25 \pm 0,05$, а добавление в концентрациях 5 и 10 мМ приводит к снижению значений pH буфера А до $6,50 \pm 0,05$ и $4,00 \pm 0,05$ соответственно. С целью оценки влияния снижения pH инкубационного буфера на исследуемые транспортные процессы проведены эксперименты, в которых с помощью HCl модифицировали pH буфера А до уровня, соответствующего воздействию NAC в концентрации 1–10 мМ. Как видно из рис. 1, значимых отличий между действием NAC в концентрации 1–10 мМ и HCl в концентрациях, равноценно изменяющих pH инкубационного буфера, не установлено.

Согласно данным, полученным ранее [7], и результатам данного исследования, NAC в концентрации 0,1–5 мМ не приводит к гемолизу эритроцитов, тогда как 10 мМ антиоксиданта вызывает значительный (>50 %) гемолиз клеток. При этом эстеразная активность – маркер жизнеспособности клеток – в не подвергшихся гемолизу клетках снижается в среднем на 60 % (рис. 2). Следует также отметить, что в ряде случаев процент гемолиза был незначительным – ~10 % (данные не приведены), что, возможно, связано с индивидуальной устойчивостью эритроцитов доноров к гемолизу при закислении инкубационного буфера. Более того, установлено, что краткосрочное (1 ч) воздействие NAC в концентрации 1–10 мМ при стабилизации инкубационного буфера до физиологических значений pH не оказывает влияния (по сравнению с нативными клетками) на жизнеспособность эритроцитов. Таким образом, снижение жизнеспособности клеток при воздействии NAC в миллимолярных концентрациях (без стабилизации pH буфера) в значительной степени обусловлено сдвигом pH инкубационного буфера в кислую область. На основании изло-

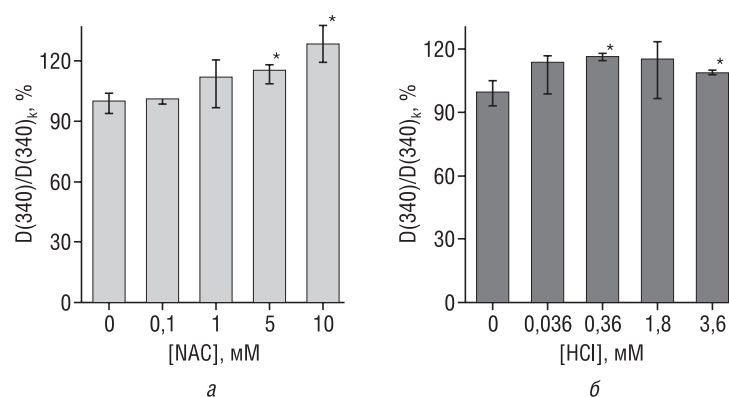


Рис. 1. Выход конъюгатов глутатиона из эритроцитов человека при действии NAC (а) и HCl (б) (HCl в используемых концентрациях снижает значение pH инкубационного буфера, как в случае воздействия NAC (0,1–10 мМ): 1 – pH 7,45; 2 – pH $7,45 \pm 0,05$; 3 – pH $7,25 \pm 0,05$; 4 – pH $6,50 \pm 0,05$; 5 – pH $4,00 \pm 0,05$. За 100 % принято оптическое поглощение образцов в отсутствие NAC или HCl (контроль). * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

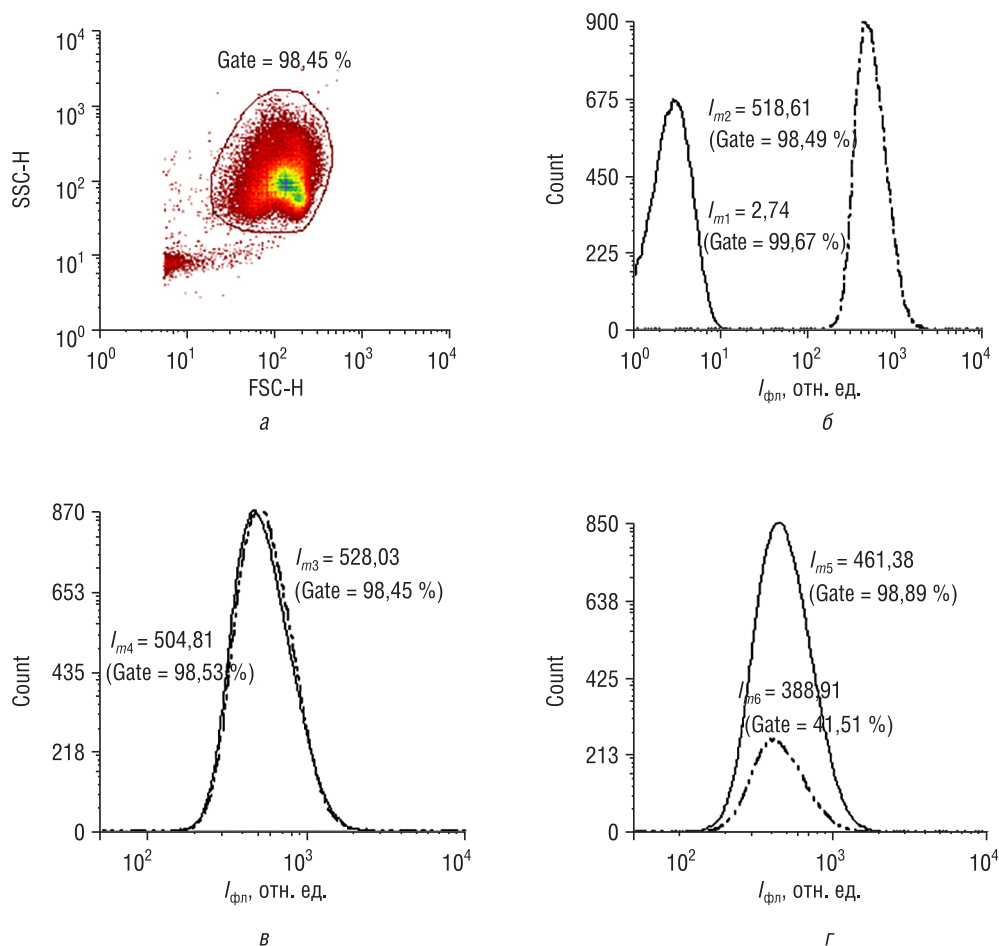


Рис. 2. Гистограммы распределения интенсивности флуоресценции кальцеина (I_{fl}) в эритроцитах после воздействия NAC в различных концентрациях: а – процентное содержание жизнеспособных эритроцитов в выбранном регионе (Gate), по оси ординат представлен параметр бокового рассеяния света (SSC-H), а по оси абсцисс – прямого рассеяния света (FSC-H); б – значения медиан I_{fl} эритроцитов до (I_{m1}) и после (I_{m2}) обработки CAL; в – значения медиан I_{fl} CAL в эритроцитах после обработки NAC в концентрациях 0,1 mM (I_{m3}) и 1 mM (I_{m4}); г – значения медиан I_{fl} CAL в эритроцитах после обработки NAC в концентрациях 5 mM (I_{m5}) и 10 mM (I_{m6}). В скобках представлено процентное содержание жизнеспособных эритроцитов в выбранном регионе

женного выше можно заключить, что для изучения транспортных процессов в эритроцитах при действии NAC целесообразно использовать концентрации данного антиоксиданта от 0,1 до 1 mM, которые сдвигают pH в сторону окислителей не более чем на 0,2.

Ранее показано, что для выведения DNP-SG-конъюгатов из клетки с участием MRP1 необходимо наличие определенного пула свободного глутатиона и АТФ [4], а для функционирования RLIP76 достаточно только присутствия АТФ [5, 6]. Однако установлено, что применение CDNB в концентрации 1 mM в течение 15 мин приводит к снижению уровня внутриклеточного GSH более чем на 70 % [2, 3], при этом последующее воздействие NAC в концентрации 5 mM в течение 3 ч на истощенные по глутатиону эритроциты позволяет практически полностью восстановить его пул [2]. Также известно, что NAC способствует выходу конъюгатов глутатиона после истощения последнего с помощью CDNB, а в ситуации нарушения редокс-баланса эритроциты могут задействовать GSH-независимый механизм детоксикации, что позволяет утилизировать низкомолекулярные тиол-содержащие соединения [3]. На основании этого можно предположить, что основная роль в выведении ксенобиотиков из клетки в таком случае может принадлежать белкам, активность которых не зависит от концентрации GSH.

Для уточнения этого предположения проведены исследования по оценке остаточного удержания флуоресцентного красителя кальцеина, за выброс которого из клеток отвечает преимущественно MRP1 белок [5]. Из рис. 3, а видно, что статистически достоверное снижение интенсивности

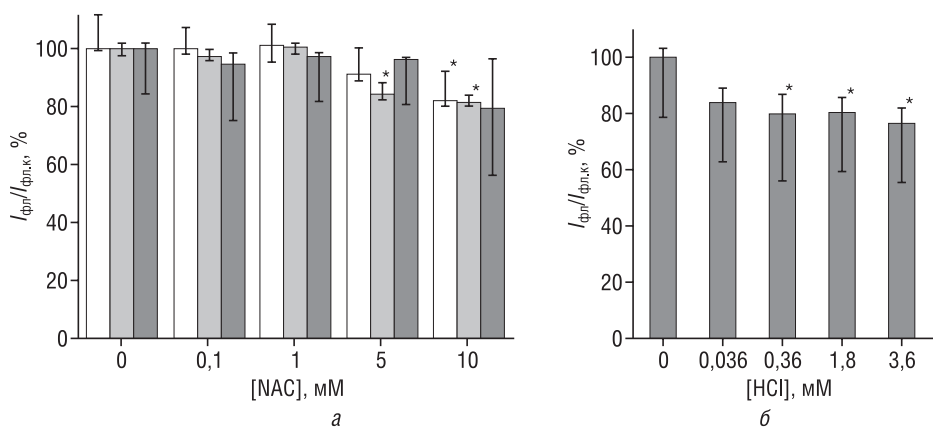


Рис. 3. Остаточное удержание кальцеина в эритроцитах при воздействии NAC (а) и HCl (б): а – – NAC; – последовательное воздействие CDNB (0,1 мМ) и NAC в концентрации 0,1–10 мМ; – одновременное воздействие NAC и NaOH; б – влияние HCl в используемых концентрациях на снижение значения pH инкубационного буфера до уровня, соответствующего воздействию NAC (0,1–10 мМ): 1 – pH 7,45; 2 – pH 7,45 ± 0,05; 3 – pH 7,25 ± 0,05; 4 – pH 6,50 ± 0,05; 5 – pH 4,00 ± 0,05. За 100 % принято значение интенсивности флуоресценции CAL ($I_{\text{фл.к}}$) в эритроцитах в отсутствие NAC или HCl (контроль). * – различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

флуоресценции CAL на 10–20 % в эритроцитах наблюдалось только при действии NAC в концентрациях 5 и 10 мМ, что свидетельствует о возрастании транспортной активности белка MRP1.

Также было оценено остаточное удержание кальцеина в эритроцитах после предварительного истощения пула глутатиона посредством CDNB, но статистически значимых различий по сравнению с клетками, проинкубированными только с NAC в течение 1 ч, выявить не удалось (рис. 3, а). Это косвенно подтверждает предположение о том, что действие белка MRP1 не зависит от пула свободного глутатиона, а присоединение последнего вызывает конформационные изменения белка лишь посредством увеличения сродства к определенному роду субстратов.

Кроме того, не установлено достоверных отличий между действием NAC и HCl (рис. 3). Это подтверждают расчеты коэффициента ранговой корреляции для двух групп данных ($R_s = 0,705$; $p = 0,0007$; $n = 10$). Так, если для представленных выше данных по влиянию NAC в концентрации 0,1–10 мМ на остаточное удержание кальцеина в качестве контроля взять соответствующие по pH величины интенсивности флуоресценции кальцеина, то получим, что снижение активности транспортера в большой степени обусловлено снижением pH инкубационной среды. В то же время скомпенсированные по pH с помощью NaOH результаты (рис. 3, а) говорят о незначительном снижении остаточного удержания кальцеина (порядка 10 %) при действии NAC в концентрации 10 мМ.

Следует отметить, что при увеличении времени инкубации эритроцитов с NAC в концентрациях 0,1 и 1 мМ до 3 ч остаточное удержание кальцеина также снижалось в среднем на 10 % (см. таблицу), но, в отличие от 1-часовой инкубации с NAC, при 3-часовом воздействии установлены статистически достоверные отличия при действии NAC в концентрации 1 мМ.

Выход конъюгатов глутатиона с CDNB, уровень GSH и остаточное удержание кальцеина в эритроцитах, подвергшихся 3-часовому воздействию NAC

[NAC], мМ	DNP-SG-конъюгаты, %	[GSH], %	CAL, %
0	100,00 (2,19; 12,93)	100,00 (1,71; 1,71)	100,00 (8,43; 0,89)
0,1	100,38 (3,64; 3,43)	102,56 (0,83; 0,83)	100,90 (6,50; 6,94)
1	107,56 (0,49; 17,84)	109,40 (1,56; 1,56)	91,38 (4,71; 1,41)*

* Различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Заключение. Установлено, что при использовании NAC в концентрациях свыше 1 мМ необходимо учитывать его способность к закислению инкубационной среды. Более того, эффекты миллимолярных концентраций NAC на изменение транспортных процессов мембранопосредованных

белков MRP1 и RLIP76 в большинстве случаев вызваны именно снижением pH. Воздействие НАС в концентрациях 0,1; 1 и 5 мМ не оказывает эффекта на активность внутриклеточных эстераз эритроцитов человека, тогда как присутствие данного антиоксиданта в инкубационной среде в концентрации 10 мМ снижает число жизнеспособных клеток более чем в 2 раза. Показано, что MRP1-опосредованный транспорт ксенобиотиков, конъюгированных с GSH, слабо зависит от концентрации последнего в клетках.

Список использованной литературы

1. Direct measurement of the rate of glutathione synthesis in 1-chloro-2,4-dinitrobenzene treated human erythrocytes / J. E. Raftos [et al.] // *Redox. Rep.* – 2006. – Vol. 11, N 1. – P. 9–14.
2. Kinetics of uptake and deacetylation of N-acetylcysteine by human erythrocytes / J. Raftos [et al.] // *Int. J. Bio. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 39, N 9. – P. 1698–1706.
3. Yildiz, D. Comparison of N-acetyl-L-cysteine and L-cysteine in respect to their transmembrane fluxes / D. Yildiz, I. Kuran // *Turk. J. Med. Sci.* – 2004. – Vol. 34. – P. 233–238.
4. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1/ S. P. Cole [et al.] // *Trends Pharma. Sci.* – 2006. – Vol. 27, N 8. – P. 438–446.
5. RLIP76: a novel glutathione-conjugate and multi-drug transporter / S. Singhal [et al.] // *Biochem. Pharma.* – 2009. – Vol. 77, N 5. – P. 761–769.
6. RLIP76 is the major ATP-dependent transporter of glutathione-conjugates and doxorubicin in human erythrocytes / R. Sharma [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2001. – Vol. 391, N 2. – P. 171–179.
7. Канаши, Ю. С. Определение жизнеспособности эритроцитов человека с помощью флуоресцентного красителя кальцеина-AM при действии N-ацетилцистеина / Ю. С. Канаши, А. В. Тамашевский // Сб. ст. XI съезда БООФИБ. – Минск, 2014. – Т. 2. – С. 179–181.
8. Novel fluorescence assay using calcein-AM for the determination of human erythrocyte viability and aging / D. Bratosin [et al.] // *Cytometry A.* – 2005. – Vol. 66, N 1. – P. 78–84.
9. Канаши, Ю. С. Влияние антиоксидантов на активность глутатион-S-трансфераз и транспорт конъюгатов глутатиона в эритроцитах человека / Ю. С. Канаши // *Вес. НАН Беларусі. Сер. біял. навук.* – 2009. – № 4. – С. 128–132.
10. Канаши, Ю. С. Влияние низкомолекулярных антиоксидантов на структурно-функциональное состояние динитрофенил-S-глутатион АТФазы в эритроцитах человека / Ю. С. Канаши, А. В. Тамашевский, Н. В. Гончарова // Сб. ст. X съезда БООФИБ. – Минск, 2012. – Т. 1. – С. 36–38.
11. Detection of MRP functional activity: calcein AM but not BCECF AM as a Multidrug Resistance-related Protein (MRP1) substrate / D. P. Olson [et al.] // *Cytometry.* – 2001. – Vol. 46. – P. 105–113.
12. Determination of the intracellular pH of intact erythrocytes by ¹H NMR spectroscopy / D. L. Rabenstein [et al.] // *Anal. Biochem.* – 1982. – Vol. 121, N 2. – P. 423–432.
13. Glaser, R. Does the Transmembrane Potential ($\Delta\psi$) or the Intracellular pH (pH_i) Control the Shape of Human Erythrocytes? / R. Glaser // *Biophys. J.* – 1998. – Vol. 75, N 1. – P. 569–570.
14. Effect of COPD treatments on MRP1-mediated transport in bronchial epithelial cells / Deen M. Vander [et al.] // *Int. J. Chron. Obstruct. Pulmon. Dis.* – 2008. – Vol. 3, N 3. – P. 469–475.
15. Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) mediated vincristine resistance: effects of N-acetylcysteine and Buthionine sulfoximine / I. Akan [et al.] // *Cancer Cell Int.* – 2005. – Vol. 5, N 1. – P. 22–31.

Поступила в редакцию 26.04.2016