

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ И КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»**

УДК 577.121: 577.15: 615.13/15

**КАНАШ
Юрий Степанович**

**МОЛЕКУЛЯРНО-МЕМБРАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ
ДЕЙСТВИЯ АНТИОКСИДАНТОВ
НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ
БЕЛКОВ-ТРАНСПОРТЁРОВ КСЕНОБИОТИКОВ
В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.01.02 – биофизика

Минск, 2021

Работа выполнена в лаборатории медицинской биофизики ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Научный руководитель: **Слобожанина Екатерина Ивановна**
доктор биологических наук, член-корреспондент
НАН Беларуси, профессор, заведующий
лабораторией медицинской биофизики ГНУ
«Институт биофизики и клеточной инженерии
НАН Беларуси»

Официальные оппоненты: **Вересов Валерий Гаврилович**, доктор
биологических наук, главный научный сотрудник
лаборатории иммунологии и клеточной
биофизики ГНУ «Институт биофизики и
клеточной инженерии НАН Беларуси»

Семенкова Галина Николаевна, кандидат
биологических наук, доцент, доцент кафедры
радиационной химии и химико-фармацевтических
технологий химического факультета
Белорусского государственного университета

Оппонирующая организация: Учреждение образования «Гродненский
государственный университет им. Янки Купалы»

Защита состоится « 18 » июня 2021 г. в 14-00 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.37.01 при ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27. Телефон ученого секретаря 351-58-56; факс 278-23-59; E-mail: lukyanenko@ibp.org.by

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Автореферат разослан « 17 » мая 2021 года

Ученый секретарь
Совета по защите диссертаций Д 01.37.01,
кандидат биологических наук



Лукьяненко Л.М.

ВВЕДЕНИЕ

При различных стрессорных воздействиях на организм человека изменяется как количество эритроцитов, так и их структурно-функциональные характеристики [Andolfo et al., 2016]. Многие патологические состояния, включая онкологические и сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ), в частности ишемическая болезнь сердца (ИБС), тесно связаны с активацией процессов свободнорадикального (СР) окисления [Prochazkova et al., 2011]. Для собственной защиты от реакционно-способных молекул, таких как активные формы кислорода (АФК), клетки организма содержат широкий спектр антиоксидантов (АО). АФК нейтрализуются эндогенными АО, такими как восстановленный глутатион (GSH), α -токоферол (α -Т), аскорбиновая кислота (АК), N-ацетилцистеин (NAC), флавоноиды [Тараховский и др., 2013] и другими ферментативными и неферментативными системами АО. Помимо этого, клетки в норме обладают устойчивостью к ксенобиотикам, которая связана с экспрессией и функционированием белков семейства ABC [Yadav et al., 2007]. В эритроцитах экспрессированы транспортные белки: MRP1, MRP4 и MRP5 из семейства ABC [Klokouzas et al., 2003; Wu et al., 2005], а также АТФ-зависимый транспортёр конъюгатов глутатиона RLIP76 [Sharma et al., 2001], который не является ABC транспортёром [Awasthi et al., 2007], но входит в комплексы с фактором и белком теплового шока 1 (Hsf-1 и HSP90), тубулином и Ral [Vatsyayan et al., 2010] и, таким образом, способен отвечать за устойчивость к химическому, окислительному и другим видам стресса [Singhal et al., 2009]. Указанные белки, наряду с GSH и глутатион-S-трансферазой (GST), играют важную роль в обезвреживании экзо- и эндогенных электрофильных соединений, способных повреждать основные компоненты клетки [Ставровская и др., 2014]. Несмотря на успешное применение АО в медицине, существует ряд работ, в которых показано, что АО отдельно и в сочетании с лекарственными средствами оказывали прооксидантное действие, и, таким образом, приводили к возникновению различных патологий [van Zandwijk et al., 2000; Sayin et al., 2014]. Такие эффекты могут быть обусловлены как высокими концентрациями АО, так и их воздействием на белки-транспортёры. В связи с тем, что информация о влиянии АО на функционирование белков-транспортёров ксенобиотиков достаточно ограничена и противоречива [Ставровская и др., 2015; Raghunath et al., 2018], возникла необходимость получения новых знаний об этих процессах.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами) и темами. Диссертационная работа выполнена в рамках ГКПНИ «Биологическая инженерия и биобезопасность» по заданию 18 «Исследование механизмов регуляции активности мембранных белков, ассоциированных с устойчивостью клеток к действию ксенобиотиков» (№ ГР20064750, 2006–2010 гг.); ГПНИ

«Фундаментальные основы биотехнологий» по заданию 1.30 «Изучить роль металлотионеинов в обеспечении гомеостаза цинка и редокс-состояния клеток крови при воздействии физико-химических факторов и разработать лабораторные способы оценки патологических состояний человека» (№ ГР20140135, 2014–2015 гг.); ГПНИ «Биотехнологии» по заданию 1.08 «Изучить участие металлотионеинов и каспаз в формировании множественной устойчивости клеток к действию ксенобиотиков с целью разработки биотехнологических приёмов для дифференциальной диагностики заболеваний крови» ГР20160072, 2016–2018 гг.); в рамках грантов БРФФИ Б12М-106 «Функционирование транспортёров семейства ABC при изменении состояния клеточных редокс-систем» (№ ГР20122294, 2012–2014 гг.), Б16МС-011 «Исследование влияния биологически активных соединений растительного происхождения как возможных противоопухолевых веществ на функционирование белков множественной лекарственной устойчивости» (№ ГР20162723 2016–2018 гг.) и гранта аспиранта «Молекулярные механизмы регуляторного действия антиоксидантов на функциональную активность белков-транспортёров ксенобиотиков» (2008–2009 гг.).

Тема работы соответствует перечням приоритетных направлений фундаментальных и прикладных исследований Республики Беларусь на 2006–2010 гг. (п. 3.10 - Молекулярная биология, биофизика регуляторных процессов и протеомика), на 2011–2015 гг. (п. 3.1 - Биохимия, биофизика и физиология растительной, животной и микробной клетки, ее надмолекулярных структур, биологических макромолекул и низкомолекулярных биорегуляторов, в том числе ферментов и гормонов) и на 2016–2020 гг. (п. 3.1 - Молекулярные и клеточные биотехнологии).

Цели и задачи исследования. Цель работы – выявить молекулярно-мембранные механизмы действия антиоксидантов на функциональную активность белков-транспортёров ксенобиотиков в эритроцитах человека в норме и при патологии.

Поставленная цель включала решение следующих задач:

1. Провести оценку жизнеспособности эритроцитов при воздействии гидрофобных и гидрофильных АО на клетки доноров и пациентов с ИБС.
2. Изучить активность GST в эритроцитах человека при действии АО.
3. Оценить изменение концентрации GSH и уровня свободнорадикальных соединений в эритроцитах доноров и пациентов с ИБС при действии АО.
4. Оценить влияние АО различных классов на микровязкость липидного бислоя мембран эритроцитов.
5. Определить экспрессию белков-транспортёров MRP1 и RLIP76 в эритроцитах человека.
6. Исследовать влияние АО на транспортную активность белков-транспортёров ксенобиотиков MRP1 и RLIP76 в эритроцитах доноров и

пациентов с ИБС.

Объекты исследования – эритроциты доноров и пациентов с ИБС, а также изолированные эритроцитарные мембраны. Образцы крови пациентов с ИБС были получены из РНПЦ «Кардиология».

Предмет исследования – структурно-функциональное состояние мембранных и цитоплазматических белков эритроцитов человека, участвующих в процессах детоксикации клеток от ксенобитиков.

Научная новизна. Впервые показано, что транспортная активность белков-транспортёров в эритроцитах человека (MRP1 и RLIP76) зависит от концентрации и времени воздействия низкомолекулярных гидрофильных и гидрофобных АО. Установлено, что транспортная активность MRP1 слабо связана с уровнем внутриклеточного GSH в эритроцитах человека.

Установлено, что при краткосрочном воздействии АО на эритроциты доноров *in vitro* независимо от их природы экспорт динитрофенил-S-глутатион (DNP-SG) конъюгатов из клеток в большей степени связан с функционированием RLIP76. Превышение уровня АФК над физиологическим диапазоном в эритроцитах доноров после воздействия АО приводит к снижению транспортной активности MRP1.

Обнаружено, что в эритроцитах пациентов с ИБС в процессе поддержания их окислительно-восстановительного баланса (ОВБ) после воздействия исследованных АО важная роль принадлежит трансмембранному АТФ-зависимому белку MRP1, транспортная активность которого усиливается при накоплении АФК, что приводит к снижению жизнеспособности клеток. В эритроцитах доноров основную функцию в поддержании ОВБ выполняет низкомолекулярный RLIP76.

Положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Воздействие АО на эритроциты человека разнонаправлено модулирует функциональную активность RLIP76 и MRP1. Уровень экспрессии MRP1 ниже по сравнению с экспрессией RLIP76 в эритроцитах доноров при физиологических условиях. Снижение жизнеспособности эритроцитов при действии АО согласуется с изменением функциональной активности белков-транспортёров.

2. В эритроцитах доноров функциональная активность MRP1 обратно коррелирует с содержанием АФК и практически не зависит от концентрации внутриклеточного GSH. В процессе поддержания ОВБ после воздействия АО на эритроциты доноров основная роль принадлежит низкомолекулярному белку RLIP76, функционирование которого также связано с уровнем GSH и активностью GST. Транспортные функции MRP1 и RLIP76 зависят от микровязкости липидного бислоя в мембранах эритроцитов человека.

3. Нарушение ОВБ пациентов с ИБС при действии АО приводит к снижению жизнеспособности клеток и не зависит от природы АО. Функциональная

активность RLIP76 в эритроцитах пациентов с ИБС после действия АО связана с уровнем GSH в большей степени, чем у доноров. Транспортная функция MRP1 усиливается при накоплении АФК после действия исследуемых АО на эритроциты пациентов с ИБС.

Личный вклад соискателя. Постановка цели и задач исследования, обсуждение полученных результатов осуществлялись совместно с научным руководителем. Экспериментальный материал получен автором самостоятельно. Анализ и интерпретация результатов проводились совместно с вед.н.с., к.б.н. Тамашевским А.В. Измерения на проточном цитофлуориметре проводились совместно с вед.н.с., к.б.н. Пинчуком С.В. (ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси») и ст.н.с. Гончаровой Н.В. (ГУ «РНПЦ трансфузиологии и медицинских биотехнологий» МЗ РБ).

Апробация результатов диссертации. Результаты диссертационной работы были представлены на: VIII, IX, X, XI и XIII международных конференциях: «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, 2008, 2010, 2012, 2014, 2018); III Международной научной конференции «Ксенобиотики и живые системы» (Минск, 2008); 13-ой Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, РФ, 2009); конференции «Молодежь в науке – 2009» (Минск, 2009); III Международной конференции «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологии и медицины» (Ростов-на-Дону, РФ, 2009); Международной школе для биофизиков «Каналы и транспортёры» (Эриче, Италия, 2011); 18-ом и 19-ом съезде Европейской Ассоциации исследователей эритроцитов (Вроцлав–Пиеховице, Польша, 2011 и Фортейланд, Эймейден, Нидерланды, 2013); Междисциплинарной конференции «Патология клетки» (Москва, РФ, 2013); Международном симпозиуме «АТФ-связывающие белки (ABC): «От множественной лекарственной устойчивости к генетическим заболеваниям» (Инсбрук, Австрия, 2016); 41-ом конгрессе Федерации европейских биохимических сообществ (FEBS) (Кушадасы, Турция, 2016); Международной научной конференции «Молодежь в науке – 2016» (Минск, 2016); Международном семинаре Европейской организации молекулярных биологов (EMBO) «Окисление тиолов в условиях токсичности и сигнализация» (Сан-Фелиу-де-Гишольс, Испания, 2017); Международных лекционных курсах FEBS/EMBO «Белки и сложность их организации» (Спецес, Греция, 2017); Совмещенном симпозиуме Бельгийского и Британского биофизических обществ «Современные тенденции в биофизике растворимых и мембранных белков» (Брюссель, Бельгия, 2018); 19-ой Международной конференции «Сахаровские чтения-2019: экологические проблемы XXI-го века» (Минск, 2019); конференции «Физико-химическая биология как основа современной медицины» (Минск, 2019); VI съезде биофизиков России (Сочи, 2019).

Опубликованность результатов диссертации. По теме диссертационной

работы опубликовано 25 работ, в том числе 5 статей в научных рецензируемых журналах, включенных в перечень ВАК Республики Беларусь (3,5 авторских листа), 6 статей в сборниках научных работ и 14 тезисов докладов. Общий объем публикаций составляет 5,8 авторских листа.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения; общей характеристики работы; основной части, в которой представлены анализ литературы (глава 1), описание использованных методов и объектов исследования (глава 2), основные результаты исследований (главы 3–5); заключения; списка литературы и приложения. Работа изложена на 132 страницах, содержит 8 таблиц и 28 рисунков. Библиографический список состоит из 260 источников и 25 публикаций соискателя.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования. В работе использована периферическая кровь условно здоровых доноров, полученная из ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий» Минздрава РБ (n=158). Образцы крови пациентов с диагнозом ИБС 2 степени (n=18, возраст $59,7 \pm 2,7$ лет) получены из РНПЦ «Кардиология». Эритроциты выделяли из свежей цельной крови путем её трёхкратного центрифугирования при 1500g, в течение 15 мин в изотоническом растворе NaCl. Мембраны эритроцитов выделяли по методу [Dodge et al., 1963]. Нагрузку эритроцитов АО в концентрациях 10 – 1000 мкМ проводили путем их инкубации с суспензией клеток в буфере А (138 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ $MgCl_2$, 6,4 мМ Na_2HPO_4 , 1 мМ $NaNH_2PO_4$, 5,6 мМ глюкоза, pH 7,4) при 37°C (1–3 ч и/или 22–24 ч). Концентрацию α -Т в эритроцитах определяли методом ВЭЖХ [Solichová et al., 2003] с модификациями, уровень GSH – по методу [Ellman et al., 1959]. Активность внутриклеточных эстераз (жизнеспособность эритроцитов) оценивали по интенсивности флуоресценции кальцеина (CAL) [Bratosin et al., 2005]. Активность GST проводили фотометрически [Habig et al., 1974]. Об изменении микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов судили по генерализованной поляризации флуоресценции (GP) липофильного зонда 6-додеканол-2-диметиламинонафтадена (лаурдана) [Parasassi et al., 1991]. Уровень экспрессии белков-транспортёров MRP1 и RLIP76 в эритроцитах определяли методом прямой и непрямой иммунофлуоресценции [Meaden et al., 2002; Sharma et al., 2001] с использованием моноклональных антител anti-MRP1 (клон QCRL-1), anti-RALBP1 и соответствующих изотипических контролей, конъюгированных с флуорофорами. Функциональную активность DNP-SG АТФ-азы оценивали по выходу конъюгатов GSH с 1-хлор-2,4-динитробензолом (CDNB) спектрофото-метрически [Singhal et al., 2009]; активность белков MRP1 и MRP4 – по транспорту конъюгатов GSH с монохлорбиманом (mbCl-SG) флуориметрическим методом [Pulaski et al., 1995], а MRP1 – по остаточному удержанию кальцеина в эритроцитах

цитофлуориметрическим методом [Olson et al., 2001]. Изменение ОББ оценивали с помощью зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата по интенсивности флуоресценции его производного DCF [Jemaà et al., 2017]. Все представленные в работе данные являются медианными или средними значениями 5-18 независимых экспериментов. Результаты экспериментов анализировали с использованием параметрического критерия Стьюдента и непараметрических критериев Уилкоксона, Манна-Уитни, Спирмена в программе STATISTICA 8.0 [Гланц, 1999].

Влияние антиоксидантов на жизнеспособность эритроцитов и функционирование белков-транспортёров ксенобиотиков

Для реализации поставленных в работе задач были выбраны 4 вида АО, которые принадлежат к классу гидрофобных (α -Т, флавоноид кверцетин) и гидрофильных (АК, NAC) соединений [Тараховский и др., 2013]. α -Т и АК наиболее изучены среди АО [Liu, 2002 et al.; Linster, Van Schaftingen, 2007]. α -Т находится с внутренней стороны мембраны, взаимодействует с липофильными компонентами клетки [Li et al., 2016] и ферментами, участвующими в защите от ксенобиотиков. АК в клетке эффективно восстанавливает окисленные соединения. NAC является источником SH групп, стимулирует синтез GSH, ингибирует биотрансформацию ксенобиотиков путём перехвата свободных радикалов (СР) и модификации активности ряда ферментов [Raftos et al., 2007]. На модельных системах показано модулирование кверцетином активности GST и ABC транспортёров [Li et al., 2018].

Известно, что исследуемые АО по-разному накапливаются в эритроцитах. α -Т поступает в клетку в основном с помощью переносящего α -Т белка (α -ТТР), уровень α -Т в плазме крови человека составляет от 9,9 до 17,5 мкМ, в эритроцитах он равен 1,4–2,2 мкМ [Vasieva et al., 2011]. Нами изучено накопление α -Т в эритроцитах человека после 1 ч инкубации их в среде, содержащей данный АО в концентрациях 10, 100 и 1000 мкМ. Регистрируемая концентрация α -Т в эритроцитах в отсутствие АК была увеличена в 3 раза и находилась в пределах 5–6 мкМ, что было обусловлено окислением значительной части α -Т, в то время как в интактных клетках она составляла $1,9 \pm 0,2$ мкМ. Сочетанное воздействие α -Т с 1 мМ АК позволило зарегистрировать уровень α -Т в эритроцитах, превышающий физиологическое значение в 70 раз. АК в эритроциты транспортируется натрий-зависимыми котранспортёрами АК и находится в диапазоне ~5–60 мкМ, а её содержание в плазме крови составляет 60–100 мкМ [Vasieva et al., 2011; Cardenas et al., 2013]. Свыше 50% NAC поглощается анионными обменниками 1, что стимулирует образование GSH [Hozyasz, 2003]. Почти весь цистеин плазмы существует в виде окисленной формы (цистин). NAC взаимодействует с цистином, образуя конъюгаты NAC-цистеин, NAC-NAC и цистеин, уровень последнего в плазме способен достигать 100 мкМ [Whillier et al., 2009]. Важную

роль в регуляции уровня восстановителей в клетке играют флавоноиды, которые проявляют АО эффект *in vivo* в концентрациях 10–300 мкМ [Rietjens et al., 2002].

Несмотря на то, что в эритроцитах отсутствуют ядро и митохондрии, им присущи характерные признаки программируемой клеточной гибели (эриптоза) [Lang et al., 2015], самым ранним маркером которого является снижение активности внутриклеточных эстераз, что ассоциируют с жизнеспособностью клеток. Проведенная нами оценка жизнеспособности эритроцитов после воздействия на них АО в концентрациях от 10 мкМ до 10 мМ позволила выбрать оптимальный диапазон, который для большинства исследуемых соединений относится к терапевтическому и составляет 10–1000 мкМ. Установлено, что инкубация эритроцитов доноров с НАС и α -Т не приводила к изменению активности внутриклеточных эстераз, а после воздействия кверцетина и АК наблюдалось статистически достоверное снижение цитозольной эстеразной активности эритроцитов в среднем на 10–25% по сравнению с интактными клетками, оказывая наибольшее влияние на эритроциты пациентов с ИБС. Отличий по параметрам прямого и бокового рассеяния света в АО-модифицированных эритроцитах выявлено не было, что свидетельствует о сохранении формы и внутренней структуры клеток.

Для выяснения вопроса о том, как влияют АО на функциональную активность белков-транспортёров, была проведена оценка содержания MRP1 и RLIP76 в эритроцитах доноров. Как следует из рисунка 1, процентное содержание эритроцитов с экспрессированным MRP1 составляло в среднем $2,4 \pm 1,3\%$,

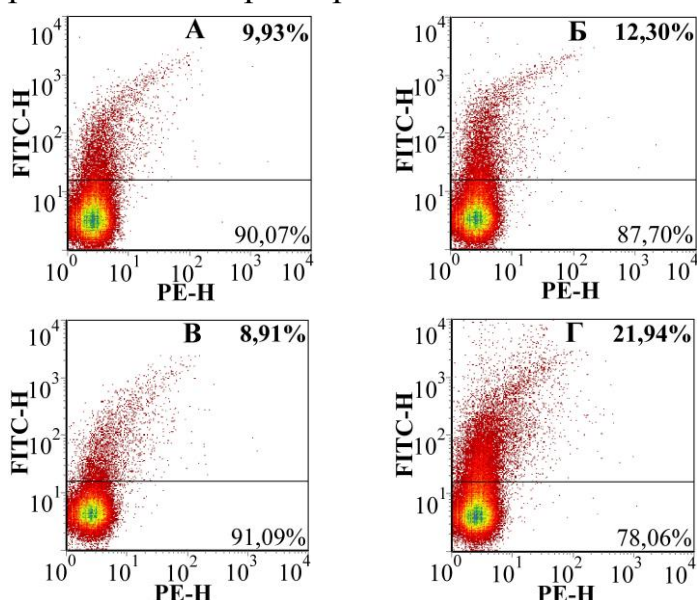


Рисунок 1. –
Точечные диаграммы,
характеризующие:
процент клеток
презентирующий анти-
IgG-FITC (А и В);
процент эритроцитов
презентирующий анти-
MRP1-FITC (Б);
процент эритроцитов
презентирующий
конъюгаты анти-
RLIP76+анти-IgG-FITC
(Г)

а количество клеток, экспрессирующих RLIP76 – $13,3 \pm 4,3\%$.

Оценка транспортной активности MRP и RLIP76 в эритроцитах человека (таблица 1), подвергшихся воздействию α -Т в интервале концентраций 10–1000 мкМ и при сочетанном действии с АК, показала, что 3ч и 24 ч воздействие α -Т в микромолярных концентрациях на эритроциты человека не приводило к

значимым изменениям в содержании DNP-SG конъюгатов в супернатантах и остаточного удержания CAL в эритроцитах по сравнению с интактными. Вместе с тем, воздействие в течение 3 ч α -Т совместно с 1 мМ АК на эритроциты вызывало увеличение транспортной активности белков, отвечающих за экспорт конъюгатов GSH, в среднем на 20–40% по сравнению с контролем, тогда как при 24 ч воздействии экспорт DNP-SG составлял в среднем 20%. Воздействие NAC в миллимолярных концентрациях на эритроциты приводило к увеличению экспорта DNP-SG и активности MRP1. АК не оказывала влияния на выход DNP-SG

Таблица 1. – Относительные значения величин оптической плотности DNP-SG конъюгатов (D/D_k , %) в супернатантах эритроцитов и интенсивности флуоресценции CAL ($I_{fl}/I_{fl,k}$, %) в эритроцитах после воздействия на них антиоксидантов *in vitro*

Анти- окси- дант	Время воздействия		3 ч		24 ч	
	Среднее \pm станд. откл.		D/D_k , %	$I_{fl}/I_{fl,k}$, %	D/D_k , %	$I_{fl}/I_{fl,k}$, %
	Интактные клетки		100	100	100	100
NAC	100 мкМ		100 \pm 4	99 \pm 3	104 \pm 5	99 \pm 2
	300 мкМ		98 \pm 4	84\pm13 *	101 \pm 3	–
	1000 мкМ		108 \pm 8	91\pm6 *	109\pm3 *	84\pm15 *
АК	100 мкМ		106 \pm 7	–	104 \pm 2	72 \pm 26
	500 мкМ		105 \pm 6	84 \pm 15	114\pm3 *	62\pm22 *
	1000 мкМ		107 \pm 8	80\pm14 *	123\pm2 *	48\pm16 *
α -Т	10 мкМ		103 \pm 6	98 \pm 13	102 \pm 4	98 \pm 14
	100 мкМ		111 \pm 3	94 \pm 8	105 \pm 5	105 \pm 25
	1000 мкМ		109 \pm 5	97 \pm 12	106 \pm 4	90 \pm 19
Квер- цетин	10 мкМ		78\pm10 *	103 \pm 4	65\pm11 *	102 \pm 3
	100 мкМ		67\pm7 *	99 \pm 7	57\pm13 *	105 \pm 5
α -Т	10мкМ	+1мМ АК	118 \pm 24	141\pm17 *	109 \pm 11	153\pm33 *
	100мкМ		118\pm16 *	148\pm39 *	108 \pm 8	151\pm28 *
	1000мкМ		138\pm26 *	136\pm35 *	118\pm12 *	145\pm34 *

За 100% приняты значения величин оптической плотности супернатантов и интенсивности флуоресценции CAL в эритроцитах, в среде инкубации которых отсутствовали АО (контроль); для α -Т совместно с АК за 100% приняты значения оптической плотности супернатантов/ интенсивности флуоресценции CAL в эритроцитах, в среде инкубации которых присутствовала АК в концентрации 1 мМ (контроль);

* - различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)

из клеток при 3 ч воздействии, однако, после 24 ч экспозиции эритроцитов с АК (500 и 1000 мкМ) выход DNP-SG конъюгатов из эритроцитов достоверно возрастал в среднем на 15–25% по сравнению с контролем. После 3 и 24 ч воздействия α -Т в микромолярных концентрациях совместно с АК происходит увеличение остаточного удержания CAL в среднем, соответственно, на 35–50% и 50–65%, что указывает на снижение транспортной функции MRP1. Инкубация клеток с АК в течение 3 ч в концентрациях 100–1000 мкМ приводила к снижению остаточного удержания CAL в эритроцитах в среднем на 10–20% по сравнению с контролем, что указывает на усиление транспортной функции MRP1. При этом, после 24 ч экспозиции клеток с АК в концентрациях 100 и 1000 мкМ остаточное

удержание CAL снижалось в 2 раза по отношению к интактным клеткам, что можно объяснить АК-индуцированным снижением pH инкубационного буфера и соответствующим снижением активности внутриклеточных эстераз [Glaser et al., 1998; Ugbaја et al., 2017]. После воздействия кверцетина в концентрациях 10-100 мкМ на эритроциты не обнаружено значимых отличий между транспортной активностью MRP1 в АО-модифицированных и контрольных эритроцитах. Выход DNP-SG конъюгатов из эритроцитов, модифицированных кверцетином (10-100 мкМ), снижался на 15-45% по отношению к контролю.

Таким образом, транспортная активность MRP1 и RLIP76 в эритроцитах зависит от концентрации и времени воздействия на них АО. Снижение жизнеспособности эритроцитов при действии АК приводит к повышению функциональной активности обоих транспортеров и снижению функционирования RLIP76 при действии кверцетина.

Структурно-функциональное состояние белков-транспортеров ксенобиотиков RLIP76 и MRP1 в эритроцитах человека при модификации окислительно-восстановительного баланса

Так как процесс защиты клеток от ксенобиотиков и СР является многоступенчатым, то при рассмотрении функционирования белков-транспортеров необходимо обязательно учитывать фон ОББ, а также вклад ферментов, типа GST, конъюгирующих ксенобиотики с GSH и состояние микровязкости липидного бислоя мембран. Модификацию ОББ эритроцитов посредством АО мы оценивали по изменению уровня GSH и АФК в клетках. Поскольку концентрация GSH в эритроцитах может достигать значений 2–3 мМ и превышает на порядок уровень остальных вместе взятых АО, то GSH наряду с АТФ имеет важное значение для функционирования белков семейства MRP [Rietjens et al., 2002]. Показано, что NAC после 3ч и 24 ч воздействия на эритроциты увеличивал уровень GSH в клетках на 10-30%, при действии АК наблюдалась тенденция к снижению уровня GSH (таблица 2). Воздействие на эритроциты кверцетина приводило к снижению концентрации GSH в клетках на 20-40%, что могло быть обусловлено его прооксидантным действием в концентрациях 100 и 300 мкМ. Полученные результаты согласуются с данными работы по влиянию кверцетина в концентрации 20 мкМ на уровень GSH в эндотелиальных клетках аорты человека и их реакции на окислительный стресс [Li et al., 2016]. Таким образом, образование кверцетин-GSH конъюгатов – один из возможных путей снижения пула GSH в клетке. Воздействие на эритроциты α -Т, а также АК и α -Т совместно не изменяли концентрацию GSH (таблица 2). Образующиеся АФК вызывают повреждение липидов и белков, что может привести к ряду заболеваний, поэтому наряду с оценкой содержания внутриклеточных АО (например, GSH) важно изучать протекание СР процессов в АО-модифицированных клетках. Нами обнаружено, что интенсивность

флуоресценции зонда DCF, встроенного в эритроциты, по изменению которой можно судить о протекании СР процессов в клетке, изменялась при воздействии

Таблица 2. – Содержание GSH и интенсивность флуоресценции DCF (отражающая уровень АФК) в эритроцитах после воздействия на них АО *in vitro*

Анти-оксидант	Время воздействия		3 ч		24 ч	
	Среднее±станд. откл.		GSH, %	DCF, %	GSH, %	DCF, %
	Интактные клетки		100	100	100	100
NAC	100 мкМ		103±5	106±21	109±8*	112±11*
	300 мкМ		109±7*	92±8	116±9*	–
	1000 мкМ		115±8*	111±15	118±9*	120±10*
АК	100 мкМ		90±10	114±18	80±20	98±15
	300 мкМ		70±27*	113±22*	88±13	–
	500 мкМ		103±19	127±20*	94±13	137±29*
	1000 мкМ		101±18	134±17*	83±21	169±52*
α-Т	10 мкМ		96±14	89±8*	91±18	109±25
	100 мкМ		95±21	91±15	101±11	97±28
	300 мкМ		–	81±19*	97±15	–
	1000 мкМ		104±13	82±13*	93±13	78±18*
Кверцетин	10 мкМ		92±3*	119±26	85±8*	88±8*
	100 мкМ		78±7*	125±27	71±16*	73±17*
	300 мкМ		71±12*	127±28	58±15*	–
α-Т	10мкМ	+1мМ АК	101±8	74±19*	117±27	75±9*
	100мкМ		96±34	68±15*	123±33	75±4*
	1000мкМ		92±21	69±22*	104±25	77±3*

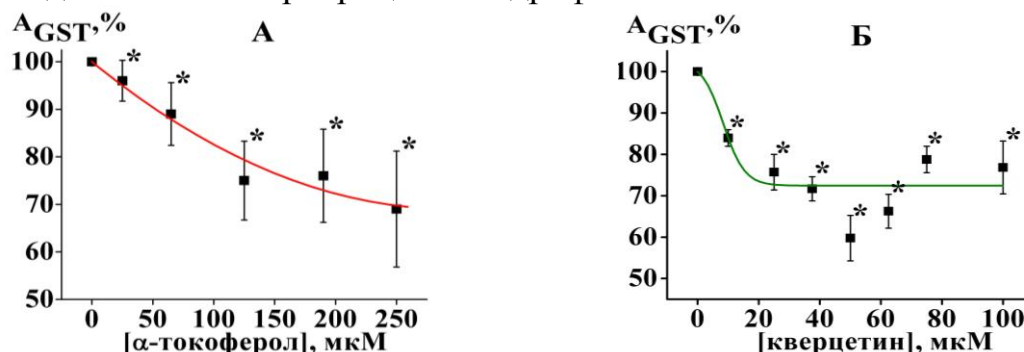
За 100% приняты значения исследуемых величин в интактных эритроцитах (контроль). Представленные данные выражены в процентах по отношению к контролю.

* - различия по сравнению с контролем достоверны ($p < 0,05$)

исследуемых АО по-разному. Как видно из таблицы 2, после 3ч воздействия на эритроциты NAC уровень АФК не изменялся, тогда, как его 24 ч воздействие приводило к сдвигу ОВБ в сторону прооксидантов. При экспонировании клеток с АК в течение 3 ч интенсивность флуоресценции DCF увеличивалась в среднем на 25-35%, после 24 ч воздействия данный параметр возрастал на 40-70% по отношению к интактным клеткам, что отчасти могло быть связано со снижением рН и метаболической активностью эритроцитов. Воздействие α-Т в течение 3 и 24 ч на эритроциты приводило к снижению на 10-20% уровня АФК. Воздействие кверцетина в течение 3 ч не приводило к значимым изменениям ОВБ, а увеличение времени инкубации до 24 ч – к снижению уровня АФК на 15-30%. Сочетанное воздействие АК и α-Т также снижало уровень АФК в среднем на 20-35% по отношению к интактным клеткам (таблица 2).

Так как реакции конъюгации GSH с ксенобиотиками катализирует внутриклеточный фермент GST, то нами было изучено изменение активности GST эритроцитов при действии АО. Как видно из рисунка 2А, активность GST после инкубации гемолизированных эритроцитов с α-Т снижалась. Наши

результаты согласуются с данными работы [van Naaften et al., 2003], где показали, что RRR- α -Т (стереоизомер α -Т) является неконкурентным ингибитором GST. Согласно [Ralat et al., 2006] GST содержит гидрофобный Н-сайт, присоединение к Н-сайту изменяет активность фермента. Нами не выявлено различий активности GST при действии на эритроциты гидрофильных АК и NAC в концентрациях



За 100% принята активность GST эритроцитов в отсутствие АО (контроль);

* – различия по сравнению с интактными GST эритроцитов достоверны ($p < 0,05$);

Рисунок 2. – Изменение активности GST при действии α -Т (А) и кверцетина (Б)

100-1000 мкМ и 100-5000 мкМ. В литературе имеются противоречивые данные о влиянии кверцетина на активность GSTP1-1 [Hayeshi et al., 2007]. Преобладающий механизм ингибирования по отношению к G и Н-сайтам является смешанным (чаще всего конкурентный). Значения IC_{50} для кверцетина при его действии на GST эритроцитов были выше в 2-4 раза по сравнению с активностью GST в тканях человека [Das et al., 1986; Yetuk et al., 2014]. Наши данные свидетельствуют, что при действии 10-100 мкМ кверцетина активность GST снижалась на 20–40% по отношению к контролю (рисунок 2Б).

Поскольку структурно-функциональное состояние мембранных белков тесно связано с их липидным микроокружением, то представлялось важным изучить изменение микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов, что в значительной степени определяет развитие ИБС [Revin et al., 2016]. Для этого был использован липофильный флуоресцентный зонд лаурдан. Установлено, что NAC в концентрациях 100 и 1000 мкМ не изменял GP лаурдана как при 2 ч инкубации, так и после 22 ч воздействия. АК в концентрациях 100 и 500 мкМ не оказывала влияния на параметры флуоресценции лаурдана, тогда как воздействие 1000 мкМ АК приводило к снижению упорядоченности липидного бислоя, что, по-видимому, обусловлено снижением pH при действии АК. Изучение влияния гидрофобных АО на микровязкость липидного бислоя мембран эритроцитов показало, что при действии α -Т в концентрации 10 и 100 мкМ в течение 2 ч значения GP лаурдана не отличались от таковых в интактных мембранах, тогда как увеличение времени инкубации до в среднем 22 ч приводило к снижению значений GP (снижению микровязкости) на 5-10 %. Увеличение концентрации α -Т до 1000 мкМ приводило к повышению микровязкости липидного бислоя в мембранах эритроцитов в среднем на 10%, что согласуется с работами [Горбунов

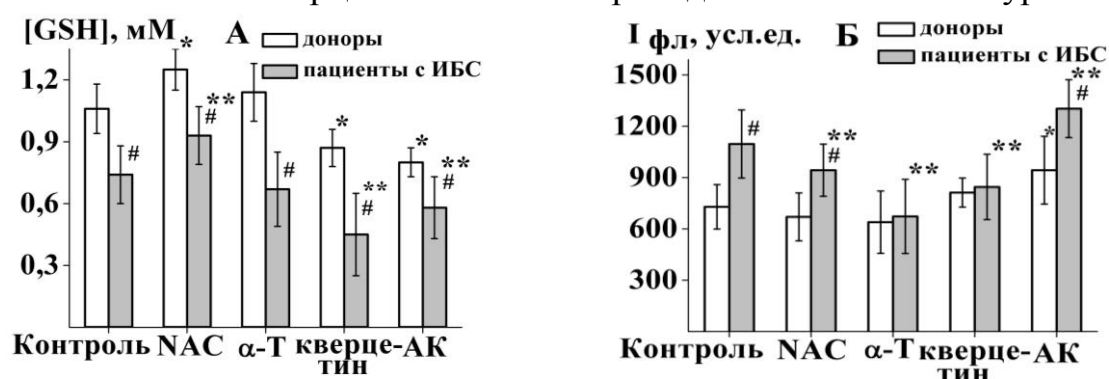
и др., 1987; Apurva et al., 2011], где выявлено, что α -Т способен увеличивать микровязкость ненасыщенных липидов и снижать микровязкость насыщенных липидов. Характер действия α -Т определяется составом жирных кислот липидов и не зависит от структуры полярных групп молекул фосфолипидов (ФЛ). При изучении влияния флавоноида кверцетина в концентрации 10 мкМ не выявлено отличий в значениях GP флуоресценции лаурдана от интактных мембран, как после 2 ч, так и после 22 ч инкубации с кверцетином. Увеличение концентрации кверцетина до 100 мкМ сопровождалось повышением микровязкости липидного бислоя мембран эритроцитов в среднем на 10-15%. Известно, что характеристики упаковки липидов и латерального распределения могут зависеть от расположения молекул флавоноида в бислое, причем его молекулы, расположенные в гидрофобной области бислоя, могут инициировать образование рафто-подобных доменов, в то время как молекулы, из области полярной границы бислоя, снижали текучесть мембраны за счет разрушения рафтовых областей [Ionescu et al., 2012]. При действии гидрофобных АО микровязкость липидного бислоя эритроцитов увеличивалась, что вело к снижению связанной с данными АО активности MRP1.

Таким образом, NAC повышал уровень GSH в эритроцитах, а кверцетин и АК его снижали. Гидрофобные АО снижали как уровень АФК, так и активность GST в эритроцитах, тогда как гидрофильные – уровень АФК повышали. Помимо этого, действие гидрофобных АО на эритроциты приводило к модификации липидного бислоя их мембран и зависело от концентрации АО и времени их воздействия на клетки и было связано с изменением активности как MRP1, так и RLIP76.

Роль белков-транспортёров ксенобиотиков в поддержании окислительно-восстановительного равновесия в эритроцитах пациентов с ИБС

В последнее десятилетие широко обсуждается вопрос о роли дисбаланса в системе оксиданты/антиоксиданты как одного из этиопатогенетических факторов многих заболеваний, в том числе и ИБС [Тамашевский и др., 2010; Lefèvre, 2017]. Метаболизм эритроцитов пациентов с ИБС изменён, что может обуславливать и морфологические модификации [Danese et al., 2015]. С целью выявления роли белков-транспортёров MRP1 и RLIP76 в поддержании ОБВ в эритроцитах нами изучен уровень маркёров окислительного стресса в эритроцитах доноров и пациентов с ИБС до и после воздействия АО. На рисунке 3А представлены данные, которые демонстрируют, что концентрация GSH в интактных эритроцитах пациентов с ИБС составила $0,74 \pm 0,14$ мМ и была снижена в среднем на 40–50% по сравнению с таковыми у доноров ($1,06 \pm 0,12$ мМ). Стоит отметить, что наряду со сниженным содержанием GSH в эритроцитах пациентов с ИБС обнаружено и снижение содержания α -Т до $1,0 \pm 0,1$ мкМ, которое согласно [Li et al., 2016] связано с риском заболеваний коронарных артерий. Из рисунка 3А следует, что воздействие NAC приводило к увеличению концентрации GSH в среднем на 15–25%, а после воздействия α -Т концентрация GSH в эритроцитах

пациентов с ИБС не изменялась относительно контроля. Инкубация эритроцитов пациентов с ИБС с кверцетином и АК приводила к снижению уровня GSH в



В качестве контроля принята концентрация GSH (А) и интенсивность флуоресценции DCF (Б) в эритроцитах доноров и пациентов с ИБС в отсутствие АО в среде инкубации: *

– для доноров различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$);

** – для пациентов с ИБС различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,01$);

– различия между донорами и пациентами с ИБС достоверны ($p < 0,05$).

Рисунок 3. – Содержание GSH (А) и интенсивность флуоресценции DCF (Б) в эритроцитах доноров и пациентов с ИБС после воздействия на них АО в концентрации 300 мкМ в течение 3 ч *in vitro*

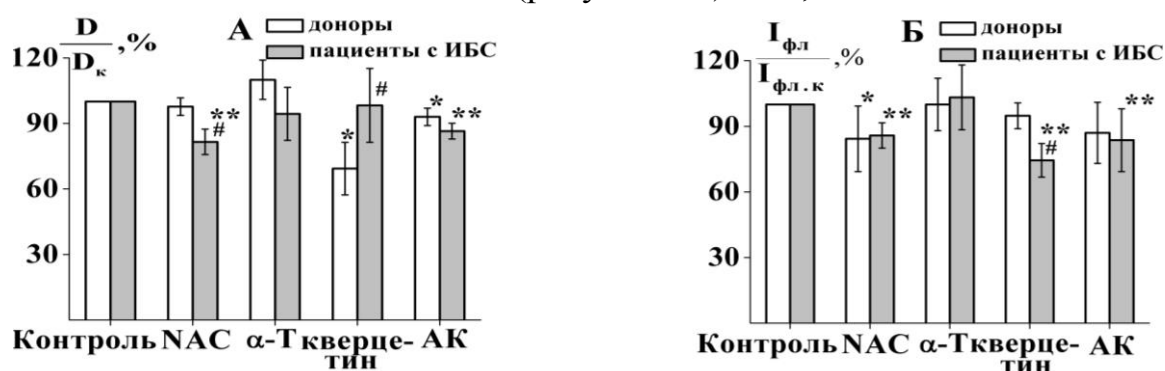
среднем на 25–35% и 30–65%, соответственно, по сравнению с контролем. Снижение уровня GSH в клетке коррелировало со снижением жизнеспособности эритроцитов в среднем, на 50–70% по сравнению с интактными клетками.

Для выяснения роли окислительного стресса в патогенезе ИБС была проведена оценка содержания АФК в эритроцитах пациентов с данным заболеванием. Установлено, что в интактных эритроцитах пациентов с ИБС по сравнению с донорскими содержание АФК повышено в среднем на 45–55% (рисунок 3Б), а после воздействия NAC, α -Т и кверцетина в концентрациях 0,3 мМ (3 ч) на эритроциты пациентов с ИБС уровень АФК в них снижался в среднем, соответственно, на 10–20%, 60–70% и 25–35% по сравнению с контролем, восстанавливаясь до значений, характерных для эритроцитов доноров (за исключением NAC). Полученные результаты согласуются с работой [Bukowska et al., 2007], где было показано, что кверцетин способен элиминировать широкий спектр АФК. Известно, что АК в процессе реакции с окисленной формой α -Т восстанавливает последний и применяется при лечении ССЗ [Chobot et al., 2013]. В то же время при воздействии АК на эритроциты пациентов с ИБС содержание АФК увеличивалось в среднем на 15–25% по сравнению с контролем, а более выраженные воздействия АО оказывали на содержание АФК именно у пациентов с ИБС, что может быть связано с тяжестью патологического процесса, протекающего в клетках [Барнаулов, 2010]. Полученные данные указывают на существенную роль окислительного стресса в патогенезе ИБС и на возможность коррекции ОВБ посредством АО.

Важную роль в модулировании уровня внутриклеточного GSH посредством транспорта и элиминации окисленного глутатиона из эритроцитов, образовании

NO и устраниении O_2^- , в регулировании сосудистой функции и кровяного давления играет MRP1 [Ellison et al., 2012]. Наряду с последним, RLIP76 участвует в ряде клеточных процессов [Mott et al., 2014] и презентруется на мембране в ответ на стрессовые воздействия, где проявляет себя как транспортёр, не относящийся к классу ABC (ATP-binding cassette), принимая участие в удалении GS-конъюгатов и доксорубина [Singhal et al., 2009]. Показана фундаментальная роль RLIP76 в регулировании функции провоспалительных цитокинов, связанных с ожирением и установлен механизм терапии метаболического синдрома [Singhal et al., 2013].

Для определения степени участия белков-транспортёров в поддержании ОБВ в эритроцитах пациентов с ИБС была проведена оценка транспорта DNP-SG конъюгатов после воздействия АО (рисунок 4А). Так, воздействие NAC и АК на



В качестве контролей приняты значения оптических плотностей (D_k) и интенсивности флуоресценции CAL ($I_{ф.л.к}$) в супернатантах и эритроцитах доноров и пациентов с ИБС в отсутствие АО в среде инкубации (100%).

- * — для доноров различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$);
- ** — для пациентов с ИБС различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,01$);
- # — различия между донорами и пациентами с ИБС достоверны ($p < 0,05$).

Рисунок 4. – Относительные значения величин оптической плотности в супернатантах (А) и остаточного удержания CAL (Б) в эритроцитах доноров и пациентов с ИБС после воздействия АО в концентрации 0,3 мМ (3 ч) *in vitro*

транспорт DNP-SG конъюгатов в эритроцитах пациентов с ИБС приводило к его снижению в среднем на 15–25% и 10–20%, соответственно, что свидетельствовало об уменьшении суммарной транспортной активности RLIP76. С помощью эритроцитарных везикул, вывернутых наружу, и соответствующих антител к RLIP76, было показано максимальное ингибирование транспорта DNP-SG конъюгатов и доксорубина, которое составляло 70% [Sharma et al., 2001]. С другой стороны, в везикулах, обработанных моноклональными антителами к MRP1, снижение АТФ-зависимого транспорта данных соединений не установлено, что и позволило предположить, что RLIP76 является основным транспортёром конъюгатов GSH и доксорубина в эритроцитах человека [Singhal et al., 2009]. Транспортная активность MRP1 после воздействия АО представлена в виде обратной величины относительного остаточного удержания кальцеина (рисунок 4Б). При воздействии АО на эритроциты пациентов с ИБС активность MRP1 усиливалась в среднем на 10–30% по сравнению с контролем, за исключением α-Т. Установлены различия между активностью MRP1 в клетках

доноров и пациентов с ИБС при действии кверцетина.

С целью установления взаимосвязи между редокс-состоянием эритроцитов, их жизнеспособностью и функциональной активностью белков-транспортёров ксенобиотиков был проведён корреляционный анализ между концентрацией GSH, содержанием АФК и показателями функционирования транспортёров MRP1 и RLIP76 в эритроцитах доноров и пациентов с ИБС после воздействия на них исследуемых АО. Установлено, что при воздействии АО на эритроциты доноров в течение 3 ч независимо от их природы (объединение всех АО) существует прямая зависимость между концентрацией GSH и транспортом DNP-SG конъюгатов ($r_s = 0,44$), что обусловлено участием GSH в процессе образования конъюгатов с различными соединениями. Этот факт поддерживает предположение о том, что экспорт DNP-SG конъюгатов в эритроцитах доноров в большей степени связан с функционированием RLIP76 [Singhal et al., 2009], а не MRP1, как утверждалось в работе [Ellison et al., 2012]. Обнаружена прямая зависимость между повышением содержания АФК и остаточным удержанием CAL в эритроцитах доноров ($r_s = 0,52$). Также показано, что снижение жизнеспособности эритроцитов доноров приводит к снижению активности MRP1 ($r_s = -0,45$) и может быть связано с истощением в них пула АТФ. При воздействии АО на эритроциты пациентов с ИБС в течение 3 ч независимо от их природы существует обратная корреляция между уровнем GSH и содержанием АФК ($r_s = -0,7$), указывающая на основную роль GSH в эритроцитах пациентов с ИБС при защите от окислительного стресса. Уменьшение концентрации GSH в эритроцитах пациентов с ИБС приводило к снижению их жизнеспособности ($r_s = 0,83$), что также коррелировало с повышенным содержанием АФК после воздействия АО ($r_s = -0,48$). Данный факт может указывать на то, что метаболизм АО в эритроцитах пациентов с ИБС взаимосвязан с их ОББ, нарушение которого вызывает гибель клеток. Усиление транспортной активности MRP1 в эритроцитах пациентов с ИБС коррелирует с накоплением в них АФК ($r_s = -0,42$), что может указывать на важную роль MRP1 в эритроцитах пациентов с ИБС в процессе поддержания ОББ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Экспорт DNP-SG конъюгатов в эритроцитах в большей степени связан с транспортной активностью RLIP76, что подтверждается данными о более высокой в (5–8 раз) экспрессии RLIP76 по сравнению с MRP1 в эритроцитах доноров при физиологических условиях. Снижение жизнеспособности эритроцитов при действии АК приводит к повышению функциональной активности обоих транспортёров и снижению функционирования RLIP76 при действии кверцетина [1, 2, 4, 6–14, 19, 21].

2. Изменение функциональной активности RLIP76 после воздействия на эритроциты АК, α -Т и кверцетина, связано со снижением уровня GSH в эритроцитах доноров на 20–30 % и/или снижением почти в 2 раза активности GST при действии гидрофобных АО. Активность MRP1 регулируется содержанием

АФК в клетках, возрастая при действии гидрофильных АО и снижаясь при действии гидрофобных и практически не зависит от концентрации GSH. В процессе поддержания ОББ после воздействия АО на эритроциты доноров основная роль принадлежит RLIP76. При действии гидрофобных АО микровязкость липидного бислоя мембран эритроцитов увеличивается, что приводит к снижению активности MRP1 [3, 14–16, 19, 21, 23, 25].

3. Функциональная активность RLIP76 в эритроцитах пациентов с ИБС после воздействия NAC и АК связана с уровнем GSH в большей степени, чем у доноров. Нарушение ОББ приводит к снижению жизнеспособности эритроцитов. Сильная обратная зависимость между активностью RLIP76/ MRP1 и содержанием АФК в эритроцитах человека, указывает на тесную взаимосвязь между активностью RLIP76/ MRP1 и ОББ в эритроцитах человека. Активность MRP1 усиливается при накоплении АФК и смещении ОББ после воздействия исследуемых АО, за исключением α -Т, у пациентов с ИБС и определяется их жизнеспособностью, которая по сравнению с донорами при воздействии АК и кверцетина снижена в 1,5 раза. Значимая роль в эритроцитах пациентов с ИБС в процессе поддержания их ОББ после воздействия исследуемых АО принадлежит MRP1. Полученные результаты свидетельствуют, что активность системы низкомолекулярных АО является маркерным признаком эффективности функционирования мембранных транспортных систем клетки [4, 5, 17, 18–24].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Предложен «Метод оценки функциональной активности белка-транспортёра MRP1 в эритроцитах и лимфоцитах человека по остаточному удержанию флуоресцентного красителя кальцеина», который внедрен на кафедре неонатологии и медицинской генетики ГУО «Белорусской медицинской академии последипломного образования» (акт о внедрении от 05.12.2018г.).

2. Предложен «Метод оценки экспрессии белка-транспортёра RLIP76 в эритроцитах человека», который был аттестован в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» (акт № 21-2014 от 28.11.2014 г.).

3. Для определения модификации липидной компоненты плазматической мембраны при действии различных веществ по параметрам флуоресценции липофильных зондов, разработан и используется «Флуоресцентный подход для оценки металл-индуцированной модификации мембран эритроцитов» в ВГМУ при проведении НИР (акт о внедрении от 09.09.2020 г.).

4. Для оценки редокс-статуса и жизнеспособности эритроцитов человека методом проточной цитофлуориметрии с использованием высокочувствительных флуоресцентных зондов 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата и кальцеина-АМ разработан «Способ оценки токсичности ионов лития в организме», применяемый на кафедре медицинской и биологической физики ВГМУ в учебном процессе (акт о внедрении от 01.10.2020 г.).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах

1. Канащ, Ю.С. Влияние антиоксидантов на активность глутатион-S-трансфераз и транспорт конъюгатов глутатиона в эритроцитах человека / Ю.С. Канащ // Молодежь в науке – 2009: прилож. к журналу «Весці НАН Беларусі»: в 5 частях – 2010. – Ч. 4. – С. 128–132.

2. Канащ, Ю.С. Активность белков-транспортёров в эритроцитах человека при действии N-ацетил-L-цистеина / Ю.С. Канащ // Известия Национальной академии наук Беларуси. «Серия биологических наук». – 2016. – № 3. – С. 70–75.

3. Гармаза, Ю.М. Внутриклеточный цинк: роль в H₂O₂-индуцированном окислительном стрессе в эритроцитах человека / Ю.М. Гармаза, А.В. Тамашевский, Ю.С. Канащ, Г.П. Зубрицкая, А.Г. Кутько, Е.И. Слобожанина // Биофизика. – 2016. – Т. 61, вып. 6. – С. 1149–1158.

4. Канащ, Ю.С. Влияние α-токоферола и аскорбиновой кислоты на функционирование белков-транспортёров ксенобиотиков в эритроцитах человека *in vitro* / Ю.С. Канащ, А.В. Тамашевский, Ю.М. Гармаза, Е.И. Слобожанина // Новости медико-биологических наук. – 2020. – Т. 20, № 1. – С. 68–77.

5. Канащ, Ю.С. Роль белков-транспортёров ксенобиотиков в поддержании окислительно - восстановительного баланса в эритроцитах пациентов с ишемической болезнью сердца/ Ю.С. Канащ, А.В. Тамашевский, Ю.М. Гармаза, Е.И. Слобожанина // Новости медико-биологических наук. – 2020. – Т. 20, № 2. – С. 103–113.

Статьи в сборниках материалов конференций

6. Слобожанина, Е.И. Влияние антиоксидантов на функциональную активность белков, ответственных за экспорт ксенобиотиков из эритроцитов/ Е.И. Слобожанина, Н.М. Козлова, Ю.С. Канащ, Г.П. Зубрицкая, А.Н. Антонович, А. Г. Кутько, Е.И. Белевич // Междунар. научн. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», VIII съезд Белорус. обществ. объединения фотобиологов и биофизиков: сборник статей, Минск, 25-27 июня 2008 г. : в 2ч. / Бел. Гос. ун-т, Ин-т биоф. и клет. инжен. НАН Беларусі, Белорус. обществ. объединения фотобиол. и биофиз.; редкол.: И.Д. Вологовский [и др.]. – Минск. – Ч.1. – С. 271–273.

7. Слобожанина, Е.И. Антиоксиданты и активность белков, ассоциированных с экспортом ксенобиотиков из эритроцитов человека / Е.И. Слобожанина, Н.М. Козлова, Ю.С. Канащ, Г.П. Зубрицкая, А.Н. Антонович, А. Г. Кутько, Е.И. Белевич // Ксенобиотики и живые системы: материалы III международной научной конференции. – Образ. Центр БГУ, редкол. В.М. Юрин [и др.]. – Минск. – 22-24 окт. 2008. – С. 135–136.

8. Канащ, Ю.С. Влияние низкомолекулярных антиоксидантов на структурно-функциональное состояние динитрофенил-S-глутатион АТФазы в эритроцитах человека/ Ю.С. Канащ, А.В. Тамашевский, Н.В. Гончарова // Междунар. научн.

конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», X съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков: сборник статей, Минск, 19-21 июня 2012 г.: в 2 ч. / Белорус. Гос. ун-т, Ин-т биоф. и клет. инж. НАН Беларуси, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биофиз.; редкол.: И.Д. Вологовский [и др.]. – Минск, 2012. – Ч. 1. – С. 36–38.

9. Канаш, Ю.С. Жизнеспособность эритроцитов человека при действии N-ацетилцистеина *in vitro* / Ю.С. Канаш, А.В. Тамашевский // Междунар. научн. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», XI съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков: сборник статей, Минск, 17-20 июня 2014 г.: в 2 ч. / Белорус. Гос. ун-т, Ин-т биоф. и клет. инж. НАН Беларуси, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биофиз.; редкол.: И.Д. Вологовский [и др.]. – Минск, 2014. – Ч.2. – С. 179–181.

10. Гармаза, Ю.М. Роль внутриклеточного цинка в развитии H₂O₂-индуцированного окислительного стресса в эритроцитах человека / Ю.М. Гармаза, А.В. Тамашевский, Ю.С. Канаш, Е.И. Слобожанина // Междунар. научн. конф. «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», XI съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков: сборник статей, Минск, 17-20 июня 2014 г.: в 2 ч. / Белорус. Гос. ун-т, Ин-т биоф. и клет. инж. НАН Беларуси, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биофиз.; редкол.: И.Д. Вологовский [и др.]. – Минск, 2014. – Ч. 2. – С. 158–160.

11. Канаш, Ю.С. Функциональная активность белков, участвующих в транспорте ксенобиотиков, в эритроцитах человека при действии α-токоферола и аскорбиновой кислоты *in vitro* / Ю.С. Канаш, Ю.М. Гармаза, А.В. Тамашевский // Сахаровские чтения 2019 года: экологические проблемы XXI-го века: материалы 19-ой Международной научной конференции Минск, РБ, 23-24 мая 2019г. / Междунар. гос. экол. ин-т им. А.Д. Сахарова Бел. гос. ун-та; редкол.: А.Н. Батян [и др.]; под ред. д-ра ф.-м. н., проф. С.А. Маскевича [и др.] – Минск: ИВЦ Минфина, 2019. – Ч. 2. – С. 86–89.

Тезисы докладов

12. Канаш, Ю.С. Влияние флавоноидов кверцетина и генистеина на функциональную активность глутатион-S-трансфераз и экспорт конъюгатов глутатиона в эритроцитах человека / Ю.С. Канаш, Е.И. Слобожанина // Актуальные проблемы биологии, нанотехнологии и медицины: материалы III Междунар. конф., Ростов-на-Дону, Россия 1-4 окт. 2009г. Южный федеральный ун-т; редкол.: Т.П. Шкурят [и др.] – Ростов-на-Дону. – 2009. – С. 87–88.

13. Kanash, J. Effect of N-acetylcysteine on activity of glutathione transferases and protein-transporters of xenobiotics from human erythrocytes/ J. Kanash, Y. Harmaza // The 18th Meeting of European Association for Red Cell Research : Abstracts, Wroclaw – Piechowice, Poland, 12-15 May 2011. / Wroclaw University of Technology, Institute of Biomedical Engineering and Instrumentation ; eds.: M. Komorowska [et al.]. – Wroclaw –

Piechowice, 2011. – P. 31–32.

14. Kanash, J.S. Effect of α -tocopherol on activity of MRP1 xenobiotic transport proteins in the presence of ascorbic acid in human erythrocytes / J.S. Kanash // Abstracts of the 19th Meeting of the European Red Cell Society (ERCS), Forteiland, Ijmuiden, The Netherlands, 10–13 October. – 2013. – P. 55.

15. Канааш, Ю.С. Функциональная активность белка MRP1 в эритроцитах человека при сочетанном воздействии α -токоферола и аскорбиновой кислоты *in vitro* / Ю.С. Канааш, Е.И. Слобожанина // Патология клетки : междисциплинарная конференция, Москва (Россия). – 12-14 декабря 2013 г. / ФГБУ РОНЦ имени Н.Н. Блохина.; редкол.: М.И. Давыдов [и др.] – Москва, 2013. – С. 3.

16. Kanash, J. Effect of low molecular antioxidants on functionality RLIP76 and MRP1 in human erythrocytes / J. Kanash, A. Tamashevski, N. Goncharova // FEBS J. – 2014. – Vol. 281, Suppl. 1. – P. 195–196.

17. Канааш, Ю.С. Активности белков-транспортёров в эритроцитах человека при действии N-ацетил-L-цистеина / Ю.С. Канааш // Молодежь в науке – 2015 : Материалы Междунар. науч. конф. молодых учёных. – 1-4 дек. 2015 г. – С. 66.

18. Kanash, J.S. The role of the multidrug resistance protein-1 in maintaining of the redox state of erythrocytes of coronary heart disease patients/ J.S. Kanash // ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins : From Multidrug Resistance to Genetic Diseases: Abstracts of the 6th Special Meeting on ABC Proteins – ABC 2016, Innsbruck, Austria, 5–11 March, 2016. / Medical University of Vienna ; eds.: K. Kuchler [et al.]. – Innsbruck, 2016. – P. 118.

19. Kanash, J.S. Redox state and zinc homeostasis of red blood cells of patients with metabolic syndrome / J.S. Kanash, Y.M. Harmaza, A.V. Tamashevski // Abstract of the 41th FEBS Congress, Ephesus, Kusadasi, Turkey, 3-8 September, 2016. – FEBS. Journal. 2016. – Vol. 283. – Suppl.1 – P. 382.

20. Kanash, J.S. N-acetyl-L-cysteine and redox-balance in erythrocytes of patients with coronary heart disease / J.S. Kanash, Y.M. Harmaza, A.V. Tamashevski // Thiol oxidation in toxicity and signaling : Abstract book of EMBO Workshop. – 17-21 Sept. 2017, Sant Feliu de Guixols / eds. : E. Hidalgo [et al.]. – Spain. – 2017. – P. 96.

21. Kanash, J.S. Effect of quercetin on the glutathione-S-transferases, RLIP76, MRP1, and MRP4 functioning in human peripheral blood cells / J.S. Kanash // Proteins and organized complexity: Abstract book of the Joint FEBS/EMBO lecture courses. – Sept. 24 – Oct. 1 2017 / eds.: D. Otzen [et al.]. – Spetses Island, Greece. – 2017. – P. 48.

22. Kanash, J. Multidrug resistance protein 1 functioning and the redox state of the coronary heart disease erythrocytes/ J. Kanash, Y. Harmaza, A. Miadzvedzeva, L. Gelis, E/ Slobozhanina // Current Trends in Soluble and Membrane Protein Biophysics : Abstract book of the Joint Meeting of Belgian and British Biophysical Soc. – 22-23 Feb 2018. / eds. : A. Matagne [et al.] – Brussels. – 2018. – P. 42.

23. Канааш, Ю.С. Активность белков-транспортёров ксенобиотиков в эритроцитах человека при действии α -токоферола *in vitro* / Ю.С. Канааш, Ю.М. Гармаза // Тезисы докладов Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», XIII съезд Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков: сборник статей, Минск, 27–29 июня 2018 г.: в 2 ч. / Белорус. Гос. ун-

т, Ин-т биоф. и клет. инжен. НАН Беларуси, Белорус. обществ. объедин. фотобиол. и биофиз.; редкол.: И.Д. Волоотовский [и др.]. – Минск, 2018. – С. 26.

24. Канаш, Ю.С. Изучение функциональной активности белков-транспортёров семейства MRP и RLIP76 при воздействии гидрофильных и гидрофобных антиоксидантов на эритроциты пациентов с ишемической болезнью сердца / Ю.С. Канаш, Ю.М. Гармаза, А.В. Тамашевский, Е.И. Слобожанина // Физико-химическая биология как основа современной медицины : сборник тезисов докладов Республиканской конференции с международным участием, посвященной 110-летию со дня рождения В.А. Бандарина, Минск, 24 мая 2019 г. / Бел. Гос. Мед. ун-т ; редкол. В. В. Хрусталёв [и др.] – Минск, 2019. – Ч. 1. – С. 131–132.

25. Канаш, Ю.С. Влияние гидрофобных и гидрофильных антиоксидантов на микровязкость липидного бислоя мембран эритроцитов *in vitro* / Ю.С. Канаш, Ю.М. Гармаза, А.В. Тамашевский // VI съезд биофизиков России : сборник материалов VI съезда биофизиков России, Сочи, 16-21 сентября 2019 г. / Кубанский Гос. Ун-т; редкол.: А.Б. Рубин [и др.] – Сочи, 2019. – Т1. – С. 158–159.

РЭЗІЮМЭ КАНАШ ЮРЫЙ СЦЯПАНВІЧ

Малекулярна-мембранныя механізмы дзеяння антыаксідантаў на функцыянальную актыўнасць бялкоў-транспарцёраў ксенабіётыкаў у эрытрацытах чалавека

Ключавыя словы: эрытрацыты, N-ацэтылцыстэін, α -такаферол (α -Т), кверцэтын, аскарбінавая кіслата (АК), бялок множнай лекавай устойлівасці 1 (MRP1), Ral-звязваючы бялок (RLIP76), жыццяздольнасць, акісляльна-аднаўленчы баланс (ААБ), ішэмічная хвароба сэрца (ІХС).

Мэта работы: даследаваць малекулярна-мембранныя механізмы дзеяння антыаксідантаў на функцыянальную актыўнасць бялкоў-транспарцёраў ксенабіётыкаў у эрытрацытах чалавека ў норме і пры паталогіі.

Аб'ект даследавання: эрытрацыты чалавека ды ізаляваныя мембраны.

Метады даследавання: спектрафатаметрыя, спектрафлуарыметрыя, праточная цытафлуарыметрыя, высокаэфектыўная вадкасная храматаграфія.

Атрыманыя вынікі і іх навізна:

Паказана, што транспартная актыўнасць бялкоў-пераносчыкаў ксенабіётыкаў у эрытрацытах чалавека (MRP1 і RLIP76) залежыць ад канцэнтрацыі і часу ўздзеяння даследаваных антыаксідантаў. Транспарт DNP-SG каньюгатаў у эрытрацытах у большай ступені звязаны з транспартнай актыўнасцю RLIP76, што стасуецца з дадзенымі па высокай экспрэсіі RLIP76 у параўнанні з MRP1 у эрытрацытах донараў пры фізіялагічных умовах. Зніжэнне жыццяздольнасці эрытрацытаў пры дзеянні АК і кверцэтына прыводзіць да зніжэння функцыянальнай актыўнасці транспарцёраў і рэгулюецца іншымі антыаксідантамі, і звязаны са зніжэннем узроўню GSH і актыўнасці GST у эрытрацытах донараў пры дзеянні гідрафобных антыаксідантаў. У працэсе падтрымання ААБ пасля ўздзеяння антыаксідантаў у эрытрацытах донараў асноўная роля належыць RLIP76. Функцыянальная актыўнасць MRP1, якая рэгулюецца колькасцю АФК у клетках, павялічваецца пры дзеянні гідрафільных антыаксідантаў і зніжаецца пры дзеянні гідрафобных злучэнняў і практычна не залежыць ад канцэнтрацыі GSH. Устаноўлена, што канцэнтрацыя GSH і ўзровень α -Т у пацыентаў з ІХС зніжаны, тады як узровень АФК павышаны ў параўнанні з такімі ў донараў, што сведчыць аб значнай ролі акісляльна-аднаўленчых працэсаў пры ІХС. Функцыянальная актыўнасць RLIP76 у эрытрацытах пацыентаў з ІХС пасля ўздзеяння антыаксідантаў звязана з узроўнем GSH у большай ступені, чым у донараў. Функцыянальная актыўнасць MRP1 ўзмацняецца пры назапашванні АФК і зруху ААБ пасля ўздзеяння даследаваных антыаксідантаў на эрытрацыты пацыентаў з ІХС і вызначаецца іх жыццяздольнасцю.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: атрыманыя вынікі могуць быць выкарыстаны ў навуковым і навучальным працэсах ВНУ біялагічнага і медыцынскага профілю.

Вобласць ужывання: біяфізіка, біяхімія, гематалогія, кардыялогія.

РЕЗЮМЕ

КАНАШ ЮРИЙ СТЕПАНОВИЧ

Молекулярно-мембранные механизмы действия антиоксидантов на функциональную активность белков-транспортёров ксенобиотиков в эритроцитах человека

Ключевые слова: эритроциты, N-ацетилцистеин (NAC), α -токоферол (α -Т), кверцетин, аскорбиновая кислота (АК), белок множественной лекарственной устойчивости 1 (MRP1), Ral-связывающий белок (RLIP76), жизнеспособность, окислительно-восстановительный баланс (ОВБ), ишемическая болезнь сердца (ИБС).

Цель работы: выявить молекулярно-мембранные механизмы действия антиоксидантов на функциональную активность белков-транспортёров ксенобиотиков в эритроцитах человека в норме и при патологии.

Объект исследования: эритроциты человека и изолированные мембраны.

Методы исследования: спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, проточная цитофлуориметрия, высокоэффективная жидкостная хроматография.

Полученные результаты и их новизна: Показано, что транспортная активность белков-транспортёров ксенобиотиков в эритроцитах человека (MRP1 и RLIP76) зависит от концентрации и времени воздействия исследованных антиоксидантов. Транспорт DNP-SG конъюгатов в эритроцитах в большей степени связан с транспортной активностью RLIP76, что согласуется с данными по высокой экспрессии RLIP76 по сравнению с MRP1 в эритроцитах доноров при физиологических условиях. Снижение жизнеспособности эритроцитов при действии АК и кверцетина приводит к снижению функциональной активности транспортёров и регулируется другими антиоксидантами, и связано со снижением уровня GSH и активности GST в эритроцитах доноров при действии гидрофобных антиоксидантов. В процессе поддержания ОВБ после воздействия антиоксидантов в эритроцитах доноров основная роль принадлежит RLIP76. Функциональная активность MRP1 регулируется содержанием АФК в клетках, возрастая при действии гидрофильных антиоксидантов и снижаясь при действии гидрофобных соединений, и практически не зависит от концентрации GSH. Установлено, что концентрация GSH и уровень α -Т у пациентов с ИБС снижены, тогда как уровень АФК повышен по сравнению с таковыми у доноров, что свидетельствует о значимой роли окислительно-восстановительных процессов при ИБС. Функциональная активность RLIP76 в эритроцитах пациентов с ИБС после воздействия антиоксидантов связана с уровнем GSH в большей степени, чем у доноров. Функциональная активность MRP1 усиливается при накоплении АФК и смещении ОВБ после воздействия исследуемых антиоксидантов на эритроциты пациентов с ИБС и определяется их жизнеспособностью.

Рекомендации по использованию: полученные результаты могут быть использованы в научном и учебном процессах ВУЗов биологического и медицинского профиля.

Область применения: биофизика, биохимия, гематология, кардиология.

SUMMARY

KANASH JURA

Molecular-membrane mechanisms of antioxidants action on the functional activity of xenobiotic transport proteins in human erythrocytes

Key words: erythrocytes, N-acetylcysteine (NAC), α -tocopherol (α -T), quercetin, ascorbic acid (AA), multidrug resistance protein 1 (MRP1), Ral-binding protein (RLIP76), viability, redox balance, coronary heart disease (CHD).

The purpose of investigation to reveal the molecular-membrane mechanisms of antioxidant action on the functional activity of xenobiotic transporter proteins in human erythrocytes in health and disease.

Object of investigation: human erythrocytes and isolated membranes.

Methods of research: spectrophotometry, spectrofluorimetry, flow cytometry, high performance liquid chromatography.

The obtained results and their novelty: It has been shown that the transport activity of xenobiotic transport proteins in human erythrocytes (MRP1 and RLIP76) does depend on the concentration and time of exposure to the studied antioxidants. The transport of DNP-SG conjugates in erythrocytes is more associated with the transport activity of RLIP76, which is consistent with the data on the high expression of RLIP76 compared to MRP1 in donor erythrocytes under physiological conditions. A decrease of the viability of erythrocytes under the action of AA and quercetin leads to a decrease in the functional activity of transporters and is regulated by other antioxidants and is associated with a decrease in the level of GSH and GST activity in donor erythrocytes under the action of hydrophobic antioxidants. RLIP76 plays a major role in the maintenance of the redox balance after exposure to antioxidants in donor erythrocytes. The functional activity of MRP1 is regulated by the content of ROS in cells, increasing under the action of hydrophilic antioxidants and decreasing under the action of hydrophobic compounds and is practically independent of the GSH concentration. It was found that the concentration of GSH and the level of α -T in CHD patients are reduced, while the level of ROS is increased compared with those in donors which indicates a significant role of redox processes in CHD. The functional activity of RLIP76 in erythrocytes of CHD patients after exposure to antioxidants is associated with GSH levels to a greater extent than in donors. The functional activity of MRP1 increases with the accumulation of ROS and displacement of the redox balance after exposure studied antioxidants on the erythrocytes of CHD patients and is determined by their viability.

Recommendations for use: the obtained results are recommended to use in scientific and educational process of Universities of biological and medical profile.

An application area: biophysics, biochemistry, hematology, cardiology.



Подписано в печать 15.05.2021 Формат 60x84_{1/16} Бумага офсетная
Печать цифровая Усл.печ.л. 1,3 Уч.изд.л. 1,4 Тираж 60 экз. Заказ 3830
ИООО «Право и экономика» 220072 Минск Сурганова 1, корп. 2 Тел. 8 029 684 18 66
Отпечатано на издательской системе Gestetner в ИООО «Право и экономика»
Свидетельство о государственной регистрации издателя,
изготовителя, распространителя печатных изданий, выданное
Министерством информации Республики Беларусь 17 февраля 2014 г.
в качестве издателя печатных изданий за № 1/185