

**ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВ, УЧАСТВУЮЩИХ
В ТРАНСПОРТЕ КСЕНОБИОТИКОВ, В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ
ДЕЙСТВИИ α -ТОКОФЕРОЛА И АСКОРБИНОВОЙ КИСЛОТЫ *IN VITRO***
**FUNCTIONAL ACTIVITY OF PROTEINS XENOBIOTIC TRANSPORTERS
AT THE ACTION OF α -TOCOPHEROL AND ASCORBIC ACID IN HUMAN
ERYTHROCYTES *IN VITRO***

Ю. С. Канааш, Ю. М. Гармаза, А. В. Тамашевский
J. Kanash, Y. Harmaza, A. Tamashevski

*Институт биофизики и клеточной инженерии Национальной академии наук Беларуси,
г. Минск, Республика Беларусь
jurakanash@rambler.ru
Institute of Biophysics and Cell Engineering of the National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk, Republic of Belarus*

Показано снижение активности глутатион-S-трансферазы (GST) при воздействии α -токоферола на эритроциты человека *in vitro*. При 3 ч воздействии α -токоферола в отсутствие и присутствие аскорбиновой кислоты на эритроциты наблюдалась тенденция к снижению активности белков MRP1 и RLIP76, тогда как по остаточному удержанию кальцеина изменение активности MRP1 не было установлено. После 3 ч и 24 ч воздействия аскорбиновой кислоты на эритроциты активность MRP1 возрастала наряду с отсутствием влияния на функционирование RLIP76.

It was established decreasing of the glutathione-S-transferase (GST) activity after exposure of α -tocopherol on human erythrocytes *in vitro*. After 3 hours of exposure of α -T in the absence and presence of ascorbic acid on erythrocytes, the activity of MRP1 and RLIP76 proteins was tendentially decreased, while the retention of calcein did not show any changes in MRP1 activity. After 3 and 24 hours of exposure of ascorbic acid on erythrocytes MRP1 activity was increased at the same time functioning of RLIP76 didn't change.

Ключевые слова: α -токоферол, аскорбиновая кислота, кальцеин, функционирование белков-транспортеров семейства MRP, RLIP76, глутатион-S-трансфераза, АФК, редокс-статус клетки.

Keywords: α -tocopherol, ascorbic acid, calcein, functioning of the protein transporters of the MRP family, RLIP76, glutathione-S-transferase, viability, reactive oxygen species, cell redox status.

Мембрана эритроцитов человека снабжена системой активного транспорта конъюгатов глутатиона с различными эндо- и экзогенными соединениями, играющей важную роль в детоксикации ксенобиотиков, в частности, при развитии окислительного стресса [1]. На культуре опухолевых клеток было установлено, что АТФ-зависимый транспорт глутатион-S-конъюгатов в клетках млекопитающих ассоциирован с интегральным белком множественной лекарственной устойчивости 1 (MRP1, Multidrug Resistant Protein 1) [1; 2]. Кроме MRP1 в эритроцитах присутствуют и два других белка данного семейства: MRP4 и MRP5 [1-2]. Наряду с мембранными белками в механизме множественной лекарственной устойчивости принимают участие ряд внутриклеточных ферментов, среди которых глутатион-S-трансфераза (GST), в эритроцитах человека – GST класса P / π [3]. Одним из звеньев между биохимическими путями глутатион-опосредованного метаболизма ксенобиотиков и АТФ-зависимого экспорта конъюгатов глутатиона из клетки является динитрофенил-S-глутатион АТФаза (DNP-SG АТФаза), известная также как RLIP76 (где 76 кДа молекулярная масса белка), экспрессированного в различных тканях и органах, в том числе и в эритроцитах человека, данный белок не относится к семейству ABC транспортеров [2; 4]. Локализация RLIP76 и характер связей определяет его активное участие в процессах клеточной сигнализации и мембранной регуляции при воздействии различных стрессовых факторов [4], но механизмы детоксикации клеток посредством данного белка детально не исследованы.

Существуют данные об успешном использовании антиоксидантов в терапии опухолевых заболеваний. Универсальными протекторами мембран клеток от окислительного повреждения являются токоферолы, а их локализация в мембране защищает последние от перекисной деструкции. Токоферолы предохраняют от окисления SH-группы мембранных белков, их окисленная форма реагирует с аскорбатом и восстанавливается [5]. В ряде эпидемиологических исследований [6–8], сообщалось, что потребление полифенолов растений или аскорбиновой кислоты (АК) и α -токоферола (α -Т) приводило к снижению риска развития онкологических заболеваний и уменьшению смертности от ишемической болезни сердца [7], но проблема регуляции системы выведения из клетки токсических соединений до сих пор не решена.

Цель работы – проведение сравнительного анализа активности глутатион-S-трансферазы и транспортной функции белков-транспортеров семейства MRP и RLIP76 при сочетанном воздействии α -Т и аскорбиновой кислоты на эритроциты человека *in vitro*.

В работе использована кровь здоровых доноров. Эритроциты отделяли от плазмы путем центрифугирования крови при 2000 g в течение 10 мин и трижды отмывали в 155 mM NaCl. Затем клетки инкубировали в буфере А: 138 mM NaCl; 5 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 6,4 mM Na₂HPO₄; 1 mM NaH₂PO₄; 5,6 mM глюкозы pH 7,4, содержащем α -Т в концентрации 10–1000 мкМ в течение 1, 3 и 24 ч при 37°C в присутствии или отсутствии аскорбиновой кислоты в концентрации 1 мМ в качестве восстановителя.

Концентрацию α -Т в эритроцитах до и после их нагрузки антиоксидантами *in vitro* определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [7]. Концентрацию восстановленного глутатиона (GSH) определяли спектрофотометрически по методу Элмана. Количество свободнорадикальных соединений оценивали с помощью хлорометил-2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетата (CM-H₂DCF-DA) по методу [9].

Транспортную активность исследуемых белков-транспортеров семейства MRP и RLIP76 оценивали тремя различными методами:

1. Спектрофотометрически по степени выхода конъюгатов глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом (DNP-SG-конъюгатов) при 340 нм, нормируя на соответствующие значения величин поглощения гемоглобина при 540 нм [2]. Данный метод позволяет судить о функциональной активности RLIP76 и MRP1.

2. Флуориметрически, посредством монохлорбимана: по кинетике транспорта конъюгатов биман-S-глутатион (B-SG). Флуоресценцию супернатантов измеряли при $\lambda_{\text{возб.}}/\lambda_{\text{пер.}} = 386/476$ нм согласно [2], по которой оценивали функциональную активность MRP1 и MRP4.

3. Посредством проточной цитофлуориметрии по остаточному удержанию кальцеина в клетках оценивали функциональную активность MRP1 и цитозольную эстеразную активность (показатель жизнеспособности) эритроцитов [5].

ВЭЖХ проводили на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония). Фотометрические исследования были выполнены на спектрофотометре Specord M-40 (Германия); флуоресцентные – на спектрофлуориметре «СМ2203» (Солар, Беларусь) и на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickenson, США) в FL-1H канале.

Различия между группами оценивали с помощью непараметрических критериев Вилкоксона и Манна-Уитни, связи между величинами определяли путём нахождения коэффициента корреляции Спирмена в программе Statistica v.6.0. В работе представлены значения средних \pm стандартных отклонений 5–8 независимых экспериментов. Результаты считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

На первом этапе исследований мы изучили накопление α -Т в эритроцитах человека после 1 ч инкубации их в среде, содержащей данный антиоксидант в концентрации 10, 100 и 1000 мкМ. Известно, что содержание аскорбата в эритроцитах, по данным [7] находится в пределах 30–40 мкМ, в то время как концентрация α -Т в интактных клетках составляла ~2 мкМ. При инкубации эритроцитов с α -Т его внутриклеточная концентрация в отсутствие АК возрастала до 5–6 мкМ, а в присутствии последнего превышала физиологическое значение в 70 раз.

Достоверных отличий величин интенсивности флуоресценции кальцеина (жизнеспособности) эритроцитов, подвергшихся воздействию α -Т, по сравнению с интактными клетками не было выявлено, что позволило сделать вывод о сохранении жизнеспособности эритроцитов при воздействии α -Т в течение 1 ч. При увеличении времени воздействия антиоксидантов на эритроциты до 24 ч уровень гемоглобина (Hb) в супернатантах при действии 0,5 и 1 мМ α -Т значимо возрастал, что свидетельствовало о частичном гемолизе эритроцитов. Однако, по данным проточной цитометрии, α -Т не оказывал значимого влияния на жизнеспособность клеток, а интенсивность флуоресценции кальцеина при действии АК в концентрации 1 мМ снижалась на 20 %.

На следующем этапе работы нами были построены зависимости внеклеточного pH при различных концентрациях АК в диапазоне от 0,1 до 1 мМ. Так при 3 ч инкубации АК в буфере А его pH изменялось в диапазоне 7,3–6,4 (для 0,5 и 1 мМ АК pH составляло 7,15 и 7,0), тогда как 24 ч инкубация аскорбата в буфере А приводила к изменению pH в диапазоне 7,2–6,3 (для 0,5 и 1 мМ аскорбата pH составляло 7,1 и 6,9).

Поскольку известно, что накопление активных форм кислорода (АФК) в клетках крови человека приводит к изменению активности белков-транспортеров, то далее мы оценили цитозольное содержание GSH в эритроцитах после их экспозиции с исследуемыми антиоксидантами (3 ч, 37 °С), который наряду с уровнем АТФ имеет важное значение для функционирования белков семейства MRP в клетках, достоверно не изменялось. Увеличение времени инкубации до 24 ч привело к тому, что, концентрация GSH после воздействия АК и α -Т в отдельности не изменялась, тогда как при сочетанном действии обоих антиоксидантов наблюдалась тенденция к увеличению уровня GSH в интактных клетках на 20 %.

Далее мы оценили уровень АФК при действии антиоксидантов. При экспонировании клеток с АК в течение 3 ч интенсивность флуоресценции DCF увеличивалась на 25–35 %, после 24 ч воздействия данный параметр возрастал более чем на 50 %, что отчасти могло быть связано со снижением pH и образованием супероксида при действии АК. Иначе говоря, при растворении аскорбиновой кислоты в инкубационной среде, происходит его окисление с образованием O₂⁻, который при снижении pH с 7,4 до 7,0 переходит в протонированную форму и ускоряет окисление H₂DCF. Наиболее вероятной причиной окислительного стресса при значениях pH ~6,0 представляется снижение активности антиоксидантных ферментов и освобождение железа из белков (например, гемоглобина). При воздействии α -токоферола на клетки в течение 3 ч и 24 ч уровень АФК снижался на 10–20 %. Сочетанное

действие аскорбиновой кислоты и α -токоферола приводило к снижению интенсивности флуоресценции DCF по отношению к интактным клеткам, говоря иначе – к снижению содержания АФК в среднем на 20–35 % как при краткосрочном, так и при долгосрочном воздействии.

Оценка активности белков-транспортёров семейства MRP и RLIP76 показала, что наблюдалась тенденция к снижению выхода DNP-SG конъюгатов из эритроцитов в среднем на 10–20 % при действии α -Т в концентрациях 0,1 и 1 мМ в течение 1 ч, однако, при дополнительном введении АК в среду инкубации эффект α -Т отсутствовал. После 24 ч экспозиции эритроцитов со 100 мкМ α -Т и 500 мкМ АК активность MRP1 и RLIP76 не изменялась. После обработки клеток α -Т в течение 1 ч достоверных отличий в транспортной активности MRP1 и MRP4 по сравнению с интактными клетками не было обнаружено, при сочетанном воздействии антиоксидантов наблюдалась тенденция к снижению экспорта биман-SG конъюгатов при действии 0,1 и 1 мМ α -Т. Активность GST при действии АК не изменялась, в то время как α -Т дозозависимо на 10–35 % снижал активность фермента. Значимая взаимосвязь между активностью GST и транспортом DNP-SG / биман-SG конъюгатов в эритроцитах отсутствовала.

С помощью флуоресцентного красителя кальцеина обнаружена тенденция к усилению активности MRP1 при действии как отдельно с 0,01-1 мМ α -Т, так и в сочетании с АК. Аскорбиновая кислота, взятая отдельно в концентрациях 0,1 и 1 мМ приводила к увеличению активности MRP1 на 20-40 %. После 24 ч экспозиции клеток с 0,1 мМ α -Т интенсивность флуоресценции кальцеина не изменялась по сравнению с интактными клетками, тогда как при действии 0,5 мМ АК - снижалась в среднем на 20 %, что свидетельствовало об активации MRP1 транспортёра. Данные результаты в совокупности с результатами, полученными в работе [10], дают возможность предположить, что α -Т практически не влияет на активность MRP1, а полученный эффект вызван, вероятнее всего, именно действием АК на данный транспортер. Результаты текущего исследования подтверждают полученные ранее нами данные, в которых было показано, что АК активирует MRP1 белок в эритроцитах человека [10]. Таким образом, при изменении баланса «антиоксиданты-прооксиданты» в пользу первых происходит активация MRP1, и наблюдается возможное снижение активности MRP4 и RLIP76 – транспортных белков, участвующих в поддержании окислительного гомеостаза в эритроцитах человека, указывая на то, что динамические процессы детоксикации происходящие в эритроцитах, направлены на поддержание гомеостаза клеток крови и сохранения целостности как органов и тканей, так и всего организма человека.

Таким образом, можно сделать следующие выводы:

1. Краткосрочная экспозиция с антиоксидантами не изменяла жизнеспособность клеток, а долгосрочное воздействие аскорбата приводило к снижению их жизнеспособности, в то время как α -токоферол в максимальных концентрациях приводил к гемолизу части эритроцитов. Уровень GSH в эритроцитах как при 3 ч, так и при 24 ч воздействии аскорбиновой кислоты и α -токоферола не изменялся.

В то же время уровень АФК увеличивался как при краткосрочном, так и долгосрочном воздействии аскорбиновой кислоты, что отчасти было связано со снижением внутриклеточного pH. Тогда как при действии α -токоферола на клетки в течение 3 ч и 24 ч уровень АФК напротив снижался. Сочетанное действие АК и α -токоферола на эритроциты приводило к ещё большему снижению содержания АФК как при 3 ч, так и при 24 ч воздействии.

Выявлена слабая обратная зависимость между концентрацией GSH и уровнем АФК при 3 ч и 24 ч воздействии аскорбиновой к-ты; при сочетанном действии антиоксидантов на эритроциты взаимосвязь была более выраженной. Таким образом, тенденция к снижению концентрации GSH приводит к росту *уровня АФК при действии аскорбиновой кислоты в эритроцитах человека in vitro*. Также, можно сделать вывод о прооксидантном характере 1мМ аскорбиновой кислоты и 0,5/1мМ α -токоферола при долгосрочном воздействии *in vitro*.

2. Показано, что выход конъюгатов глутатиона с CDNB и B-SG при 1 ч воздействии α -токоферола не изменялся как в отсутствие, так и в присутствии аскорбиновой кислоты, также и при 24 ч воздействии антиоксиданты не оказывали влияния на функциональную активность белков-транспортёров MRP1, 4 и RLIP76. С одной стороны, это могло быть связано с разнонаправленным действием α -токоферола на белки MRP1 и MRP4, а с другой было обусловлено снижением активности эритроцитарной GST при действии α -токоферола. Функциональная активность MRP1 белка при 1 ч воздействии α -токоферола не изменялась в обоих случаях, также и после 24 ч воздействия α -токоферола и аскорбиновой кислоты на эритроциты человека, тогда как аскорбиновая кислота снижала остаточное удержание кальцеина в эритроцитах, приводя к увеличению активности белка MRP1. Данные результаты дают возможность предположить, что α -токоферол не влияет, а аскорбиновая кислота увеличивает активность MRP1 транспортера. Применение рассмотренных антиоксидантов α -токоферола и аскорбиновой кислоты в микромолярных концентрациях, превышающих физиологически регистрируемый уровень в несколько десятков раз, не приводит к значимым изменениям клеточного гомеостаза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wu, C. P. Modulatory effects of plant phenols on human multidrug-resistance proteins 1, 4 and 5 (ABCC1, 4 and 5) / C.P. Wu [et al.] // FEBS J. – 2005. – Vol. 272. – № 18. – P. 4725–4740.
2. cGMP and glutathione-conjugate transport in human erythrocytes / A. Klokouzas [et al.] // Eur. J. Biochem. – 2003. – Vol. 270. – P. 3696–3708.
3. Vasieva, O. The many faces of glutathione transferase pi / O. Vasieva [et al.] // Curr. Mol. Med. – 2011. – Vol. 11, № 2. – P. 129–139.

4. 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, № 2. – P. 171–179.
5. Active caspases-8 and -3 in circulating human erythrocytes purified on immobilized annexin-V: a cytometric demonstration / D. Bratosin [et al.] // Cytometry A. – 2009. – Vol. 75, № 3 – P. 236–244.
6. Cardenas, E. Vitamin E: a dark horse at the crossroad of cancer management / E. Cardenas, R. Ghosh // Biochem. Pharmacol. 2013. – Vol. 86, № 7. – P. 845–852.
7. Halliwell, B. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? / B. Halliwell, J. Rafter, A. Jenner // Am. J. Clin. Nutr. – 2005. – Vol. 81. – P. 268S–276S.
8. Comparison of the effect of phenol and its derivatives on protein and free radical formation in human erythrocytes (*in vitro*) / B. Bukowska [et al.] // Blood Cell Mol Dis. – 2007. – Vol. 39, № 3 – P. 238–244.
9. Procházková, J. ABC transporters affect the detection of intracellular oxidants by fluorescent probes / J. Procházková [et al.] // Free Radic Res. – 2011. – Vol. 45, № 7. – P. 779–787.
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 // Сборник статей X международного съезда белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков – 2012. – Ч. 1. – С. 36–38.

ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДОВ СИНТЕЗА И ВЫДЕЛЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО СОЕДИНЕНИЯ ФЛУДАРАБИНФОСФАТА OPTIMIZATION OF METHODS FOR SYNTHESIS AND ISOLATION OF ANTICANCER COMPOUND FLUDARABINEPHOSPHATE

Е. И. Квасюк, И. Г. Гриб, О. В. Колядко
E. Kvasyuk, I. Grib, O. Kolyadko

*Белорусский государственный университет, МГЭИ им. А. Д. Сахарова БГУ,
г. Минск, Республика Беларусь
ekvasyuk@inbox.ru
Belarusian State University, ISEI BSU, Minsk, Republic of Belarus*

Флударабинфосфат является одним из эффективных препаратов, используемых в современной медицинской практике для лечения ряда онкологических заболеваний крови. Для создания лекарственной формы препарата требуется фармацевтическая субстанция с высокой степенью чистоты активного соединения. Очистка флударабинфосфата с помощью традиционных подходов, используемых в органической химии, не приводит к положительным результатам. В этой связи разработка оптимальных условий синтеза и выделения препарата, которым посвящено данное исследование, представляет актуальную задачу.

Fludarabinephosphate is one of the effective compounds used in medicine for the treatment of leukemia. Preparation of drug on the base of fludarabinephosphate needs very pure substance. Purification of synthesized compound by using of traditional approaches which used in organic chemistry is unsuccessful. That is why optimization of methods for synthesis and isolation fludarabinephosphate with high purity is the main aim of this actual research.

Ключевые слова: флударабинфосфат, противоопухолевая активность, синтез, выделение, оптимизация условий получения.

Keywords: fludarabiphosphate, anticancer activity, synthesis, isolation, optimization of conditions for preparation.

Флударабинфосфат представляет собой бимодифицированный пуриновый нуклеотид, являющийся антимабололитом природного соединения аденозин-5'-монофосфата (АМР). В гетероциклической части, в положении С-2 вместо атома водорода присутствует атом фтора, а углеводный фрагмент представлен D-арабинофуранозой вместо D-рибозы. Полное химическое название соединения – (9-β-D-арабинофуранозил)-2-фтораденин-5'-монофосфат (FaraAMP). Коммерческий препарат на его основе под названием «Флудара» в настоящее время широко используется в терапии ряда онкогематологических заболеваний. Предпосылкой к созданию флударабинфосфата послужила высокая биологическая активность его аналога, не содержащего атома фтора – арабинофуранозиладенин (араА). Однако тот оказался неустойчивым к действию аденозиндезаминазы, превращающей араА в не обладающий активностью арабинозид гипоксантина. Для ингибирования дезаминазы приходилось использовать её ингибитор – дезоксикоформицин, что, наряду с недостаточной растворимостью араА и его высокой токсичностью, не способствовали широкому применению этого соединения в медицинской практике. Введение