

Канап Ю.С.¹, Тамашэўскі А.У.², Гармаза Ю.М.², Слабажаніна К.І.¹
Функцыянаванне мембраназвязаных транспартных бялкоў MRP1 і RLIP76 у эрытрацытах чалавека пры мадыфікацыі іх рэдокс-статусу *in vitro* антыаксідантамі рознай прыроды

¹ДНУ «Інстытут біяфізікі і клетачнай інжынерыі НАН Беларусі»,
Мінск, Рэспубліка Беларусь

²ДУ «РНПЦ трансфузіялогіі і медыцынскіх біятэхналогій», Мінск,
Рэспубліка Беларусь

Вядома, што мембрана эрытрацытаў чалавека забяспечана сістэмай актыўнага транспарту каньюгатаў глутатыёну з рознымі энда- і экзагеннымі злучэннямі, якая выконвае важную ролю ў ахове арганізма ад ксенабіётыкаў, у прыватнасці, пры развіцці акісляльнага стрэсу. Гэты транспарт з'яўляецца АТФ-залежным і асацыяваны з бялком множнай лекавай устойлівасці 1 (MRP1), які здольны транспартаваць ксенабіётыкі глутатыён-залежным і глутатыён-незалежным чынам. Таксама адным са звёнаў паміж біяхімічнымі шляхамі глутатыён-апасродкаванага метабалізму ксенабіётыкаў і АТФ-залежнага экспарту электрофільных злучэнняў з клеткі з'яўляецца дынітрафеніл-S-глутатыён АТФаза (DNP-SG АТФаза або RLIP76), які таксама прымае актыўны ўдзел у працэсах клетачнай сігналацыі і мембранавай рэгуляцыі пры ўздзеянні стрэсавых фактараў. Універсальнымі пратэктарамі мембран клетак ад акісляльнага пашкоджання з'яўляюцца антыаксіданты (АА). Аднак інфармацыя пра ўплыў АА рознай прыроды на функцыянаванне бялкоў-транспарцёраў ксенабіётыкаў пры фізіялагічных умовах дастаткова супярэчлівая.

Мэта дадзенай працы – вывучэнне транспартнай актыўнасці бялкоў-пераношчыкаў MRP1 і RLIP76 пры ўздзеянні гідрафільных і гідрафобных антыаксідантаў на эрытрацыты донараў *in vitro*.

Матэрыялы і метады. У працы выкарыстана кроў здаровых донараў (кансервант "гепарын"). Дзеля мадыфікацыі рэдокс-балансу ў

эрытрацытах *in vitro* выкарыстоўвалі гідрафобныя антыаксіданты - кверцэтын і α -такаферол (α -Т) і гідрафільныя - N-ацэтылцыстэін (NAC) і аскарбінавая кіслата (АК), час уздзеяння - 3 і 24 г. Жыццяздольнасць эрытрацытаў кантралявалі па актыўнасці ўнутрыклеткавых эстэраз, выкарыстоўваючы кальцэін-АМ тэст. Мадыфікацыю рэдокс-статусу ацэньвалі па хуткасці праходжання свабоднарадыкальных (СР) працэсаў, выкарыстоўваючы флуарэсцэнтны зонд CM-H₂DCFDA. Функцыянальную актыўнасць RLIP76 вызначалі спектрафотаметрычным метадам па ступені выхаду DNP-SG-каньюгатаў, а MRP1 - метадам праточнай цытафлуарыметрыі па ўтрыманні кальцэіна ў клетках. Узровень экспрэсіі бялкоў-транспартэраў MRP1 і RLIP76 у мембранах эрытрацытаў вызначалі метадам прамой і непрамой імунафлуарэсцэнцыі. Адрозненні паміж групамі разлічвалі з дапамогай непараметрычнага крытэрыю Вілкаксана (n = 5-8, p < 0,05).

Вынікі і абмеркаванне. Праведзеная ацэнка жыццяздольнасці эрытрацытаў пасля ўздзеяння на іх АА ў шырокім спектры канцэнтрацый, дазволіла абраць аптымальны ўзровень значэнняў, які для большасці даследаваных злучэнняў належыць да тэрапеўтычнага дыяпазону, а менавіта 10-1000 мкм. Даследаванне мадыфікацыі рэдокс-статусу эрытрацытаў пасля іх прадінкубацыі *in vitro* з даследванымі групамі АА у вышэй адзначаных дыяпазонах канцэнтрацый паказала рознабаковы клеткавы адказ. Выяўлена, што α -Т і кверцэтын інгібіравалі працяканне СР працэсаў, г.зн. выступалі ў якасці аднаўляльнікаў, а АК і NAC - актывавалі іх, г.зн. з'яўляліся акісляльнікамі. Ацэнка транспартнай актыўнасці бялкоў MRP1 і RLIP76 у АА-мадыфікаваных эрытрацытах таксама выявіла рознакіраванасць іх дзеяння. Калі інкубацыя клетак з гідрафільнымі АА прыводзіла да статыстычна значнай актывацыі транспартных функцый і MRP1, і RLIP76, то ўдзеецне гідрафобнага α -Т насіла рознабаковы характар – назіралася ўзмацненне транспартнай актыўнасці RLIP76, але інгібіраванне актыўнасці MRP1. У сваю чаргу, уздзеяцне на эрытрацыты гідрафобнага АА - кверцэтына значна зніжала функцыянальную актыўнасць RLIP76, але не ўплывала на работу MRP1. Ацэнка экспрэсіі даследваных бялкоў у мембранах эрытрацытаў пры фізіялагічных умовах выявіла ў сярэднім 1-4% MRP1-пазітыўных клетак ў даследванай папуляцыі і 9-18% - RLIP76-пазітыўных клетак.

Атрыманья вынікі сведчаць аб цеснай узаемасувязі паміж функцыянальнай актыўнасцю RLIP76 / MRP1 і працяканнем СР працэсаў у эрытрацытах. Пры гэтым у працэсе падтрымання

акісляльна-аднаўленчага балансу пасля ўздзеяння АА на клеткі донараў асноўная роля належыць нізкамалекулярнаму бялку RLR76.

Падзяка. Аўтары выказваюць шчырую падзяку Кацярыне Бялевіч за дапамогу ў карэктурцы тэзісаў.