БИОХИМИЯ, 2021, том 86, вып. 2, с. 236 – 247

УДК 57.021

РОЛЬ Р-ГЛИКОПРОТЕИНА В ОГРАНИЧЕНИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ*

© 2021 А.В. Щулькин, Ю.В. Абаленихина, И.В. Черных, П.Д. Ерохина, Е.Н. Якушева**

Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, 390026 Рязань, Россия; электронная почта: alekseyshulkin@rambler.ru

Поступила в редакцию 15.07.2020
После доработки 03.09.2020
Принята к публикации 09.09.2020

Р-гликопротеин является одним из наиболее клинически значимых представителей ABC-транспортеров в силу участия в транспорте биобиотиков и ксенобиотиков через цитоплазматическую мембрану. Известно, что активность и экспрессия Р-гликопротеина может изменяться под воздействием различных химических веществ, факторов внешней среды, патологических процессов. В настоящем исследовании была изучена роль Р-гликопротеина в ограничении проницаемости цитоплазматических мембран в условиях окислительного стресса. Клетки аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2), гиперэкспрессирующие данный белок-транспортер, культивировали с пероксидом водорода в питательной среде в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 72 ч. Транспорт субстрата Р-гликопротеина фексофенадина через мембрану клеток оценивали в специальных трансвелл-системах. Количество белка-транспортера и транскрипционного фактора Nrf2 анализировали методом иммуноферментного анализа (ИФА). Концентрацию белковых SH-групп, продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков определяли спектрофотометрически. По результатам исследования пероксид водорода в концентрациях 0,1–5 мкМ не оказывал достоверного влияния на изучаемые показатели, однако в концентрации 10 мкМ вызывал снижение уровня белковых SH-групп, что сопровождалось повышением количества Nrf2. Последний, в свою очередь, увеличивал содержание и активность белка-транспортера Р-гликопротеина, сдерживающего растущую проницаемость клеточной мембраны. Увеличение концентрации прооксиданта до 50 мкМ вызывало усиление окислительного стресса, что проявлялось снижением уровня SH-групп, повышением концентрации продуктов перекисного окисления липидов, карбонильных производных белков и снижением содержания Р-гликопротеина, что в итоге приводило к значительному повышению проницаемости цитоплазматической мембраны. Таким образом, транспортная и защитная роль Р-гликопротеина, заключающаяся в ограничении проницаемости клеточной мембраны, зависит от выраженности окислительного стресса и реализуется только при незначительных повреждениях мембран.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Р-гликопротеин, Nrf2, окислительный стресс, проницаемость биологической мембраны, цитотоксичность пероксида водорода, окислительное повреждение липидов и белков, восстановленные тиолы.

DOI: 10.31857/S0320972521020081

ВВЕДЕНИЕ

ABC-транспортеры (англ. абб. ABC от ATP-Binding Cassette) – это АТР-зависимые белки-транспортеры, обеспечивающие энергозависимый перенос веществ через цитоплазматические мембраны. ABC-транспортеры выявлены в трех доменах (надцарствах) биологических видов – бактериях, археях и эукариотах, а также в некоторых гигантских вирусах [1]. Геном человека включает 49 генов ABC-транспортеров, объединенных в семь подсемейств (обозначаемых латинскими буквами A–G). Известно, что нарушение функционирования 18 транспортеров связано с развитием заболеваний (например, нарушение ABCC7 вызывает муковисцидоз, ABCB11 – прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз, и т.д.), а 20 из них

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ИФА – иммуноферментный анализ; клетки линии Caco-2 – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека; ОП – оптическая плотность; ПОЛ – продукты перекисного окисления липидов; DTNB – 5,5′-дитиобис(2-нитробензойная кислота); MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид; Nrf2 – транскрипционный фактор NF-E2-related factor 2; P-gp – Р-гликопротеин.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya, в рубрике «Papers in Press», BM20-223, 18.01.2021.

** Адресат для корреспонденции.

вовлечены в транспорт лекарственных веществ [2]. ABC-транспортеры имеют общую структурную организацию: каждая молекула переносчика состоит из двух трансмембранных доменов, которые образуют транспортный канал и обеспечивают распознавание и связывание субстратов, а также двух нуклеотид-связывающих доменов, которые гидролизуют ATP [3, 4].

Самым изученным белком из суперсемейства ABC-транспортеров является P-гликопротеин (он же – белок множественной лекарственной устойчивости 1, P-gp, ABCB1-белок, MDR1) [5, 6]. P-gp представляет собой крупный трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 170 кДа (из них 150 кДа приходится на пептидную часть). P-gp обладает широкой субстратной специфичностью. Его субстратами являются преимущественно липофильные вещества с молекулярной массой 330–4000 Да, относящиеся к следующим фармакологическим группам: противоопухолевые, гипотензивные и антигистаминные препараты, сердечные гликозиды, антиагреганты, антикоагулянты, стероидные и тиреоидные гормоны, антибиотики, ингибиторы ВИЧ-протеиназы, иммунодепрессанты и др. [7].

Впервые P-gp был выделен Juliano and Ling в 1976 г. из цитоплазматической мембраны клеток яичника китайского хомячка, отобранных по устойчивости к колхицину и демонстрирующих перекрестную резистентность к широкому спектру амфифильных веществ [8]. В дальнейшем этот белок-транспортер был обнаружен в энтероцитах кишечника, гепатоцитах, эпителиальных клетках почечных канальцев, эндотелиальных клетках гистогематических барьеров. Поэтому в настоящее время принято считать, что P-gp играет важную роль в развитии резистентности опухолей к химиотерапии [9], а также в транспорте эндогенных и экзогенных веществ [10].

Активность и экспрессия P-gp могут изменяться под воздействием различных химических веществ, факторов внешней среды и патологических процессов [11]. Например, рифампицин и гипоксия могут активировать функционирование белка-транспортера, а циклоспорин и верапамил его ингибируют [7], что, в свою очередь, влияет на проникновение субстратов белка-транспортера внутрь клеток через цитоплазматическую мембрану (повышает или снижает соответственно).

Одним из факторов, влияющих на проницаемость цитоплазматической мембраны, является гиперпродукция активных форм кислорода (АФК). АФК при взаимодействии с цитоплазматической мембраной клеток вызывают активацию перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к образованию пор, уменьшению толщины бислоя, нарушению текучести и, в конечном счете, повышению ее проницаемости [12].

С другой стороны, гиперпродукция АФК и развитие окислительного стресса увеличивают экспрессию редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2 (англ. NF-E2-related factor 2) [13], который, в свою очередь, может повысить экспрессию P-gp [14], ограничивающего проницаемость мембраны для субстратов.

Таким образом, при гиперпродукции АФК проницаемость цитоплазматической мембраны для субстратов P-gp может как повыситься (за счет разрушения мембраны), так и понизиться (за счет повышения активности белка-транспортера), что на данный момент не изучено и послужило целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток линии Caco-2. Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2) (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37 °C и 5%-ном содержании CO_2 в инкубаторе WS-189C («World Science», Корея) в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4 500 мг/л), также содержащей L-глутамин (4 мМ), 15% бычьей сыворотки, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все составляющие производства «Sigma-Aldrich», Германия). После достижения 70–90% конфлюентности клетки снимали с флакона добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия) и высеивали: в 96-луночный планшет («Corning», США) – для оценки цитотоксичности пероксида водорода; в 6-луночные планшеты («Corning», США) – для оценки влияния пероксида водорода на количество P-gp, Nrf2 и концентрацию продуктов перекисного окисления липидов, карбонильных производных белков и содержания белковых тиоловых SH-групп; в специальные трансвелл-системы (12 мм Transwell® планшеты с поликарбонатной мембранной вставкой с порами 0,4 мкм, «Corning», США) – для оценки влияния пероксида водорода на проницаемость клеточных мембран для субстрата P-gp [15]. Клетки линии Caco-2 культивировали в течение 21 сут, поскольку на данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в клетки, подобные энтероцитам тонкого кишеч-

ника, гиперэкспрессирующие P-gp. Смену культуральной среды проводили раз в два дня, а на последней неделе – каждый день.

Окислительный стресс моделировали добавлением в культуральную среду пероксида водорода H_2O_2 («Sigma-Aldrich», Германия) в конечных концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5; 10 и 50 мкМ и инкубацией в течение 72 ч. Смену среды проводили каждые 24 ч. На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения.

Тест на выживаемость (цитотоксический тест). Клетки засеивали в 96-луночный планшет из расчета 10^4 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут., затем добавляли культуральную среду с H_2O_2. После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0,5%-ного раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида (МТТ) и инкубировали еще в течение 2 ч, затем раствор с МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1%-ного раствора диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия) [16]. Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на иммуноферментном планшетном анализаторе Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США)[16].

Выживаемость клеток Caco-2 в присутствии пероксида водорода рассчитывали по формуле: (ОП опытных лунок – ОП среды)/(ОП контрольных лунок – ОП среды) × 100%, где ОП – оптическая плотность.

Приготовление клеточных лизатов для анализа. Клетки засеивали в 6-луночные планшеты из расчета 10^5 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут., затем добавляли культуральную среду с H_2O_2. После окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия).

Часть клеток (2×10^6) трехкратно промывали фосфатным буфером pH 7,4 («ПанЭко», Россия), лизировали трехкратным циклом замораживания-размораживания в 200 мкл буфера при –20 °С и использовали для проведения ИФА.

Вторую часть клеток (1×10^6) промывали изотоническим раствором NaCl («Медпро», Россия), добавляли 150 мкл лизирующего буфера (50 мМ pH 7,4 Tris-HCl, 150 мМ KCl, 0,5% тритон X-100, смесь ингибиторов протеиназ (4-(2-аминоэтилбензенсульфонил) флуорида гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ, апротинин 0,3 мкМ, бестатин 130 мкМ, ЭДТА 1мМ, *транс*-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4-гуанидино)бутан (E-64) 14 мкМ, лейпептин 1 мкМ, «Sigma-Aldrich», Германия)), встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 5000 *g* (CM-50, «Eppendorf», Германия). Цитоплазматическую (экстраядерную) фракцию переносили в отдельные пробирки и использовали для определения концентрации тиоловых (SH-) групп.

Аналогичным образом лизировали клетки, которые параллельно инкубировали в 6-луночных планшетах для определения концентрации продуктов ПОЛ и карбонильных производных белков, из расчета на 3×10^6 клеток – 450 мкл лизирующего буфера [17].

Анализ содержания P-gp и Nrf2 в клетках линии Caco-2. В лизате клеток методом ИФА определяли количество P-gp и Nrf2 коммерческими наборами (Human Permeability glycoprotein ELISA Kit и Human Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 ELISA Kit соответственно; «Blue gene», Китай). Светопоглощение измеряли при 450 нм на иммуноферментном планшетном анализаторе Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США). Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, «ThermoFisher», США).

Определение концентрации белковых тиоловых (SH-) групп. Концентрацию белковых тиоловых групп определяли по разнице между уровнем общих и низкомолекулярных SH-групп. Анализ содержания общих SH-групп в лизате клеток проводили по методу Эллмана с 5,5′-дитиобис(2-нитро)-бензойной кислотой (DTNB) в неденатурирующих условиях [18]. К 100 мкл образца добавляли 100 мкл 2 мМ DTNB («Serva», Германия) в 1 М Tris-HCl буфере (pH 8,0) и 1000 мкл дистиллированной воды. После 30-мин экспозиции количественно оценивали содержание 5-тио-2-нитробензойной кислоты при 412 нм на Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США). Концентрацию SH-групп рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции $\varepsilon_{412} = 13{,}6$ мМ$^{-1}$см$^{-1}$ [19]. Для определения содержания низкомолекулярных SH-групп пробу предварительно смешивали с охлажденной 5%-ной трихлоруксусной кислотой («Химмед», Россия), инкубировали на льду 15 мин, затем центрифугировали при 11 000 *g* (CM-50, «Eppendorf», Германия) 5 мин при 4 °С. Полученный супернатант нейтрализовали с помощью 1%-ного NaOH («Химмед», Россия) и использовали для определения низкомолекулярных SH-групп по реакции с DTNB.

Определение концентрации продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков. В лизате клеток с помощью коммерческих наборов определяли концентрацию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) («Elabscience», Китай) и карбонильных производных белков («Sigma-Aldrich», Германия).

Метод определения продуктов ПОЛ – малонового диальдегида и 4-гидрокси-олефинов (4-гидрокси-2-ноненаля и 4-гидрокси-2-гексеналя) – основан на их взаимодействии с 1-метил-2-фенилиндолом с образованием стабильного хромофора, который имеет максимум поглощения при 586 нм [20].

Метод определения карбонильных производных белков основан на их взаимодействии с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрировали при длине волны 375 нм. Концентрацию карбонильных производных белков рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции $\varepsilon_{375} = 22$ мМ$^{-1}$см$^{-1}$ [21].

Анализ выполняли на иммуноферментном планшетном анализаторе Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США).

Оценка транспорта субстрата Р-гликопротеина (фексофенадина) через мембрану клеток линии Caco-2. Оценку проникновения субстрата P-gp через билипидную мембрану клеток линии Caco-2 оценивали в специальных трансвелл-системах (рис. 1). Трансвелл-система представлена двумя камерами: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры является полупроницаемой мембраной, на которую высеивали клетки линии Caco-2 с плотностью 10^5/см^2 и культивировали в течение 21 сут.

Целостность клеточного монослоя оценивали по величине трансэпителиального сопротивления, которое определяли с помощью вольтметра Millicell ERS-2 («Millipore», США). Условием для выполнения транспортных экспериментов было значение выше 500 мОм × см^2. В лунки трансвелл-системы добавляли культуральную среду с H_2O_2 в тестируемых концентрациях. После окончания инкубации культуральную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich», Германия) с 25 мМ HEPES («Sigma-Aldrich», Германия) и 1% диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия). Затем добавляли субстрат P-gp – фексофенадин («Sigma-Aldrich», Германия) – в апикальную камеру в конечной концентрации 150 мкМ [22]. Через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из базолатеральной камеры-реципиента для определения концентрации субстрата (*a-b* транспорт, обусловленный пассивной диффузией против функционирования P-gp). В аналогичных трансвелл-системах оценивали транспорт фексофенадина из базолатеральной камеры в апикальную (*b-a* транспорт, обусловленный пассивной диффузией и функционированием P-gp). Для этого субстрат в той же концентрации добавляли в базолатеральную камеру, а затем через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из апикальной камеры для определения концентрации фексофенадина.

Транспорт маркерного субстрата рассчитывали по формуле [23]:

$$\mathrm{Papp} = \frac{\mathrm{dQ}}{\mathrm{dt}} \times \frac{1}{(\mathrm{A} \times \mathrm{C_O})},$$

где Papp – коэффициент кажущейся проницаемости (см/с), dQ/dt – изменение количества субстрата в камере-реципиенте за время инкубации (мкМ × мл/с), A – площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе (см^2), C_0 – начальная концентрация субстрата в камере-доноре (мкМ).

Определение концентрации фексофенадина. Концентрацию фексофенадина в транспортной среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием при длине волны 220 нм. Исследование выполнялось на ВЭЖХ системе «Стайер» (Россия) по оригинальной методике [24]. Полученная проба транспортной среды (50 мкл), содержащая фексофенадин, разводи-

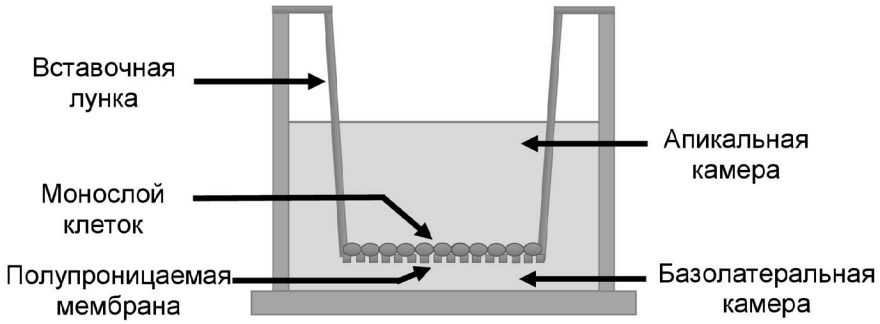

Рис. 1. Структура трансвелл-системы. Данная система представлена двумя камерами: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры является полупроницаемой мембраной, на которую высеивали клетки линии Caco-2 с плотностью 10^5/см^2

лась в 150 мкл подвижной фазы, и 100 мкл полученного раствора вводились в хроматограф.

При анализе использовалась хроматографическая колонка Synergi 4 μm Polar-RP 80 Å (250 × 4,6) («Phenomenex», США). Температура разделения – 45 °С, скорость потока – 1 мл/мин. Состав подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила («PanReac AppliChem», Испания), 267,4 мл воды деионизированной, 6,33 мл кислоты уксусной ледяной («PanReac AppliChem», Испания) с добавлением триэтиламина («PanReac AppliChem», Испания) до pH 6,7. Время удерживания фексофенадина в данных условиях составляло 12,8 мин. Количественное определение проводилось методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составлял 1,2–57,4 мкМ.

Статистический анализ. Полученные результаты анализировали с помощью программ «StatSoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ811I521319AR25ACD-W) и Microsoft Excel for Mac ver. 16.24 (ID02984-001-000001). Результаты представлены в виде M ± SD. Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена–Кейлса. Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили с помощью критерия Пирсона.

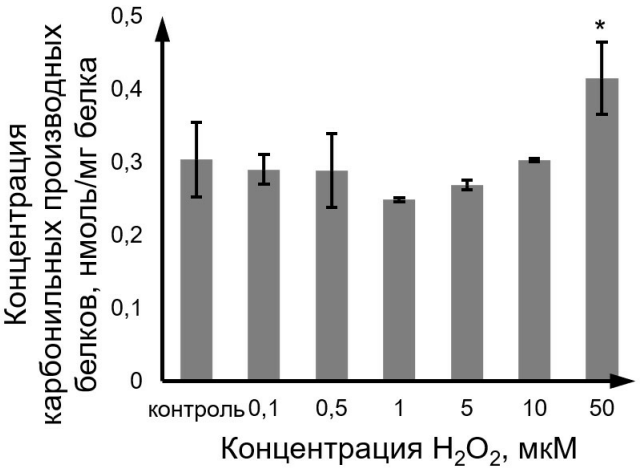

Рис. 3. Изменение концентрации карбонильных производных белков при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 72 ч. Количественное определение карбонилированных белков проводили в лизате клеток Caco-2 (M ± SD, $n = 3$) фотометрическим методом с использованием коммерческого набора «Sigma-Aldrich», Германия. * – Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

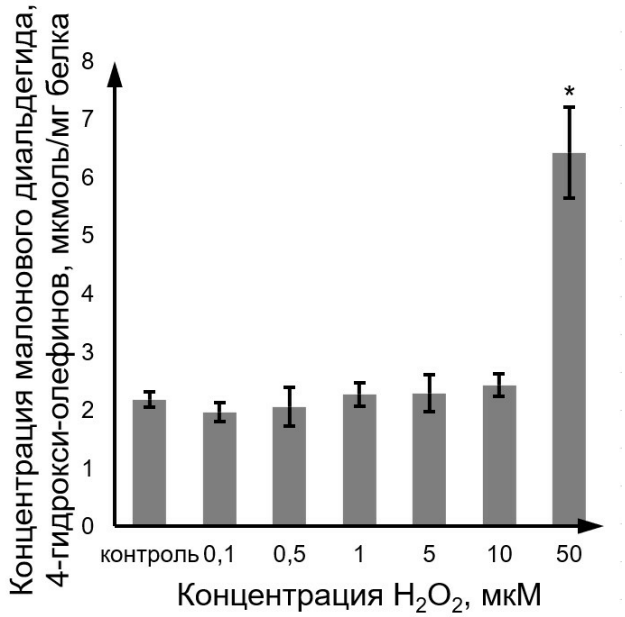

Рис. 2. Изменение концентрации продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида и 4-гидроксиолефинов) при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 72 ч. Количественное определение продуктов ПОЛ проводили в лизате клеток Caco-2 (M ± SD, $n = 3$) фотометрическим методом с использованием коммерческого набора «Elabscience», Китай. * – Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Окислительное повреждение липидов и белков клеток линии Caco-2 под действием H_2O_2. Окислительное повреждение липидов оценивали по уровню продуктов перекисного окисления (малонового диальдегида и 4-гидрокси-олефинов), белков – по концентрации белковых тиоловых (SH-) групп и содержанию карбонильных производных белков. H_2O_2 в концентрациях 0,1–10 мкМ достоверно не влиял на уровень продуктов ПОЛ, а в концентрации 50 мкМ повышал данный показатель на 194,9% ($p = 0,0002$) по сравнению с контролем (рис. 2).

Аналогичным образом содержание карбонильных производных белков в лизате клеток Caco-2 повышалось только при концентрации H_2O_2 50 мкМ – на 36,5% ($p = 0,001$) (рис. 3).

В то же время уровень белковых тиоловых (SH-) групп при воздействии H_2O_2 в концентрации 10 мкМ уменьшался на 52,4% ($p = 0,021$) и при концентрации 50 мкМ – на 38,1% ($p = 0,022$) по сравнению с контролем. При концентрации пероксида водорода 0,1; 0,5; 1 и 5 мкМ уровень восстановленных тиолов не изменялся относительно значений контрольной группы (рис. 4).

Таким образом, установлено, что H_2O_2 на клетках линии Caco-2 вызывает повреждение

липидов и белков в концентрации от 50 мкМ, при этом окисление белковых SH-групп, играющих регуляторную роль, происходит уже при концентрации прооксиданта 10 мкМ.

Цитотоксическое действие H_2O_2 на клетки линии Caco-2. Цитотоксическое действие H_2O_2 оценивалось в ходе МТТ-теста. В интактной группе клеток выживаемость клеток составила 100%, при действии пероксида водорода в концентрациях 0,1–10 мкМ – статистически значимо не отличалась от значений группы контроля и составила 87,6 ± 9,3%. При концентрации H_2O_2 50 мкМ выживаемость клеток снижалась до 58,8 ± 11,5% ($p = 0,02$). В совокупности с описанными выше результатами эти данные свидетельствуют о том, что H_2O_2 вызывает повреждение и гибель клеток только при развитии выраженного окислительного стресса, проявляющегося повреждением липидов и белков.

Влияние H_2O_2 на количество P-gp и Nrf2. Количество Nrf2 в клетках линии Caco-2 повышалось по сравнению с контролем под действием H_2O_2 в концентрациях 10 мкМ и 50 мкМ на 302,5% ($p = 0,02$) и 237,5% ($p = 0,03$) соответственно, а при остальных концентрациях прооксиданта – достоверно не изменялось (рис. 5)

Показано, что в диапазоне концентраций H_2O_2 от 0,1 до 50 мкМ уровень Nrf2 был обратно пропорционален содержанию белковых тиоловых (SH-) групп (рис. 6), что согласуется с классическими представлениями о механизме регуляции Nrf2 [25].

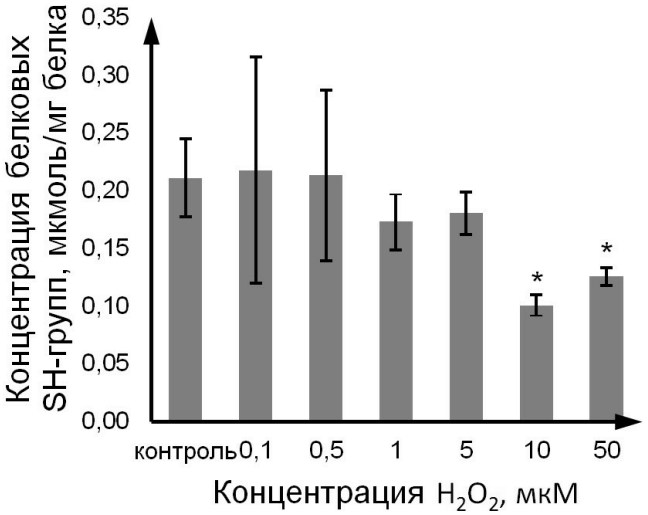

Рис. 4. Изменение концентрации белковых SH-групп при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 72 ч. Количественное определение тиоловых (SH-) групп проводили фотометрическим методом по реакции с DTNB («Serva», Германия) в лизате клеток Caco-2 (М ± SD, $n = 3$). * – Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

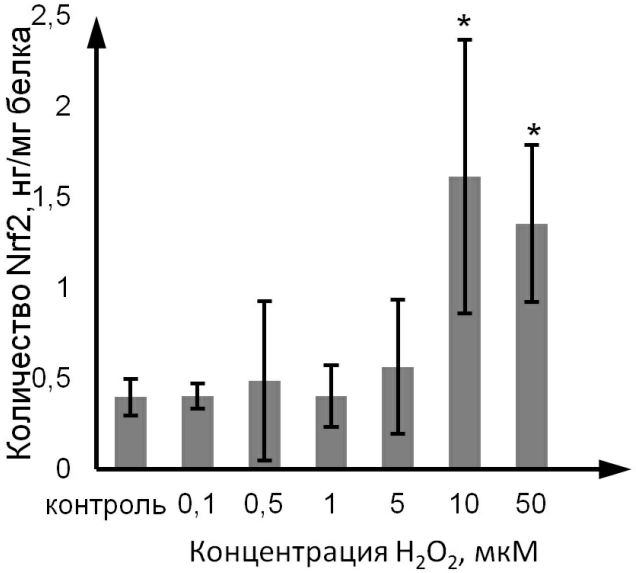

Рис. 5. Изменение количества Nrf2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 72 ч. Количество Nrf2 определяли в лизате клеток Caco-2 (М ± SD, $n = 3$) с помощью ИФА. * – Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

Количество P-gp в клетках линии Caco-2, оцененное методом ИФА, составило 110,8 нг/мг белка или 23,5 нг/10^6 клеток. H_2O_2 в концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5 мкМ не влиял на количество белка-транспортера. В концентрации 10 мкМ пероксид водорода повышал содержание P-gp на 68,9% ($p = 0,01$), а в концентрации 50 мкМ – снижал его на 65,8% ($p = 0,01$) по сравнению с показателями контроля (рис. 7)

Анализ результатов выявил, что уровень P-gp в лизате клеток Caco-2 был прямо пропорционален содержанию Nrf2 в экспериментах с H_2O_2 в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мкМ (рис. 8).

Таким образом, окислительный стресс и окисление SH-групп повышает уровень транскрипционного фактора Nrf2, который, в свою очередь, увеличивает количество белка-транспортера P-gp. Усиление окислительного стресса приводит к снижению количества P-gp, несмотря на сохраняющийся повышенный уровень Nrf2.

Влияние H_2O_2 на транспорт субстрата P-gp (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток линии Caco-2. Коэффициент кажущейся проницаемости Papp *b-a* фексофенадина, характеризующий его транспорт из базолатеральной камеры в апикальную за счет пассивной диффузии и функционирования P-gp, составил $3,08 \times 10^{-6} \pm \pm 0,94 \times 10^{-6}$ см/с, коэффициент кажущейся проницаемости Papp *a-b*, оценивающий транспорт из апикальной камеры в базолатеральную

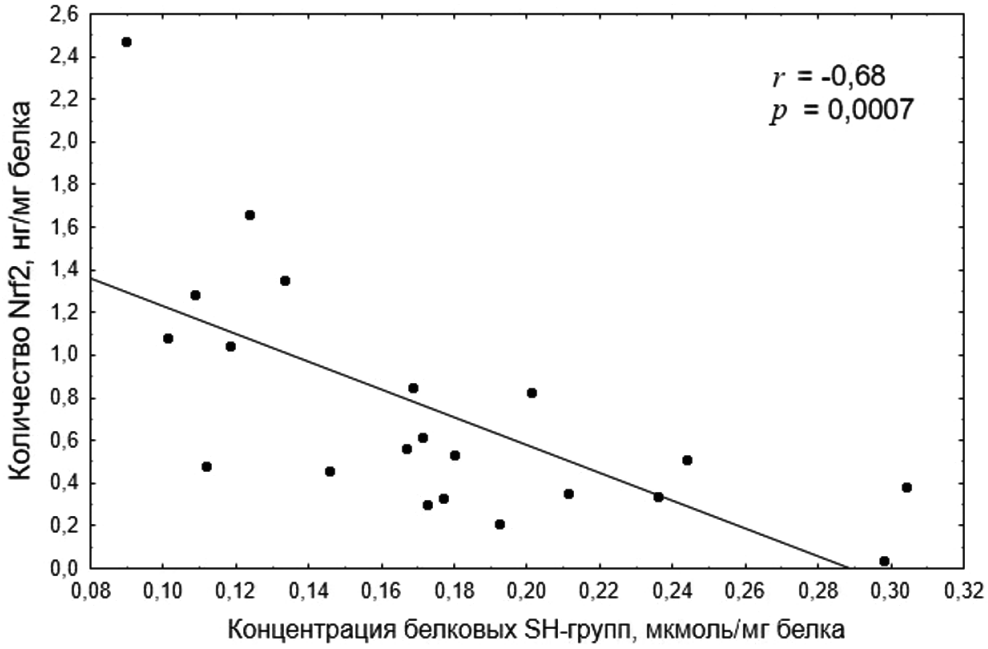

Рис. 6. Корреляционная зависимость между концентрацией SH-групп (мкмоль/мг белка) и количеством Nrf2 (нг/мг белка) при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 72 ч. Коэффициент корреляции $r = -0,68$, $p = 0,0007$, что свидетельствует об обратной зависимости между концентрацией восстановленных тиолов и количеством транскрипционного фактора Nrf2

за счет пассивной диффузии против функции P-gp, составил $1,13 \times 10^{-6} \pm 0,6 \times 10^{-6}$ см/с. Из представленных данных видно, что транспорт, обусловленный функционированием P-gp, почти в 3 раза выше транспорта, происходящего за счет пассивной диффузии против работы белка-транспортера ($p = 0,013$) (таблица).

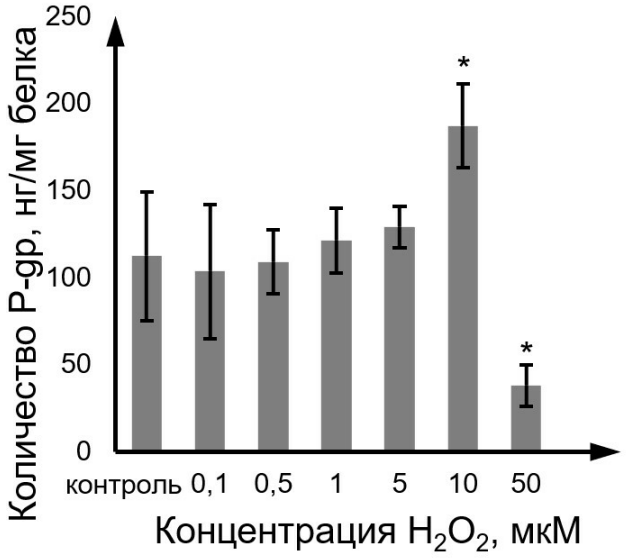

Рис. 7. Изменение количества P-gp при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 72 ч. Количество P-gp определяли в лизате клеток Caco-2 (M ± SD, $n = 3$) с помощью ИФА. * – Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

H_2O_2 в концентрациях 0,1–5 мкМ достоверно не влиял на транспорт субстрата P-gp фексофенадина из апикальной камеры в базальную и в обратном направлении. При этом сохранялось превышение транспорта, осуществляемого P-gp и пассивной диффузией, над транспортом пассивной диффузией против работы изучаемого белка-транспортера ($p < 0,05$), что характеризует стабильное состояние его функциональной активности и проницаемости мембраны.

В концентрации 10 мкМ H_2O_2 вызывал повышение коэффициента кажущейся проницаемости Papp *b-a* фексофенадина по сравнению с контролем на 98,1% ($p = 0,056$) и не влиял на коэффициент кажущейся проницаемости Papp *a-b*. Данные результаты свидетельствуют о том, что транспорт фексофенадина, обусловленный P-gp, повышается, при этом транспорт субстрата пассивной диффузией против функционирования белка-транспортера достоверно не изменяется.

При увеличении концентрации H_2O_2 до 50 мкМ происходило повышение коэффициента кажущейся проницаемости Papp *b-a* фексофенадина на 260,7% ($p = 0,001$) и увеличение коэффициента кажущейся проницаемости Papp *a-b* на 1029,2% ($p = 0,001$) по сравнению с контролем (таблица). При этом коэффициент кажу-

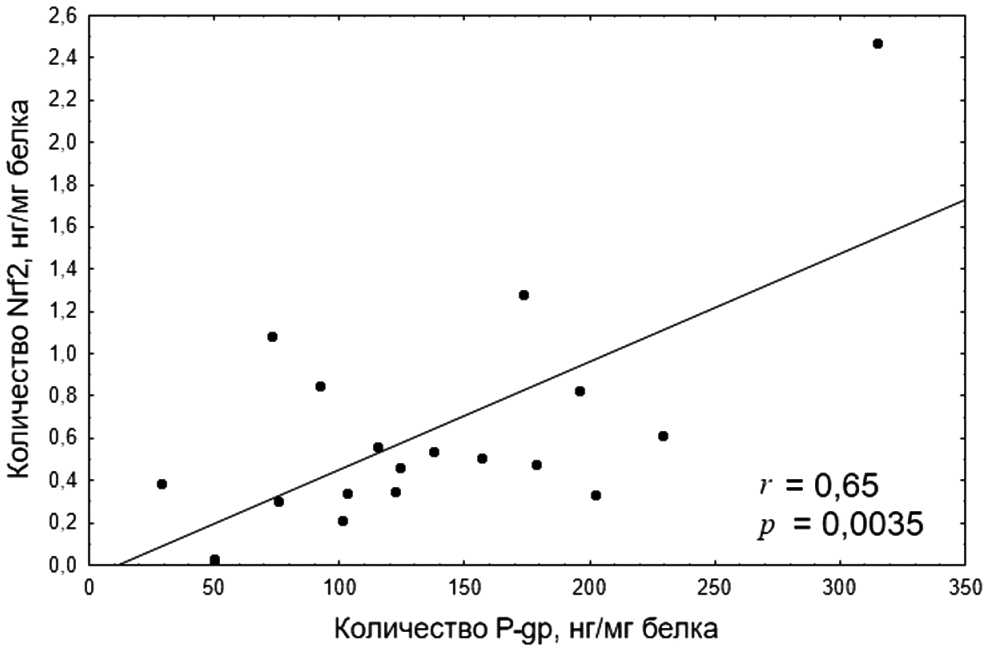

Рис. 8. Корреляционная зависимость между количеством Nrf2 (нг/мг белка) и P-gp (нг/мг белка) при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–10 мкМ в течение 72 ч. Коэффициент корреляции $r = 0,65$, $p = 0,0035$, что свидетельствует о прямой зависимости между количеством транскрипционного фактора Nrf2 и уровнем P-gp при условии целостности цитоплазматической мембраны

щейся проницаемости Papp *b-a* (обусловленный P-gp и пассивной диффузий) выравнивался с коэффициентом кажущейся проницаемости Papp *a-b* (обусловленным пассивной диффузий против функции белка-транспортера) ($p > 0,05$).

Влияние H_2O_2 на транспорт субстрата P-gp (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток Caco-2 (M ± SD, $n = 3$)

Серии эксперимента	Papp *b-a*, $\times10^{-6}$ см/с	Papp *a-b*, $\times10^{-6}$ см/с
Контроль	3,08 ± 0,94	1,13 ± 0,6
0,1 мкМ H_2O_2	3,02 ± 0,85	1,23 ± 0,59
0,5 мкМ H_2O_2	3,19 ± 0,53	1,32 ± 0,26
1 мкМ H_2O_2	3,73 ± 1,29	1,79 ± 0,14
5 мкМ H_2O_2	3,37 ± 0,41	1,18 ± 0,45
10 мкМ H_2O_2	* 6,10 ± 0,82	2,64 ± 1,44
50 мкМ H_2O_2	** 11,11 ± 2,96	**12,76 ± 3,39

Примечание. Клетки Caco-2 после экспозиции с пероксидом водорода (72 ч) инкубировали в транспортной среде с добавлением фексофенадина (150 мкМ) в апикальную или базолатеральную камеры соответствующих трансвелл-систем. Забирали образцы через 1, 2 и 3 ч из противоположной камеры-реципиента: базолатеральной (*a-b* транспорт) и апикальной камеры (*b-a* транспорт) для определения концентрации фексофенадина. Концентрацию фексофенадина в транспортной среде определяли методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. * – Отличие от контроля, $p = 0,056$, ** – достоверное отличие от контроля, $p < 0,001$.

Таким образом, показано, что H_2O_2 в концентрации 10 мкМ повышает активность P-gp в клетках линии Caco-2. При более высокой концентрации H_2O_2 происходит повреждение как клеточной мембраны, так и белка-транспортера P-gp, что следует из данных по количеству белка-транспортера в лизате клеток – это приводит к существенному повышению проницаемости клеточной мембраны в обоих направлениях.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

P-gp – АТР-зависимый белок-транспортер, обеспечивающий эффлюкс экзогенных и эндогенных веществ из клеток в межклеточное пространство и биологические жидкости. В опухолевых клетках P-gp способствует их защите от цитостатиков, в кишечнике – препятствует абсорбции биобиотиков и ксенобиотиков, в эндотелии гематоэнцефалического барьера – проникновению субстратов в ткань мозга, в печени и почках – выводит вещества в желчь и мочу [6]. Некоторые лекарственные вещества и условия среды могут изменять скорость синтеза и активность P-gp. Например, показано, что Nrf2 может стимулировать синтез белка-транспортера при окислительном повреждении гепатоцитов [26],

нервных клеток [27], клеток гематоэнцефалического барьера [28] и карциномы легкого A549 [14], что приводит к повышению активности P-gp и соответственно снижает проницаемость мембраны для его субстратов.

В настоящем исследовании в опытах *in vitro* на линии клеток Caco-2 оценивалось количество P-gp и проницаемость его субстрата фексофенадина через билипидную мембрану при окислительном стрессе разной степени выраженности, вызванном H_2O_2. Период распада пероксида водорода составляет от миллисекунд до секунд, что позволяет ему проникать в клетку сквозь мембрану и оказывать внутриклеточное воздействие. Проникновение пероксида водорода сквозь клеточную мембрану может также осуществляться с участием аквапоринов [29]. H_2O_2 является стабильным и малореактивным агентом, вследствие чего может действовать как вторичный внутриклеточный посредник [30]. Неконтролируемое взаимодействие пероксида водорода с переходными металлами (Fe^{2+} или Cu^{+}) по реакции Фентона приводит к образованию АФК [31]. В свою очередь, активные формы кислорода могут быть нейтрализованы антиоксидантными системами или накапливаться в клетках, вызывая окислительный стресс, что приводит к повреждению белков, липидов, ДНК, мутагенезу и гибели клеток. В условиях окислительного стресса наиболее чувствительными к повреждению являются серосодержащие аминокислотные остатки (метионин и цистеин), что имеет регуляторное значение [32, 33].

На изменение соотношения восстановленных и окисленных SH-групп в белках реагирует Nrf2 – редокс-чувствительный транскрипционный фактор. Его экспрессия повышается при развитии окислительного стресса и направлена на защиту клетки от воздействия свободных радикалов [13, 34]. В нормальных условиях данный транскрипционный фактор находится в комплексе с белком-репрессором Keap1, их связывание регулируется рядом протеинкиназ. Keap1, с одной стороны, способствует убиквитинированию и протеосомальной деградации Nrf2 (необходимым условием для этого процесса является наличие двух остатков цистеина в молекуле Keap1), а с другой – предотвращает его проникновение из цитоплазмы в ядро [35]. После активации комплекс Keap1–Nrf2 диссоциирует, и Nrf2 транслоцируется в ядро, где связывается с элементами антиоксидантного ответа (англ. абб. ARE) и активирует транскрипцию защитных ферментов [35].

В то же время окислительный стресс приводит к повышению проницаемости билипидной мембраны [36]. Соотношение характера структурного и функционального повреждения мембраны при разной степени выраженности окислительного стресса недостаточно изучено. Насколько нам известно, ранее исследований, в которых анализировались бы количественные и функциональные параметры мембранного транспортера P-gp при развитии окислительного стресса, не проводилось.

В ходе данной работы было показано, что развитие окислительного стресса, вызванного H_2O_2 в концентрации 10 мкМ, приводило к окислению белковых SH-групп, что вызывало повышение количества Nrf2. Данный транскрипционный фактор стимулировал увеличение содержания и активности P-gp, что проявлялось в повышении транспорта субстрата белка-транспортера из базолатеральной камеры трансвелл-системы в апикальную (за счет пассивной диффузии и функционирования P-gp). Логично было ожидать, что транспорт фексофенадина из апикальной камеры в базолатеральную (за счет пассивной диффузии против работы белка-транспортера) при этом снизится. Однако в нашем исследовании данный показатель не изменялся. Скорее всего, это связано с тем, что при воздействии H_2O_2 в концентрации 10 мкМ увеличивается проницаемость билипидной мембраны, но повышение активности P-gp нивелирует данное нарушение.

Увеличение концентрации H_2O_2 до 50 мкМ усиливало окислительный стресс, вызывало накопление малонового диальдегида и 4-гидроксиолефинов (4-гидрокси-2-ноненаля и 4-гидрокси-2-гексеналя), карбонильных производных белков, а также снижало количество P-gp, при этом уровень Nrf2 оставался повышенным, что, скорее всего, связано с локализацией изучаемых белков. P-gp находится преимущественно в цитоплазматической мембране, подверженной воздействию H_2O_2 в первую очередь, а Nrf2 – в цитоплазме и ядре [37], более защищенных от воздействия прооксиданта в инкубационной среде.

Снижение количества P-gp и повреждение билипидной мембраны в условиях окислительного стресса (концентрация H_2O_2 50 мкМ) приводило к повышению транспорта субстрата белка-транспортера фексофенадина через цитоплазматическую мембрану как из базолатеральной камеры в апикальную, так и наоборот – из апикальной в базолатеральную. Причем значение коэффициента кажущейся проницаемости Papp *b-a* соответствовало коэффициенту кажущейся проницаемости Papp *a-b*. Биохимические изменения при воздействии H_2O_2 в концентрациях 50 мкМ сопровождались существенным по-

вышением гибели клеток по результатам МТТ-теста.

Полученные результаты могут иметь важное практические значение. Например, считается, что P-gp в гематоэнцефалическом барьере является одним из ключевых факторов, ограничивающих проникновение лекарственных веществ-субстратов в головной мозг, снижая тем самым эффективность терапии церебральных заболеваний (острого нарушения мозгового кровообращения, эпилепсии), а его ингибирование рассматривается в качестве терапевтической мишени при лечении данных патологий [38, 39].

В нашем исследовании показано, что развитие выраженного окислительного стресса (которое наблюдается и при данных неврологических заболеваниях) приводит к повреждению билипидных мембран и P-gp, что сопровождается повышением проницаемости цитоплазматических мембран. То есть в условиях патологии защитная роль P-gp сохраняется только при компенсированном окислительном стрессе, что говорит в пользу того, что данный белок-транспортер с большой вероятностью не стоит рассматривать в качестве перспективной мишени для терапевтического воздействия.

Таким образом, увеличение количества Nrf2 при окислительном стрессе стимулирует повышение содержания P-gp, что сдерживает растущую проницаемость клеточной мембраны. Усиление окислительного стресса вызывает повреждение мембран и белка-транспортера P-gp, что приводит к значительному повышению проницаемости цитоплазматической мембраны в обоих направлениях. Таким образом, транспортная и защитная роль P-gp, заключающаяся в ограничении проницаемости клеточной мембраны, зависит от выраженности окислительного стресса и реализуется только при незначительных повреждениях мембран.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-1856.2020.7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Davidson, A. L. (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**, 317-364, doi: 10.1128/MMBR.00031-07.
2. Vasiliou, V., Vasiliou, K., and Nebert, D. W. (2009) Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family, *Hum. Genomics*, **3**, 281-290, doi: 10.1186/1479-7364-3-3-281.
3. Licht, A., and Schneider, E. (2011) ATP binding cassette systems: Structures, mechanisms, and functions, *Cent. Eur. J. Biol.*, **6**, 785-801, doi: 10.2478/s11535-011-0054-4.
4. Esser, L., Zhou, F., Pluchino, K. M., Shiloach, J., Ma, J., et al. (2017) Structures of the multidrug transporter P-glycoprotein reveal asymmetric ATP binding and the mechanism of polyspecificity, *J. Biol. Chem.*, **292**, 446-461, doi: 10.1074/jbc.M116.755884.
5. Sharom, F. J. (2011) The P-glycoprotein multidrug transporter, *Essays Biochem.*, **50**, 161-178, doi: 10.1042/bse0500161.
6. Якушева Е. Н., Титов Д. С. (2018) Структура и функционирование белка множественной лекарственной устойчивости 1, *Биохимия*, **8**, 1148-1172, doi: 10.1134/S0320972518080043.
7. Кукес В. Г., Грачев С. В., Сычев Д. А., Раменская Г. В. (2008) Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей?, *Гэотар-Медиа*, Москва, 304 с.
8. Juliano, R. L., and Ling, V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, *Biochem. Biophis. Acta*, **455**, 155-162, doi: 10.1016/0005-2736(76)90160-7.
9. Pokharel, D., Roseblade, A., Oenarto, V., Lu, J. F., and Bebawy, M. (2017) Proteins regulating the intercellular transfer and function of P-glycoprotein in multidrug-resistant cancer, *Ecancermedicalscience*, **11**, e768, doi: 10.3332/ecancer.2017.768.
10. Borst, P., and Schinkel, A. H. (2013) P-glycoprotein ABCB1: a major player in drug handling by mammals, *J. Clin. Invest.*, **23**, 4131-4133, doi: 10.1172/JCI70430.
11. Yano, K., Tomono, T., and Ogihara, T. (2018) Advances in studies of P-glycoprotein and its expression regulators, *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 11-19, doi: 10.1248/bpb.b17-00725.
12. Van der Paal, J., Neyts, E. C., Verlackt, C. C. W., and Bogaerts, A. (2016) Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress, *Chem. Sci.*, **7**, 489-498, doi: 10.1039/C5SC02311D.
13. Raghunath, A., Sundarraj, K., Nagarajan, R., Arfuso, F., Bian, J., Kumar, A. P., Sethi, G., and Perumala, E. (2018) Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications, *Redox. Biol.*, **17**, 297-314, doi: 10.1016/j.redox.2018.05.002.
14. Wu, B., Li, H. X., Lian, J., Guo, Y. J., Tang, Y. H., Chang, Z. J., Hu, L. F., Zhao, G. J., Hong, G. L., and Lu, Z. Q. (2019) Nrf2 overexpression protects against paraquat induced A549 cell injury primarily by upregulating P glycoprotein and reducing intracellular paraquat accumulation,

Exp. Ther. Med., **17**, 1240-1247, doi: 10.3892/etm.2018.7044.

15. Якушева Е. Н., Щулькин А. В., Черных И. В., Попова Н. М., Котлярова А. А., Слепнев А. А. (2019) Метод анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-Р *in vitro*, *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, **17**, 71-78, doi: 10.7816/RCF17171-78.
16. Tolosa, L., Donato, M. T., and Gómez-Lechón, M. J. (2015) General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay, *Methods Mol. Biol.*, **1250**, 333-348, doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_26.
17. Tinnikov, A. A., and Samuels, H. H. (2013) A novel cell lysis approach reveals that caspase-2 rapidly translocates from the nucleus to the cytoplasm in response to apoptotic stimuli, *PLoS One*, **8**, e61085, doi: 10.1371/journal.pone.0061085.
18. Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Dorsselear, A. V., and Branlant, G. (2000) A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **275**, 35908-35913, doi: 10.1074/jbc.M006137200.
19. Ellman, L. G. (1959) Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77, doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.
20. Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J. C., Chaudière, J. (1998) Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation, *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 1176-1183, doi: 10.1021/tx9701790.
21. Weber, D., Davies, M. J., and Grunea, T. (2015) Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: focus on sample preparation and derivatization conditions, *Redox Biol.*, **5**, 367-380, doi: 10.1016/j.redox.2015.06.005.
22. Petri, N., Tannergren, C., Rungstad, D., and Lennernäs, H. (2004) Transport characteristics of fexofenadine in the Caco-2 cell model, *Pharmac. Res.*, **21**, 1398-1404, doi: 10.1023/B:PHAM.0000036913.90332.b1.
23. Elsby, R., Surry, D. D., Smith, V. N., and Gray, A. J. (2008) Validation and application of Caco-2 assays for the in vitro evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions, *Xenobiotica*, **38**, 1140-1164, doi: 10.1080/00498250802050880.
24. Ерохина П. Д., Абаленихина Ю. В., Щулькин А. В., Черных И. В., Попова Н. М., Слепнев А. А., Якушева Е. Н. (2020) Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-Р *in vitro*, *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*, **28**, 135-142, doi: 10.23888/PAVLOVJ2020282135-142.
25. Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L. A., and Seliger, B. (2015) Hydrogen peroxide – production, fate and role in redox signaling of tumor cells, *Cell Commun. Signal.*, **13**, e39, doi: 10.1186/s12964-015-0118-6.
26. Thakkar, N., Slizgi, J. R., and Brouwer, K. L. R. (2017) Effect of liver disease on hepatic transporter expression and function, *J. Pharm Sci.*, **106,** 2282-2294, doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.053.
27. Grewal, G. K., Kukal, S., Kanojia, N., Saso, L., Kukreti, Sh., and Kukreti, R. (2017) Effect of oxidative stress on ABC transporters: contribution to epilepsy pharmacoresistance, *Molecules*, **22**, e365, doi: 10.3390/molecules22030365.
28. Aryal, M., Fischer, K., Gentile, C., Gitto, S., Zhang, Y.-Z., and McDannold, N. (2017) Effects on P-glycoprotein expression after blood-brain barrier disruption using focused ultrasound and microbubbles, *PLoS One*, **3**, e0166061, doi: 10.1371/journal.pone.0166061.
29. Rodrigues, O., Reshetnyak, G., Grondin, A., Saijo ,Y., Leonhardt, N., Maurel Ch., and Verdoucq, L. (2017) Aquaporins facilitate hydrogen peroxide entry into guard cells to mediate ABA- and pathogen-triggered stomatal closure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 9200-9205, doi: 10.1073/pnas.1704754114.
30. Sies, H. (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress, *Redox Biol.*, **11**, 613-619, doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035.
31. Smirnoff, N., and Arnaud, D. (2019) Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants, *New Phytol.*, **2**, 1197-1214, doi: 10.1111/nph.15488.
32. Vogelsang, L., and Dietz, K.-J. (2020) Regulatory thiol oxidation in chloroplast metabolism, oxidative stress response and environmental signaling in plants, *Biochem. J.*, **477**, 1865-1878, doi:10.1042/BCJ20190124.
33. Poole, L.B. (2015) The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry, *Free Radic. Biol. Med.*, **1**, 148-157, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013.
34. Kang, K. A., and Hyun, J. W. (2017) Oxidative stress, Nrf2, and epigenetic modification contribute to anticancer drug resistance, *Toxicol. Res.*, **33**, 1-5, doi: 10.5487/TR.2017.33.1.001.
35. Wen, Zh., Liu, W., Li, X., Chen, W., Liu, J., Wen, Zh., and Liu, Zh. (2019) A protective role of the NRF2-Keap1 pathway in maintaining intestinal barrier function, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, e1759149, doi: 10.1155/2019/1759149.
36. Itri, R., Junqueira, H. C., Mertins, O., and Baptista, M. S. (2014) Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids, *Biophys. Rev.*, **6**, 47-61, doi: 10.1007/s12551-013-0128-9.
37. Yoon, D. S., Choi, Y., and Lee, J. W. (2016) Cellular localization of NRF2 determines the self-renewal and osteogenic differentiation potential of human MSCs via the P53–SIRT1 axis, *Cell Death Dis.*, **7**, e2093, doi: 10.1038/cddis.2016.3.
38. Fromm, M. F. (2004) Importance of P-glycoprotein at blood–tissue barriers, *Trends Pharmacol. Sci.*, 25, 423-429, doi: 10.1016/j.tips.2004.06.002.
39. Wang, G.-X., Wang, D.-W., Liu, Y., and Ma, Y.-H. (2016) Intractable epilepsy and the P-glycoprotein hypothesis, *Int. J. Neurosci.*, **126**, 385-392, doi: 10.3109/00207454.2015.1038710.

P-GLYCOPROTEIN ROLE IN LIMITATION OF PERMEABILITY OF CELL MEMBRANES DURING OXIDATIVE STRESS*

A. V. Shchulkin, Yu. V. Abalenikhina, I. V. Chernykh, P. D. Erokhina, and E. N. Yakusheva**

Ryazan State Medical University, 390026 Ryazan, Russia; E-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

P-Glycoprotein (P-gp) is one of the most clinically significant representatives of the ABC transporter superfamily due to its participation in the transport of biotic components and xenobiotics across the plasma membrane. It is known that various chemicals, environmental factors, and pathological processes can affect P-gp activity and expression. In this study, we investigated the role of P-gp in limiting the cell membrane permeability during oxidative stress. Human adenocarcinoma colon cells (Caco-2) overexpressing P-gp were cultured for 72 h in the medium containing hydrogen peroxide (0.1-50 μM). The transport of the P-gp substrate fexofenadine was evaluated in a special Transwell system. The amounts of P-gp and Nrf2 transcription factor were analyzed by the enzyme-linked immunosorbent assay. The concentration of SH-groups in proteins and the contents of lipid peroxidation products and protein carbonyl derivatives were determined spectrophotometrically. Hydrogen peroxide at a concentration of 0.1-5 μM did not significantly affect the studied parameters, while incubation with 10 μM H_2O_2 decreased in the level of SH groups in cell lysates and increased in the amount of Nrf2 in the cell lysates. Nrf2, in its turn, mediated an increase in the content and activity of the P-gp transporter, thus limiting the increasing permeability of the cell membrane. Hydrogen peroxide at a concentration of 50 μM promoted oxidative stress, which was manifested as a decrease in the content of SH-groups, increase in the concentration of lipid peroxidation products and protein carbonyl derivatives, and decrease in the P-gp level, which led to a significantly increased permeability of the plasma membrane. These results show that the transport and protective roles of P-gp, in particular, reduction of the cell membrane permeability, are affected by the intensity of oxidative stress and can be manifested only if the extent of membrane damage is insignificant.

Keywords: P-glycoprotein (P-gp), Nrf2, oxidative stress, permeability of biological membranes, hydrogen peroxide cytotoxicity, oxidative damage of lipids and proteins, reduced thiols