

Изучение активности почечных транспортеров органических анионов на модели постишемической реперфузии *in vitro*

В.А. Евтеев, Р.Е. Казаков, А.Б. Прокофьев, И.А. Мазеркина, Н.Д. Бунятян
ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России,
г. Москва, Россия

Аннотация

Цель работы заключается в изучении функциональных характеристик SLC-транспортеров органических анионов: OAT1 и OAT3 в норме и условиях модельной постишемической реперфузии.

Материалы и методы. В качестве модели для исследования использовалась клеточная линия HEK293. Условия ишемии создавались по ранее описанной методике. Активность транспортеров оценивалась по захвату маркерного субстрата – флуоресцеина. Концентрация флуоресцеина измерялась с помощью планшетного флуориметра. Нормализация результатов производилась по количеству общего белка.

Результаты. В условиях ишемии активность транспортеров органических анионов уменьшалась по сравнению с нормой. Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что в условиях постишемической реперфузии, содержание дикарбоновых кислот в клетке находится на низком уровне, что в свою очередь может приводить к снижению активности транспортеров.

Ключевые слова: транспортеры, анионы, ишемия.

Для цитирования: Евтеев В.А., Казаков Р.Е., Прокофьев А.Б. и др. Изучение активности почечных транспортеров органических анионов на модели постишемической реперфузии *in vitro*. Сеченовский вестник. 2018; 4 (34): 25–27. DOI: 10.26442/22187332.2018.4.25-27

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ:

Евтеев Владимир Александрович, мл. науч. сотр. отдела персонализированной медицины и клинической фармакогенетики Центра клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России

Адрес: 109240, Россия, Москва, ул. Николаямская, д. 16/2, с. 3

Тел.: +7 (906) 771-27-16

E-mail: pharmchemist@gmail.com

Статья поступила в редакцию: 20.11.2018

Статья принята к печати: 03.12.2018

Activity of renal organic anion transporters in a model of ischemia and reperfusion injury *in vitro*

Vladimir A. Evteev, Ruslan E. Kazakov, Aleksey B. Prokof'ev, Irina A. Mazerkina,
Natal'ya D. Bunyatyan

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russia

Abstract

The aim of the work is to study the functional characteristics of SLC transporters of organic anions: OAT1 and OAT3 in normal conditions and in model ischemia/reperfusion injury.

Materials and methods. The HEK293 cell line was used as a model for the study. Conditions of ischemia/reperfusion injury were created by the previously described method. The activity of the transporters was assessed by the capture of the marker substrate – fluorescein. The concentration of fluorescein was measured using a plate fluorimeter. The results were normalized by the amount of total protein.

Results. In condition of ischemia/reperfusion injury, the activity of organic anion transporters decreased in comparison with the norm. The data obtained allow us to conclude that in conditions of ischemia/reperfusion injury, the concentration of dicarboxylic acids in the cell is low, which in turn can lead to a decrease activity of transporters.

Key words: transporters, anions, ischemia.

For citation: Evteev V.A., Kazakov R.E., Prokof'ev A.B. et al. Activity of renal organic anion transporters in a model of ischemia and reperfusion injury in vitro. *Sechenov Medical Journal*. 2018; 4 (34): 25–27. DOI: 10.26442/22187332.2018.4.25-27

CONTACT INFORMATION:

Vladimir A. Evteev, junior researcher, the Department of Personalized Medicine and Clinical Pharmacogenetics, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Address: 16/2, bld. 3, Nikoloyamskaya str., Moscow, 109240, Russia

Tel.: +7 (906) 771-27-16

E-mail: pharmchemist@gmail.com

The article received: 20.11.2018

The article approved for publication: 03.12.2018

ВВЕДЕНИЕ

Система транспортеров органических анионов (OAT) играет важную роль в выведении широкого спектра эндогенных соединений и ксенобиотиков. Наибольшую клиническую значимость представляют изоформы OAT1 и OAT3. OAT располагаются на базолатеральной мембране эпителия проксимальных почечных канальцев [1]. OAT1 и OAT3 осуществляют захват органических анионов внутрь клеток из крови через базальную мембрану в обмен на анионы дикарбоновых кислот [2]. Кроме того, повышенная активность OAT служит одной из причин накопления ксенобиотиков в клетках проксимальных канальцев и связанной с этим нефротоксичности [3]. В связи с этим оценка уровня активности OAT может служить одним из критериев рациональной фармакотерапии препаратами, являющимися субстратами этих транспортеров.

Цель исследования – оценить влияние постишемической реперфузии на активность транспортеров органических анионов на модели клеточной линии HEK293.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Генетический паспорт клеточной линии HEK293

Культура клеток HEK293 была любезно предоставлена коллегами из НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина». Для подтверждения генетической чистоты был произведен анализ STR-локусов. Экстракция ДНК проводилась с использованием реагента для ПЦР-совместимого лизиса COrDIS Sprint (ООО «ГОРДИЗ»). Для полученных генотипов проводился поиск по референсной базе клеточных линий ATCC. По результатам STR-профилирования совпадение используемой клеточной линии с референсной составило 100%.

Культивирование клеток

Клетки культивировали в 24 луночных планшетах с мембранными вставками диаметром пор 0,4 мкм («Costar», США) на модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM; «Gibco», США), содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят

(«HyClone», США), 50 ед/мл гентамицина («ПанЭко», Россия) и 0,1 мг/мл пирувата натрия («Santa Cruz», США) при 37°C, 5% CO₂ и относительной влажности 80–85%. В экспериментах использовали культуры в логарифмической стадии.

Модель постишемической реперфузии

Проводилась согласно ранее описанной методике [4]. К контрольным клеткам добавляли бикарбонат-HEPES буферный раствор Рингера (NaHCO₃ 24 mM, Na₂HPO₄ 0,8 mM, NaH₂PO₄ 0,2 mM, NaCl 86,5 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,2 mM, MgCl₂ 0,8 mM, HEPES 20 mM) и доводили до pH 7,4 с помощью 0,5 н NaOH. Содержание глюкозы в буфере – 5 mM. Клетки выдерживали при 37°C с нормальным парциальным давлением кислорода. Модельная ишемия была получена при добавлении к клеткам бикарбонат-MES буферного раствора Рингера с pH 6,6 (NaHCO₃ 4,5 mM, Na₂HPO₄ 0,8 mM, NaH₂PO₄ 0,2 mM, NaCl 106,0 mM, KCl 5,4 mM, CaCl₂ 1,2 mM, MgCl₂ 0,8 mM, MES (морфолиноэтансульфоновая кислота) 20 mM; Регулировка pH производилась с помощью с 0,5 н раствора NaOH. В буфер не добав-

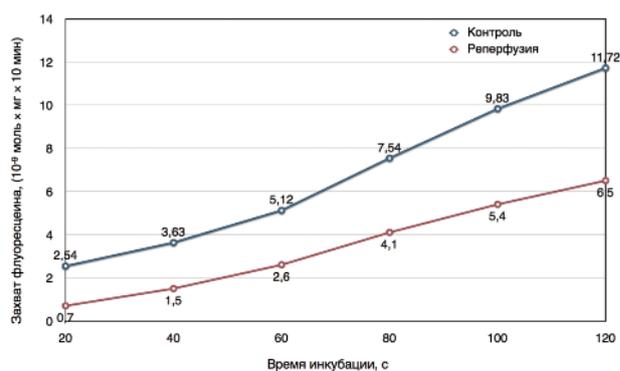


РИС. Базолатеральный захват флуоресцеина клетками HEK293 в норме и на модели постишемической реперфузии. Захват флуоресцеина выражен в его количестве вещества, умноженном на массу общего клеточного белка (в мкг) и на время инкубации (10 мин).

FIG. Basolateral uptake of fluorescein in normal HEK293 cells and after model of ischemia and reperfusion. Fluorescein uptake is expressed as pmol per mg cell protein and the time of incubation (10 min).

ляли глюкозу. Содержание кислорода – менее 1%. Объем буфера для апикального и базолатерального отделов составил 0,2 и 0,5 мл соответственно (чтобы избежать разности гидростатических давлений). Перед исследованием транспорта клетки промывались ледяным PBS-буфером 2–3 раза (рН 7,4). Время инкубации как с контрольным, так и с ишемическим буфером – 2 ч. После этого клетки переводили на обычный режим культивирования.

Транспорт флуоресцеина

Флуоресцеин в конечной концентрации 1×10^{-5} М добавлялся в базолатеральный отдел на следующие промежутки времени: 20, 40, 60, 80, 100, 120 с. После этого клетки промывались 3–4 раза ледяным PBS-буфером до тех пор пока флуоресцеин не определялся в промываемом буфере.

Определение концентрации флуоресцеина

Клетки лизировали в 1 мл 0,1% Triton-X100 и флуоресценцию рассчитывали планшетном ридере «Chameleon V» («Hidex», Финляндия). Производилась коррективная на внеклеточное связывание и неспецифическую адгезию к клеткам путем вычита-

ния количества флуоресцеина на клетки при 4°C. Нормирование производили по количеству белка, измеренного по Брэтфорду.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Был изучен базолатеральный захват флуоресцеина в клеточной линии НЕК293 в норме и на модели постишемической реперфузии (см. рис.).

Как видно из графика, захват флуоресцеина клетками НЕК293 в условиях постишемической реперфузии снижается по сравнению с нормой.

ВЫВОДЫ

Понижение активности транспортеров органических анионов на модели постишемической реперфузии, по-видимому, связано с низкой активностью цикла трикарбоновых кислот, являющегося поставщиком трикарбоновых кислот, необходимых для функционирования транспортеров.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare that there is not conflict of interests.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Nigam SK, Bush KT, Martovetsky G et al. The Organic Anion Transporter (OAT) Family: A Systems Biology Perspective. *Physiol Rev* 2015; 95 (1): 83–123.
2. Forrest LR, Kramer R, Ziegler C. The structural basis of secondary active transport mechanisms. *Biochim Biophys Acta-Bioenerg* 2011; 1807 (2): 167–88.
3. Hagos Y, Natascha A. Wolff. Assessment of the Role of Renal Organic Anion Transporters in Drug-Induced Nephrotoxicity. *Toxins* 2010; 2: 2055–82.
4. Cihlar T, Ho ES. Fluorescence-based assay for the interaction of small molecules with the human renal organic anion transporter 1. *Anal Biochem* 2000; 283 (1): 49–55.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Евтеев Владимир Александрович, мл. науч. сотр. отдела персонализированной медицины и клинической фармакогенетики Центра клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России

Казаков Руслан Евгеньевич, канд. биол. наук, ст. науч. сотр., начальник отдела персонализированной медицины и клинической фармакогенетики Центра клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России

Прокофьев Алексей Борисович, д-р мед. наук, директор Центра клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России

Мазеркина Ирина Анатольевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. отдела персонализированной медицины и клинической фармакогенетики Центра клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России

Бунятян Наталья Дмитриевна, д-р фарм. наук, профессор, гл. науч. сотр. Центра клинической фармакологии ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России

Vladimir A. Evteev, junior researcher, the Department of personalized medicine and clinical pharmacogenetics, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Ruslan E. Kazakov, Ph.D., Senior Researcher, Head of the Department of personalized medicine and clinical pharmacogenetics, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Aleksey B. Prokof'ev, Doctor of Medical Sciences, Director of the Clinical Pharmacology Center, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Irina A. Mazerkina, PhD, Senior Researcher, the Department of personalized medicine and clinical pharmacogenetics, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products

Natal'ya D. Bunyatyan, Doctor of Pharmacy, Prof., Chief Researcher, Center for Clinical Pharmacology, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products