

ИНГИБИТОРЫ ЭПОКСИГЕНАЗ ПОДАВЛЯЮТ СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ

© 2018 г. З. И. Крутецкая*, А. В. Мельницкая, В. Г. Антонов,
академик РАН А. Д. Ноздрачев

Поступило 04.12.2017 г.

С помощью метода фиксации потенциала в эпителии кожи лягушки исследовали участие эпоксигеназ в регуляции иммуномодулятором глутоксимом мембранных транспорта ионов Na^+ . Впервые показали, что обработка кожи лягушки ингибиторами эпоксигеназ – эконазолом или проадифеном – практически полностью подавляет стимулирующее влияние глутоксима на транспорт Na^+ . Полученные результаты свидетельствуют об участии ферментов и/или продуктов эпоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты в регуляции глутоксимом транспорта Na^+ в коже лягушки.

DOI:

Кожа амфибий – классический модельный объект для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембранны. Транспорт Na^+ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, работа которой обеспечивает создание и поддержание электролитического и водного гомеостаза. Белковые компоненты этой системы могут являться мишенью для окислительного стресса [1, 2]. Ранее [3] мы обнаружили, что транспорт Na^+ в клетках эпителия кожи лягушки модулируется окисляющими и восстановливающими агентами. В цитируемой работе мы впервые показали, что окисленный глутатион (GSSG) и препарат глутоксим® (Г – динатриевая соль GSSG с нанодобавкой *d*-металла, “ФАРМА–ВАМ”, Россия), приложенные к базолатеральной поверхности кожи лягушки, имитируют действие инсулина и стимулируют трансэпителиальный транспорт Na^+ .

В реабсорбирующих эпителиях арахидоновая кислота (АК) и её производные (эйкозаноиды) участвуют в регуляции транспорта ионов и воды [4]. Выделяют три основных пути метаболизма АК: циклооксигеназный, липоксигеназный и эпоксигеназный (цитохром Р-450-зависимый) [5]. Ранее нами было показано, что ингибиторы циклооксигеназ [6] и липоксигеназ [7] ослабляют стимулирующее действие Г на транспорт Na^+ в коже лягушки. В то же время известно, что эпоксигеназы содержат многочисленные консервативные остатки цистеина и могут являться мишенью для окисляющих и восстановливающих агентов [8]. В связи с этим

представлялось целесообразным исследовать роль эпоксигеназ в регуляции Г транспорта Na^+ в эпителии кожи лягушки, чему и посвящено настоящее сообщение.

В экспериментах использовали эффективные блокаторы эпоксигеназ – антимикотические агенты имидазольной природы эконазол и проадифен (SKF525A). Известно, что в микромолярной концентрации эконазол и проадифен блокируют цитохром Р-450-зависимые оксигеназы [9].

Опыты проводили на самцах лягушки *Rana temporaria* в период с ноября по март. Кожу с брюшной лягушки срезали и помещали в камеру Уссинга (“World Precision Instruments, Inc.”, Германия) с диаметром внутреннего отверстия 12 мм. Опыты проводили при комнатной температуре (22–23 °C). Для регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ) кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала [3]. Из ВАХ определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания I_{SC} ($I_{\text{SC}} = I_{\text{T}}$ при $V_{\text{T}} = 0$, где I_{T} – трансэпителиальный ток), потенциал открытой цепи V_{OC} ($V_{\text{OC}} = V_{\text{T}}$ при $I_{\text{T}} = 0$, где V_{T} – трансэпителиальный потенциал) и трансэпителиальную проводимость g_{T} . Транспорт ионов Na^+ оценивали по величине амилоридчувствительного I_{SC} . В экспериментах использовали реактивы фирмы “Sigma-Aldrich” (США). Проадифен и эконазол добавляли за 30–40 мин до введения в раствор Г. Статистический анализ проводили с применением критерия *t* Стьюдента.

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле составили (здесь и далее по тексту $M \pm m$, n (число опытов) = 10) : $I_{\text{SC}} = 29,79 \pm$

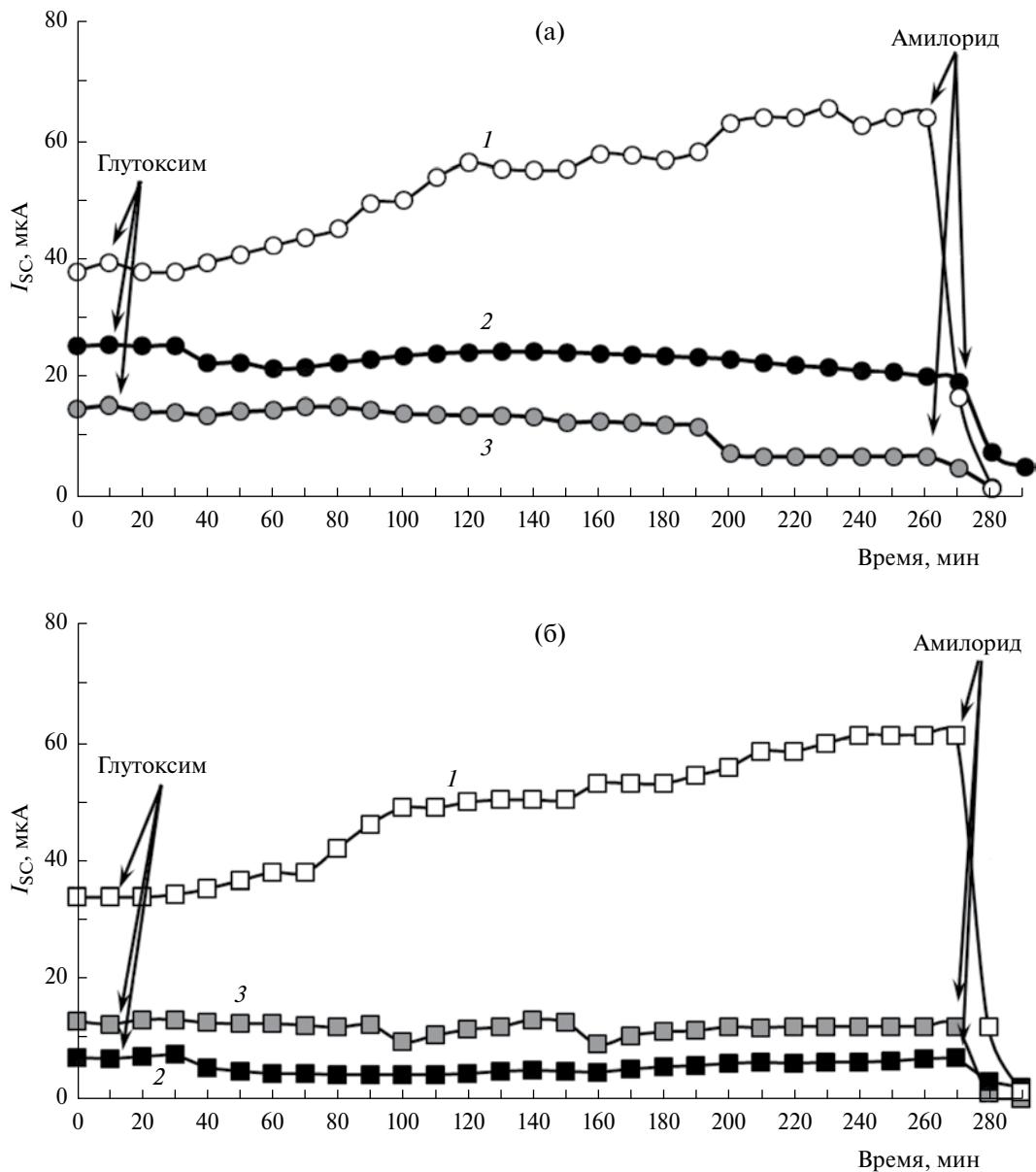


Рис. 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{SC} через кожу лягушки в ответ на действие глутоксима (Г) и блокаторов эпоксигеназ, приложенных со стороны апикальной (а) или базолатеральной (б) поверхности кожи. (1) – I_{SC} после добавления 100 мкг/мл Г к базолатеральной поверхности интактной кожи; (2) – I_{SC} после добавления Г к коже лягушки, предварительно обработанной в течение 30 мин 100 мкМ проадифена; (3) – I_{SC} после добавления Г к коже лягушки, предварительно обработанной в течение 30 мин 50 мкМ эконазола. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ). На рисунке представлены результаты типичных экспериментов.

$\pm 4,36$ мкА, $V_{OC} = -64,13 \pm 10,08$ мВ, $g_T = 0,49 \pm 0,09$ мСм. Мы установили, что Г (100 мкг/мл), приложенный к базолатеральной поверхности кожи лягушки подобно инсулину стимулирует транспорт Na^+ (рис. 1, кривая 1). После приложения Г, I_{SC} возрос на $38,42 \pm 7,45\%$; V_{OC} – на $43,24 \pm 7,08\%$; величина g_T не изменилась.

Мы обнаружили, что предварительная обработка апикальной или базолатеральной поверхности

кожи лягушки блокаторами эпоксигеназ эконазолом (50 мкМ) или проадифеном (100 мкМ) в течение 30 мин перед добавлением к базолатеральной поверхности кожи 100 мкг/мл Г практически полностью подавляла стимулирующее влияние Г на транспорт Na^+ (табл. 1 и рис. 1). Таким образом, в настоящей работе впервые на эпителии кожи лягушки показано, что два структурно различных ингибитора эпоксигеназ подавляют влияние

Таблица 1. Влияние глутоксима (Г) на электрические характеристики кожи лягушки

Блокатор, концентрация	Электрические характеристики	Изменения электрических характеристик после приложения Г к коже лягушки, предварительно обработанной со стороны апикальной поверхности блокаторами эпоксигеназ, %	Изменения электрических характеристик после приложения Г к коже лягушки, предварительно обработанной со стороны базолатеральной поверхности блокаторами эпоксигеназ, %
Проадифен, 100 мкМ	I_{SC}	$\downarrow 10,56 \pm 2,65$	$\downarrow 26,79 \pm 9,01$
	V_{OC}	$\downarrow 9,55 \pm 1,34$	$\downarrow 38,61 \pm 12,67$
	g_T	$\downarrow 8,62 \pm 1,07$	$\uparrow 34,95 \pm 10,91$
Эконазол, 50 мкМ	I_{SC}	$\downarrow 25,05 \pm 8,32$	$\downarrow 8,09 \pm 1,01$
	V_{OC}	$\downarrow 31,23 \pm 11,45$	$\downarrow 22,05 \pm 7,54$
	g_T	$\uparrow 6,28 \pm 0,12$	$\downarrow 21,43 \pm 8,02$

Стрелками обозначено увеличение (\uparrow) или уменьшение (\downarrow) значений электрических характеристик кожи после приложения Г по сравнению с контролем. $M \pm m, n = 10$.

Г на транспорт Na^+ , что свидетельствует об участии ферментов и/или продуктов эпоксигеназного пути окисления АК во влиянии Г на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Известно, что продукты эпоксигеназного пути окисления АК (преимущественно эпоксизайкозатриеновые кислоты) участвуют в регуляции транспортных функций осморегулирующих эпителиев и патогенезе гипертензии [10–12]. В последнее время появились данные об участии эпоксигеназ и их продуктов в сигнальных каскадах инсулинового рецептора [13, 14]. Так, обнаружено, что гиперэкспрессия и увеличение активности эпоксигеназ CYP2J2 и CYP2J3 приводит к потенцированию передачи сигнала от рецептора инсулина и субстрата инсулинового рецептора IRS-1 в клетках разных типов (клетки печени, мышц, сердца и почек) [13, 14]. Полученные нами ранее результаты [3] и данные литературы [15] позволяют предположить, что регуляторное влияние дисульфидсодержащих агентов (в том числе GSSG и Г) на транспорт Na^+ обусловлено их способностью взаимодействовать с богатыми цистеином доменами рецептора инсулина в базолатеральной мембране эпителиальных клеток, что вызывает трансактивацию рецептора и запуск сигнальных каскадов, приводящих к стимуляции мембранныго транспорта Na^+ в коже лягушки. В связи с этим можно предположить, что подавление ингибиторами эпоксигеназ стимулирующего влияния Г на транспорт Na^+ в коже лягушки также может быть обусловлено подавлением и/или ослаблением передачи сигнала от инсулинового рецептора.

Известно, что многие Na^+ -транспортирующие белки содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишениями для внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей [1, 2]. В наших экспериментах добавление в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, блокатора амилоридчувствительных эпителиальных Na^+ -каналов (ENaC) амилорида (20 мкМ), вызывало полное подавление транспорта Na^+ (рис. 1). Это свидетельствует о том, что влияние Г на транспорт Na^+ обусловлено в основном модуляцией активности ENaC.

Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе и ранее [6, 7], свидетельствуют о том, что в сигнальный каскад, запускаемый Г в коже лягушки и приводящий к стимуляции транспорта Na^+ , вовлечены все три пути окисления АК – циклооксигеназный, липоксигеназный и эпоксигеназный. Кроме того, полученные данные об ингибировании эконазолом и проадифеном стимулирующего влияния Г на транспорт Na^+ позволяют сделать вывод, что совместное клиническое применение иммуномодулятора Г и антимикотических агентов, ингибирующих эпоксигеназы, нежелательно, так как это может привести к ослаблению терапевтического эффекта Г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Firsov D., Robert-Nicoud M., Gruender S., et al. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 2743–2749.
2. Boldyrev A.A., Bulygina E.R. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1997. V. 834. P. 666–668.

3. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Мельницкая А.В. и др. // ДАН. 2008. Т. 421. № 5. С. 709–712.
4. Els W.J., Helman S.H. // J. Membr. Biol. 1997. V. 155. P. 75–87.
5. Needleman P., Turk J., Jacksick B.A., et al. // Annu. Rev. Biochem. 1986. V. 55. P. 69–102.
6. Крутецкая З.И., Мельницкая А.В., Антонов В.Г. и др. // ДАН. 2013. Т. 451. № 2. С. 236–238.
7. Крутецкая З.И., Мельницкая А.В., Антонов В.Г. и др. // ДАН. 2017. Т. 474. № 3. С. 374–377.
8. Capdevila J., Wang W. // Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 2013. V. 22. P. 163–169.
9. Capdevila J., Gil L., Orellana M., et al. // Arch. Biochem. Biophys. 1988. V. 261. P. 257–263.
10. Wei Y., Lin D. – H., Kemp R. et al. // J. Gen. Physiol. 2004. V. 124. P. 719–727.
11. Pavlov T.S., Ilatovskaya D., Levchenko V., et al. // Amer. J. Physiol. 2011. V. 301. P. F672–F681.
12. Fan F., Roman R.J. // J. Amer. Soc. Nephrol. 2017. V. 28. P. 2845–2855.
13. Xu X., Zhao C.X., Wang L., et al. // Diabetes. 2010. V. 59. P. 997–1005.
14. Ma B., Xiong X., Chen C., et al. // Endocrinol. 2013. V. 154. P. 2843–2856.
15. Василенко К.П., Бурова Е.Б., Антонов В.Г. и др. // Цитология. 2006. Т. 48. № 6. С. 500–507.