

УДК 577.576.8

ИНГИБИТОРЫ КОМПЛЕКСА ARP2/3 И БЕЛКОВ WASP МОДУЛИРУЮТ ВЛИЯНИЕ ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na⁺ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ

© 2016 г. З. И. Крутецкая, А. В. Мельницкая, В. Г. Антонов,
академик РАН А. Д. Ноздрачев

Поступило 19.10.2015 г.

С помощью метода фиксации потенциала исследовали участие белков WASP и комплекса Arp2/3 в действии иммуномодулятора глутоксима на транспорт Na⁺ в коже лягушки. Впервые показано, что преинкубация кожи с ингибитором белка N-WASP – вискостатином – или ингибитором комплекса Arp2/3 – соединением СК-0944666 – приводит к снижению стимулирующего действия глутоксима на транспорт Na⁺. Полученные данные свидетельствуют об участии процессов полимеризации и ветвления актиновых филаментов в действии глутоксима на транспорт Na⁺ в коже лягушки.

DOI: 10.7868/S0869565216090243

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевого пузыря амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев [1], что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов транспорта воды и ионов в клетках почки.

Известно, что ключевые Na⁺-транспортирующие белки, такие как амилоридчувствительные эпителиальные Na⁺-каналы (ENaC), Na⁺/K⁺-АТФазы и Na⁺/H⁺-обменники, являются мишенями для окисляющих и восстанавливающих агентов [2], однако молекулярные механизмы влияния окислителей и восстановителей на компоненты системы трансэпителиального транспорта Na⁺ практически не изучены.

Ранее нами впервые было показано, что транспорт Na⁺ в коже лягушки модулируется такими окислителями, как цистамин, цистин, окисленный глутатион (GSSG) и его синтетический аналог препарат глутоксим® (Г, производство “ФАРМА ВАМ”, Россия) [3]. В цитируемой работе впервые было обнаружено, что GSSG и Г после аппликации к базолатеральной поверхности кожи лягушки имитируют эффект инсулина и стимулируют трансэпителиальный транспорт Na⁺. С использованием фармакологических агентов,

влияющих на структурные элементы и компоненты сигнальных систем в клетках, нами также было впервые показано, что в регуляции Г транспорта Na⁺ в коже лягушки принимают участие тирозинкиназы и фосфатидилинозитолкиназы [4], протеинкиназа С [5], серин/треониновые протеинфосфатазы PP1/PP2, микротрубочки и микрофиламенты [6], продукты циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты [7] и процессы везикулярного транспорта [8].

Известно, что актиновый цитоскелет участвует в модуляции активности многих Na⁺-транспортирующих белков, колокализированных с актиновыми филаментами и актинсвязывающими белками (анкирином и спектрином), а также вовлечен в регуляцию трансэпителиального транспорта Na⁺ некоторыми гормонами [9]. Ключевую роль в процессах формирования микрофиламентов из мономеров G-актина играет комплекс Arp2/3 (Actin-Related Proteins). В состав сайтов нуклеации входят также белки WASP (Wiskott–Aldrich syndrome family proteins, семейство белков синдрома Вискотта–Олдрича), которые активируют комплексы Arp2/3, обеспечивают их взаимодействие с мономерами актина, запускают полимеризацию актина и формирование разветвленных актиновых филаментов [10].

В связи с этим представляло интерес исследовать возможное участие процессов роста и ветвления актиновых филаментов в механизмах действия Г на транспорт Na⁺ в коже лягушки. Это и составило предмет настоящего сообщения.

Эксперименты проводили на самцах лягушки *Rana temporaria* в период с ноября по март. Кожу с брюшка лягушки срезали и помещали в камеру

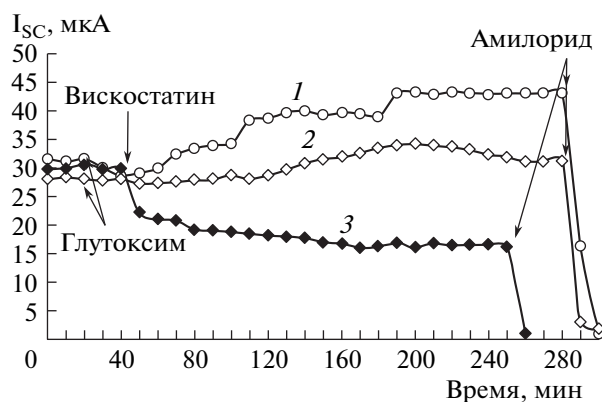


Рис. 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{SC} через кожу лягушки в ответ на действие глутоксима и вискоstatsина. Здесь и на рис. 2: 1 – I_{SC} после аппликации 100 мкг/мл глутоксима на базолатеральную поверхность интактной кожи; 2 – I_{SC} после аппликации глутоксима на кожу лягушки, предварительно обработанную (в течение 30 мин) со стороны апикальной поверхности 10 мкМ вискоstatsина; 3 – I_{SC} после добавления со стороны апикальной поверхности кожи 10 мкМ вискоstatsина. Здесь и в опытах, результаты которых представлены на рис. 2, в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли 20 мкМ амилорид (блокатор ENaC).

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]. Эти ВАХ позволили определить следующие электрические параметры кожи: ток короткого замыкания I_{SC} ($I_{SC} = I_T$ при $V_T = 0$, где I_T – трансэпителиальный ток), потенциал открытой цепи V_{OC} ($V_{OC} = V_T$ при $I_T = 0$, где V_T – трансэпителиальный потенциал) и трансэпителиальную проводимость g_T . Транспорт Na^+ оценивали как амилоридчувствительный I_{SC} . В экспериментах использовали реактивы фирмы “Sigma” (США). Также использовали селективный ингибитор белка N-WASP – вискоstatsин [11] и ингибитор комплекса Agr2/3 – соединение СК-0944666 [12]. Вискоstatsин и СК-0944666 добавляли за 30–40 мин до введения в раствор Г.

Статистический анализ проводили с применением критерия t Стьюдента. Данные представляли в виде $M \pm m$. Достоверными считали различия при $p \leq 0.05$. На рисунках приведены результаты типичных экспериментов.

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляли: $I_{SC} = 30.31 \pm 3.14$ мкА, $V_{OC} = -52.28 \pm 6.25$ мВ, $g_T = 0.57 \pm 0.14$ мСм. Мы обнаружили, что Г (100 мкг/мл), апплицирован-

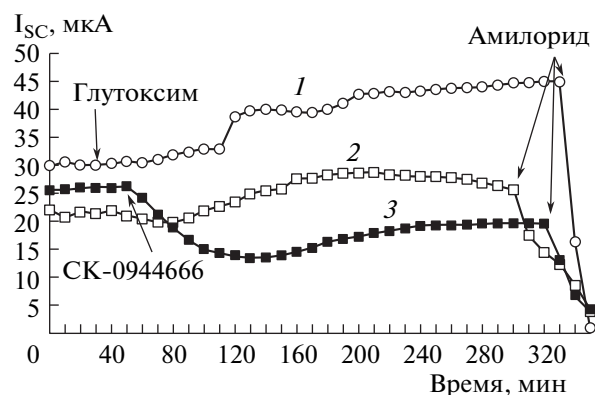


Рис. 2. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{SC} через кожу лягушки в ответ на действие глутоксима и соединения СК-0944666. 2 – I_{SC} после добавления глутоксима к коже лягушки, предварительно обработанной (в течение 30 мин) со стороны апикальной поверхности 100 мкМ СК-0944666; 3 – I_{SC} после добавления со стороны апикальной поверхности кожи 100 мкМ СК-0944666.

ный на базолатеральную поверхность интактной кожи лягушки, подобно инсулину, стимулирует транспорт Na^+ (рис. 1, 2, кривая 1). В среднем (по результатам 10 экспериментов) после аппликации Г I_{SC} возрастает на $31.24 \pm 8.32\%$, V_{OC} – на $38.04 \pm 5.15\%$, величина g_T не меняется.

Также мы установили, что вискоstatsин (рис. 1, кривая 3) и СК-0944666 (рис. 2, кривая 3) подавляют транспорт Na^+ в коже лягушки. Так, обработка апикальной поверхности кожи 10 мкМ вискоstatsина или 100 мкМ СК-0944666 (по данным 10 экспериментов) снижает I_{SC} на 32.34 ± 5.32 или $25.79 \pm 3.5\%$, V_{OC} – на 28.01 ± 5.15 или $21.59 \pm 8.34\%$, а g_T – на 10.77 ± 1.12 или $3.31 \pm 0.91\%$ для вискоstatsина и СК-0944666 соответственно. Также обнаружили, что предварительная обработка кожи вискоstatsином (рис. 1, кривая 2) или СК-0944666 (рис. 2, кривая 2) снижает стимулирующее действие Г на транспорт Na^+ в коже лягушки. В среднем (по данным 10 экспериментов) изменение электрических характеристик кожи лягушки после аппликации 100 мкг/мл Г к базолатеральной поверхности кожи, предварительно обработанной в течение 30 мин со стороны апикальной поверхности 10 мкМ вискоstatsина или 100 мкМ СК-0944666, было следующим: I_{SC} увеличивается на 14.34 ± 3.12 или $18.75 \pm 4.01\%$, V_{OC} – на 16.09 ± 5.11 или $5.98 \pm 0.34\%$, а g_T – на 1.58 ± 0.32 или $13.47 \pm 2.85\%$ для вискоstatsина и СК-0944666 соответственно.

Известно, что многие Na^+ -транспортирующие белки содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенями для внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей [2]. Добавление в раствор, омывающий апикаль-

ную поверхность кожи лягушки блокатора ENaC амилорида (20 мкМ), вызывало полное подавление транспорта Na^+ (рис. 1, 2). Это указывает на то, что эффект Г на транспорт Na^+ обусловлен, в основном, модуляцией активности ENaC.

Таким образом, нами впервые показано, что ингибитор белков WASP – вискостатин и ингибитор комплекса Arp2/3 – соединение СК-0944666 – снижают транспорт Na^+ и подавляют стимулирующее действие Г на транспорт Na^+ в клетках кожи лягушки. Полученные результаты существенно дополняют данные литературы. На эпителиальных клетках разных типов было обнаружено, что в модуляцию активности ENaC вовлечены актинассоциированные белки. Так, на трансфицированных клетках яичников китайского хомячка (СНО) показано, что комплекс Arp2/3 и актинсвязывающий белок кортактин модулируют воротные характеристики ENaC, снижая вероятность открытого состояния канала [13]. Кроме того, коэкспрессия ENaC и белка N-WASP существенно повышает активность ENaC в клетках СНО [14]. В то же время в других типах эпителиальных клеток, таких как свежесыводенные клетки собирательных трубочек почки крысы (клетки CCD), ингибитор белков N-WASP вискостатин не влияет на реабсорбцию Na^+ и активность ENaC [14].

Ранее нами было показано, что транспорт Na^+ в коже лягушки зависит от структурно-функциональной организации актинового и тубулинового компонентов цитоскелета [15]. Также было обнаружено, что любые изменения в структуре микро-трубочек и микрофиламентов приводят к снижению стимулирующего действия Г на транспорт Na^+ [6]. Результаты настоящей работы также свидетельствуют о том, что ингибирование процессов роста и ветвления актиновых филаментов приводит к снижению транспорта Na^+ и подавлению эффекта Г на транспорт Na^+ в коже лягушки.

Таким образом, полученные нами результаты и данные литературы позволяют рассматривать белковый комплекс Arp2/3 и белки WASP в качестве важного звена, вовлеченного в сигнальные каскады, запускаемые глутоксимом в клетках эпителиа кожи лягушки.

Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ № 1.0.127.2010.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Наточин Ю.В.* Основы физиологии почки. Л.: Наука, 1982. 184 с.
2. *Firsov D., Robert-Nicoud M., Gruender S., et al.* // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 2743–2749.
3. *Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Мельницкая А.В. и др.* // ДАН. 2008. Т. 421. № 5. С. 709–712.
4. *Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., et al.* // Cell Tissue Biol. 2010. V. 4. № 3. P. 273–279.
5. *Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. и др.* // Биол. мембраны. 2009. Т. 26. № 4. С. 320–321.
6. *Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., et al.* // Cell Tissue Biol. 2012. V. 6. № 3. P. 248–253.
7. *Крутецкая З.И., Мельницкая А.В., Антонов В.Г. и др.* // ДАН. 2013. Т. 451. № 2. С. 236–238.
8. *Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Бутов С.Н. и др.* // Биофизика. 2014. Т. 59. № 5. С. 883–886.
9. *Els W.J., Chou K.Y.* // J. Physiol. 1993. V. 462. P. 447–464.
10. *Bouma G., Burns S.O., Thrasher A.J.* // Immunobiology. 2009. V. 214. P. 778–790.
11. *Peterson J.R., Bickford L.C., Morgan D., et al.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2004. V. 11. P. 747–755.
12. *Nolen B.J., Tomasevic N., Russell A., et al.* // Nature. 2009. V. 20. P. 1031–1034.
13. *Karpushev A.V., Levchenko V., Ilatovskaya D.V., et al.* // Hypertension. 2011. V. 57. P. 996–1002.
14. *Ilatovskaya D.V., Pavlov T.S., Levchenko V., et al.* // FASEB J. 2011. V. 25. P. 2688–2699.
15. *Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е.* // Цитология. 2006. Т. 48. № 10. С. 817–840.