

УДК 577.576.8

ЛИПОКСИГЕНАЗЫ МОДУЛИРУЮТ ВЛИЯНИЕ ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ

© 2017 г. З. И. Крутецкая*, А. В. Мельнищкая, В. Г. Антонов,
академик РАН А. Д. Ноздрачев

Поступило 21.09.2016 г.

С использованием метода фиксации потенциала исследовали участие липоксигеназ в действии иммуномодулятора глутоксима на транспорт Na^+ в клетках эпителия кожи лягушки. Впервые показано, что преинкубация кожи с ингибиторами липоксигеназ кофеиновой кислотой, байкалейном и нордигидрогуаретиковой кислотой приводит к подавлению стимулирующего действия глутоксима на транспорт Na^+ . Полученные данные свидетельствуют об участии липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты в действии глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки.

DOI: 10.7868/S0869565217150233

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов трансэпителиального транспорта ионов. Транспорт Na^+ в клетках эпителия представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие Na^+ -транспортные белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки. Белковые компоненты этой системы могут являться мишенью для окислительного стресса [1, 2]. Ранее [3] нами было показано, что транспорт Na^+ в эпителиальных клетках кожи лягушки модулируется различными окисляющими агентами. В цитируемой работе впервые было обнаружено, что препарат глутоксим® (Г – динатриевая соль окисленного глутатиона (GSSG) с нанодобавкой d-металла, “ФАРМА–ВАМ”, Россия), приложенный к базолатеральной поверхности кожи лягушки, имитирует действие инсулина и стимулирует трансэпителиальный транспорт Na^+ . Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляторного действия GSSG и Г на транспорт Na^+ , во многом еще не ясны.

Арахидоновая кислота (АК) и её метаболиты выступают в качестве сигнальных молекул, участвующих в процессах внутри- и внеклеточной сигнализации и обладающих широким спектром физиологических и патологических эффектов [4]. Выделяют три основных пути метаболизма АК:

циклооксигеназный, липоксигеназный и эпокси-геназный (цитохром P-450-зависимый) [5]. В эпителии почек и других реабсорбирующих эпителиях АК и ее производные участвуют в регуляции транспорта ионов и воды. Установлено, что многие ионные каналы, в том числе амилоридчувствительные эпителиальные Na^+ -каналы (ENaC), играющие ключевую роль в транспорте Na^+ через реабсорбирующие эпителиальные клетки, являются мишенями как для самой АК, так и для её метаболитов [6]. Ранее нами было показано, что ингибиторы циклооксигеназ [7] и блокатор липоксигеназ широкого спектра действия – нордигидрогуаретиковая кислота (НДГК) [8] – существенно снижают транспорт Na^+ , а также подавляют стимулирующее действие Г на транспорт Na^+ в кожном эпителии лягушки.

В связи с этим представлялось целесообразным более детально исследовать роль липоксигеназного пути окисления АК в регуляции Г транспорта Na^+ в кожном эпителии лягушки, чему и посвящено настоящее сообщение.

В экспериментах использовали блокатор всех известных типов липоксигеназ – НДГК, избирательный блокатор 5-липоксигеназ – кофеиновую (3,4-дигидроксициннамовую) кислоту и селективный блокатор 12/15-липоксигеназ – флавоноид байкалейн [9, 10].

Опыты проводили на самцах лягушки *Rana temporaria* в период с ноября по март. Кожу с брюшка лягушки срезали и помещали в камеру Уссинга (“World Precision Instruments, Inc.”, Германия)

Санкт-Петербургский государственный университет
*E-mail: z.krutetskaya@spbu.ru

с диаметром внутреннего отверстия 12 мм. Опыты проводили при комнатной температуре (22–23 °С). 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} ($I_{SC} = I_T$ 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-Aldrich” (США). Каффеиновую кислоту, НДГК и байкалейн 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 в среднем (по данным 10 экспериментов, $M \pm m$) составили: $I_{SC} = 29,13 \pm 4,05$ мкА, $V_{OC} = -102,14 \pm 9,81$ мВ, $g_T = 0,35 \pm 0,02$ мСм. Мы установили, что Г (100 мкг/мл), приложенный к базолатеральной поверхности кожи лягушки, подобно инсулину стимулирует транспорт Na^+ (рис. 1а, б, кривая 1). В среднем (по результатам 10 экспериментов) после приложения Г, I_{SC} возрос на $35,34 \pm 9,18\%$; V_{OC} – на $40,12 \pm 5,34\%$; величина g_T не изменилась.

Предварительная обработка кожи блокаторами липоксигеназ снижала стимулирующее действие Г на транспорт Na^+ в каждом эпителии лягушки

(табл. 1 и рис. 1а, б). Блокатор 5-липоксигеназ каффеиновая кислота полностью подавляла стимулирующее действие Г на транспорт Na^+ (рис. 1а, б, кривая 4). Модулирующее влияние блокатора 12/15-липоксигеназ байкалейна зависело от места приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи лягушки. Так, преинкубация апикальной поверхности кожи с байкалейном полностью подавляла стимулирующее действие Г на транспорт Na^+ (табл. 1 и рис. 1а, б, кривая 2), тогда как приложение байкалейна со стороны базолатеральной поверхности вызывало снижение, но не подавление стимулирующего действия Г (табл. 1 и рис. 1б, кривая 2). Преинкубация кожи с НДГК существенно снижала стимулирующее действие Г на транспорт Na^+ , причем ингибирующий эффект также был более выражен при приложении НДГК со стороны апикальной поверхности кожи (табл. 1 и рис. 1а, б, кривая 3).

Таким образом, нами впервые обнаружено, что три структурно разных ингибитора липоксигеназ значительно подавляют влияние Г на транспорт Na^+ , что свидетельствует об участии ферментов и/или продуктов липоксигеназного пути окисления АК в действии Г на транспорт Na^+ в клетках эпителия кожи лягушки.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Ранее с использованием НДГК было выявлено участие продуктов липоксигеназного пути окисления АК в модуляции транспорта Na^+ в клетках эпителия трахеи

Таблица 1. Влияние глутоксиима 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 липоксигеназ, %	Изменения электрических характеристик после приложения Г к коже лягушки, предварительно обработанной со стороны базолатеральной поверхности блокаторами липоксигеназ, %
Каффеиновая кислота, 50 мкМ	I_{SC}	↓ 30,26 ± 6,12	↓ 38,11 ± 8,24
	V_{OC}	↓ 15,15 ± 4,08	↓ 27,53 ± 5,01
	g_T	↓ 25,01 ± 4,75	↓ 13,86 ± 3,35
НДГК, 50 мкМ	I_{SC}	↑ 12,34 ± 2,34	↑ 23,28 ± 4,32
	V_{OC}	↑ 14,48 ± 3,01	↑ 25,33 ± 3,24
	g_T	↑ 9,34 ± 1,04	↑ 12,28 ± 2,47
Байкалейн, 50 мкМ	I_{SC}	↓ 38,34 ± 5,13	↑ 9,34 ± 3,13
	V_{OC}	↓ 21,37 ± 5,14	↑ 5,65 ± 1,34
	g_T	↓ 36,35 ± 8,14	↑ 3,08 ± 1,01

Стрелками обозначено увеличение (↑) или уменьшение (↓) значений электрических характеристик кожи при сравнении с контролем. Для каждой серии экспериментов *n* (число измерений) = 10.

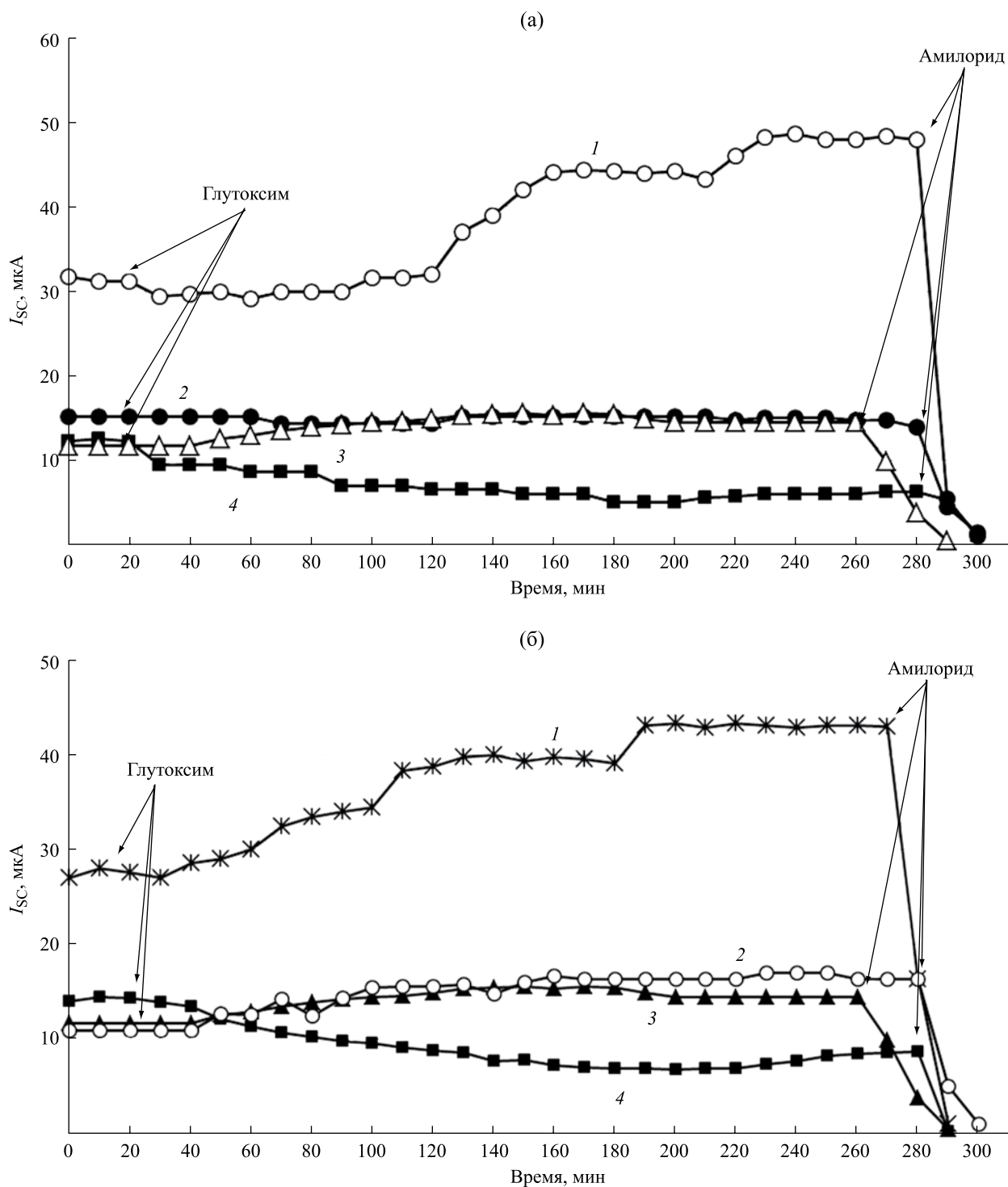


Рис. 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{SC} через кожу лягушки в ответ на действие Г и блокаторов липоксигеназ, приложенных со стороны апикальной (а) или базолатеральной (б) поверхности кожи. (1) – I_{SC} после нанесения 100 мкг/мл Г на базолатеральную поверхность интактной кожи; (2) – I_{SC} после добавления Г к коже лягушки, предварительно обработанной в течение 30 мин 50 мкМ байкалейна; (3) – I_{SC} после добавления Г к коже лягушки, предварительно обработанной в течение 30 мин 50 мкМ НДГК; (4) – I_{SC} после нанесения Г на кожу лягушки, предварительно обработанную в течение 30 мин 50 мкМ кофеиновой кислоты. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ЕNaС амилорид (20 мкМ). На рисунке представлены результаты типичных экспериментов.

кролика [11] и культуре клеток дистальных сегментов почки лягушки *Xenopus laevis* (клетки А6) [12]. Обнаружено также влияние продуктов липоксигеназ в регуляции транспорта Na^+ в разных сегментах нефрона [13]. Так, показано, что метаболиты 5- и 12-липоксигеназных путей окисления АК ингибируют транспорт Na^+ в клетках проксимальных канальцев почки крысы [14] и дистальных канальцев почки мыши [15].

Нами также обнаружены различия в степени ингибирующего влияния блокаторов липоксигеназ на действие Г, наблюдаемые при применении блокаторов липоксигеназ к апикальной или базолатеральной поверхности кожи лягушки. Наиболее вероятно предположить, что подобные различия обусловлены разным белковым и липидным составом сигнальных комплексов, ассоциированных с апикальным и базолатеральным доменами поляризованных эпителиальных клеток. В пользу этого предположения могут свидетельствовать также данные об обнаружении в апикальной мембране клеток А6 сигнального каскада, включающего G_i -белки, фосфолипазу A_2 , липоксигеназы и ENaC , и отсутствующего в базолатеральной мембране этих клеток [12].

Известно, что многие Na^+ -транспортирующие белки содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенями для внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей [1, 2]. Добавление в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, блокатора ENaC амилорида (20 мкМ), вызывало полное подавление транспорта Na^+ (рис. 1а, б). Это указывает на то, что влияние Г на транспорт Na^+ обусловлено в основном модуляцией активности ENaC .

Таким образом, полученные нами результаты и данные литературы позволяют рассматривать ферменты и/или продукты липоксигеназного пути

окисления АК в качестве участников сигнального каскада, запускаемого Г и приводящего к стимуляции транспорта Na^+ в коже лягушки.

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. *Axelrod J.* // Biochem. Soc. Trans. 1990. V. 18. P. 503–507.
5. *Needleman P., Turk J., Jacksick B.A., et al.* // Annu. Rev. Biochem. 1986. V. 55. P. 69–102.
6. *Els W.J., Helman S.H.* // J. Membr. Biol. 1997. V. 155. P. 75–87.
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.* В кн.: Актуальные вопросы биологической физики и химии. Севастополь, 2016. Т. 1. С. 38–40.
9. *Ordway R.W., Singer J.J., Walsh J.V., Jr.* // Trends Neurosci. 1991. V. 14. P. 96–100.
10. *Piomelli D., Greengard P.* // Trends Pharmacol. Sci. 1990. V. 11. P. 367–373.
11. *Egan M.E., Wagner M.H., Zeitlin P.L., et al.* // Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol. V. 7. P. 500–506.
12. *Cantiello H.F., Patenaude C.R., Codina J., et al.* // J. Biol. Chem. 1990. V. 265. P. 21624–21628.
13. *Imig J.D., Khan M.A.* // Comp. Physiol. 2015. V. 15. P. 423–441.
14. *Perico N., Cornejo R.P., Benigni A., et al.* // J. Amer. Soc. Nephrol. 1991. V. 2. P. 57–69.
15. *González-Núñez D., Solé M., Natarajan R., et al.* // Kidney Int. 2005. V. 67. P. 178–186.