

Експериментальна фізіологія та біохімія

УДК 616-01/-099:616-092.4+616.6

Є.А. БУРЛАКА

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця (Київ, Україна)
Каролінський інститут (Стокгольм, Швеція)

Первинні тубулярні пошкодження нирок на моделі гемолітико-уремічного синдрому та роль оуабайну в їх запобіганні

Гемолітико-уремічний синдром (ГУС) — захворювання, що характеризується наявністю тріади симптомокомплексів: гемолітичної анемії, тромбоцитопенії, гострої ниркової недостатності [8]. Шига токсин 2 (Shiga toxin 2), що продукується *Escherichia coli*, є основним фактором пошкоджень при ГУС [2, 11, 12]. ГУС — це одна з найчастіших причин гострої недостатності нирок у дітей та хронічних ускладнень, що вимагають замісної терапії. Окрім високого рівня смертності, зумовленого ГУС, захворювання є частою причиною хронічних ренальних та екстраренальних ускладнень [4].

Набільш виражені тканинні пошкодження при ГУС розвиваються в нирках [8, 9], зокрема в їх кірковій речовині. При цьому найбільш масивним типом пошкодження є апоптоз, головним чином в тубулярному сегменті нефрона [9]. Апоптоз проксимально тубулярних клітин є первинним пошкодженням нирок при ГУС і в подальшому спричинює каскад незворотних хронічних пошкоджень нирок, що призводить до формування у пацієнтів хронічного захворювання нирок (ХЗН).

Пошкодження нирок під впливом *Shiga toxin 2 (Stx2)* зумовлене наявністю специфічних рецепторів, зокрема в тубулярному сегменті нефрону [2, 4, 11, 12]. Реалізація патофізіологічних ефектів *Stx2* відбувається за рахунок його взаємодії зі специфічними глоботріаосилцерамідними рецепторами на поверхні мембрани тропних клітин — гала1-4-гал1-4-глюкозилцерамід (*Gb3*). Саме проксимально тубулярні клітини нирок людини (HRTEC) та проксимально тубулярні клітини нирок гризунів мають високий рівень експресії *Gb3* на поверхні мембран, що зумовлює їх високу чутливість до дії *Stx2* [9].

Ендогенні стероїдні гормони (оуабайн, дигоксин) належать до групи біологічно активних сполук, які безперервно синтезуються в організмі людини та виконують ряд протекторних функцій. Стимуляція синтезу оуабайну виявлена під впливом адренокортикотропного гормону, ангіотензину II, вазопресину [1, 5, 6, 10]. Ендогенні стероїдні гормони мають широкий спектр біологічних функцій, головним чином, за рахунок здатності до контролю процесів проліферації та загибелі клітин.

Механізм дії ендогенних стероїдних гормонів, в тому числі оуабайну, пов'язаний з їх активуючим впливом на Na^+/K^+ -АТФазу — активну транспортну систему іонів натрію та калію, що наявна в мембранах усіх еукаріотичних клітин [6]. Крім відомої насосної функції, Na^+/K^+ -АТФаза виконує сигнальну функцію, що забезпечує контроль низки функцій в організмі — підтримку електричного потенціалу мембрани,

що є необхідним для нервової трансмісії, скорочення м'язів, регуляції апоптозу, розмноження та диференціювання клітин [5, 6, 10].

Матеріали та методи досліджень. *Клітини.* Проксимально тубулярні клітини були виділені з нирок щурів-самців віком 20 днів лінії *Sprague-Dawley* за стандартною методикою [7]. Після видалення нирки *ex tempore* розміщували в оксигеновий розчин 0,9% NaCl при температурі 37°C. Кіркову речовину нирок виділяли і поміщали в 0,9% NaCl, що містить колагеназу (7 мг на 20 мл NaCl) з подальшим інкубуванням протягом 15 хв при температурі 37°C. Інкубування супроводжувалось ретельним перемішуванням матеріалу за допомогою піпетки Пастера. Реакція припинялась двократним промиванням суспензії клітин 0,9% NaCl, що містив 1% інгібітору трипсину. Після промивання однакою об'єм відмитих клітин наносили на покривні скельця в 60-міліметрові чашки Петрі. Культивування клітин проводили в середовищі DMEM (20 mM HEPES, 24 mM NaHCO₃, 10 мг/мл пеніциліну, 10 мг/мл стрептоміцину, 10% сироватки зародка бика) протягом 24 год за умов 5% CO₂ при температурі 37°C.

Індукція апоптозу. Розвиток апоптозу проксимально тубулярних клітин індукували шляхом додавання в інкубаційне середовище токсину *E. coli* — *Shiga toxin-2* дозою 4 нг/мл з подальшою інкубацією протягом 24 год.

Детекція апоптозних клітин. Для визначення індекса апоптозу використовували *ApopTag Red In Situ Apoptosis Detection kit* (Chemicon International). Проксимально тубулярні клітини культивували на 24-лунковій пласті, кожна лунка якої містила 12-міліметрові покривні скельця. На 2-й день культивування клітини, інкубовані з *Stx2* та з оубаїном, ідентифікували як апоптозні за рахунок їх мічення дигоксигеніном за участю термінальної деоксинуклеотидил-трансферази. Ядра клітин візуалізували за допомогою 4,6-діаміно-2-феніліндолу (DAPI, 1,5 мг/мл), який додавали з фосфатним буфером (PBS) при останньому промиванні клітин. Перед мікроскопією скельця з клітинами покривали *Immu-Mount* (Thermo Shandon, Midland, Canada).

Детекцію апоптозних клітин проводили з використанням *Leica TCS SP* інвертованого скануючого лазерного конфокального мікроскопа з використанням x40/1.4 N.A. олійно-імерсійного об'єктива. *ApopTag Red* флуоресценція індукувалась при 543 нм та реєструвалась за допомогою фільтра від 560 до 620 нм. Знімки були опрацьовані з використанням програмного забезпечення *Leica*. DAPI-позитивні клітини візуалізувались в ультрафіолетовому світлі. Клітини вважали апоптозними, коли вони візуалізувались як DAPI-, так і *ApopTag Red*-позитивні й мали морфологічні особливості, характерні для апоптозу (зморщування клітини, наявність пікнотичних ядер та апоптозних тілець). Індекс апоптозу (IA — кількість апоптозних клітин/загальна кількість клітин x 100) визначали при підраховуванні співвідношення *ApopTag*-позитивних клітин до загальної кількості DAPI-позитивних клітин. У кожній досліджуваній групі клітин підраховували 100 DAPI-позитивних клітин у 8–10 випадкових полях зору.

Фрагментація ДНК. Для визначення рівнів утворення низькомолекулярних олігомерів ДНК використано *Quick Apoptotic DNA Ladder Detection Kit* (Bio Vision research Product). Після інкубації проксимально тубулярних клітин нирок щурів з *Stx2* дозою 4 нг/мл протягом 24 год проводили їх трипсинізацію, двічі промивали фосфатним буфером (PBS) та центрифугували протягом 5 хв при 500g. Екстракцію ДНК проводили згідно з інструкцією. Після екстракції осад ДНК розчиняли в 30 мкл суспензійного буферу. Електрофорез зразків проводили у 1% агарозному гелі з вмістом броміду етидію 0,5 мкг/мл. Візуалізацію зразків проводили в УФ-спектрі світла.

FACS-аналіз. Проксимально тубулярні клітини нирок щурів культивували на 10-міліметрових чашках Петрі, вони були інкубовані з *Stx2* в концентрації 4 нг/мл протягом 24 год, після чого клітини інкубували з 5 мкл PE аннексину V- та йодидом пропідію (PI). Після цього клітини ретельно перемішували та інкубували протягом 15 хв при температурі 25°C в темряві. Аналіз проводили за допомогою рідинної цитометрії. Результати представлені як співвідношення аннексин V-позитивних клітин до аннексин V- та PI-позитивних клітин.

Статистичний аналіз. Статистичний аналіз проводили за допомогою програмного забезпечення *STATISTICA 6.0*. Для порівняння відмінностей груп використовували *t-test* у випадку параметричного розподілу варіант, для обрахунку інших даних — *one-way ANOVA (Fisher LCD post-hoc test)*, непараметричний аналіз (*Mann-Whitney test*). Величини, представлені як Mean±SD. $P < 0,05$, вважали статистично достовірним.

Результати досліджень та їх обговорення. Шига токсин 2 — основний пошкоджувальний фактор нирок при ГУС. Пошкодження нирок при ГУС характеризується розвитком гострої ниркової недостатності, що зумовлює подальше формування незворотних пошкоджень нирок, зокрема тубуло-інтерстиційних, з можливим розвитком хронічного їх захворювання [3, 12]. В чутливих до його впливу клітинах *Stx2* діє через специфічні мембранні рецептори глікофінголіпід глоботріаосилцераміду (Gb_3).

Шига токсин 2 пошкоджує рРНК, тим самим інгібуючи синтез білка. Останнє призводить до риботоксичного стресу, який супроводжується активацією відповідних мітоген-активованих протеїн-кіназ (MAP), вивільненням цитокінів з подальшою загибеллю клітини [3].

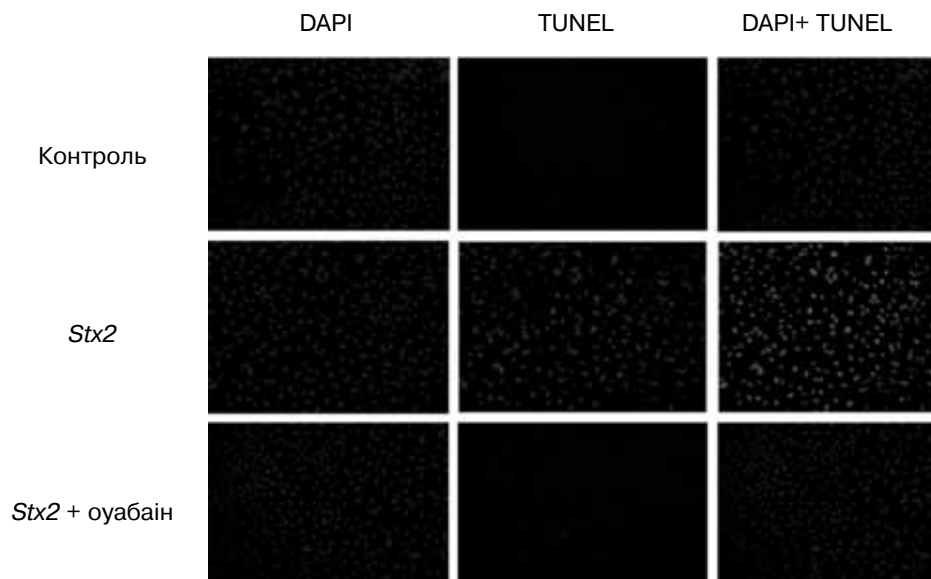
Ми провели оцінку рівня апоптозу в первинній культурі проксимально тубулярних клітин нирок щурів після 24 год інкубування з *Stx2* в концентрації 4 нг/мл та оуабаїном в концентрації 5 нМ. *Stx2* дозою 4 нг/мл викликав високий рівень апоптозу в первинній культурі проксимально тубулярних клітин нирок щурів порівняно з групою контролю ($25 \pm 2\%$ проти $4 \pm 0,3\%$, $p < 0,001$). При одночасному інкубуванні проксимально тубулярних клітин з *Stx2* та оуабаїном проявляється виражене зниження рівня апоптозу (рис. 1).

Для верифікації стадій апоптозу та оцінки виживання клітин під впливом *Stx2* та вивчення захисного впливу оуабаїну ми застосували FACS-аналіз, що базується на оцінці рівня аннексин-V-позитивних клітин. В результаті проведеного аналізу виявлено високі рівні раннього апоптозу, пізнього апоптозу/некрозу після інкубування проксимально тубулярних клітин нирок щурів з *Stx2* протягом 24 год (рис. 2).

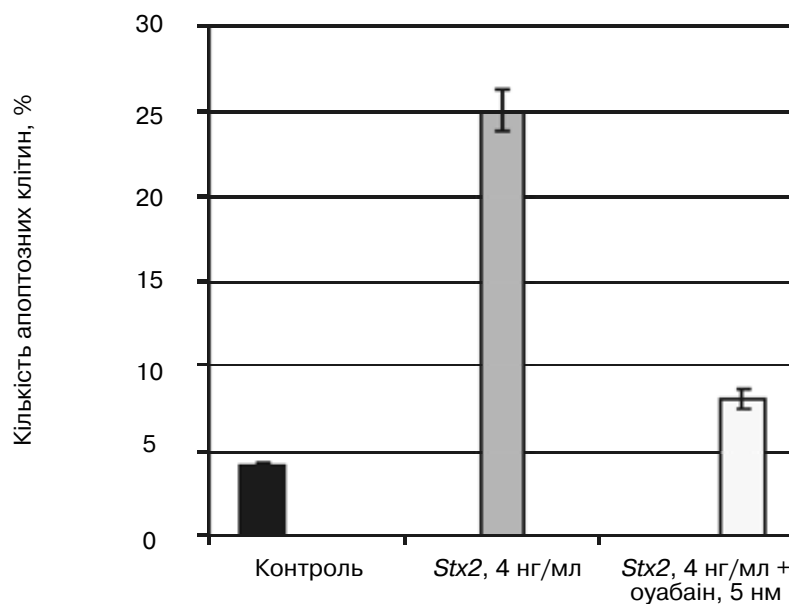
Отримані нами результати свідчать про наявність безпосереднього впливу *Stx2* на життєвий цикл клітин проксимального відділу нефрону. Рівні раннього апоптозу, пізнього апоптозу/некрозу в культурі клітин, інкубованих з *Stx2*, є значно вищими порівняно з групою контролю. Оуабаїн проявляє виражений протекторний ефект, про що свідчать нижчі рівні раннього апоптозу, пізнього апоптозу/некрозу при сумісному інкубуванні проксимально тубулярних клітин нирок щурів з *Stx2* та оуабаїном.

Розвиток апоптозу супроводжується відповідними морфологічними змінами (зморщення клітин, зменшення розміру клітини, підвищення щільності цитоплазми, ущільнення органел). Крім цих морфологічних змін апоптоз супроводжується пошкодженням ДНК [4]. Для оцінки генотоксичного впливу *Stx2* на ДНК проксимально тубулярних клітин нирок щурів та ефекту оуабаїну було проведено визначення рівня фрагментації геномної ДНК після інкубації клітин з *Stx2* та при одночасній інкубації *Stx2* з оуабаїном протягом 24 год. Показано, після 24-годинної інкубації первинної культури проксимально тубулярних

клітин нирок щурів з *Stx2* дозою 4 нг/мл розвивається виражений генотоксичний ефект, що проявлявся високим рівнем фрагментації геномної ДНК. Пошкоджувальні ефекти Шига токсину 2 було нівельовано впливом оуабайну (рис. 3).

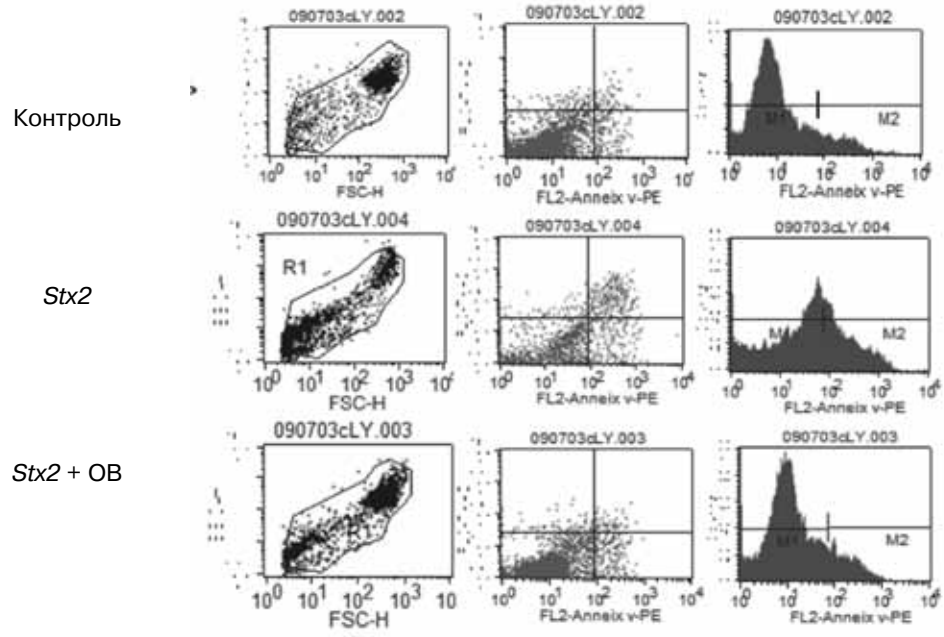


а

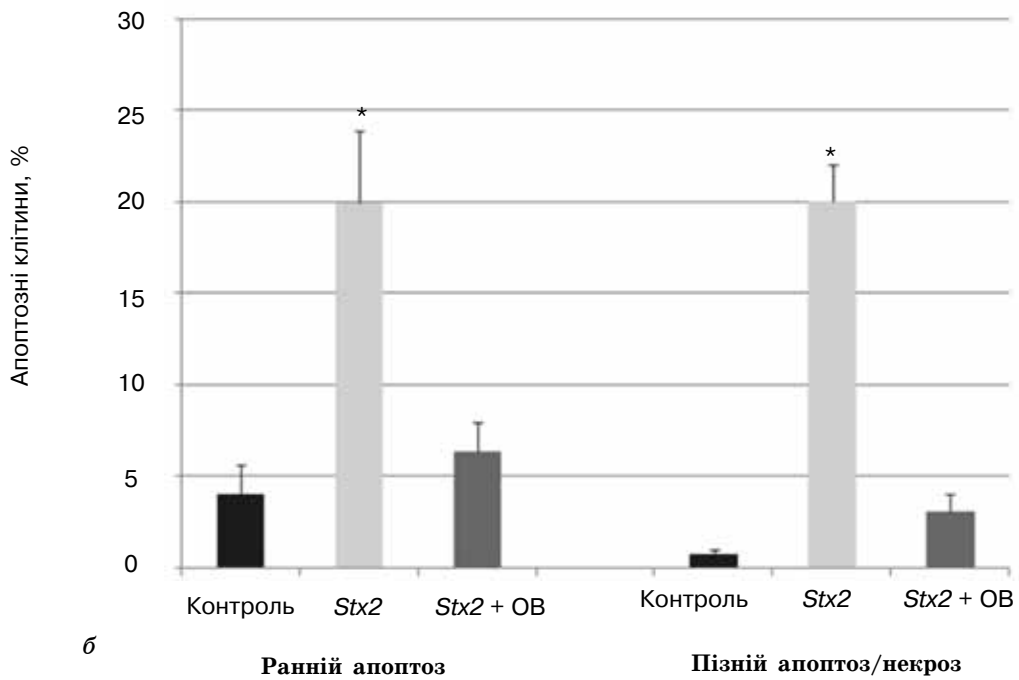


б

Рис.1. Антиапоптозний вплив оуабайну на проксимально тубулярні клітини нирок щурів за умов пошкодження *Stx2*: а — імуногістохімічне дослідження культури проксимально тубулярних клітин; б — рівень апоптозу в групах досліджуваних клітин. * — $p < 0,001$.



а



б

Рис. 2. Ефекти оубаїну на життєвий цикл проксимально тубулярних клітин нирок щурів за умов пошкодження *Stx2*: а) типові FACS діаграми різних експериментальних груп (контроль, проксимально тубулярні клітини нирок щурів, інкубовані з *Stx2* (4 нг/мл), проксимально тубулярні клітини, інкубовані з *Stx2* (4 нг/мл) та оубаїном (5 нМ)); б) рівень апоптозу (співвідношення аннексин V- та PI-позитивних клітин), OB — оубаїн, * — $p < 0,02$.

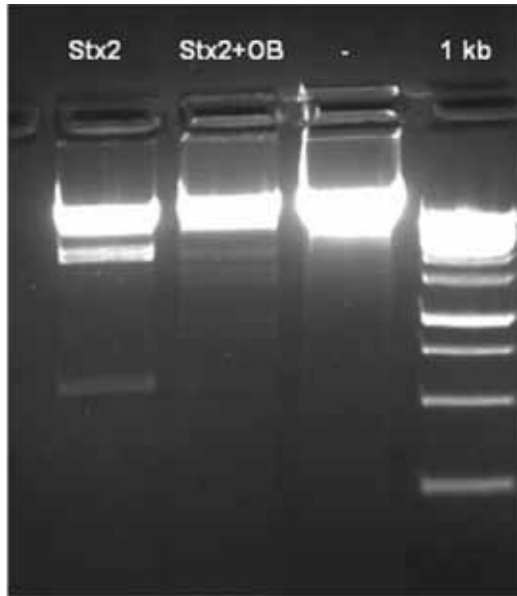


Рис. 3. Протекторні ефекти оубаїну при генотоксичному впливі *Stx2* на проксимально тубулярні клітини нирок щурів.

Таким чином, отримані нами результати свідчать про те, що *Stx2*, який є основним патогенетичним фактором при ГУС, проявляє високі рівні пошкоджувальних властивостей при впливі на проксимальний сегмент нефрону. Захисний вплив ендогенного стероїдного гормону оубаїну здійснюється за рахунок його антиапоптозного ефекту, здатності впливати на напрям життєвого циклу клітини, забезпечення захисту геномної ДНК.

Висновки. 1. Шига токсин 2 (*Stx2*) на первинній культурі клітин нирок щурів зумовлює формування фенотипу пошкоджень тубулярного сегмента нефрону, що характерно для гемолітико-уремічного синдрому (ГУС). 2. Пошкоджувальний вплив *Stx2* при впливі на проксимальний сегмент нефрону пов'язаний зі змінами життєвого циклу клітин, їх загибеллю.

3. Індуковані впливом *Stx2* цитотоксичні ефекти на первинній культурі проксимально тубулярних клітин нирок асоціюються з високим рівнем генотоксичності.

4. Застосування оубаїну при пошкодженні проксимального сегмента нефрону під впливом *Stx2* забезпечує нефропротекторний ефект, що проявляється зниженням рівня апоптозу, відновленням життєвого циклу клітин, зниженням пошкодження геномної ДНК.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Bagrov A.Y., Shapiro J.I., Fedorova O.V. Endogenous cardiogenic steroids: physiology, pharmacology and novel therapeutic targets // *Pharmacol Rev.* — 2009. — Vol. 61, N. 1. — P. 9–38.
2. Delvaeye M., Noris M., De Vriese D. et al. Thrombomodulin Mutations in Atypical Hemolytic-Uremic Syndrome // *N. Engl. J. Med.* — 2009. — Vol. 361. — P. 1511–1522.
3. Fujii J., Wood K., Matsuda F. et al. Shiga Toxin 2 Causes Apoptosis in Human Brain Microvascular Endothelial Cells via C/EBP Homologous Protein // *Infection and immunity.* — 2008. — Vol. 76. — P. 3679–3689.
4. Karpman D., Hakansson A., Perez M. et al. Apoptosis of renal cortical cells in the hemolytic uremic syndrome: in vivo and in vitro studies // *Infect Immun.* — 1998. — Vol. 66. — P. 636–644.
5. Larsson S. Short-term primary cultures in studies of growth regulation in rat proximal tubule cells // *Am. J. Kidney Dis.* — 1991. — Vol. 17. — P. 631–633.
6. Liang M., Tian J., Liu L. et al. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase // *J Biol Chem.* — 2007. — Vol. 282. — P. 10585–10593.
7. Liu X., Miyakawa A., Aperia A. et al. Na,K-ATPase generates calcium oscillations in hippocampal astrocytes // *Neuroreport.* — 2007. — Vol. 18. — P. 597–600.
8. Noris M., Remuzzi G. Hemolytic uremic syndrome // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2005. — Vol. 16. — P. 1035–1050.
9. Psotha M., Obata F., Kolling G. et al. Shiga Toxin 2 Targets the Murine Renal Collecting Duct Epithelium // *Infection*

and Immunity. — 2009. — Vol. 77. — P. 959–969. 10. Schoner W., Scheiner-Bobis G. Endogenous cardiac glycosides: hormones using the sodium pump as signal transducer // Semin Nephrol. — 2005. — Vol. 25. — P. 343–351. 11. Siegler R., Oakes R. Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis, treatment, and outcome // Curr. Opin. Pediatr. — 2005. — Vol. 17. — P. 200–204. 12. Tarr P., Gordon C., Chandler W. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome // Lancet. — 2005. — Vol. 365. — P. 1073–1086.

Стаття надійшла до редколегії 2.03.11

**ПЕРВИЧНЫЕ ТУБУЛЯРНЫЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК НА МОДЕЛИ
ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА И РОЛЬ ОУАБАИНА
В ИХ ПРЕДУПРЕЖДЕНИИ**

Е.А. БУРЛАКА

Нами выявлено, что Шига токсин 2 (*Stx2*), который является основным патогенетическим фактором при гемолитико-уремическом синдроме (ГУС), вызывает развитие выраженных цитотоксических повреждений проксимально тубулярных клеток почек крыс. Фенотип повреждений проксимально тубулярных клеток почек крыс под влиянием Шига токсина 2 проявляется высокими уровнями апоптоза и некроза, изменениями направления жизненного цикла клеток и высоким уровнем генотоксичности. Выявлено защитный эффект эндогенного стероидного гормона оуабайн при повреждениях тубулярного сегмента нефрона на экспериментальной модели ГУС.

Ключевые слова: гемолитико-уремический синдром, апоптоз, эндогенные стероидные гормоны, оуабайн

**PRIMARY TUBULAR KIDNEY INJURIES IN HEMOLYTIC UREMIC
SYNDROME MODEL AND ROLE OF OUABAIN AS A MEANS OF
PREVENTION**

E. BURLAKA

It has been shown that Shiga toxin 2 (*Stx2*) which is a principal pathogenic agent in Hemolytic uremic syndrome (HUS) causes prominent cytotoxic injuries of proximal tubule cells in rats. Phenotype of the rat proximal tubule cells damages developed under *Stx2* influence manifests it self in high levels of apoptosis and necrosis, changes of cell life-cycle and high level of genomic toxicity. Protective effect of the endogenous steroid hormone ouabain in proximal segment of nephron injuries in experimental model of HUS has been detected.

Key words: hemolytic uremic syndrome, apoptosis, endogenous steroid hormones, ouabain.