

УДК 618.3-06:618-009.24

Є. А. Бурлака

Національний медичний університет
імені О.О. Богомольця, м. КиївЗАХИСНА РОЛЬ ОУАБАЇНУ НА
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІЙ МОДЕЛІ
ГЕМОЛІТИКО-УРЕМІЧНОГО СИНДРОМУ

Ключові слова: токсин Шига 2, гемолітико-уремічний синдром, нирки, ендогенні стероїдні гормони, оуабайн.

Резюме. Нами показано, що *Stx2*, який є основним патогенетичним фактором при гемолітико-уремічному синдромі (ГУС), викликає виражені цитотоксичні пошкодження проксимально тубулярних клітин нирок щурів. Це проявляється високими рівнями апоптозу та некрозу, змінами напрямку життєвого циклу клітин та високим рівнем генотоксичності. Також встановлено захисний ефект ендогенного стероїдного гормону оуабайн при пошкодженнях тубулярного сегмента нефрона на експериментальній моделі ГУС.

Вступ

Гемолітико-уремічний синдром (ГУС) є частотою причиною гострої та хронічної ниркової недостатності дитячого віку. Множинність пошкоджень при гемолітико-уремічному синдромі визначається розвитком риботоксичного стресу у відповідь на активацію мітоген-активованих кіназ (МАР), виділенням цитокінів та клітинною смертю. Пошкодження і загибель клітин, у тому числі в нирках, відбувається за типом апоптозу. У біоптичному матеріалі нирок пацієнтів із ГУС виявлено апоптоз як у гломерулярних, так і в тубулярних клітинах (1).

У мишей з експериментальною моделлю ГУС пошкодження, які розвиваються в нирках та призводять до розвитку недостатності нирок, обумовлені впливом токсина Шига 2 (*Stx2*) (1,2). Патоморфологічні дослідження нирок експериментальних тварин, інфікованих перорально *E. Coli* або після внутрішньовенного введення *Stx2*, крім типових пошкоджень ендотеліальних клітин, виявили пошкодження клубочків, мезангіальних клітин та проксимального тубулярного епітелія (4,5).

Масивність пошкоджень нирок під впливом *Stx2* обумовлені присутністю специфічних рецепторів, у тому числі, в тубулярному сегменті нефрона (2-5). Реалізація патофізіологічних ефектів *Stx2* відбувається за рахунок його взаємодії з специфічними глоботріаосилцерамідними рецепторами на поверхні мембрани тропних клітин - гала1-4-гал1-4-глюкозилцерамід (*Gb3*). Показано, що проксимально тубулярні клітини нирок людини (HRTEC) (6) та проксимально тубулярні клітини нирок гризунів мають високий рівень експресії *Gb3* на поверхні мембран, що зумовлює високий рівень цитотоксичності *Stx2* при впливі на ці клітини (7).

Ендогенні стероїдні гормони (оуабайн, дигоксин) належать до групи біологічно активних сполук, які безперервно синтезуються в організмі людини та виконують ряд протективних функцій. Стимуляція синтезу оуабайна виявлена під впливом адренокортикотропного гормону, ангіотензину II, вазопресина (8,9,10).

Мішенню дії ендогенних стероїдних гормонів, в тому числі оуабайну, є Na^+/K^+ -АТФаза – активна транспортна система іонів натрію та калію, що присутня в мембранах усіх еукаріотичних клітин і належить до родини мембраноасоційованих АТФаз Р-типу (9). Крім відомої насосної функції, Na^+/K^+ -АТФаза контролює численні клітинні функції – підтримка електричного потенціалу мембрани, що є необхідним для нервової трансмісії, скорочення м'язів, регуляції апоптозу, розмноження та диференціювання клітин (8-10,12). Зокрема останні впливи реалізуються за рахунок сигнальної функції Na^+/K^+ -АТФази та її активуючого впливу на відповідні транскрипційні фактори.

Матеріал і методи*Клітини*

Проксимально тубулярні клітини були виділені з нирок щурів-самців віком 20 діб лінії Sprague-Dawley за стандартною методикою (11). Після видалення нирки *ex tempore* поміщали 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 наступним інкубуванням протягом 15 хв при температурі 37°C. Інкубування супроводжувалося ретельним перемішуванням матеріалу за допомогою піпетки Пастера. Реакція зупинялася двократним промиванням суспензії клітин

0,9% NaCl, що містив 1% інгібітора трипсину. Після промивання однаковий об'єм відмитих клітин наносився на покривні скельця в 60-мм чашки Петрі. Культивування клітин проводилося 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 насичення 5% CO₂ при температурі 37°C.

Індукція апоптозу

Розвиток апоптозу проксимально тубулярних клітин індукували шляхом додавання в інкубаційне середовище токсина E. coli - Shiga toxin-2 в дозі 4 нг/мл із наступною інкубацією протягом 24 год.

Детекція апоптозних клітин

Для визначення індексу апоптозу використовувалася AporTag Red In Situ Apoptosis Detection kit (Chemicon International). Проксимально тубулярні клітини культивувалися на 24-лунковій платі, кожна лунка якої містила 12-мм покривне скельце. На 2-й день культивування клітини, інкубовані з Stx2 та з оуабаїном, ідентифікувалися як апоптозні внаслідок помічення дігексигеніном за участю термінальної дезоксирибонуклеотидил трансферази. Ядра клітин візуалізувалися за допомогою 4,6-діаміно-2-феніліндолу (DAPI, 1,5 мг/мл), що додавався з фосфатним буфером (PBS) при останньому промиванні клітин. Перед мікроскопією скельця з клітинами покривалися ImmMount (Thermo Shandon, Midland, Canada).

Детекція апоптозних клітин проводилася з використанням Leica TCS SP інвертованого скануючого лазерного конфокального мікроскопа з використанням x40/1.4 N.A. олійно-імерсійного об'єктива. AporTag Red флюоресценція індукувалася при 543 нм та реєструвалася за допомогою фільтра від 560- до 620 нм. Знімки були опрацьовані з використанням програмного забезпечення Leica. DAPI-позитивні клітини візуалізувалися в ультрафіолетовому світлі. Клітини вважалися апоптозними, коли вони візуалізувалися як DAPI-так і AporTag Red позитивні та 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) визначався при підрахуванні співвідношення AporTag-позитивних клітин до загальної кількості DAPI-позитивних клітин. У кожній досліджуваній групі клітин проводився підрахунок 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 в дозі 4 нг/мл протягом 24 год проводили їх трипсинізацію, двічі промивали фосфатним буфером (PBS) та центрифугували протягом 5 хв при 500xg. Екстракцію ДНК проводили згідно з інструкцією. Після екстракції осад ДНК було розчинено в 30 мкл суспензійного буфера. Електрофорез зразків проводили у 1% агарозному гелі з вмістом бромиду етидія 0,5 мкг/мл. Візуалізація зразків проводилася в УФ спектрі світла.

FACS-аналіз

Проксимально тубулярні клітини нирок щурів культивувалися на 10 мм чашках Петрі та були інкубовані з Stx2 в концентрації 4 нг/мл протягом 24 год. Після чого клітини інкубувалися з 5 мкл PE Аннексину V та йодидом пропідія (PI). Після чого клітини ретельно перемішувалися та інкубувалися протягом 15 хв при температурі 25 °C в темряві. Аналіз проводився за допомогою рідинної цитометрії. Результати представлені як співвідношення Аннексин V позитивних клітин до Аннексин V та PI позитивних клітин.

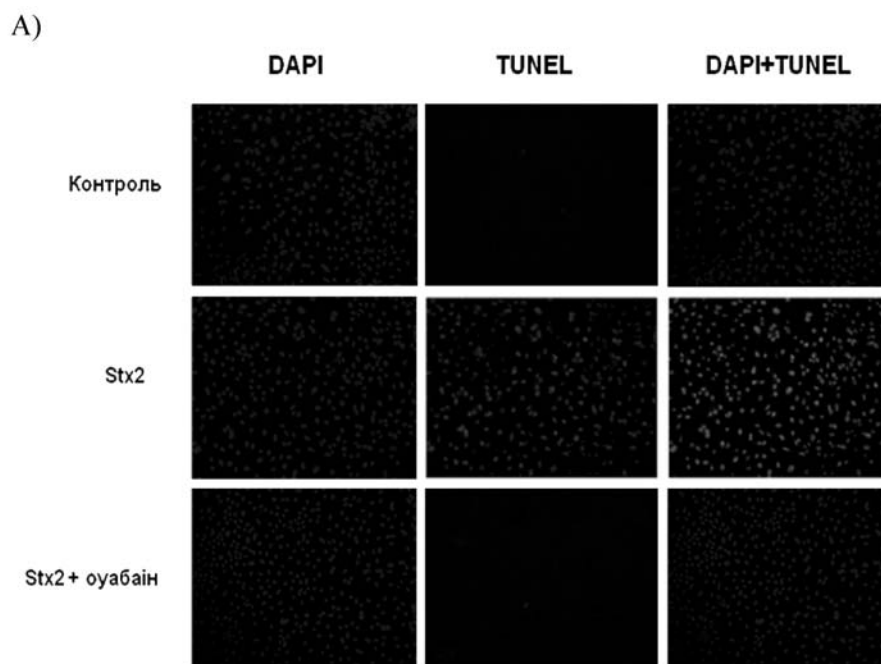
Статистичний аналіз

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 вірогідним.

Обговорення результатів дослідження

Токсин Шига є основним пошкоджуючим фактором нирок при ГУС, що асоціюється з розвитком гострої ниркової недостатності, формуванням незворотніх пошкоджень структур нирок із можливим подальшим розвитком хронічного захворювання нирок (1). У чутливих до його впливу клітинах Stx2 діє через специфічні мембранні рецептори глікофінголіпід глоботріаосилцераміда (Gb₃) та пошкоджує рРНК, тим самим інгібуючи синтез білка. Останнє призводить до риботоксичного стресу, який супроводжується активацією відповідних мітоген-активованих протеїн кіназ (MAP), вивільненням цитокинів та загибеллю клітини (13). Stx2 викликає розвиток гломерулярної мікроангіопатії, апоптоз гломерулярних та тубулярних клітин.

Нами було проведено оцінку рівня апоптозу в первинній культурі проксимально тубулярних клітин нирок щурів після 24 год інкубування з Stx2 в концентрації 4 нг/мл та оуабаїна в концентрації 5 нМ.



Б)

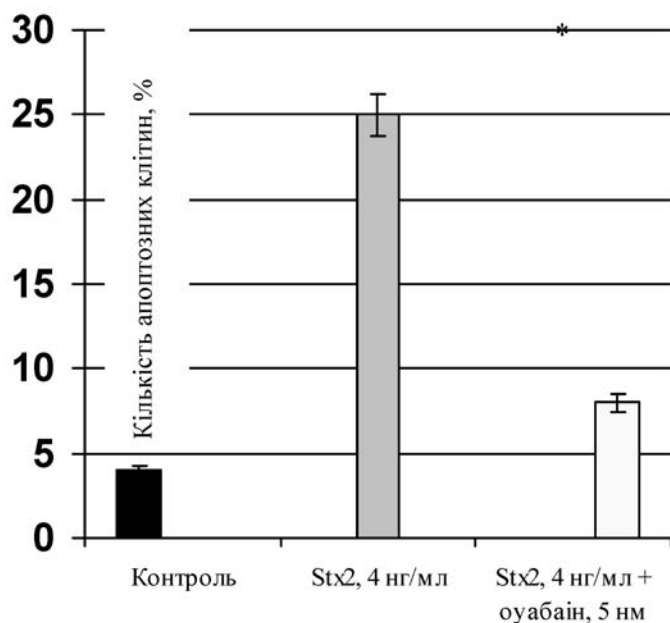
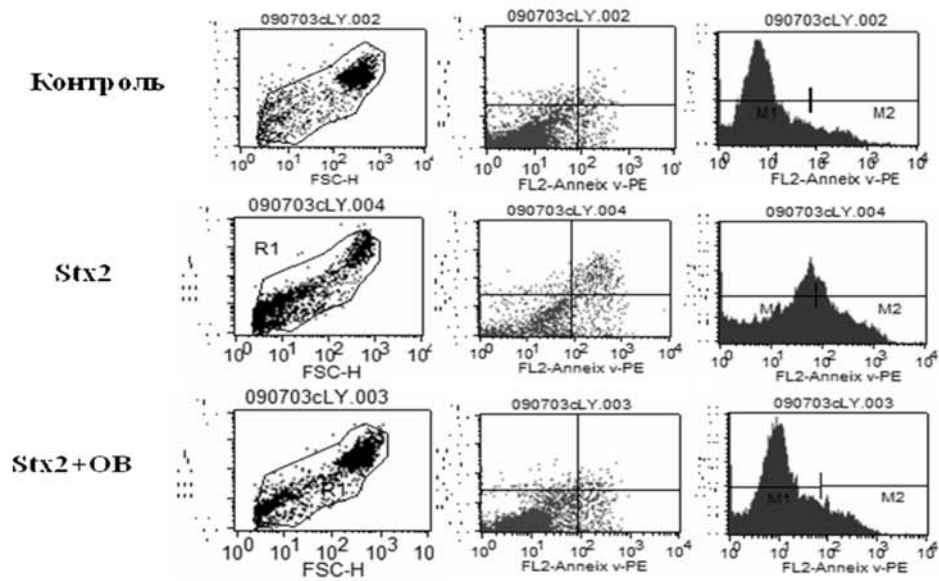


Рис.1. Антиапоптозний вплив оуабайну на проксимально тубулярні клітини нирок щурів за умов пошкодження Stx2. А) – імуногістохімічне дослідження культури проксимально тубулярних клітин. Б) – рівень апоптозу в групах досліджуваних клітин. * – $P < 0,001$

Stx2 в дозі 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 із Stx2 в дозі 4 нг/мл та оуабайном в концентрації 5 нм виявлено виражене зниження рівня апоптозу (рис. 1).

Аннексин-V є специфічним фосфатидилсерин-зв'язуючим білком, який використовується для детекції апоптозних клітин. Для верифікації стадій апоптозу та оцінки виживаності клітин під впливом Stx2 та вивчення захисного впливу оуабайну нами застосовано FACS-аналіз. Була показана наявність високих рівнів раннього апоптозу, пізнього апоптозу/некрозу після інкубування

А)



Б)

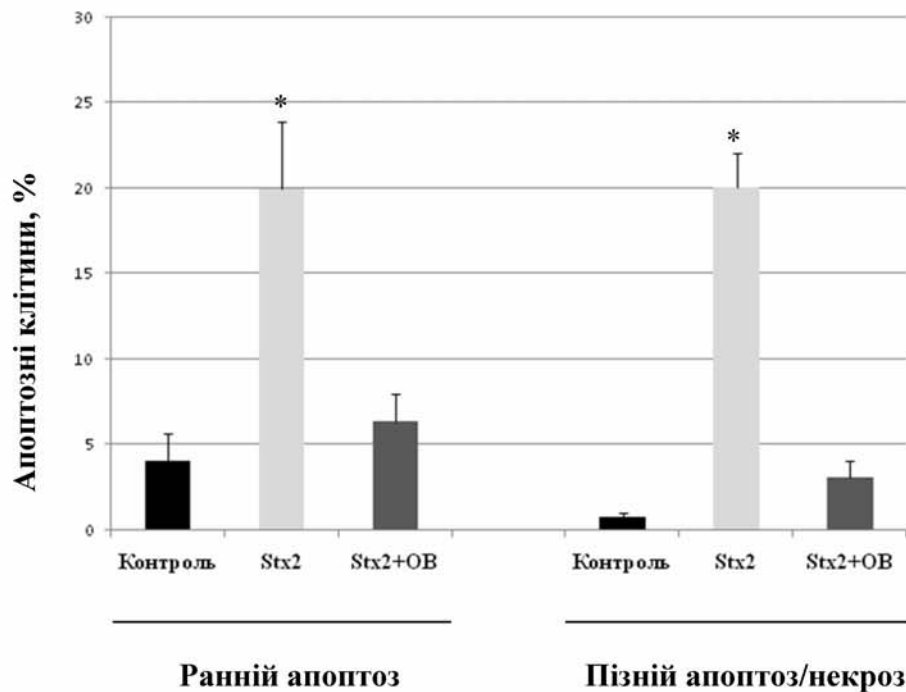


Рис. 2. Ефекти оуабайну на життєвий цикл проксимально тубулярних клітин нирок щурів за умов пошкодження Stx2

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 оуабайном (5 нМ)).

Б) Рівень апоптозу (співвідношення Аннексин V позитивних клітин до Аннексин V та PI позитивних клітин). *OB* – оуабайн. * – $P < 0,02$.

проксимально-тубулярних клітин нирок щурів з Stx2 протягом 24 год (рис. 2).

Отримані нами результати свідчать про наявність безпосереднього впливу Stx2 на життєвий цикл проксимально тубулярних клітин. Рівні ран-

нього апоптозу, пізнього апоптозу/некрозу в культурі клітин, інкубованих із Stx2 є значно вищими, порівняно з групою контролю. Оуабайн має виражений протективний ефект, про що свідчать нижчі рівні раннього апоптозу, пізнього апоптозу/

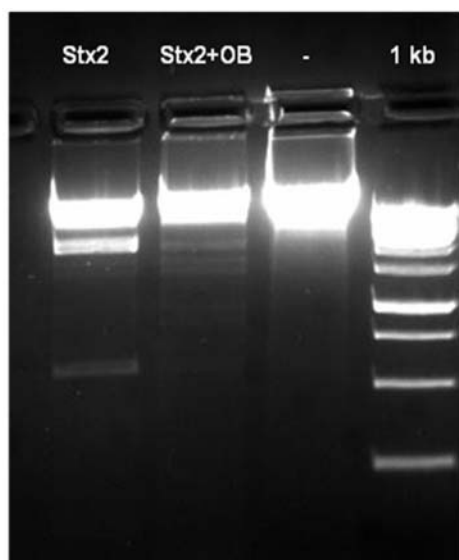


Рис. 3. Протективні ефекти оуабайну при генотоксичному впливі Stx2 на проксимально тубулярні клітини нирок щурів

некрозу при сумічному інкубування проксимально тубулярних клітин нирок щурів з Stx2 та оуабайном.

Розвиток апоптозу супроводжується відповідними морфологічними змінами (зморщення клітин, зменшення розміру клітини, підвищення щільності цитоплазми, ущільнення органел). Крім цих морфологічних змін, апоптоз супроводжується пошкодженням ДНК (14).

Для оцінки генотоксичного впливу Stx2 на ДНК проксимально тубулярних клітин нирок щурів та ефект оуабайна було проведено визначення рівня фрагментації геномної ДНК після інкубації клітин з Stx2 та при одночасній інкубації Stx2 з оуабайном протягом 24 год. Зареєстровано високий рівень фрагментації геномної ДНК у первинній культурі проксимально тубулярних клітин нирок щурів після 24-годинної інкубації з Stx2 в дозі 4 нг/мл. Пошкоджуючі ефекти Шига токсина було нівельовано під впливом оуабайну (рис. 3).

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

Перспективи подальших досліджень

Буде продовжене вивчення ефектів Stx2 при гемолітико-уремічному синдромі.

Висновки

1. Токсин Шига 2 (Stx2) на первинній культурі клітин нирок щурів викликає розвиток пошкоджень тубулярного сегмента нефрону, які характерні для гемолітико-уремічному синдрому (ГУС).

2. Пошкоджуючий вплив Stx2 пов'язаний із виникненням генотоксичного ефекту, змінами життєвого циклу клітин та їх загибеллю.

3. Застосування оуабайну забезпечує зниження рівня цитотоксичних пошкоджень проксимально тубулярних клітин нирок, що виникають в проксимальному відділі нефрону та знижує пошкодження геномної ДНК, що виникають під впливом Stx2.

Література. 1. *Noris M.* Hemolytic uremic syndrome / M. Noris M, G. Remuzzi // Journal of the American Society of Nephrology. – 2005. – V. 16. – P. 1035–1050. 2. *Siegler R.* Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis, treatment, and outcome / R. Siegler, R. Oakes R // Current Opinion in Pediatrics. – 2005. – V. 17. – P. 200–204. 3. *Tarr P.I.* Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome / P.S., Tarr, C.A. Gordon, W.L. Chandler // Lancet. – 2005. – V. 365. – P. 1073–1086. 4. *Sugatani J.* Urinary concentration defect in rats given Shiga toxin: elevation in urinary AQP2 level associated with polyuria / J. Sugatani, N. Komiyama, T. Mochizuki [et al.] // Life Sciences. – 2002. – V. 71. – P. 171–189. 5. *Karpman D.* Apoptosis of renal cortical cells in the hemolytic uremic syndrome: in vivo and in vitro studies / D. Karpman, A. Hakansson, M.T. Perez [et al.] // Infection and Immunity. – 1998. – V. 66. – P. 636–644. 6. *V.P. Creydt.* Cytotoxic effect of Shiga toxin-2 holotoxin and its B subunit on human renal tubular epithelial cells / V.P. Creydt, C. Silberstein, E. Zotta [et al.] // Microbes and Infection. – 2006. – V. 8. – P. 410–419. 7. *Psojka M.A.* Shiga Toxin 2 Targets the Murine Renal Collecting Duct Epithelium / M.A. Psojka, F. Obata, G.L. Kolling [et al.] // Infection and Immunity. – 2009. – V. 77. – P. 959–969. 8. *Bagrov A.Y.* Endogenous cardiotoxic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets / A.Y. Bagrov, J.I. Shapiro, O.V. Fedorova // Pharmacological Reviews. – 2009. – V. 61, No.1. – P. 9–38. 9. *Schoner W.* Endogenous cardiac glycosides: hormones using the sodium pump as signal transducer / W. Schoner, G. Scheiner-Bobis // Seminars in Nephrology. – 2005. – V. 25. – P. 343–351. 10. *Liang M.* Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase / M. Liang, J. Tian, L. Liu [et al.] // The Journal Biological Chemistry. – 2007. – V. 282. – P. 10585–10593. 11. *Larsson S.H.* Short-term primary cultures in studies of growth regulation in rat proximal tubule cells / S.H. Larsson // American Journal of Kidney Diseases. – 1991. – V. 17. – P. 631–633. 12. *Liu X.L.* Na,K-ATPase generates calcium oscillations in hippocampal astrocytes / X.L. Liu, A. Miyakawa, A. Aperia [et al.] // NeuroReport. – 2007. – V. 18. – P. 597–600. 13. *Tarr P.I.* Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome / P.I. Tarr, C.A. Gordon, W.L. Chandler // Lancet. – 2005. – V. 365. – P. 1073–1086. 14. *Fujii J.* Shiga Toxin 2 Causes Apoptosis in Human Brain Microvascular Endothelial Cells via C/EBP Homologous Protein / J. Fujii, K. Wood, F. Matsuda [et al.] // Infection and Immunity. – 2008. – V.76. – P. 3679–3689.

ЗАЩИТНАЯ РОЛЬ ОУАБАИНА НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Е. А. Бурлака

Резюме. Нами показано, что Stx2, который является патогенетическим фактором при гемолитико-уремическом синдроме (ГУС), вызывает выраженные цитотоксические повреждения проксимально тубулярных клеток почек крыс. Это проявляется высокими уровнями апоптоза и некроза, изменениями направления жизненного цикла клеток и высоким уровнем цитотоксичности. Кроме того, показан защитный эффект эндогенного стероидного гормона оуабайна.

на при повреждениях тубулярного сегмента нефрона на экспериментальной модели ГУС.

Ключевые слова: токсин Шига 2, гемолитико-уремический синдром, почки, эндогенные стероидные гормоны, оубаин.

**PROTECTIVE ROLE OF OUABAIN ON
EXPERIMENTAL MODEL OF HEMOLYTICO-
UREMIC SYNDROME**

E. A. Burlaka

Abstract. It has been shown by us that Stx 2, which is a principal pathogenic agent in Hemolytic-uremic syndrome

(HUS), causes prominent cytotoxic damages of the proximal tubular cells of the rat kidney. It is realized with high levels of apoptosis and necrosis, changes of cell life-cycles direction and high genotoxicity level. Protective effect of endogenous steroid hormone ouabain in case of the damages of nephron tubular segments on experimental modes has been determined too.

Key words: Shiga toxin 2, hemolytic uremic syndrome, kidneys, endogenous steroid hormones, ouabain

Clin. and experim. pathol. - 2011. - Vol.10, №1 (35). - P.16-21.

Надійшла до редакції 25.02.2011

Рецензент – проф. д.мед.н. Ю.С.Роговий

© Е. А. Бурлака, 2011