

© Бурлака Є.А.

УДК: 616-092:616-092.4+616.61-002.1:616-08-039.11:615.357

НА,К-АТФАЗА-ЗАЛЕЖНИЙ СИГНАЛЬНИЙ ШЛЯХ В АНТИАПОПТОЗНОМУ ЗАХИСТІ ОУАБАІНОМ ПРИ ПЕРВИННИХ ПОШКОДЖЕННЯХ НИРОК ЗА УМОВ ГЕМОЛІТИКО-УРЕМІЧНОГО СИНДРОМУ

Бурлака Є.А.

Національний медичний університет ім. О.О.Богомольця (бульвар Т. Шевченка, 13, м. Київ, Україна, 01601), Каролінський інститут (Karolinska Institutet, Department of Woman's and Children's Health, Q2:09 Astrid Lindgren Children's Hospital, 171 76 Stockholm, Sweden)

Резюме. У статті представлені результати досліджень молекулярних механізмів ренопротективної функції оуабайна за умов первинних тубулярних пошкоджень нирок під впливом токсина Шига 2 (Stx2). Показано, що захисний вплив оуабайна реалізується за рахунок активації сигнальної функції Na,К-АТФази та посилення міжмолекулярної взаємодії в мікродомені Na,К-АТФаза-IP₃R, що призводить до активації нуклеарного транскрипційного фактора NF-κB. Кінцевим результатом реалізації активації сигнального шляху є зниження рівнів апоптозу, - як первинного порушення при пошкодженні нирок за умов гемолітико-уремічного синдрому (ГУС). Включення ендогенних стероїдних гормонів (дигоксин, оуабайн) в схеми лікування захворювань нирок у дітей дозволить попередити виникнення та прогресування серцево-судинних ускладнень за рахунок їх кардіопротективних властивостей та забезпечить нефропротективний ефект.

Ключові слова: оуабайн, гемолітико-уремічний синдром, апоптоз, Na,К-АТФаза, NF-κB.

Вступ

Ендогенні стероїдні гормони (дигоксин, оуабайн) широко застосовуються клінічній практиці для лікування хронічної серцевої недостатності, аритмій. Найбільш часто використовуються в клінічній практиці дигоксин та оуабайн. Їх отримують з *Digitalis* та *Strophantus Gratus*, відповідно. За хімічною структурою, дигоксин та оуабайн належать до групи карденолідів, та характеризуються наявністю п'ятичленного ненасиченого лактонового кільця [Bagrov et al., 2009] (рис. 1).

Ендогенний синтез дигоксина відбувається в організмі більшості савців. Зокрема його присутність виявлено в плазмі, сечі, наднирниках, грудному молоці. В організмі людини встановлено наявність ендогенного синтезу дигоксина в гіпоталамусі та наднирниках. Виявлено його екскрецію з сечею. Концентрація дигоксина в плазмі крові людини зростає під час вагітності, протягом періоду новонародженості, після тривалих фізичних навантажень [Schoner et al., 2005; Dvela et al., 2007].

Ендогенні стероїдні гормони відіграють важливу роль в регуляції ряду фізіологічних функцій нирок та серцево-судинної системи. Головною функцією даної групи

молекул є регуляція процесів проліферації клітин та контроль їх життєвого циклу за рахунок впливу на Na⁺/K⁺-АТФазу. Крім того, вони приймають участь в регуляції артеріального тиску, процесів фіброзу, контролю та модулювання імунної відповіді, метаболізму вуглеводів, функцій ЦНС. Множинність функціональних можливостей ендогенних стероїдів визначає широкі можливості їх терапевтичного застосування [Dvela et al., 2007].

Мета дослідження: дослідити молекулярні механізми захисного впливу ендогенного стероїдного гормону оуабайн при пошкодженні нирок за умов гемолітико-уремічного синдрому.

Матеріали та методи

Клітини

Проксимально тубулярні клітини були виділені з нирок щурів-самців віком 20 діб лінії Sprague-Dawley за стандартною методикою [Li et al., 2006]. 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 наступним інкубуванням протягом 15 хв. при температурі 37°C. Інкубування супроводжувалось ретельним перемішуванням матеріалу за допомогою піпетки Пастера. Реакція зупинялась двократним промиванням суспензії клітин 0,9% NaCl, що містив 1% інгібітора трипсина. Після промивання однаковий об'єм відмитих клітин наносився на покривні скельця в 60-мм чашки Петрі. Культивування клітин проводилось в середовищі DMEM (20 мМ HEPES, 24 мМ 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 середови-

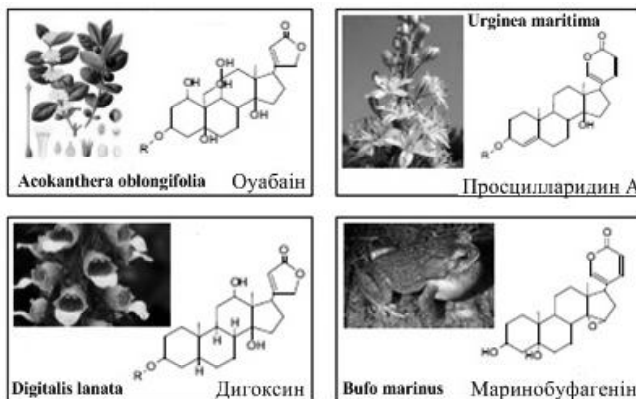


Рис. 1. Хімічна структура серцевих глікозидів.

ще токсина E. coli - Shiga toxin-2 в дозі 4 нг/мл з наступною інкубацією протягом 24 год.

Детекція апоптозних клітин

Для визначення індекса апоптозу використовувався AporTag Red In Situ Apoptosis Detection kit (Chemicon International). Проксимально тубулярні клітини культивувались на 24-лунковій платі, кожна лунка якої містила 12-мм покривні скельця. На 2-ий день культивування клітини, інкубовані з Stx2 та з оуабаїном, ідентифікувались як апоптозні за рахунок їх мічення дігксоксигеніном за участю термінальної деоксинуклеотидил трансферази. Ядра клітин візуалізувались 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 покривались Immu-Mount (Thermo Shandon, Midland, Canada).

Детекція апоптозних клітин проводилась з використанням Leica TCS SP інвертованого скануючого лазерного конфокального мікроскопа з використанням $\times 40/1.4$ N.A. олійно-імерсійного об'єктива. AporTag Red флюоресценція 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 вважались апоптозними, коли вони візуалізувались 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 $\times 100$) визначався при підрахування співвідношення AporTag-позитивних клітин до загальної кількості DAPI-позитивних клітин. У кожній досліджуваній групі клітин проводився підрахунок 100 DAPI-позитивних клітин в 8-10 випадкових полях зору.

Імунопреципітація

Клітини, інкубовані протягом 24 год. з оуабаїном (5 нМ) та Stx2 (4 нг/мл), промивали фосфатним буфером (PBS) та лізували льодяним лізуючим буфером (50 мМ Tris/HCl (рН 7.4), 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,5 мМ дитіотреїтол, 0,5% деоксихлорат натрію, 1,5% NP-40, 1 мМ фенілметилсульфоніла флюорит, інгібітори протеаз (Roche Diagnostics) у співвідношенні 1:1000 до кінцевого об'єму буфера), гомогенізувались та центрифугувались (25000 \times g) протягом 60 хв. при 4°C. Інкубування супернатанта з анти-Na,K-АТФаза $\alpha 1$ антитілами проводилось протягом 2 год. при 4°C з подальшим інкубуванням з агарозними подушечками (Santa Cruz Biotechnology) протягом 12 год. при 4°C за умов безперервного помішування. Western Blotting проводився в 10% поліакриламідному гелі та був трансферований на полівінілден дифлюоридні мембрани. Блокування мембран проводилось в 5% знежиреному молоці на TBS-T (136 мМ NaCl, 10 мМ Tris, 0,05% Tween 20) з наступною інкубацією з вторинними антитілами, міченими пероксидазою хрину (GE Healthcare) протягом 1 год.

при кімнатній температурі. Мембрани відмивались TBS-T, після чого візуалізація білків проводилась хемілюмінесцентно з використанням хемілюмінесцентного субстрата ECL (GE Healthcare).

Активність NF- κ B

Детекція ядерної транслокації NF- κ B проводилась імуногістохімічно за стандартною методикою [Li et al., 2006]. Інкубацію клітин проводили з використанням первинних шурячих анти-людських поліклональних анти NF- κ B p65 антитіл (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) та вторинних анти-шурячих антитіл Alexa 546 (1:3000).

Імунопозитивні клітини ідентифікувались за допомогою Leica TCS SP інвертованого скануючого лазерного конфокального мікроскопа з використанням $\times 40/1.4$ N.A. олійно-імерсійного об'єктива. В кожній експериментальній групі проводили аналіз 8-10 випадково вибраних полів.

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 \pm SD, $p < 0,05$ вважали статистично достовірним.

Результати. Обговорення

Вплив дігксоксину на нирки відбувається шляхом декількох механізмів: покращення гемодинаміки за рахунок вазодилатації, інгібування тубулярної реабсорбції Na⁺, нормалізації здатності нирок до концентрації та розведення сечі, стимуляції секреції передсердного натрійуретичного фактора, корекції апоптозу [Dvela et al., 2007].

Нами проведено дослідження протективних властивостей оуабаїна за умов пошкодження первинної культури проксимально тубулярних клітин норок шурів лінії Sprague-Dawley токсином Шига 2 (Stx2). Токсин Шига 1 (Stx1) та токсин Шига 2 (Stx2) є головними патогенетичними факторами, які призводять до розвитку пошкодження при гемолітико-уремічному синдромі (ГУС) [Noris et al., 2005; Tarr et al., 2005]. Найбільш виражені пошкодження тканин при ГУС відмічаються в нирках Stx2 є первинним вірулентним фактором, під впливом якого розвиваються пошкодження клубочків та каналців нефрона [Noris et al., 2005; Tarr et al., 2005; Siegler et al., 2005].

Оцінка рівня апоптозу проксимально тубулярних клітин нирок шурів після 24 інкубування з Stx2 в концентрації 4 нг/мл та під впливом оуабаїна в концентрації 5 нМ. При впливі на культуру клітин Stx2 виявлено високий рівень апоптозу порівняно з групою контролю (25 \pm 2% проти 4 \pm 0,3%, $p < 0,001$). При одночасному інкубуванні проксимально тубулярних клітин з Stx2 в дозі 4 нг/мл та оуабаїном в концентрації 5 нМ виявлено виражений антиапоптозний ефект (рис. 2).

Мішенню впливу ендогенних стероїдних гормонів,

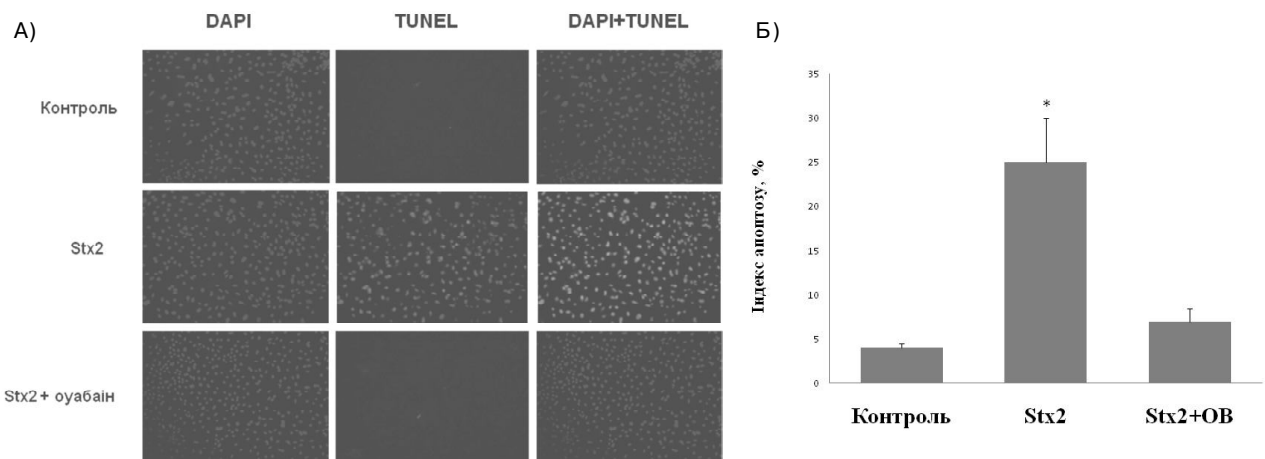


Рис. 2. Антиапоптотний вплив оубаїна на проксимально тубулярних клітинах нирок щурів за умов пошкодження Stx2. А) - імуногістохімічне дослідження культури проксимально тубулярних клітин. Б) - рівень апоптозу в групах досліджуваних клітин. **Примітка.** * - $p < 0,001$.

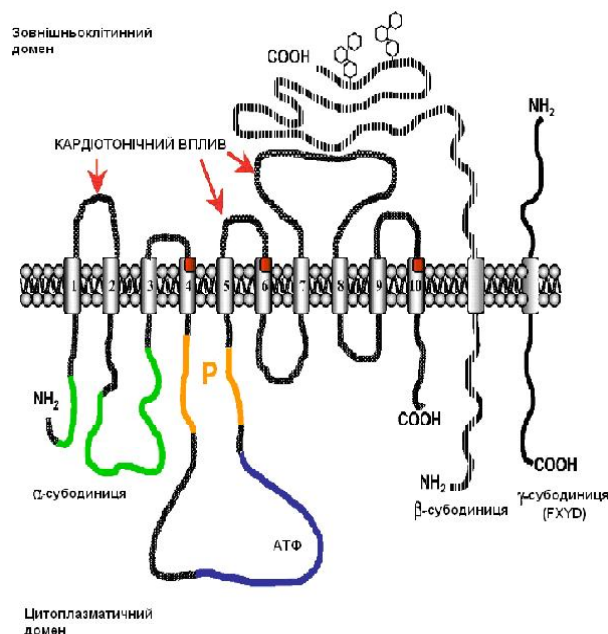


Рис. 3. Структура Na^+/K^+ -АТФази.

в тому числі дигоксина, є Na^+/K^+ [Li et al., 2006]. Na^+/K^+ -АТФаза контролює чисельні клітинні функції - підтримка електричного потенціалу мембрани, що є необхідним для нервової трансмісії, скорочення м'язів, регуляції апоптозу, поділу та диференціювання клітин [Skou et al., 1992; Krupinski et al., 2009; Blanlo et al., 1998]. Na^+/K^+ -АТФаза складається з двох субодиниць - каталітичної з молекулярною масою 110 кДа та глікозилірованої β глікопротеїнової субодиниці молекулярною масою 31,5 кДа [Geering, 2008]. Зв'язуючі сайти Na^+/K^+ -АТФази для іонів натрія, серцевих глікозидів знаходяться на зовнішньоклітинному сегменті (рис. 3).

Відомо 4 ізоформи Na^+/K^+ -АТФази, що відрізняються розташуванням в різних типах тканин та чутливістю до ендогенних стероїдних гормонів. Перша ізоформа

фермента є убівітарною, а найбільша скупченість її виявлена в клітинах нирок [Skou et al., 1992], а друга - експресується в клітинах серця [Krupinski et al., 2009], гладеньких м'язів, мозку, хрящової та кісткової тканини, адипоцитів. Експресія другої ізоформи є інсулін залежною. Третя ізоформа Na^+/K^+ -АТФази експресується в клітинах центральної та периферичної нервової систем, сполучної тканини серця. Четверта ізоформа є специфічною для тестикулярних клітин [Blanco et al., 1998; Geering, 2008; Shamraj et al., 1992].

У тубулярних ниркових клітинах експресія $1/\beta$ ізоформи Na^+/K^+ -АТФази забезпечує реабсорбцію натрія з гломерулярного фільтрата. Ендогенні стероїдні гормони приймають безпосередню участь в регуляції функціонального стану Na^+/K^+ -АТФази нирок [Siegler et al., 2005; Shamraj et al., 1992; Jorgensen et al., 2003]. Зокрема, нами показано, що наномолярні концентрації оубаїна викликають активацію сигнальної функції Na^+/K^+ -АТФази, посилення її взаємодії з інозитол-трифосфатними рецепторами (IP_3R) (рис. 4).

У результаті взаємодії в мікродомени Na,K -АТФаза- IP_3R відбувається активація NF- κB - універсального нуклеарного фактора транскрипції. В цитоплазмі клітини NF- κB знаходиться в неактивному стані в комплексі з інгібіторним білком I κB . При впливі стимулюючих агентів відбувається фосфорилування I- κB та його деградація, що призводить до вивільнення NF- κB та транслокації у ядро [Nakanishi et al., 2005].

Нами показано, що інкубація проксимально тубулярних клітин нирок з оубаїном в наномолярних концентраціях призводить до його нуклеарної транслокації, що забезпечує антиапоптотний ефект у випадку цитотоксичного впливу Stx2 на моделі гемолітико-уремічного синдрому (рис. 5).

Таким чином, ренопротективний вплив ендогенного стероїдного гормону оубаїна за умов виникнення первинних пошкоджень нирок, характерних для ГУС, реалізується за рахунок активації сигнальної функції Na,K -

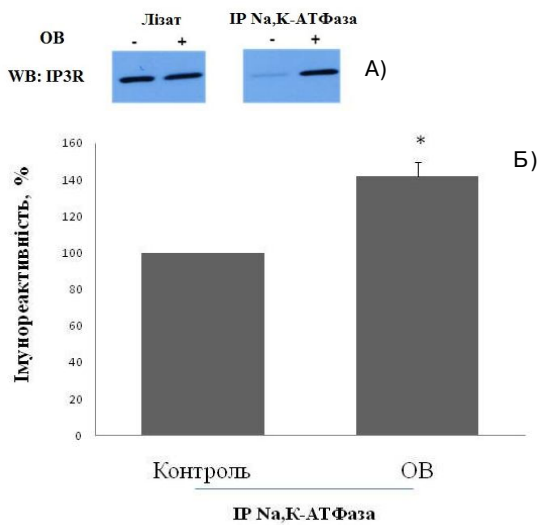


Рис. 4. Вплив оубаїна на сигнальну функцію Na,K-АТФази. А) - імунопреципітація IP₃R та Na,K-АТФази. Б) - імунореактивність IP₃R та Na,K-АТФази (імунореактивність в групі контролю прийнята за 100%). WB - Western Blotting, IP - імунопреципітація.

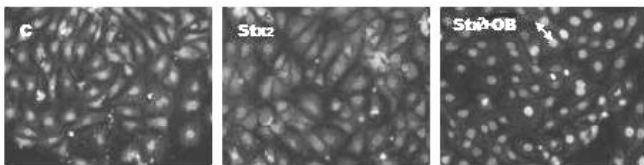


Рис. 5. Вплив оубаїна на функціональний стан NF-κB в проксимально тубулярних клітинах нирок щурів за умов пошкодження Stx2.

АТФази та посилення її взаємодії з рецепторами IP₃R. Використання ендогенних стероїдних гормонів (дигоксин, оубаїн) в клінічній практиці може мати місце при лікуванні як гострих захворювань нирок так і хронічного захворювань нирок (ХЗН). Включення дигоксина та оубаїна в комплексні схеми лікування захворювань нирок є перспективним напрямком для забезпечення нових нефро- та кардіопротективних ефектів.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Токсин Шига 2 (Stx2) при впливі на первинну культуру проксимально тубулярних клітин нирок щурів індукує виникнення апоптозу, що є первинним пошкодженням при гемолітико-уремічному синдромі (ГУС).
 2. Неінгібіторні концентрації оубаїна проявляють виражений антиапоптозний ефект на культурі проксимально тубулярних клітин нирок щурів, що забезпечує попередження первинних пошкоджень нирок при ГУС.
 3. Реалізація антиапоптозної дії оубаїна за умов дії Stx2 відбувається за рахунок активації сигнальної функції Na,K-АТФази, що призводить до посилення взаємодії в мікродомені Na,K-АТФаза/IP₃R та наступної активації редокс-залежного ядерного транскрипційного фактора NF-κB.
- Включення ендогенних стероїдних гормонів (дигоксин, оубаїн) в якості нефро- та кардіопротекторів у комплексні схеми терапії захворювань нирок у дітей дозволить уповільнити прогресування пошкоджень нирок та виникнення серцево-судинних ускладнень.

Література

Bagrov A.Y. Endogenous cardiostimulatory steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets /A.Y.Bagrov, J.I.Shapiro, O.V.Fedorova // Pharmacol. Rev. - 2009. - Vol.61, №1. - P. 9-38.

Blanco G. Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function /G.Blanco, R.W.Mercer //Am. J. Physiol. Renal. Physiol. - 1998. - Vol.275. - P. 633-650.

Dvela M. Diverse biological responses to different cardiostimulatory steroids / M.Dvela, H.Rosen, T.Feldmann [et al.] // Pathophysiology. - 2007. - Vol.14. - P. 159-166.

Dvela M. Diverse biological responses to different cardiostimulatory steroids /M.Dvela, H.Rosen, T.Feldmann // Pathophysiology. - 2007. - Vol.14. - P. 159-166.

Geering K. Functional roles of Na,K-ATPase subunits /K.Geering //Curr Opin Nephrol. Hypertens. - 2008. - Vol.17. - P. 526-532.

Jorgensen P.L. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions /P.L.Jorgensen, K.O.Hakansson, S.J. Karlsh //Ann. Rev. Physiol. - 2003. - Vol.65. - P. 817-849.

Krupinski T. Unexpected roles of the Na-K-ATPase and other ion transporters in cell junctions and tubulogenesis / T.Krupinski, G.J.Beitel //Physiology (Bethesda). - 2009. - Vol.24. - P. 192-201.

Li J. Low doses of ouabain protect from serum deprivation-triggered apoptosis and stimulate kidney cell proliferation via activation of NF-κB /J.Li, S.Zelenin, A.Aperia, O.Aizman //J. Am. Soc. Nephrol. - 2006. - Vol.17. - P. 1848-1857.

Nakanishi C. Nuclear factor-kappaB inhibitors as sensitizers to anticancer drugs /C.Nakanishi, M.Toi //Nat. Rev. Cancer. - 2005. - Vol.5. - P. 297-309.

Noris M. Hemolytic uremic syndrome /M. Noris, G.Remuzzi //J. Am. Soc. Nephrol. - 2005. - Vol.16. - P. 1035-1050.

Schoner W. Endogenous cardiac glycosides: hormones using the sodium pump as signal transducer /W.Schoner, G.Scheiner-Bobis //Semin Nephrol. - 2005. - Vol.25. - P. 343-351.

Shamraj O.I. Characterisation of Na/K-ATPase, its isoforms, and the inotropic response to ouabain in isolated failing human hearts /O.I.Shamraj, I.L.Grupp, G.Grupp [et al.] //Cardiovasc Res. - 1992. - Vol.27. - P. 2229-2237.

Siegler R. Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis, treatment, and outcome /R.Siegler, R.Oakes //Curr Opin Pediatr. - 2005. - Vol.17. - P. 200-204.

Skou J.C., Esmann M. The Na,K-ATPase /J.C.Skou, M.Esmann //J. Bioenerg. Biomembr. - 1992. - Vol.24. - P. 249-261.

Tarr P.I. Shiga-toxin-producing Escherichia coli and haemolytic uraemic syndrome /P.I.Tarr, C.A.Gordon //Lancet. - 2005. - Vol.365. - P. 1073-1086.

НА,К-АТФАЗА-ЗАВИСИМЫЙ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ В АНТИАПОПТОЗНОЙ ЗАЩИТЕ ОУБАИНОМ ПРИ ПЕРВИЧНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЯХ ПОЧЕК В УСЛОВИЯХ ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКОГО СИНДРОМА
 Бурлака Е.А.

Резюме. В статье представлены результаты исследований молекулярных механизмов ренопротективной функции оубаина в условиях первичных тубулярных повреждений почек под влиянием токсина Шига 2 (Stx2). Показано, что защитное влияние оубаина реализуется за счет активации сигнальной функции Na,K-АТФазы и усиления межмолекулярных взаимодействий в микродомене Na,K-АТФаза-IP₃R, что приводит к активации нуклеарного транскрипционного фактора NF-κB. Конечным результатом реализации активации сигнального пути является снижение уровней апоптоза, - как первичного нарушения при повреждении почек в условиях гемолитико-уремического синдрома (ГУС). Включение эндогенных стероидных гормонов (дигоксин, оубаин) в схемы лечения заболеваний почек у детей позволит предупредить возникновение и прогрессирование сердечно-сосудистых осложнений за счет их кардиопротективных свойств и обеспечит нефропротективный эффект.

Ключевые слова: оубаин, гемолитико-уремический синдром, апоптоз, Na,K-АТФаза, NF-κB.

NA,K-ATPASE-DEPENDENT SIGNALING PATHWAY IN ANTIAPOPTOTIC DEFENCE PROVIDED BY OUABAIN UNDER PRIMARY KIDNEY DAMAGE DURING HEMOLYTIC UREMIC SYNDROME

Burlaka E.A.

Summary. We report our findings about molecular mechanisms of renoprotective function of the ouabain under conditions of primary renal tubular damage caused by Shiga toxin 2 (Stx2). We have shown that protective effect of ouabain realized due to activation of signaling function of the Na,K-ATPase resulting in enhanced intramolecular interaction in microdomen Na,K-ATPase-IP₃R, leading to activation of the nuclear transcriptional factor NF-κB. Downstream effect of this signaling pathway leads to reduction of the apoptosis level - as a primary event in kidney damage during hemolytic uremic syndrome (HUS). Inclusion of endogenous steroid hormones (digoxin, ouabain) in the treatment schemes of kidney diseases in pediatric practice could serve to prevent progression of cardiovascular complications due to their cardioprotective properties and may provide nephroprotective effect.

Key words: ouabain, hemolytic uremic syndrome, apoptosis, Na,K-ATPase, NF-κB.
