

ДИКЛОФЕНАК МОДУЛИРУЕТ ТРАНСЭПИТЕЛИАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТ Na⁺ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ

Мельницкая А.В.¹, Крутецкая З.И.¹, Антонов В.Г.², Крутецкая Н.И.¹,
Бадюлина В.И.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет
Университетская наб., 7/9, 199034, г. Санкт-Петербург, РФ; e-mail: avmelnitskaya@yandex.ru

² Военно-Медицинская академия им. С.М. Кирова
ул. Академика Лебедева, 6, 194044, г. Санкт-Петербург, РФ.
Поступила в редакцию: 05.07.2021

Аннотация. Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов трансэпителиального транспорта ионов. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевого пузыря амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев, что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов транспорта воды и ионов в клетках почки. Арахидоновая кислота (АК) и ее метаболиты выступают в качестве сигнальных молекул, участвующих в процессах внутри- и внеклеточной сигнализации, и обладающих широким спектром физиологических и патологических эффектов. В почках и других реабсорбирующих эпителиях, в том числе в эпителии кожи лягушки, АК и ее производные участвуют в регуляции транспорта ионов и воды. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможную роль циклооксигеназного пути окисления АК в регуляции транспорта Na⁺ в коже лягушки. В экспериментах использовали неселективный ингибитор циклооксигеназы – производное фенилуксусной кислоты – диклофенак, широко применяющийся в клинической практике в качестве нестероидного противовоспалительного средства. С использованием метода фиксации потенциала впервые на эпителии кожи лягушки показано, что диклофенак (25 мкг/мл) подавляет транспорт Na⁺. Степень ингибирующего действия диклофенака на транспорт Na⁺ различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи. Результаты, полученные нами в настоящей работе и ранее, свидетельствуют об участии циклооксигеназы и/или продуктов циклооксигеназного пути окисления АК в регуляции транспорта Na⁺ в эпителии кожи лягушки.

Ключевые слова: кожа лягушки, трансэпителиальный транспорт Na⁺, диклофенак, циклооксигеназы.

ВВЕДЕНИЕ

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов трансэпителиального транспорта ионов. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевого пузыря амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев, что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов транспорта воды и ионов в клетках почки [1]. Транспорт Na⁺ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие Na⁺-транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки. Белковые компоненты этой системы являются мишенью для действия широкого спектра гормонов и фармакологических агентов.

Арахидоновая кислота (АК) и ее метаболиты выступают в качестве сигнальных молекул, участвующих в процессах внутри- и внеклеточной сигнализации, и обладающих широким спектром физиологических и патологических эффектов [2]. Выделяют три основных пути метаболизма арахидоновой кислоты: циклооксигеназный, липоксигеназный и эпоксигеназный (цитохром P-450-зависимый). Известно, что в почках и других реабсорбирующих эпителиях, в том числе в эпителии кожи лягушки, АК и ее производные (преимущественно продукты циклооксигеназного пути окисления АК – простагландины) участвуют в регуляции транспорта ионов и воды [3]. В коже лягушки простагландины стимулируют трансэпителиальный транспорт Na⁺, усиливают секрецию ионов K⁺ и увеличивают проницаемость апикальной мембраны для воды [3]. Установлено, что многие ионные каналы, в том числе амилорид-чувствительные эпителиальные Na⁺-каналы (ENaC), играющие ключевую роль в транспорте Na⁺ через реабсорбирующие эпителии, являются мишенями как для самой АК, так и для ее метаболитов [4-6]. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможную роль циклооксигеназного пути окисления АК в регуляции транспорта Na⁺ в коже лягушки. В экспериментах использовали неселективный ингибитор циклооксигеназы – производное фенилуксусной кислоты – диклофенак, широко применяющийся в клинической практике в качестве нестероидного противовоспалительного средства.

МЕТОДИКА

Эксперименты 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) с диаметром внутреннего отверстия 12 мм. Камеру заполняли раствором Рингера для холоднокровных, содержащим (в мМ): 110 NaCl, 2,5 KCl, 3 CaCl₂, 5 Tris HCl, pH 7,4. Опыты проводили при комнатной температуре (22–23 °C).

Для измерения электрических параметров кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрации вольт-амперных характеристик. Для измерения вольт-амперных характеристик на кожу подавали линейно изменяющееся напряжение (ramp) со скоростью 20 мВ/с. В интервалах между измерениями вольт-амперных характеристик трансэпителиальный потенциал (V_T) кожи поддерживали при 0 мВ (режим короткого замыкания) или при потенциале открытой цепи V_{OC} ($V_{OC} = V_T$ при трансэпителиальном токе $I_T = 0$). Из вольт-амперных характеристик определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания I_{SC} ($I_{SC} = I_T$ при $V_T = 0$), V_{OC} и трансэпителиальную проводимость g_T .

Транспорт Na^+ оценивали как амилорид-чувствительный I_{SC} . В связи с этим, в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ). Известно, что в концентрациях 20 – 100 мкМ амилорид избирательно блокирует ENaC [7].

Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Статистический анализ проводили с применением t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде $x \pm s_x$. На рисунках приведены результаты типичных экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляют: $I_{SC} = 13,18 \pm 2,14$ мкА; $V_{OC} = -28,35 \pm 4,94$ мВ; $g_T = 0,51 \pm 0,08$ мСм.

Впервые показано, что диклофенак подавляет транспорт Na^+ в коже лягушки. Обнаружено также, что ингибирующее влияние диклофенака на транспорт Na^+ больше выражено при приложении агента со стороны базолатеральной поверхности кожи. В среднем (по результатам 10 экспериментов), после обработки кожи лягушки диклофенаком (25 мкг/мл) в течение 70 ± 10 мин I_{SC} уменьшается на $25,34 \pm 4,92$ или на $53,45 \pm 8,35$ %, V_{OC} уменьшается на $12,13 \pm 2,98$ или на $58,34 \pm 11,25$ %, а g_T уменьшается на $15,05 \pm 2,09$ или увеличивается на $15,41 \pm 4,32$ %, при приложении диклофенака со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Известно, что в почках и других реабсорбирующих эпителиях, АК и ее производные участвуют в регуляции транспорта ионов и воды. Так, в культуре клеток кортикальных собирательных трубочек почки мыши показано, что ингибиторы циклооксигеназ диклофенак и ибупрофен подавляют I_{SC} и модулируют активность ENaC [6]. Результаты, представленные в настоящей работе, согласуются также с данными, полученными нами ранее при сравнительном исследовании влияния на транспорт Na^+ в коже лягушки трех структурно различных ингибиторов циклооксигеназ. Ранее нами было показано, что обработка кожи мелоксикамом, индометацином или ацетилсалициловой кислотой (аспирином) существенно снижает базальный уровень транспорта Na^+ в эпителии кожи лягушки [8].

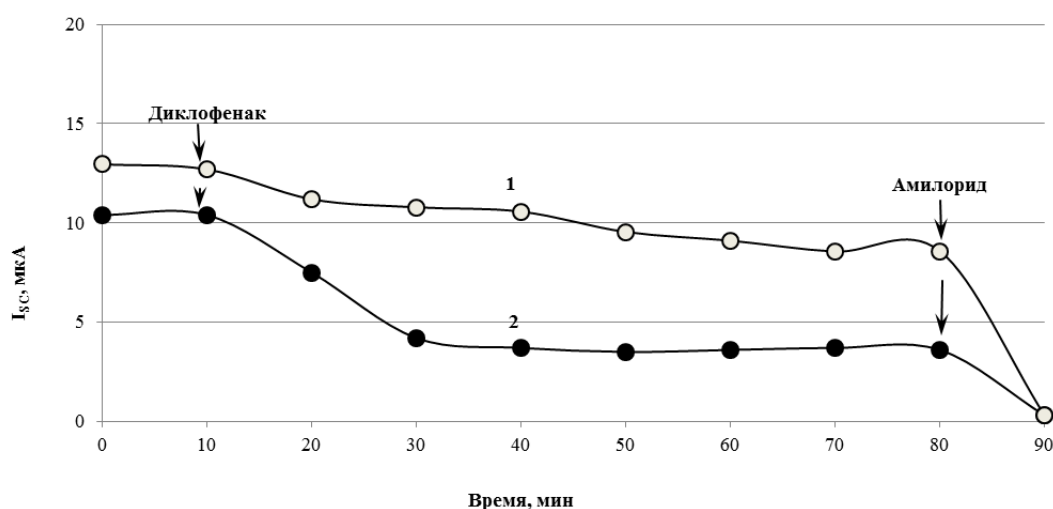


Рисунок 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{SC} через кожу лягушки в ответ на действие диклофенака. (1) – I_{SC} после добавления 25 мкг/мл диклофенака к апикальной поверхности кожи; (2) – I_{SC} после добавления 25 мкг/мл диклофенака к базолатеральной поверхности кожи. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных Na^+ -каналов (ENaC) амилорид (20 мкМ)

Полученные нами результаты свидетельствуют также о том, что степень ингибирующего действия диклофенака на транспорт Na^+ различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи (рисунок 1). Можно предположить, что влияние ингибитора циклооксигеназ диклофенака на транспорт Na^+ в коже лягушки осуществляется при участии различных белковых и липидных сигнальных комплексов, ассоциированных с апикальным и базолатеральными доменами поляризованных эпителиальных клеток.

Известно, что транспорт Na^+ в эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие многочисленные Na^+ -транспортирующие белки (ENaC, Na^+ - K^+ -АТФазы и Na^+ / H^+ -обменники), локализованные в различных мембранах клетки. Добавление блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, вызывало полное подавление транспорта Na^+ , что указывает на то, что влияние диклофенака на транспорт Na^+ связано, в основном, с модуляцией активности ENaC.

Полученные нами результаты могут представлять интерес в связи с данными литературы о способности ингибиторов циклооксигеназ модулировать активность протонактивируемых ионных каналов (ASICs) – одного из представителей суперсемейства Deg/ENaC, к которому принадлежат и ENaC, играющие ключевую роль в транспорте Na^+ в реабсорбирующих эпителиях. Недавно было обнаружено, что нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), помимо их хорошо известной способности ингибировать синтез простагландинов, снижают экспрессию ASIC и подавляют их активность [9,10]. В экспериментах на изолированных интернейронах гиппокампа и на рекомбинантных ASIC, экспрессируемых в клетках яичника китайского хомячка (CHO), было показано, что диклофенак и ибупрофен аллостерически подавляли ASIC-каналы, уменьшая максимальный индуцированный протонами ток и замедляя десенсibilизацию [10]. Таким образом, результаты подобных экспериментов свидетельствуют о том, что НПВП могут служить нейротропными средствами при патологических состояниях, связанных с подкислением.

Таким образом, результаты, полученные нами в настоящей работе и ранее, свидетельствуют об участии циклооксигеназ и/или продуктов циклооксигеназного пути окисления АК в регуляции транспорта Na^+ в эпителии кожи лягушки. Полученные нами данные о влиянии диклофенака на трансэпителиальный транспорт Na^+ способствуют более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия производных фенилуксусной кислоты, широко применяемых в клинической практике в качестве противовоспалительных, анальгезирующих и жаропонижающих средств.

Работа выполнена в рамках плановых тем Кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного университета и Кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики Военно-Медицинской академии им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург), а также Договора на выполнение научно-исследовательских работ № 05/03-20.

Список литературы / References:

1. Наточин Ю.В. *Основы физиологии почки*. Л.: Наука, 1982, 184 с. [Natochin, Yu.V. *Fundamentals of kidney physiology*. L.: Nauka, 1982, 184 p. (In Russ.)]
2. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С. *Механизмы внутриклеточной сигнализации*. СПб.: Изд. СПбГУ, 2003, 208 с. [Krutetskaya, Z.I., Lebedev, O.E., Kurilova, L.S. *Mechanisms of intracellular signalling*, SPb.: Saint-Petersburg State University, 2003, 208 p. (In Russ.)]
3. Els W.J., Helman S.H. Dual role of prostaglandins (PGE_2) in regulation of channel density and open probability of epithelial Na^+ channels in frog skin (*R. pipiens*). *J. Membr. Biol.*, 1997, vol. 155, pp. 75-87.
4. Ordway R.W., Singer J.J., Walsh J.V., Jr. Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Neurosci.*, 1991, vol. 14, pp. 96-100. DOI: 10.1016/0166-2236(91)90069-7
5. Meves H. Arachidonic acid and ion channels: an update. *Br. J. Pharmacol.*, 2008, vol. 155, pp. 4-16. DOI: 10.1038/bjp.2008.216.
6. Pavlov T.S., Platovskaya D., Levchenko V., Mattson D.L., Roman R.J., Staruschenko A. Effects of cytochrome P-450 metabolites of arachidonic acid on the epithelial sodium channel (ENaC). *Am. J. Physiol.*, 2011, vol. 301, pp. F672-F681. DOI: 10.1152/ajprenal.00597.2010
7. Bentley P.J. Amiloride: a potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder. *J. Physiol.*, 1968, vol. 195, pp. 317-330. DOI: 10.1113/jphysiol.1968.sp008460
8. Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. Nonsteroidal anti-inflammatory analgesic meloxicam modulates the effect of glutoxim on Na^+ transport in frog skin. In: *«Translation approaches to cause-oriented treatment of pain symptoms»*, St. Petersburg, 2012, pp. 20-21.
9. Voilley N., de Weille J., Mamet J., Lazdunski M. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. *J. Neurosci.*, 2001, vol. 21, pp. 8026-33. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-20-08026.2001.
10. Dorofeeva N.A., Barygin O.I., Staruschenko A., Bolshakov K.V., Magazanik L.G. Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons. *J. Neurochem.*, 2008, vol. 106, pp. 429-441. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05412.x

DICLOFENAC MODULATES TRANSEPITHELIAL Na⁺ TRANSPORT IN FROG SKIN**Melnitskaya A.V.¹, Krutetskaya Z.I.¹, Antonov V.G.², Krutetskaya N.I.¹, Badulina V.I.¹**¹ Saint-Petersburg State University*Universitetskaya emb., 7/9, Saint-Petersburg, 199034, Russia*² Kirov Medical Academy*Lebedeva str., 6, Saint-Petersburg, 194044, Russia; e-mail: avmelnitskaya@yandex.ru*

Abstract. The skin of amphibians and other isolated epithelial systems are classical model objects for studying transepithelial ion transport mechanisms. In terms of their ability to transport electrolytes and their response to certain hormones, the skin and bladder of amphibians are similar to the distal renal tubules, which makes it possible to use the data obtained on these objects to elucidate the mechanisms of water and ion transport in kidney cells. Arachidonic acid (AA) and its metabolites act as signaling molecules involved in the processes of intra- and intercellular signaling, and have a wide range of physiological and pathological effects. In the kidneys and other reabsorbing epithelium, including the frog skin epithelium, AA and its derivatives are involved in ion and water transport regulation. In this regard, it seemed appropriate to investigate the possible role of the cyclooxygenase pathway of AA oxidation in Na⁺ transport regulation in frog skin. In experiments we used a non-selective cyclooxygenase inhibitor diclofenac, a derivative of phenylacetic acid, which is widely used in clinical practice as a non-steroidal anti-inflammatory drug. Using voltage-clamp technique, we have shown for the first time on the frog skin epithelium that diclofenac (25 µg/ml) inhibits Na⁺ transport. The degree of diclofenac inhibitory effect on Na⁺ transport differs depending on the application of the agent from the apical or basolateral skin surface. The results obtained in this work and earlier indicate the involvement of cyclooxygenases and / or products of the cyclooxygenase pathway of AA oxidation in Na⁺ transport regulation in frog skin epithelium.

Key words: *frog skin, transepithelial Na⁺ transport, cyclooxygenase, diclofenac.*