

ЦИСТАМИН И ЦИСТИН ПОДАВЛЯЮТ ТРАНСПОРТ Na^+ В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ 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, г. Санкт-Петербург, 199033, РФ; e-mail: avmelnitskaya@yandex.ru

² Военно-Медицинская академия им. С.М. Кирова

ул. Академика Лебедева, 6, г. Санкт-Петербург, 194044, РФ

Поступила в редакцию 23.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0543

Аннотация. Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов трансэпителиального транспорта ионов. 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 могут являться мишенью для окислительного стресса. В то же время, влияние окислителей и восстановителей на транспорт Na^+ в нативных эпителиальных системах, таких как эпителий кожи лягушки, практически не изучено. С помощью метода фиксации потенциала исследовано влияние дисульфидсодержащих окисляющих агентов цистина и цистамина на транспорт Na^+ в коже лягушки. Впервые показано, что обработка кожи лягушки *Rana temporaria* цистамином или цистином в концентрации 10 мкг/мл снижает трансэпителиальный транспорт Na^+ . Обнаружено также, что предварительная инкубация с дитиотреитолом, восстанавливающим дисульфидные связи в белках, предотвращает ингибирующий эффект цистамина и цистина. Полученные результаты свидетельствуют о том, что транспорт Na^+ в коже лягушки чувствителен к окислительному стрессу и модулируется дисульфидсодержащими окисляющими агентами, такими как цистамин или цистин, а также о том, что влияние цистамина и цистина на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки опосредовано их взаимодействием с функционально важными остатками цистеина Na^+ -транспортирующих белков.

Ключевые слова: транспорт Na^+ , цистамин, цистин, дитиотреитол, эпителий кожи лягушки.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование механизмов трансэпителиального транспорта веществ является интенсивно развивающимся направлением современной биофизики, физиологии и медицины. Для практической медицины большой интерес имеет изучение транспорта ионов в почке, являющейся уникальным органом по разнообразию, интенсивности и избирательности транспортных процессов, а также по многообразию механизмов их селективного регулирования. Классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны являются кожа и мочевого пузырь амфибий. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевого пузырь амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев, что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов трансэпителиального транспорта воды и ионов в клетках почки [1].

Транспорт Na^+ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие различные Na^+ -транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки, которые являются мишенью для окислительного стресса. В реабсорбирующих эпителиях ключевую роль в транспорте Na^+ играют амилорид-чувствительные эпителиальные Na^+ -каналы (ENaC). Многочисленные остатки цистеина, локализованные в различных сегментах ENaC, определяют его редокс-чувствительность и являются мишенью для внутри- и внеклеточных окисляющих и восстанавливающих агентов [2,3]. Внеклеточные фрагменты ENaC содержат CRD1 и CRD2 домены, богатые остатками цистеина, которые являются высококонсервативными среди членов семейства дегенерины/ENaC. Эти внеклеточные цистеиновые остатки, вероятно, участвуют в образовании дисульфидных связей, важных для правильного фолдинга белка [3] и транслокации каналов к плазмалемме [2,3]. Трансмембранные сегменты и N- и C-терминальные фрагменты α , β и γ субъединиц ENaC также содержат остатки цистеина, которые доступны для окисляющих и восстанавливающих агентов со стороны цитозоля [4]. Согласно двухмембранной модели активного транспорта Na^+ эпителиальными клетками, предложенной Кефед-Джонсеном и Уссингом, Na^+ удаляется из клетки при помощи Na^+/K^+ -АТФазы, локализованной во внутренней (базолатеральной или серозной) мембране эпителиальных клеток [5]. Na^+/K^+ -АТФаза, как и другие ион-транспортирующие системы, чувствительна к действию окисляющих и восстанавливающих агентов [6]. Однако, большая часть данных о редокс-регуляции Na^+/K^+ -АТФазы получена для очищенного фермента или ферментного комплекса, экспрессированного в гетерологичных системах. В то же время, влияние окислителей и восстановителей на транспорт Na^+ в нативных эпителиальных системах, таких как эпителий кожи лягушки, практически не изучено.

Дисульфидсодержащие агенты цистин (цистеин дисульфид) и цистамин (цистинамин) – важные внутриклеточные антиоксиданты и радиопротекторы [7-9]. Цистин (цистеина дисульфид) является важным антиоксидантом. Увеличение внутриклеточной концентрации цистина наблюдается при наследственном аутосомно-рецессивном лизосомальном заболевании цистинозе, при котором нарушаются функции почек [7,9]. Цистамин (цистинамин) – радиопротекторное средство, повышает устойчивость организма к воздействию ионизирующей радиации. Кроме того, цистамин действует как антиоксидант и используется в терапии нейродегенеративного заболевания – болезни Хантингтона (Huntington's disease) [8,9]. В связи с этим, целью настоящего исследования являлось изучение влияния дисульфидсодержащих окисляющих агентов цистамина и цистина на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки.

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 конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ).

Использовали реактивы фирмы Sigma (США. Для восстановления дисульфидных связей в молекулах белков использовали (2S,3S)-1,4-бис(сульфанил)бутан-2,3-диол – дитиотреитол (ДТТ). ДТТ добавляли за 20 мин до введения в раствор цистамина или цистина.

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: $I_{SC} = 13,57 \pm 2,28$ мкА; $V_{OC} = -37,88 \pm 1,94$ мВ; $g_T = 0,36 \pm 0,01$ мСм.

Показано, что обработка кожи лягушки дисульфидсодержащими окисляющими агентами цистином и цистамином снижает транспорт Na^+ в коже лягушки (табл. 1, рис. 1).

Стрелками обозначено уменьшение (\downarrow) значений электрических характеристик кожи после приложения цистамина или цистина по сравнению с контролем. Для каждой серии экспериментов n (число измерений) = 10.

Полученные данные свидетельствуют также о том, что степень и кинетика ингибирующего действия цистамина и цистина на транспорт Na^+ различается в зависимости от приложения агентов со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи и более выражено при приложении агентов со стороны апикальной поверхности кожи (табл. 1, рис. 1). Можно предположить, что влияние цистамина и цистина на транспорт Na^+ в коже лягушки осуществляется при участии различных белковых и липидных сигнальных комплексов, ассоциированных с апикальным и базолатеральным доменами поляризованных эпителиальных клеток.

Наиболее вероятно, что действие дисульфидсодержащих агентов на транспорт Na^+ в коже лягушки связано с их способностью взаимодействовать с функционально значимыми остатками цистеина Na^+ -транспортирующих

Таблица 1. Влияние цистамина и цистина на электрические характеристики кожи лягушки

Вещество, концентрация	Электрические характеристики кожи лягушки	Изменения электрических характеристик после приложения дисульфидсодержащих окислителей к апикальной поверхности кожи лягушки, %	Изменения электрических характеристик после приложения дисульфидсодержащих окислителей к базолатеральной поверхности кожи лягушки, %
<u>Цистамин</u> , 10 мкг/мл	I_{SC}	$\downarrow 38,54 \pm 9,34$	$\downarrow 16,23 \pm 1,87$
	V_{OC}	$\downarrow 40,05 \pm 11,03$ %	$\downarrow 19,48 \pm 2,36$
	g_T	$\downarrow 2,34 \pm 0,15$	$\downarrow 2,51 \pm 0,12$
<u>Цистин</u> , 10 мкг/мл	I_{SC}	$\downarrow 48,34 \pm 12,26$	$\downarrow 12,86 \pm 3,05$
	V_{OC}	$\downarrow 45,11 \pm 9,64$	$\downarrow 12,23 \pm 3,77$
	g_T	$\downarrow 3,24 \pm 0,18$	$\downarrow 1,94 \pm 0,08$

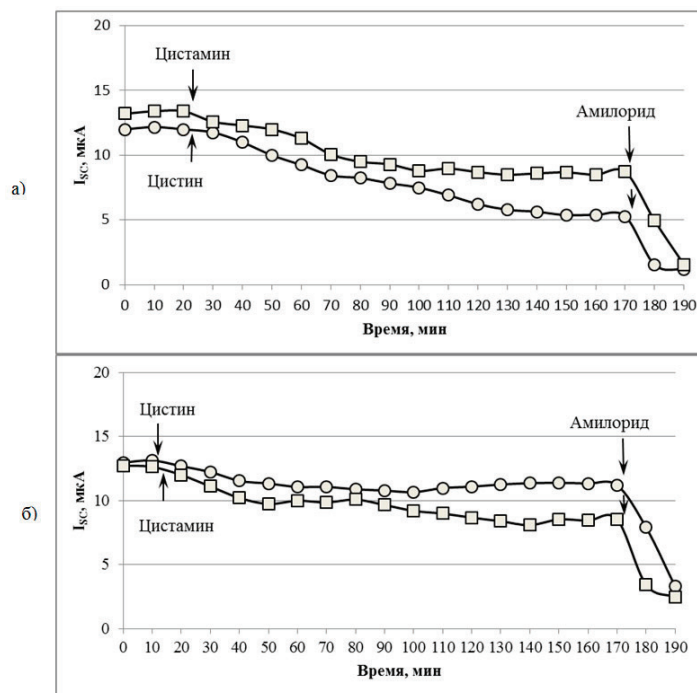


Рисунок 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{sc} через кожу лягушки в ответ на действие цистина или цистамина в концентрации 10 мкг/мл при приложении дисульфидсодержащих окислителей к апикальной (а) или базолатеральной (б) поверхности кожи

белков. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать влияние дитиотреитола (ДТТ), восстанавливающего дисульфидные связи в белках, на эффект цистина и цистамина на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. Обнаружено, что предварительная обработка кожи лягушки в течение 20 мин ДТТ в концентрации 1 мМ, существенно снижает ингибирующее действие цистина и цистамина на трансэпителиальный транспорт Na^+ (табл. 2, рис. 2). Это свидетельствует о том, что влияние цистамина или цистина на транспорт Na^+ опосредовано взаимодействием этих окисляющих агентов с функционально важными остатками цистеина транспортных или регуляторных белков, участвующих в транспорте Na^+ в коже лягушки.

В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных Na^+ -каналов (ENaC) амилорид (20 мкМ).

Известно, что ключевые Na^+ -транспортирующие белки (ENaC, Na^+ - K^+ -АТФазы и Na^+ / H^+ -обменники) содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенями для действия внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей [2-4]. Однако добавление блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, вызывало полное подавление транспорта Na^+ (рис. 1, 2). Кроме того, полученные нами результаты о том, что ингибирующий эффект цистамина и цистина значительно менее выражен при приложении агентов со стороны базолатеральной поверхности кожи,

Таблица 2. Влияние цистамина и цистина на электрические характеристики кожи лягушки, предварительно обработанной 1 мМ ДТТ

Вещество, концентрация	Электрические характеристики кожи лягушки	Изменения электрических характеристик после приложения дисульфидсодержащих окислителей к апикальной поверхности кожи лягушки, %	Изменения электрических характеристик после приложения дисульфидсодержащих окислителей к базолатеральной поверхности кожи лягушки, %
Cистамин, 10 мкг/мл	I_{sc}	↓ 8,24 ± 2,35	↓ 5,32 ± 1,48
	V_{oc}	↓ 10,12 ± 3,96	↓ 8,04 ± 1,16
	g_T	—	↓ 1,63 ± 0,08
Cистин, 10 мкг/мл	I_{sc}	↓ 15,12 ± 6,32	↓ 9,21 ± 3,12
	V_{oc}	↓ 17,29 ± 8,11	↓ 12,34 ± 3,79
	g_T	—	↓ 1,87 ± 0,09

Стрелками обозначено уменьшение (↓) значений электрических характеристик кожи после приложения цистамина или цистина по сравнению с контролем. Для каждой серии экспериментов n (число измерений) = 10

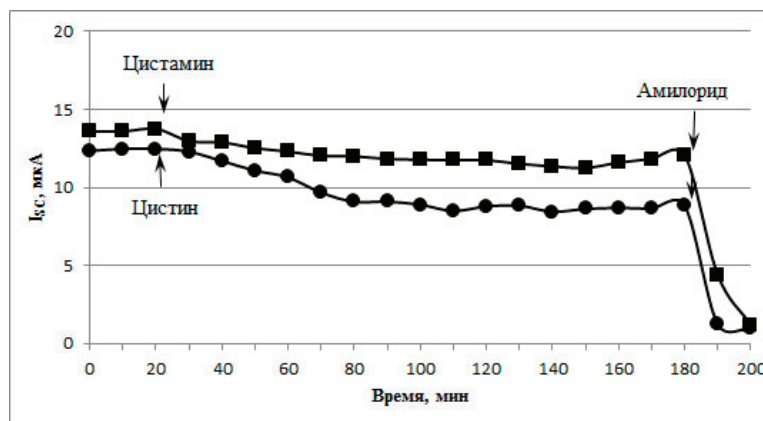


Рисунок 2. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{sc} через кожу лягушки в ответ на действие цистина или цистамина в концентрации 10 мкг/мл при приложении дисульфидсодержащих окислителей к апикальной поверхности кожи, предварительно обработанной в течение 20 мин дитиотрептолом (ДТТ) в концентрации 1 мМ

также свидетельствуют о том, что основные мишени для действия цистамина и цистина на транспорт Na^+ локализованы именно в апикальных, а не в базолатеральных мембранах клеток эпителия кожи лягушки. Наиболее вероятно предположить, что эффект цистамина и цистина на транспорт Na^+ обусловлен, в основном, модуляцией активности ENaC, экспрессируемых в апикальных мембранах полярных клеток эпителия.

В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных Na^+ -каналов (ENaC) амилорид (20 мкМ). Сходные данные были получены при приложении дисульфидсодержащих окислителей к базолатеральной поверхности кожи, предварительно обработанной ДТТ (табл. 2).

По-видимому, исследуемые дисульфидсодержащие соединения – цистамин и цистин, приложенные со стороны апикальной поверхности кожи, взаимодействуют с богатыми цистеином экстраклеточными доменами ENaC (CRD₁ и CRD₂), что приводит к ингибированию активности ENaC и подавлению транспорта Na^+ в коже лягушки.

Кроме того, цистин и цистамин могут также проникать в эпителиальные клетки. Цистамин, будучи незаряженным, хорошо проникает через мембрану. Цистин может транспортироваться в клетку с участием гетеромерных переносчиков аминокислот: $b^{0,+}$ переносчика, обнаруженного в апикальной мембране эпителиальных клеток, или в результате обращенного режима работы переносчика LAT2/4F2hc, локализованного в базолатеральной мембране эпителиальных клеток [10]. Таким образом, ингибирующее влияние цистина и цистамина на транспорт Na^+ , по-видимому, является результатом сочетанного действия этих дисульфидсодержащих агентов как на экстраклеточные, так и на расположенные со стороны цитозоля функционально важные остатки цистеина ENaC и/или других Na^+ -транспортирующих белков.

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Обнаружено, что ENaC лягушки *X. laevis*, крысы и человека, экспрессированные в ооцитах *Xenopus*, быстро и обратимо ингибируются внутриклеточными агентами, окисляющими SH-группы остатков цистеина: производными метантиосульфата (0,1–0,5 мМ) [4, 11], катионами металлов (500 мкМ Cd^{2+} или 500 мкМ Zn^{2+}), а также Cu^{2+} фенантролином $Cu(Phe)_3$, мягким окисляющим агентом, который способствует образованию S-S связей [4]. С использованием метода пэтч-клэмп показано, что эти окисляющие агенты ингибируют активность ENaC, вызывая длительные закрытия канала, что свидетельствует о влиянии на воротный механизм каналов. Амплитуда токов через одиночные каналы при этом не изменяется. Восстанавливающий агент 10 мкМ ДТТ практически полностью обращает ингибирующее действие всех тиол-модифицирующих соединений [4].

Эти данные убедительно показывают, что ENaC чувствительны к изменению редокс-состояния цитозоля и что изменение внутриклеточного редокс-потенциала может регулировать транспорт Na^+ в эпителиальных системах. Физиологическую значимость модуляции ENaC и других Na^+ -транспортирующих белков внутриклеточными остатками цистеина еще предстоит установить. Однако уже сейчас ведется интенсивный поиск и разработка новых и эффективных средств модуляции активности таких белков различными окислительно-восстановительными и сульфгидрильными реагентами.

Интересные данные были получены при исследовании влияния чеснока (*Allium sativu*) и его характерных сероорганических соединений на активность ENaC. Обнаружено, что экстракт чеснока дозозависимо ингибирует ENaC человека, гетерологически экспрессируемых в ооцитах *Xenopus*. Действие экстракта чеснока блокировалось ДТТ и L-цистеином, что указывает на участие тиол-реактивных соединений [12]. В дальнейшем было установлено, что ингибирующий эффект экстракта чеснока связан с наличием в нем тиол-реактивного соединения - аллицина, который в концентрации 100 мкМ снижал активность ENaC на 77%. Предполагается, что эффект аллицина может быть обусловлен как непосредственным взаимодействием этого тиол-реактивного соединения с цистеиновыми остатками ENaC, изменяющими активность канала, так и за счет модификации аллицином различных сигнальных белков или ферментов, которые, в свою очередь, модулируют активность

ENaC, что хорошо согласуется с медленной кинетикой действия экстракта чеснока на ENaC. Так, известно, что модификация остатков цистеина аллицином ингибирует активность некоторых ферментов, таких как цистеиновые протеазы [13].

Известно, что протеолитический процессинг ENaC различными протеазами важен для активации канала [14,15]. Неадекватная активация ENaC протеазами может способствовать патофизиологии муковисцидоза и может быть связана с задержкой натрия и патогенезом артериальной гипертензии при почечной недостаточности. Протеазы активируют ENaC, расщепляя специфические сайты во внеклеточных доменах α -, γ - и δ -субъединицы, но не β -субъединицы [14]. Также сообщалось, что протеазы могут косвенно влиять на активность ENaC [16]. Помимо сериновых протеаз, в протеолитической активации ENaC могут участвовать и другие группы протеаз, в том числе, металлопротеиназы [17] и катепсиновые протеазы [18].

Как известно, протеазы классифицируют в соответствии с их каталитическим активным центром на шесть групп: аспаргатные, глутаминовые, металло-, сериновые, треониновые и цистеиновые протеазы. Цистеиновые протеазы, такие как катепсины, играют важную роль в различных воспалительных/иммунных заболеваниях и обладают широким спектром (пато-)физиологических эффектов [19]. Как правило, цистеиновые протеазы секретируются макрофагами и эпителиальными клетками при травмах и заболеваниях. Например, катепсиновая протеаза Cat-S экспрессируется в почках, селезенке, лимфатических узлах и легких [20], а также антигенпрезентирующими клетками и макрофагами, что обеспечивает ее секрецию в широком диапазоне различных тканей и органов [21].

Обнаружено, что Cat-S активирует токи через ENaC в ооцитах, экспрессирующих $\alpha\beta\gamma$ -ENaC человека и в культуре клеток собирательных трубочек мыши M-1 [18]. Приложение Cat-S (2 мкМ) со стороны апикальной поверхности приводило к устойчивому увеличению чувствительного к амилориду I_{sc} , в среднем, на 24%, что свидетельствует о том, что Cat-S может стимулировать ENaC-опосредованный трансэпителиальный транспорт натрия в дифференцированных почечных эпителиальных клетках. Предполагается, что цистеиновая протеаза Cat-S активирует ENaC, скорее всего, путем протеолитического расщепления ее γ -субъединицы на поверхности клетки. Таким образом, стимуляция ENaC локально высвобождаемым Cat-S может играть патофизиологическую роль при самых различных воспалительных заболеваниях, например, при колите или нефрите.

Как уже упоминалось нами ранее, дисульфидсодержащие окисляющие агенты, в том числе, цистамин, широко используются в терапии нейродегенеративных заболеваний, например, болезни Хантингтона [7,9]. В данном случае, в основе терапевтического эффекта цистамина лежит его способность ингибировать некоторые тиолзависимые ферменты, такие как трансклутаминазы [22] или цистеиновые протеазы – каспазы [7]. В связи с этим, можно предположить, что эффект цистамина и цистина на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки также может быть опосредован модуляцией этими тиол-реактивными соединениями активности некоторых ферментов, таких как, например, протеазы, которые в свою очередь, влияют на активность широкого спектра Na^+ -транспортирующих белков.

Таким образом, в настоящей работе впервые исследовано влияние дисульфидсодержащих окисляющих агентов цистина и цистамина на транспорт Na^+ в коже лягушки. Нами показано, что транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки чувствителен к окислительному стрессу и модулируется дисульфидсодержащими окисляющими агентами, такими как цистамин и цистин. Обнаружено, что дисульфидсодержащие окисляющие агенты, приложенные со стороны апикальной поверхности кожи, существенно подавляют транспорт Na^+ , при этом наибольшее ингибирующее действие на транспорт Na^+ оказывает цистин. Цистин и цистамин, добавленные со стороны базолатеральной поверхности кожи, вызывают некоторое снижение транспорта Na^+ . Показано также, что регуляторное влияние цистамина и цистина на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки опосредовано их взаимодействием с функционально важными остатками цистеина Na^+ -транспортирующих белков.

Полученные нами данные о влиянии цистамина и цистина на трансэпителиальный транспорт Na^+ способствуют также более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия этих аминокислот, широко применяемых в клинической практике для смягчения окислительного стресса, купирования процессов воспаления, и усиления врожденных нейропротекторных механизмов при лечении нейродегенеративных и нервно-психических заболеваний. Кроме того, открытие новых соединений, влияющих на активность ENaC и других Na^+ -транспортирующих белков, актуально для биомедицинских исследований многих патологий и является предпосылкой для разработки новых фармакологических средств терапии подобных состояний.

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. Benos D.J., Stanton B.A. Functional domains within the degenerin/epitelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels. *J. Physiol.*, 1999, vol. 520, pp. 631-644.

3. Firsov D., Robert-Nicoud M., Gruender S., Schild L., Rossier B.C. Mutational analysis of cysteine-rich domain of the epithelium sodium channel (ENaC): Identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, pp. 2743-2749.
4. Kellenberger S., Gautschi I., Pfister Y., Schild L. Intracellular thiol-mediated modulation of epithelial sodium channel activity. *J. Biol. Chem.*, 2005, vol. 280, pp. 7739-7747.
5. Koefoed-Johnsen V., Ussing H.H. The nature of the frog skin potential. *Acta. Physiol. Scand.*, 1958, vol. 42, pp. 298-308.
6. Boldyrev A.A., Bulygina E.R. Na/K-ATPase and oxidative stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1997, vol. 834, pp. 666-668.
7. Coor C., Salmon R.F., Quigley R., Marver D., Baum M. Role of adenosine triphosphate (ATP) and NaKATPase in the inhibition of proximal tubule transport with intracellular cystine loading. *J. Clin. Invest.*, 1991, vol. 87, pp. 955-961.
8. Lesort M., Lee M., Tucholski J., Johnson G.V.W. Cystamine inhibits caspase activity. *J. Biol. Chem.*, 2003, vol. 278, pp. 3825-3830.
9. Paul B.D., Snyder S.H. Therapeutic applications of cysteamine and cystamine in neurodegenerative and neuropsychiatric diseases. *Front. Neurol.*, 2019, vol. 10, art. 1315.
10. Wagner C.A., Lang F., Broer S. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *Amer. J. Physiol.*, 2001, vol. 281, pp. C1077-C1093.
11. Sheng S.H., Li J.Q., McNulty K.A., Kieber-Emmons T., Kleyman T.R. Epithelial sodium channel pore region. Structure and role in gating. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, pp. 1326-1334.
12. Krumm P., Giraldez T., Alvarez de la Rosa D., Clauss W.G., Fronius M., Althaus M. Thiol-reactive compounds from garlic inhibit the epithelial sodium channel (ENaC). *Bioorg. Med. Chem.*, 2012, vol. 20, pp. 3979-3984.
13. Waag T., Gelhaus C., Rath J., Stich A., Leippe M., Schirmeister T. Allicin and derivatives are cysteine protease inhibitors with antiparasitic activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2010, vol. 20, pp. 5541-5543.
14. Kleyman T.R., Carattino M.D., Hughey R.P. ENaC at the cutting edge: regulation of epithelial sodium channels by proteases. *J. Biol. Chem.*, 2009, vol. 284, pp. 20447-20451.
15. Rossier B.C., Stutts M.J. Activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by serine proteases. *Annu. Rev. Physiol.*, 2009, vol. 71, pp. 361-379.
16. Bengrine A., Li J., Hamm L.L., Awayda M.S. Indirect activation of the epithelial Na⁺ channel by trypsin. *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282, pp. 26884-26896.
17. Garcia-Caballero A., Ishmael S.S., Dang Y., Gillie D., Bond J.S., Milgram S.L., Stutts M.J. Activation of the epithelial sodium channel by the metalloprotease meprin β -subunit. *Channels (Austin)*, 2011, vol. 5, pp. 14-22.
18. Haerteis S., Krappitz M., Bertog M., Krappitz A., Baraznenok V., Henderson I., Lindstrom E., Murphy J.E., Bunnett N.W., Korbmayer C. Proteolytic activation of the epithelial sodium channel (ENaC) by the cysteine protease cathepsin-S. *Eur. J. Physiol.*, 2012, vol. 464, pp. 353-365.
19. Brix K., Dunkhorst A., Mayer K., Jordans S. Cysteine cathepsins: cellular roadmap to different functions. *Biochimie*, 2008, vol. 90, pp. 194-207.
20. Kirschke H., Wiederanders B., Bromme D., Rinne A. Cathepsin S from bovine spleen. Purification, distribution, intracellular localization and action on proteins. *Biochem. J.*, 1989, vol. 264, pp. 467-473.
21. Zavasnik-Bergant T., Turk B. Cysteine cathepsins in the immune response. *Tissue Antigens*, 2006, vol. 67, pp. 349-355.
22. Lorand L., Conrad S.M. Transglutaminase. *Mol. Cell Biochem.*, 1984, vol. 58, pp. 9-35.

CYSTAMINE AND CYSTINE SUPPRESS Na^+ TRANSPORT IN FROG SKIN EPITHELIUMMelnitskaya A.V.¹, Krutetskaya Z.I.¹, Antonov V.G.², Krutetskaya N.I.¹, Badyulina V.I.¹¹ Saint Petersburg State University

Universitetskaya emb., 7/9, St. Petersburg, 199033, Russia; e-mail: avmelnitskaya@yandex.ru

²S.M. Kirov Military Medical Academy

st. Academician Lebedeva, 6, St. Petersburg, 194044, Russia

Received 23.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0543

Abstract. Amphibian skin and other isolated epithelial systems are classical model objects for studying the mechanisms of transepithelial ion transport. Na^+ transport in osmoregulatory epithelium is a complex, multicomponent system, which involves Na^+ transporting proteins and signaling cascades localized in various cell membranes. The protein components of this system may be a target for oxidative stress. At the same time, the effect of oxidizing and reducing agents on Na^+ transport in native epithelial systems, such as frog skin epithelium, practically has not been studied. Using voltage-clamp technique the effect of disulfide-containing oxidizing agents cystine and cystamine on Na^+ transport in frog skin was investigated. It has been shown for the first time that the treatment of the skin of the *Rana temporaria* frog with cystamine or cystine at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ suppresses the transepithelial Na^+ transport. It was also found that the preincubation with dithiothreitol, which reduces disulfide bonds in proteins, prevents the inhibitory effect of cystamine and cystine. The obtained results indicate that Na^+ transport in the frog skin is sensitive to oxidative stress and is modulated by disulfide-containing oxidizing agents, such as cystamine or cystine, and also that the effect of cystamine and cystine on Na^+ transport in the frog skin epithelium is mediated by their interaction with functionally important cysteine residues of Na^+ -transporting proteins.

Key words: Na^+ transport, cystamine, cystine, dithiothreitol, frog skin epithelium.