

НЕСТЕРОИДНЫЙ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ПРЕПАРАТ МЕЛОКСИКАМ ОСЛАБЛЯЕТ ЭФФЕКТ ИММУНОМОДУЛЯТОРА ГЛУТОКСИМА НА 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, 199034, РФ; e-mail: a.melnitskaya@spbu.ru

² Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет

Литовская ул., 2, г. Санкт-Петербург, 194100, РФ

Поступила в редакцию 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbpс.2023.0628

Аннотация. Статья посвящена исследованию редокс-регуляции трансэпителиального транспорта ионов в осморегулирующих эпителиях. Фармакологический аналог окисленного глутатиона препарат глутоксим® обладает антиоксидантными и радиопротекторными свойствами и широко применяется в качестве иммуномодулятора и цитопротектора в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний. С использованием метода фиксации потенциала исследовано влияние ингибитора циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты - нестероидного противовоспалительного препарата мелоксикама на эффект глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки *Rana temporaria*. Впервые показано, что преинкубация кожи лягушки с мелоксикамом существенно снижает стимулирующее действие глутоксима на транспорт Na^+ . Полученные данные свидетельствуют об участии циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты в действии глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. Полученные результаты способствуют также более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия глутоксима и мелоксикама, и могут быть полезны для применения этих препаратов в клинической практике.

Ключевые слова: транспорт Na^+ , глутоксим, мелоксикам, эпителий кожи лягушки.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование механизмов трансэпителиального транспорта веществ является интенсивно развивающимся направлением современной биофизики, физиологии и медицины. Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны [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. Многочисленные остатки цистеина, локализованные в различных сегментах этих белков, определяют их редокс-чувствительность и являются мишенью для действия внутри- и внеклеточных окисляющих и восстанавливающих агентов.

Фармакологический аналог окисленного глутатиона (GSSG) препарат глутоксим® (динатриевая соль GSSG с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) широко используется в качестве иммуномодулятора и цитопротектора в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний [2]. Этот препарат оказывает комплексное влияние на процессы редокс-регуляции в клетках, однако тонкие биофизические механизмы его действия далеки от полного понимания.

Ранее нами впервые было обнаружено, что GSSG и глутоксим модулируют транспорт Na^+ в коже лягушки [3]. Обнаружено, что приложение этих агентов со стороны апикальной поверхности кожи подавляет транспорт Na^+ , тогда как при добавлении со стороны базолатеральной поверхности кожи, GSSG и глутоксим действуют как инсулиномиметики и стимулируют трансэпителиальный транспорт Na^+ . В дальнейшем было показано, что в регуляции GSSG и глутоксимом транспорта Na^+ в коже лягушки, также как и в сигнальных каскадах, запускаемых инсулином, принимают участие тирозинкиназы и фосфатидилинозитолкиназы [4], протеинкиназа С [5], серин/треониновые протеинфосфатазы PP1/PP2 [6], а также микротрубочки и актиновые филаменты [6,7]. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляторного действия GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ , во многом не ясны.

Известно, что арахидоновая кислота (АК) и ее производные являются важными сигнальными молекулами, выступающими в качестве местных гормонов и медиаторов, играющих важную роль в регуляции различных физиологических и патофизиологических процессов [8]. Выделяют три основных пути метаболизма АК: циклооксигеназный, липоксигеназный и эпоксигеназный (цитохром P-450-зависимый) [8]. В почках и других реабсорбирующих эпителиях АК и ее производные (преимущественно продукты циклооксигеназного пути окисления АК – простагландины) участвуют в регуляции транспорта ионов и воды [9,10]. 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 [11-13]. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможную роль циклооксигеназного пути окисления АК в регуляции глутоксимом транспорта Na^+ в коже лягушки.

В экспериментах использовали ингибитор циклооксигеназ мелоксикам (4-гидрокси-2-метил-N-(5-метил-1,3-тиазол-2-ил)-2Н-1,2-бензотиазин-3-карбоксамид-1,1-диоксид)–нестероидный противовоспалительный препарат из группы оксикамов (производные эноловой кислоты). Мелоксикам широко применяется в клинической практике в качестве нестероидного противовоспалительного средства (НПВС), противоревматического препарата и анальгетика. Мелоксикам относится к НПВС нового поколения, значительно более селективен к циклооксигеназе 2, чем к циклооксигеназе 1, благодаря чему он обладает менее выраженным побочным действием на почки и желудочно-кишечный тракт [14].

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 °С).

Для измерения электрических параметров кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ). Для измерения ВАХ на кожу подавали линейно изменяющееся напряжение (ramp) со скоростью 20 мВ/с. В интервалах между измерениями ВАХ 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 ВАХ 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} .

Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Маточные растворы амилорида (10 мМ) и мелоксикама (20 мМ) готовили на воде. Глутоксим предоставлен фирмой «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург. Маточный раствор глутоксима (50 мг/мл) готовили на воде. Фармакологические агенты добавляли к базолатеральной поверхности кожи лягушки.

Статистический анализ проводили с применением *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде $x \pm s_x$. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$. На рисунке приведены результаты типичных экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляют: $I_{SC} = 9,15 \pm 2,12$ мкА; $V_{OC} = -24,26 \pm 3,12$ мВ; $g_T = 0,38 \pm 0,01$ мСм.

Показано, что глутоксим (200 мкг/мл), приложенный со стороны базолатеральной поверхности кожи, стимулирует транспорт Na^+ ; данные приведены в таблице 1 и на рисунке 1а. Полученные результаты согласуются с данными литературы о способности GSSG и его фармакологических аналогов оказывать рецептор-опосредованное влияние на клеточные процессы. Так, в клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 GSSG и глутоксим вызывают трансактивацию (лиганд-независимую активацию) рецептора эпидермального фактора роста и активацию его собственной тирозинкиназной активности [15,16]. Можно предположить, что GSSG и его фармакологические аналоги могут взаимодействовать с богатыми цистеином экстраклеточными доменами α -субъединиц инсулинового рецептора, вызывать трансактивацию рецептора и запускать сигнальный каскад, приводящий к активации Na^+ -транспортирующих белков и стимуляции транспорта Na^+ .

Впервые показано, что преинкубация базолатеральной поверхности кожи с мелоксикамом (40 мкМ) в течение 30 мин перед добавлением к той же поверхности кожи 200 мкг/мл глутоксима, существенно ослабляет стимулирующее влияние глутоксима на транспорт Na^+ (данные приведены в табл. 2, на рис. 1б).

Известно, что транспорт Na^+ в эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие многочисленные Na^+ -транспортирующие белки (амилорид-чувствительные эпителиальные Na^+ -каналы (ENaC), Na^+ - K^+ -АТФазы и Na^+ / H^+ -обменники), локализованные в различных

Таблица 1. Влияние глутоксима на электрические характеристики кожи лягушки

Вещество, концентрация	Электрические характеристики кожи лягушки	Изменения электрических характеристик после приложения глутоксима к базолатеральной поверхности кожи лягушки, %
Глутоксим 200 мкг/мл	I_{SC}	↑ 36,24 ± 10,08
	V_{OC}	↑ 39,13 ± 12,24
	g_T	↑ 2,35 ± 0,12

Стрелками обозначено увеличение (↑) значений электрических характеристик кожи после приложения глутоксима в концентрации 200 мкг/мл со стороны базолатеральной поверхности кожи лягушки по сравнению с контролем. Для каждой серии экспериментов *n* (число измерений) = 10

Таблица 2. Влияние глутоксима на электрические характеристики кожи лягушки, предварительно обработанной 40 мкМ мелоксикама

Вещество, концентрация	Электрические характеристики кожи лягушки	Изменения электрических характеристик после приложения глутоксима к базолатеральной поверхности кожи лягушки, %
Глутоксим, 200 мкг/мл	I_{sc}	$\uparrow 17,39 \pm 5,22$
	V_{oc}	$\uparrow 20,34 \pm 12,26$
	g_T	$\uparrow 3,01 \pm 0,06$

Стрелками обозначено увеличение (\uparrow) значений электрических характеристик кожи после приложения глутоксима по сравнению с контролем. Для каждой серии экспериментов n (число измерений) = 10

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 глутоксима на транспорт Na^+ связано, в основном, с модуляцией активности ENaC.

Таким образом, нами впервые показано модулирующее влияние ингибитора циклооксигеназ мелоксикама на эффект глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. Полученные результаты свидетельствуют об участии циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты в регуляторном действии глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. Результаты настоящей работы и ранних работ [3-7] позволяют предположить, что глутоксим может взаимодействовать с богатыми цистеином доменами рецептора инсулина в базолатеральной мембране эпителиальных клеток, вызывать его трансактивацию и запускать сигнальный каскад, включающий тирозинкиназы, фосфатидилинозитолкиназы, протеинкиназу C, протеинфосфатазы, элементы актинового и тубулинового цитоскелета, а также продукты и/или ферменты циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты, что приводит к стимуляции транспорта Na^+ в коже лягушки.

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Хорошо известно, что ингибирование синтеза простагландинов НПВС модулирует влияние других гормонов и биологически активных веществ, таких как ангиотензин, норэпинефрин и вазопрессин, на скорость почечного кровотока и клубочковой фильтрации, а также на уровни экскреции натрия и воды [17]. Подобные эффекты НПВС являются причиной почечной токсичности этих препаратов и часто приводят к развитию анальгетической нефропатии на фоне приема НПВС [18].

В то же время, необходимо учитывать, что не все биологические эффекты мелоксикама связаны с его способностью ингибировать циклооксигеназы. Результаты недавних исследований указывают на потенциальные антиоксидантные свойства мелоксикама. Обнаружено, что мелоксикам ингибирует апоптоз клеток за счет усиления антиоксидантных систем клетки [19]. Этот же механизм считается ответственным за нейропротекторное действие препарата и его низкую гепатотоксичность [20]. Нейропротекторный эффект не

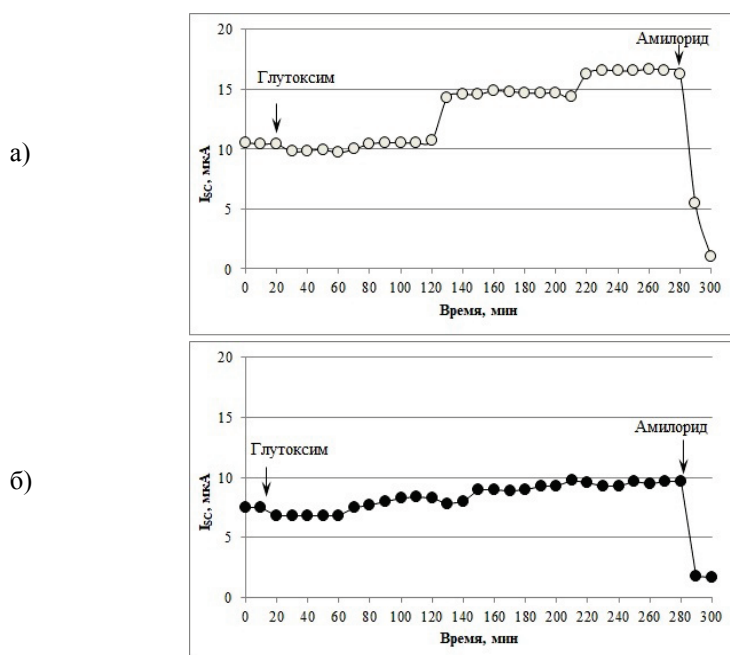


Рисунок 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{sc} через кожу лягушки при приложении глутоксима к базолатеральной поверхности нативной кожи (а) и кожи лягушки, предварительно обработанной 40 мкМ мелоксикама (б). В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных Na^+ -каналов (ENaC) амилорид (20 мкМ)

наблюдался у других типичных НПВС, таких как индометацин и ибупрофен, а также более селективных ингибиторов циклооксигеназы 2. Кроме того, обнаружено, что нейропротекторный эффект мелоксикама индуцируется за счет активации защитного сигнального каскада, в который вовлечены фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K/Akt путь), и осуществляется без участия циклооксигеназ [21]. Ранее, нами было показано, что регуляторное действие глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки осуществляется также при участии фосфатидилинозитол-3- и 4-киназ [4]. Таким образом, можно предположить конкурентное взаимодействие между глутоксимом и мелоксикамом как на уровне антиоксидантных свойств указанных препаратов, так и на уровне регулируемых ими сигнальных каскадов. Тем не менее, этот вопрос требует дальнейшего изучения, включая возможные побочные эффекты и лекарственные взаимодействия.

Известно, что некоторые клинические случаи требуют совместного применения глутоксима и НПВС. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что совместное применение глутоксима и мелоксикама нежелательно, т.к. может привести к ослаблению терапевтического эффекта глутоксима. Полученные результаты способствуют также более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия глутоксима и производных эноловой кислоты, и могут быть полезны для применения этих препаратов в клинической практике.

Работа выполнена в рамках плановых тем Кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного университета и Кафедры биохимии Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, 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. Zhukov O.B., Zubarev A.R., Mezentseva M.V., Andryushkova Yu.A., Ose I.V. Modern aspects of immunomodulating therapy for those sick with recurrent infections of sexual transmission and with antibiotic-resistant bacterial prostatitis. *Vracheb. Sosl.*, 2004, vol. 5/6, pp. 51-56.
3. Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Effect of disulfide-containing agents on the Na^+ transport in the frog skin. *Doklady Biological Sciences*, 2008, vol. 421, pp. 235-238.
4. Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Antonov V.G., Butov S.N. Involvement of tyrosine and phosphatidylinositol kinases in oxidized glutathione and glutoxim regulation of Na^+ transport in frog skin. *Cell and Tissue Biology*, 2010, vol. 4, no. 3, pp. 273-279.
5. Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E. The involvement of protein kinase C in the effect of oxidized glutathione and glutoxim on Na^+ transport in frog skin. *Biochemistry (Moscow)*, Supplement Series A: Membrane and Cell Biology, 2009, vol. 3, no. 3, pp. 323.
6. Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. The effect of glutoxim on Na^+ transport in frog skin: the role of cytoskeleton. *Cell and Tissue Biology*, 2012, vol. 6, no. 3, pp. 248-253.
7. Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. The involvement of microtubules in the glutoxim regulation of Na^+ transport in the frog skin. *Doklady Biological Sciences*, 2012, vol. 445, pp. 227-229.
8. Wang B., Wu L., Chen J., Dong L., Chen C., Wen Z., Hu J., Fleming I., Wang D.W. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal Transduc. Target. Ther.*, 2021, vol. 26, no. 6(1), p. 94, doi: 10.1038/s41392-020-00443-w.
9. 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, no. 1, pp. 75-87, doi: 10.1007/s002329900159.
10. Shakhmatova E.I., Kuznetsova A.A., Prutskova N.P., Bogolepova A.E., Natochin Iu.V. The effect of cyclooxygenase inhibitors on ion and water transport in the human kidney and frog skin and bladder. *Russ. Fiziol. Zh. Im. I.M. Sechenova*, 1997, vol. 83, no. 10, pp. 68-75.
11. 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.
12. Meves H. Arachidonic acid and ion channels: an update. *Br. J. Pharmacol.*, 2008, vol. 155, pp. 14-16.
13. Pavlov T.S., Ilatovskaya 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.
14. Engelhardt G., Bögel R., Schnitzler Chr., Utzmann R. Meloxicam: Influence on arachidonic acid metabolism. Part I. In vitro findings. *Biochem. Pharmacol.*, 1996, vol. 51, pp. 29-38.
15. Vasilenko K.P., Burova E.B., Antonov V.G., Nikolskii N.N. Oxidized glutathione induces activation of the epidermal growth factor receptor and MAP kinases ERK 1, 2. *Tsitologiya*, 2006, vol. 48, no. 6, pp. 500-507.
16. Burova E.B., Vasilenko K.P., Antonov V.D., Nikolskii N.N. Transactivation of the epidermal growth factor receptor by oxidized glutathione and its pharmacological analogue glutoxim in A431 cells. *Dokl. Biol. Sci.*, 2005, vol. 404, pp. 392-394.
17. Sejoong Kim M.D., Kwon Wook Joo M.D. Electrolyte and acid-base disturbances associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Electrolytes Blood Pressure*, 2007, vol. 5, no. 2, pp. 116-125.

18. Black H.E. Renal toxicity of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Toxicologic pathologic*, 1986, vol. 14, no. 1, pp. 83-90.
19. Park J.H., Park Y.S., Lee J.B., Park K.H., Paik M.K., Jeong M., Koh H.C. Meloxicam inhibits fipronil-induced apoptosis via modulation of the oxidative stress and inflammatory response in SH-SY5Y cells. *J. Appl. Toxicol.*, 2016, vol. 36, pp. 10–23.
20. Pawlukianiec C., Gryciuk M.E., Mil K.M., Zendzian-Piotrowska M., Zalewska A., Maciejczyk M.A. New insight into meloxicam: Assessment of antioxidant and anti-glycating activity in in vitro studies. *Pharmaceuticals* (Basel), 2020, vol. 13, no. 9, p. 240.
21. Tasaki Y., Yamamoto J., Omura T., Noda T., Kamiyama N., Yoshida K., Satomi M., Sakaguchi T., Asari M., Ohkubo T., Shimizu K., Matsubara K. Oxicam structure in non-steroidal anti-inflammatory drugs is essential to exhibit Akt-mediated neuroprotection against 1-methyl-4-phenyl pyridinium-induced cytotoxicity. *Eur. J. Pharmacol.*, 2012, vol. 676, pp. 57-63.

**NON-STEROID ANTI-INFLAMMATORY DRUG MELOXICAM ATTENUATES THE EFFECT OF
IMMUNOMODULATOR GLUTOXIM ON Na⁺ TRANSPORT
IN FROG SKIN EPITHELIUM**

Melnitskaya A.V.¹, Krutetskaya Z.I.¹, Antonov V.G.², Krutetskaya N.I.¹, Badulina V.I.¹

¹ St. Petersburg State University

Universitetskaya emb. 7/9, St. Petersburg, 199034, Russia; e-mail: a.melnitskaya@spbu.ru

² St. Petersburg State Pediatric Medical University

Litovskaya st., 2, St. Petersburg, 194100, Russia

Received 20.07.2023. DOI: 10.29039/rusjbp.2023.0628

Abstract. The article is devoted to the study of redox regulation of transepithelial ion transport in osmoregulatory epithelium. The pharmacological analogue of oxidized glutathione, drug glutoxim®, has antioxidant and radioprotective properties and is widely used as an immunomodulator and cytoprotector in complex therapy of bacterial, viral and oncological diseases. Using voltage-clamp technique, the influence of non-steroidal anti-inflammatory drug meloxicam, an inhibitor of the cyclooxygenase pathway of arachidonic acid oxidation, on glutoxim effect on Na⁺ transport in frog *Rana temporaria* skin was investigated. It was shown for the first time that frog skin preincubation with meloxicam significantly reduces the stimulatory effect of glutoxim on Na⁺ transport. The data obtained indicate the involvement of cyclooxygenase pathway of arachidonic acid oxidation in the effect of glutoxim on Na⁺ transport in frog skin epithelium. The results also contribute to a more detailed understanding of molecular mechanisms of pharmacological effect of glutoxim and meloxicam, and may be useful for their application in clinics.

Key words: Na⁺ transport, glutoxim, meloxicam, frog skin epithelium.