

## ИНГИБИТОР ЛИПОКСИГЕНАЗ НОРДИГИДРОГУАРЕТИКОВАЯ КИСЛОТА ПОДАВЛЯЕТ ЭФФЕКТ ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ $\text{Na}^+$ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ

Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г.

Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ

e-mail: avmelnitskaya@yandex.ru

**Аннотация.** С использованием метода фиксации потенциала исследовано участие липоксигеназ в действии иммуномодулятора глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. Впервые показано, что преинкубация кожи с ингибитором всех известных типов липоксигеназ нордигидрогуаретиковой кислотой приводит к подавлению стимулирующего действия глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$ . Полученные данные свидетельствуют об участии липоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты в действии глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки.

**Ключевые слова:** транспорт  $\text{Na}^+$ , глутоксим, арахидоновая кислота, липоксигеназы.

## THE INHIBITOR OF LIPOXYGENASES NORDIHYDROGUAIARETIC ACID DECREASES THE EFFECT OF GLUTOXIM ON $\text{Na}^+$ TRANSPORT IN FROG SKIN

Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G.

Saint-Petersburg State University

University emb., 7/9, Saint-Petersburg, 199034, Russia

e-mail: avmelnitskaya@yandex.ru

**Abstract.** With the use of the voltage-clamp technique the involvement of the lipoxygenase oxidation pathway of arachidonic acid in the effect of immunomodulator glutoxim on  $\text{Na}^+$  transport in frog skin was investigated. It was shown that the inhibitor of all known types of lipoxygenases nordihydroguaiaretic acid decreases the stimulatory effect of glutoxim on  $\text{Na}^+$  transport in frog skin. The results suggest the involvement of lipoxygenase oxidation pathway of arachidonic acid in glutoxim effect on  $\text{Na}^+$  transport in frog skin.

**Key words:**  $\text{Na}^+$  transport, glutoxim, arachidonic acid, lipoxygenases.

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  $\text{Na}^+$  в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие  $\text{Na}^+$ -транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки. Различные белковые компоненты этой системы могут являться мишенью для окислительного стресса [2, 3].

Ранее нами было показано, что транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки чувствителен к окислительному стрессу и модулируется различными окисляющими агентами, такими как цистамин, цистин, окисленный глутатион (GSSG), глутоксим® (динатриевая соль GSSG с нанодобавкой d-металла; «ФАРМА – ВАМ», Санкт-Петербург), приложенными к апикальной или базолатеральной поверхности кожи [4]. Обнаружено, что добавление этих окислителей со стороны апикальной поверхности кожи ингибирует транспорт  $\text{Na}^+$ . Можно предположить, что ингибирующее действие дисульфидсодержащих агентов связано с их способностью взаимодействовать с высококонсервативными остатками цистеина внеклеточных доменов эпителиальных  $\text{Na}^+$  каналов (ENaC), что приводит к ингибированию активности ENaC и подавлению трансэпителиального транспорта  $\text{Na}^+$ . В то же время, при добавлении агентов со стороны базолатеральной поверхности кожи, только цистин и цистамин сохраняли своё ингибирующее действие, тогда как GSSG и глутоксим имитировали действие инсулина и стимулировали трансэпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$ . Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляторного действия GSSG и глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$ , во многом еще не ясны.

Арахидоновая кислота и ее метаболиты выступают в качестве сигнальных молекул, участвующих в процессах внутри- и внеклеточной сигнализации, и обладающих широким спектром физиологических и патологических эффектов [5]. Выделяют три основных пути метаболизма арахидоновой кислоты: циклооксигеназный, липоксигеназный и эпоксигеназный (цитохром P-450-зависимый). В почках и других реабсорбирующих эпителиях, арахидоновая кислота и ее производные участвуют в регуляции транспорта ионов и воды. Установлено, что многие ионные каналы, в том числе амилорид-чувствительные эпителиальные  $\text{Na}^+$ -каналы (ENaC), играющие ключевую роль в транспорте  $\text{Na}^+$  через реабсорбирующие эпителии, являются мишенями как для самой арахидоновой кислоты, так и для ее метаболитов [6]. Ранее нами было показано, что ингибиторы циклооксигеназ существенно снижают базальный уровень транспорта  $\text{Na}^+$ , а также подавляют стимулирующее действие глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки [7]. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможную роль липоксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты в регуляции глутоксимом транспорта  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. В экспериментах использовали классический блокатор всех известных типов липоксигеназ нордигидрогуаретиковую кислоту (НДГА) [8].

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. Опыты проводили при комнатной температуре (22-23 °С). Для регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ) кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала [4]. Из ВАХ определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания  $I_{SC}$  ( $I_{SC} = I_T$  при  $V_T = 0$ , где  $I_T$  – трансэпителиальный ток), потенциал открытой цепи  $V_{OC}$  ( $V_{OC} = V_T$  при  $I_T = 0$ , где  $V_T$  – трансэпителиальный потенциал) и трансэпителиальную проводимость  $g_T$ . Транспорт  $Na^+$  оценивали как амилорид-чувствительный  $I_{SC}$ . Использовали реактивы фирмы Sigma (США). НДГА добавляли за 30 – 40 мин до введения в раствор глутоксима. Статистический анализ проводили с применением критерия *t* Стьюдента. Данные представлены в виде  $x \pm s_x$ . На рисунке приведены результаты типичных экспериментов.

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляют:  $I_{SC} = 32.35 \pm 2.41$  мкА;  $V_{OC} = -61.72 \pm 6.03$  мВ;  $g_T = 0.52 \pm 0.03$  мСм. Показано, что глутоксим (100 мкг/мл), приложенный к базолатеральной поверхности интактной кожи лягушки, подобно инсулину, стимулирует транспорт  $Na^+$  (см. рис. 1, кривая 1). В среднем (по результатам 10 экспериментов) после приложения глутоксима  $I_{SC}$  возрастает на  $34.45 \pm 9.11\%$ ;  $V_{OC}$  – на  $42.16 \pm 6.32\%$ ; величина  $g_T$  не меняется. На основании результатов, полученных в настоящей работе и ранее [4, 7, 9], можно предположить, что глутоксим может взаимодействовать с богатыми цистеином экстраклеточными доменами рецептора инсулина в базолатеральной мембране эпителиальных клеток, вызывать его трансактивацию и запускать сигнальный каскад, приводящий к увеличению транспорта  $Na^+$  в коже лягушки. Полученные результаты хорошо согласуются с данными литературы. Так, в клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 GSSG и глутоксим вызывают трансактивацию рецептора эпидермального фактора роста и активацию его собственной тирозинкиназной активности [10].

Обнаружено, что НДГА подавляет транспорт  $Na^+$  в коже лягушки. В среднем (по результатам 10 экспериментов) после приложения 50 мкМ НДГА к апикальной или базолатеральной поверхности кожи лягушки  $I_{SC}$  снижается на  $35.48 \pm 4.48$  или  $39.34 \pm 6.02$  %,  $V_{OC}$  – на  $8.12 \pm 3.35$  или  $10.23 \pm 3.14$  %; а  $g_T$  уменьшается на  $19.13 \pm 3.65$  или  $11.77 \pm 2.18$  %, при приложении НДГА со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно.

Показано также, что предварительная обработка кожи лягушки НДГА также существенно снижает стимулирующее действие глутоксима на транспорт  $Na^+$  (см. рис. 1). В среднем (по данным 10 экспериментов) изменение электрических характеристик кожи лягушки после добавления 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности кожи, предварительно обработанной в течение 30 мин 50 мкМ НДГА, было следующим:  $I_{SC}$  увеличивается на  $12.34 \pm 2.34$  или  $23.28 \pm 4.32$  %,  $V_{OC}$  – на  $14.48 \pm 3.01$  или  $25.33 \pm 3.24$  %,  $g_T$  увеличивается на  $9.34 \pm 1.04$  или  $12.28 \pm 2.47$  %, при приложении НДГА со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно.

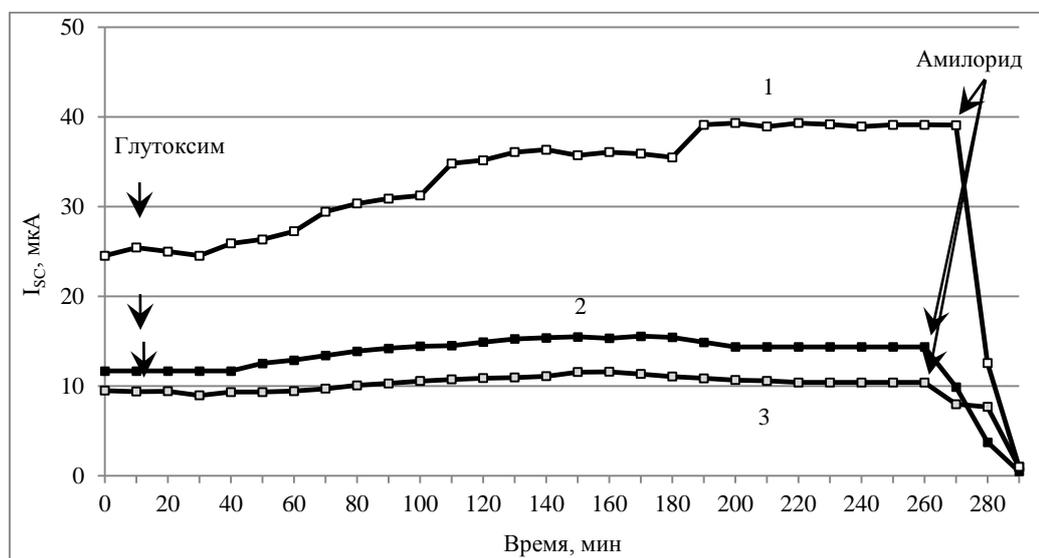


Рисунок 1 – Кинетика изменения тока короткого замыкания  $I_{SC}$  через кожу лягушки в ответ на действие глутоксима и НДГА

1 –  $I_{SC}$  после добавления 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности интактной кожи;

2 –  $I_{SC}$  после добавления глутоксима к коже лягушки, предварительно обработанной (в течение 30 мин) со стороны базолатеральной поверхности 50 мкМ НДГА;

3 –  $I_{SC}$  после добавления глутоксима к коже лягушки, предварительно обработанной (в течение 30 мин) со стороны апикальной поверхности 50 мкМ НДГА; в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ)

Известно, что ключевые  $\text{Na}^+$ -транспортирующие белки (ENaC,  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазы и  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$ -обменники) содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенями для внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей. Однако добавление блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, вызывало полное подавление транспорта  $\text{Na}^+$ . Это указывает на то, что эффект глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  обусловлен, в основном, модуляцией активности ENaC.

Таким образом, впервые показано, что блокатор липоксигеназ нордигидрогуаретиковая кислота подавляет стимулирующее действие глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. Полученные данные свидетельствуют об участии липоксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты в регуляции глутоксимумом транспорта  $\text{Na}^+$  в коже лягушки.

#### **Список литературы / References:**

1. Наточин Ю.В. *Основы физиологии почки*. Л.: Наука, 1982, 184 с. [Natochin Yu.V. *Osnovy fiziologii pochki*. Leningrad: Nauka, 1982, 184 p. (In Russ.)]
2. Boldyrev A.A., Bulygina E.R. Na/K-ATPase and oxidative stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1997, vol. 834, pp. 666–668.
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. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Мельницкая А.В., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д. Влияние дисульфид-содержащих соединений на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. *ДАН*, 2008, т. 421, № 5, с. 709-712. [Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Effect of disulfide containing compounds on  $\text{Na}^+$  transport in frog skin. *Dokl. Akad. Nauk*, 2008, vol. 421, no. 5, pp. 709-712. (In Russ.)]
5. 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 signaling*. SPb.: SPbU., 2003, 208 p. (In Russ.)]
6. 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.
7. Крутецкая З.И., Мельницкая А.В., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д. Ингибиторы циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты подавляют стимулирующее действие глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. *ДАН*, 2013, т. 451, № 2, с. 236-238. [Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Inhibitors of the cyclooxygenase oxidation pathway of arachidonic acid suppress the stimulating effect of glutoxim on  $\text{Na}^+$  transport in frog skin. *Dokl. Biol. Sci.*, 2013, vol. 451, no. 1, pp. 193-195. (In Russ.)]
8. Czapski G.A., Czubowicz K., Strosznajder R.P. Evaluation of the antioxidative properties of lipoxygenase inhibitors. *Pharmacol. Rep.*, 2012, vol. 64, pp. 1179-1188.
9. Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Антонов В.Г., Бутов С.Н. Участие тирозинкиназ и фосфатидилинозитолкиназ в действии окисленного глутатиона и глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. *Цитология*, 2010, т. 52, № 4, с. 342-348. [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  $\text{Na}^+$  transport in frog skin. *Cell Tissue Biol.*, 2010, vol. 4, no. 3, pp. 273-279. (In Russ.)]
10. Василенко К.П., Бурова Е.Б., Антонов В.Г., Никольский Н.Н. 2006. Окисленный глутатион вызывает активацию рецептора эпидермального фактора роста и MAP-киназ ERK 1,2. *Цитология*, т. 48, № 6, с. 500-507. [Vasilenko K.P., Burova E.B., Antonov V.G., Nikoliskii, 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. (In Russ.)]

#### **ВЛИЯНИЕ МЕТИЛ- $\beta$ -ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА $\text{Ca}^{2+}$ -ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ГЛУТОКСИМОМ В МАКРОФАГАХ**

Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г.  
Санкт-Петербургский государственный университет  
Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ  
e-mail: z.krutetskaya@spbu, cozzu@mail.ru

**Аннотация.** С использованием флуоресцентного  $\text{Ca}^{2+}$ -зонда Fura-2AM изучено участие липидных микродоменов рафтов в действии иммуномодулятора глутоксима на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в перитонеальных макрофагах крысы. Глутоксимум вызывает двухфазный  $\text{Ca}^{2+}$ -ответ, связанный с мобилизацией  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо и последующим депо-зависимым входом  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофаги. Впервые показано, что преинкубация клеток с метил- $\beta$ -циклодекстрином, вызывающим экстракцию мембранного холестерина и разрушение рафтов, приводит к подавлению обеих фаз  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов, индуцируемых глутоксимумом в перитонеальных макрофагах. Полученные результаты свидетельствуют о том, что интактность рафтов необходима для развития комплексного сигнального каскада, вызываемого глутоксимумом и проводящего к увеличению внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах.

**Ключевые слова:** перитонеальные макрофаги, глутоксимум, липидные рафты.