

ВЛИЯНИЕ ДИСУЛЬФИДСОДЕРЖАЩЕГО ИММУНОМОДУЛЯТОРА МОЛИКСАНА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ

© 2023 г. А.В. Мельницкая*,[#], З.И. Крутецкая*, В.Г. Антонов**, Н.И. Крутецкая*

*Санкт-Петербургский государственный университет,
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

**Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,
Литовская ул., 2, Санкт-Петербург, 194100, Россия

[#]E-mail: a.melnitskaya@spbu.ru

Поступила в редакцию 29.12.2022 г.

После доработки 29.12.2022 г.

Принята к публикации 17.01.2023 г.

Рассматривается влияние фармакологического аналога окисленного глутатиона — дисульфидсодержащего иммуномодулятора моликсана на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. С использованием метода фиксации потенциала впервые показано, что моликсан модулирует транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. Обнаружено, что приложение моликсана со стороны апикальной поверхности кожи подавляет транспорт Na^+ , тогда как при добавлении со стороны базолатеральной поверхности моликсан имитирует действие инсулина и стимулирует транспорт Na^+ . Результаты свидетельствуют о том, что окисленный глутатион и его фармакологические аналоги моликсан и глутатоксим однонаправленно модулируют транспорт Na^+ в коже лягушки.

Ключевые слова: моликсан, GSSG, транспорт Na^+ , эпителий кожи лягушки.

DOI: 10.31857/S0006302923050150, EDN: PHJODD

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 пузыря амфибий. 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 трансэпителиального транспорта воды и ионов в клетках почки [1].

Транспорт Na^+ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпо-

нентную 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 амилоридчувствительные 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 остатки цистеина, 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

Сокращения: ENaC — амилоридчувствительные эпителиальные Na^+ -каналы, GSH — восстановленная форма глутатиона, GSSG — окисленная форма глутатиона.

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-транспортующие 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.

Важнейшую роль в редокс-регулируемых внутриклеточных сигнальных путях играют эндогенные системы глутатиона. Глутатион (γ -глутамилцистеинилглицин) существует в клетке в восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) формах и является универсальным тиолсодержащим трипептидом, обнаруженным в большинстве клеток растений, микроорганизмов и млекопитающих. Глутатион предотвращает окисление SH-групп или восстанавливает S—S-связи, индуцированные окислительным стрессом, инактивирует свободные радикалы, участвует в детоксикации токсических ксенобиотиков (лекарственных веществ, канцерогенов) [7], участвует в активации транскрипции генов, в том числе некоторых антиоксидантных ферментов, а также ингибировании редоксзависимых путей активации апоптоза; входит в систему детоксикации и антиоксидантной защиты, предупреждения и ограничения окислительного стресса [8, 9].

На основе дисульфидсодержащих окисляющих агентов синтезирован и успешно применен в клинической практике целый ряд фармакологических препаратов, которые были объединены в группу тиопозтинов, характеризующихся системным цитопротекторным эффектом [10, 11]. Фармакологические аналоги GSSG глутоксим® (динатриевая соль GSSG с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) и моликсан® (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) используются как иммуномодуляторы и цитопротекторы в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний. Эти препараты оказывают комплексное влияние на процессы редокс-регуляции в клетках, однако тонкие биофизические механизмы их действия далеки от полного понимания.

Ранее нами было впервые обнаружено, что GSSG и глутоксим модулируют транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки [12]. 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 имитируют действие инсулина и стимулируют транспорт Na^+ . В связи с этим, целью настоящей работы было исследование влияния другого дисульфидсодержащего препарата — моликсана — на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

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 mM): NaCl — 110, KCl — 2.5, CaCl_2 — 3, Tris-HCl — 5, pH 7.4. Опыты проводили при комнатной температуре (22–23°C).

Для измерения электрических параметров кожи лягушки *Rana temporaria* 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 амилоридчувствительный ток I_{SC} . В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилоридчувствительных эпителиальных Na^+ -каналов амилорид (20 мкМ).

Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Маточный раствор амилорида (10 мМ) готовили на воде. Моликсан был предоставлен фирмой «ФАРМА-ВАМ» (Санкт-Петербург). Маточный раствор моликсана (50 мг/мл) готовили на воде. Фармакологические агенты добавляли к апикальной или базолатеральной поверхности кожи лягушки.

Статистический анализ проводили с применением *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде $x \pm s_x$. Достоверными считали различия

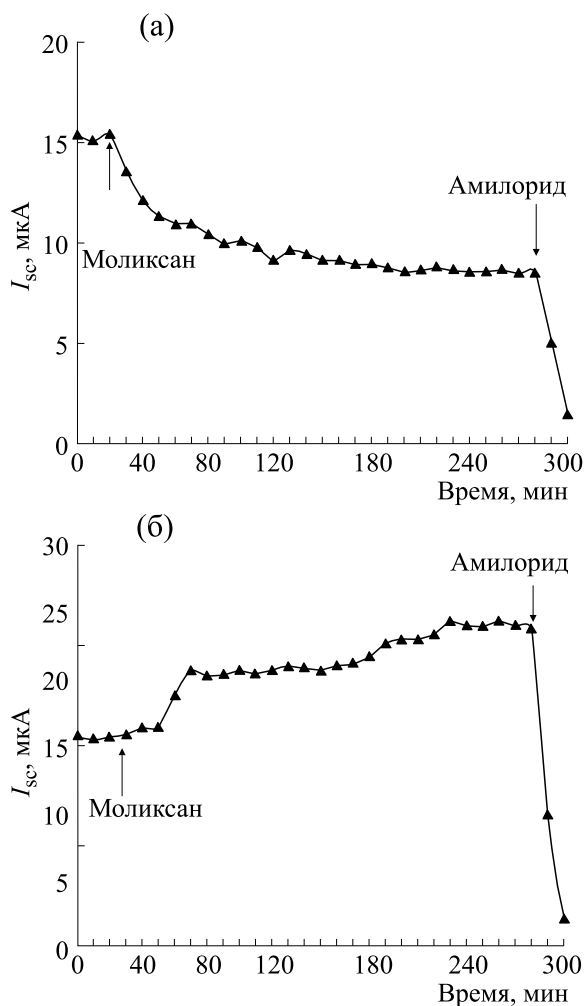


Рис. 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{SC} через кожу лягушки в ответ на приложение фармакологического аналога окисленного глутатиона (GSSG) — дисульфидсодержащего иммуномодулятора моликсана (200 мкг/мл), добавленного со стороны апикальной (а) или базолатеральной (б) поверхности кожи лягушки. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилоридчувствительных эпителиальных Na^+ -каналов (ENaC) — амилорид (20 мкМ).

при $p \leq 0.05$. На рисунках представлены результаты типичных экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (здесь и далее по тексту число опытов $n = 10$) составляют: $I_{SC} = 14.51 \pm 2.35$ мкА; $V_{OC} = -27.03 \pm 4.16$ мВ; $g_T = 0.53 \pm 0.25$ мСм.

Обнаружено, что моликсан модулирует транспорт Na^+ в коже лягушки. В среднем изменение электрических характеристик кожи лягушки по-

сле добавления 200 мкг/мл моликсана к апикальной поверхности кожи было следующим: I_{SC} уменьшился на $30.34 \pm 4.82\%$, V_{OC} уменьшился на $26.35 \pm 12.24\%$, а g_T уменьшилась на $9.32 \pm 2.74\%$. В случае обработки моликсаном базолатеральной поверхности кожи лягушки изменение электрических характеристик в среднем было следующим: I_{SC} увеличился на $36.46 \pm 5.2\%$, V_{OC} увеличился на $40.08 \pm 8.34\%$, а g_T — на $8.15 \pm 3.01\%$. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что влияние моликсана на транспорт Na^+ различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи (рис. 1а,б) аналогично эффекту GSSG и глутоксима, показанному нами ранее [12].

Обработка апикальной поверхности кожи лягушки моликсаном подавляет транспорт Na^+ (рис. 1а). Наиболее вероятно предположить, что ингибирующее влияние моликсана может быть связано с его способностью взаимодействовать с функционально значимыми остатками цистеина Na^+ -транспортирующих белков, что приводит к ингибированию их активности и подавлению транспорта Na^+ . Полученные результаты согласуются с литературными данными, согласно которым ENaC и другие Na^+ -транспортирующие белки быстро и обратимо ингибируются агентами, окисляющими SH-группы остатков цистеина [2, 3, 6]. Кроме того, с использованием метода локальной фиксации потенциала на альвеолярных клетках I крысы было показано, что GSSG в микромолярных концентрациях снижает вероятность открытого состояния ENaC, экспрессируемых в апикальных мембранах пневмоцитов, а также приводит к снижению клиренса альвеолярной жидкости в экспериментах *in vivo*. В данном исследовании продемонстрировано также, что сдвиг окислительно-восстановительного потенциала к более окисленному состоянию при добавлении GSSG вызывает обратимое снижение активности ENaC, которое можно устранить с помощью добавления GSH. Более того, за это изменение активности ENaC ответственна прямая обратимая модификация ENaC с помощью GSSG (S-глутатионилирование субъединиц ENaC). В целом эти результаты показывают, что обратимое S-глутатионилирование субъединиц ENaC может играть важную роль в регуляции баланса жидкости в легких [13].

В то же время, моликсан, приложенный со стороны базолатеральной поверхности кожи, стимулирует транспорт Na^+ (рис. 1б). 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 [14, 15]. Также нами ранее было показано, что в случае приложения к базолатеральной поверхности кожи лягушки, GSSG и глутоксим действуют как инсулиномиметики и стимулируют трансэпителиальный транспорт Na^+ [12]. Можно предположить, что GSSG и его фармакологические аналоги моликсан и глутоксим 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^+ .

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, 6]. Однако добавление блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, вызывало полное подавление транспорта Na^+ . Можно предположить, что влияние моликсана на транспорт Na^+ обусловлено в основном модуляцией активности ENaC.

Таким образом, в настоящей работе показано модулирующее влияние моликсана на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. Полученные результаты свидетельствуют также о том, что моликсан, GSSG и глутоксим однонаправленно модулируют транспорт Na^+ в коже лягушки. Можно предположить, что влияние этих дисульфидсодержащих окислителей на транспорт Na^+ опосредовано сходными регуляторными механизмами.

Полученные нами данные о влиянии моликсана, GSSG и глутоксима на трансэпителиальный транспорт Na^+ способствуют также более детальному пониманию молекулярных механизмов действия этих дисульфидсодержащих окисляющих агентов, широко применяемых в клинической практике в качестве препаратов, обладающих иммуномодулирующим, гемопоэтическим и гепатопротекторным действием, а также для смягчения окислительного стресса и купирования процессов воспаления. Кроме того, обнаружение новых соединений, влияющих на активность ENaC и других Na^+ -транспортирующих белков, актуально для биомедицинских исследований многих патологических процессов и является предпосылкой для разработки новых фармакологических средств в терапии подобных состояний.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Договоров СПбГУ на выполнение научно-исследовательских работ № 01/18-НИОКР от 05.03.2018 и № 05/03-20 от 12.03.2020.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание животных и все манипуляции с ними выполняли в соответствии с нормативными документами и требованиями Приказа Минздрава России № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. В. Наточин, *Основы физиологии почки* (Наука, Л., 1982).
2. D. J. Benos and B. A. Stanton, *J. Physiol.*, **520**, 631 (1999).
3. D. Firsov, M. Robert-Nicoud, S. Gruender, et al., *J. Biol. Chem.*, **274**, 2743 (1999).
4. S. Kellenberger, I. Gautschi, Y. Pfister, et al., *J. Biol. Chem.*, **280**, 7739 (2005).
5. V. Koefoed-Johnsen and H. H. Ussing, *Acta. Physiol. Scand.*, **42**, 298 (1958).
6. A. A. Boldyrev and E. R. Bulygina, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **834**, 666 (1997).
7. J. D. Hayes and L. I. McLellan, *Free Rad. Res.*, **31**, 273 (1999).
8. В. И. Кулинский и Л. С. Колесниченко, *Биомед. химия*, **55** (4), 365 (2009).
9. J. D. Uys, P. J. Mulholland, and D. M. Townsend, *Biomed. Pharmacother.*, **68**, 799 (2014).
10. A. E. Borisov, L. A. Kozhemyakin, A. E. Antushevich, et al., *Vestn. Hirurgii im. I. I. Grekova*, **4** (2), 32 (2001).
11. О. Б. Жуков, А. Р. Зубарев, М. В. Мезенцева и др., *Врачебное сословие*, **5** (6), 51 (2004).
12. Z. I. Krutetskaya, O. E. Lebedev, A. V. Melnitskaya, et al., *Dokl. RAN*, **421** (5), 709 (2008).
13. C. A. Downs, L. Kreiner, X. M. Zhao, et al., *Am. J. Physiol.*, **308**, L943 (2015).
14. Е. Б. Бурова, К. П. Василенко, В. Г. Антонов и др., *Докл. РАН*, **404**, 1 (2005).
15. К. П. Василенко, Е. Б. Бурова, В. Г. Антонов и др., *Цитология*, **48** (6), 500 (2006).

The Effect of Molixan, a Disulfide-Containing Immunomodulator, on Na⁺ Transport across Frog Skin Epithelium

A.V. Melnitskaya*, Z.I. Krutetskaya*, V.G. Antonov, and N.I. Krutetskaya***

**Saint Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, Saint Petersburg, 199034 Russia*

*** Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Litovskaya ul. 2, Saint Petersburg, 194100 Russia*

The effect of molixan, a disulfide-containing immunomodulator which is an analogue of oxidized glutathione, on Na⁺ transport across frog skin epithelium has been studied. Using the voltage-clamp technique, the capacity of molixan to modulate Na⁺ transport across frog skin epithelium has been revealed for the first time. It was also found that when molixan is applied to the apical surface of frog skin, it suppresses Na⁺ transport, while molixan added on the basolateral surface may mimic the effect of insulin and stimulate Na⁺ transport. The results obtained indicate that oxidized glutathione and its analogs molixan and glutoxim unidirectionally modulate Na⁺ transport across frog skin.

Keywords: molixan, GSSG, Na⁺ transport, frog skin epithelium