

УДК 577.151:612.014:616.61  
© Благодаренко Е.А., 2011

## АКТИВНОСТЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В КЛЕТКАХ ПРОКСИМАЛЬНЫХ КАНАЛЬЦЕВ ПОЧЕК В УСЛОВИЯХ СМОДЕЛИРОВАННОЙ ГИПЕРГЛИКЕМИИ IN VITRO

Благодаренко Е.А.

ГУ «Луганский государственный медицинский университет»

**Вступление.** Сахарный диабет (СД) является хроническим эндокринным заболеванием с преимущественным поражением сосудов, нервной ткани, почек и широким спектром проявлений. Поражение почек проявляется в виде диабетической нефропатии (ДН). Основным исходом ДН является нефросклероз. Нефросклероз неизбежно приводит к формированию хронической почечной недостаточности и значительноотягощает течение СД, являясь одной из основных причин инвалидизации и смерти при этой патологии [3].

В основе ДН лежит поражение сосудистого русла, автономной нервной системы и повреждение ткани почек повышенными концентрациями глюкозы и избытком продуктов изменённого, вследствие гипергликемии и недостатка глюкозы внутри клеток, обмена веществ (кетокислоты, свободные радикалы, лактат). От состояния эпителия проксимальных канальцев почек зависит объём альбуминурии и глюкозурии, водно-солевой обмен гидростатическое давление в клубочках почек и др. Наличие повреждения эпителия проксимальных канальцев непосредственно влияет на развитие как склероза интерстиция (от гиперосмолярности), так и гломерулосклероза. Это - основные составляющие нефросклероза, который является причиной формирования хронической почечной недостаточности [4].

В настоящее время исследователи большое внимание уделяют изучению изменений активности внутриклеточных сигнальных путей митоген-активированных протеин киназ (МАПК) как патогенетического звена многих заболеваний [5]. Эти изменения влияют на активность генов, синтез структурных белков и ферментов, выживание и программированную гибель клеток. Сегодня установлена активная роль МАПК не только в регуляции деления и апоптоза, но и в осуществлении перехода клеток в другое функциональное состояние, активации трансформирующего фактора роста, способствующего образованию фиброзной ткани.

Сигнальные пути МАПК регулируют разнообразные процессы начиная с пролиферации и дифференцировки и заканчивая апоптозом. Активируемые множеством стимулов, они фосфорилируют большое число белков, включая факторы транскрипции, белки цитоскелета, киназы и другие ферменты, влияющие на экспрессию генов, обмен веществ, деление и выживание клеток, морфологию клеток.

Каждый путь МАПК состоит из трёхъярусного каскада киназ [1], включающего киназу киназы МАП-киназы (МАПККК, МАПЗК, МЕКК или МККК»), киназу МАП-киназы (МАПКК, МАП2К, МЕК или МКК») и саму МАП-киназу. Этот трёхъярусный каскад по типу переключателя сверхчувствительно передаёт внутрь клетки ответы на внешние стимулы и ряд внутренних. Часто существует и 4й ярус киназ (МАМПКККК). Киназы этого уровня могут быть связаны с клеточной оболочкой посредством малой ГТФазы или фосфолипидов. В клетках млекопитающих определено 5 семейств МАПК: 1) Киназы, регулируемые внеклеточными сигналами («ERK1 and ERK2»), 2) Jun N-терминальные киназы

(«JNK1, JNK2 and JNK3»), 3) изоферменты киназы p38 (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  и p38 $\delta$ ), 4) ERK3/ERK4, 5) ERK5. Полный путь внутриклеточной передачи от рецептора до МАП-киназы последней в ряду определён только для ERK1 и ERK2 киназ, которые действуют дальше после Ras прото-онкобелка. ERK киназы экспрессированы во многих тканях и образуют часть МАП-киназной действующей единицы, содержащей Raf- киназы 3-го яруса. В зависимости от силы и длительности стимуляции, активация ERK1/ERK2 MAPKs может привести либо к пролиферации либо к дифференцировке [2].

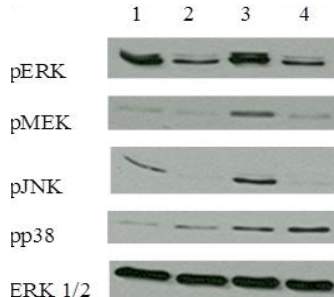
**Целью** работы было изучение активности МАП-киназ в условиях гипергликемии с точки зрения их возможного влияния на внутриклеточные механизмы развития эпителиально-мезенхимальной транзиции и влияния на эти механизмы ангиотензинов I и II. Работа выполнена у рамках научной программы МОЗ Украины «Механизмы апоптоза в культурах клеток и репаративные процессы в тканях» (№ государственной регистрации 0107U001159), в соответствии с планом научных работ ДЗ «Луганский державний медичний університет»

**Материалы и методы. Культура клеток.** Культуру эпителиоцитов проксимальных канальцев почек НК-2 выращивали при 37 °С во влажном CO<sub>2</sub> инкубаторе во флаконах типа Т-75 для обычных пассажей и заседали в 6-луночные планшеты для экспериментальных процедур. Клетки НК-2 выращивали в среде К-SFM, содержащей 5,7 мМ/л глюкозы, с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2мМ L-глутамин, 100 Ед/мл: 100мкг/мл пенициллина/стрептомицина. Отделение клеток от дна флакона производилось путем инкубирования клеточной культуры в 0,05% растворе Трипсин/EDTA в течении 5 минут после удаления инкубационной среды. Пассаж клеток производился на каждые третьи сутки в отношении 1:5.

**Анализ жизнеспособности и пролиферации клеток.** Жизнеспособность клеток определялась путем подсчета клеток при окрашивании трипановым синим. Клетки заседали в 6-луночные планшеты. После сбора клеток 50 мкл клеточной суспензии смешивалось с 50 мкл трипанового синего. Погибшие клетки окрашиваются в синий цвет. Подсчет живых и мертвых клеток производился в гемоцитометре. Жизнеспособность рассчитывалась как отношение живых клеток к общему количеству.

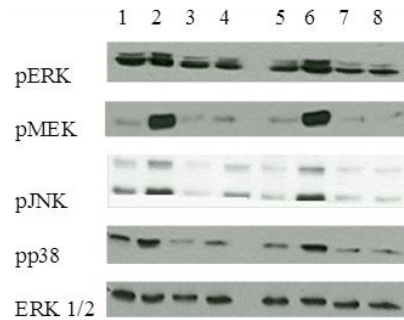
**Вестерн-блоттинг.** Для получения образцов для анализа лизис клеток и экстракция белков производилась по методу Лэммли в лизис-буфере. Равные количества проб смеси белков разделялись электрофорезом в 10% полиакриламидном геле с напряжением 150 В в течение 1 часа. Разделенные белки из геля переносились на нитроцеллюлозную мембрану методом танк-блоттинга с силой тока 0,4 А в течение 1 часа. Затем мембрана была блокирована в 5% растворе нежирного сухого молока в течение 1 часа. Различные специфические антитела к фосфорилированным киназам добавлялись к раствору на ночь в условиях помешивания и температуре 4° С. После трехразового промывания мембрана инкуби-

ривалась с пероксидаза-мечеными козьими антикроличьими вторичными антителами в течение 1 часа. Затем мембрану промывали три раза, и комплекс антиген-антитело был визуализирован при помощи набора хемилюминисценции. Уровень содержания фосфорилированных белков был стандартизирован путем повторного анализа мембраны с соответствующим суммарным антителом.



**Рис. 1.** Уровень фосфорилирования МАП киназ в НК-2 клетках на 7-й день инкубирования в среде с повышенным содержанием глюкозы. 1 – контроль без сыворотки; 2 – без сыворотки+глюкоза 25мМ; 3 – контроль в нормальной среде; 4 – нормальная среда + глюкоза 25мМ

**Результаты и обсуждение.** Инкубация клеток НК-2 в среде с повышенным содержанием глюкозы 25мМоль/л (моделирующее диабетическую гипергликемию) приводила к снижению степени фосфорилирования МАП-киназ (рис. 1), то есть к снижению их активности ниже нормального уровня во все экспериментальные сроки: 1, 4, 7 дней инкубации. Подавление активности МАП-киназ, в частности ERK1/2 являлось фактором, способствующим снижению пролиферации клеток. Применение ангиотензина I и II (100 нг/мл в течении 10 мин) на фоне инкубации клеток в гипергликемической среде ещё более снижало активность МАП-киназ (рис. 2). Это указывает на то, что в проведенных экспериментах выявленный эффект Ангиотензина был опосредован через рецепторы АТ II, сигнальные пути которого активируют фосфатазы МАП киназ, т.е. приводят к дефосфорилированию МАП киназ.



**Рис. 2.** Уровень фосфорилирования МАП киназ в НК-2 клетках после 10 мин инкубирования с ангиотензином I и II в среде с повышенным содержанием глюкозы. 1 – контроль без сыворотки, 2 – стимуляция сывороткой, 3 – ангиотензин I, 4 – ангиотензин II, 5 – без сыворотки + глюкоза 25мМ, 6 – глюкоза 25мМ + стимуляция сывороткой, 7 – глюкоза 25 мМ + ангиотензин I, 8 – глюкоза 25 мМ + ангиотензин II.

Таким образом, применение Ангиотензина усугубляло эффект инкубирования в гипергликемической среде на активность МАПК. При этом аналогичное воздействие оказывал как Ангиотензин I, так и Ангиотензин II. Это указывает на то, что в наших экспериментах Ангиотензин I внутриклеточно превращался в Ангиотензин II при помощи АПФ.

**Вывод.** Таким образом, на базе изученной экспериментальной модели выявлено, что воздействие ангиотензинов I и II на фоне гипергликемии подавляет ниже нормы активность сигнальных путей, регулирующих митоз клеток. Выявленные эффекты могут внести вклад в дальнейшее понимание механизмов развития нефропатии при сахарном диабете и совершенствование путей предупреждения и лечения указанной патологии. Перспективой дальнейших исследований является изучение активности внутриклеточных сигнальных путей на базе представленной экспериментальной модели при применении различных видов блокаторов ангиотензиновой регуляции.

## ЛИТЕРАТУРА:

1. Потехина Е.С. Митоген-активируемые протеинкиназные каскады и участие в них ste20-подобных протеинкиназ / Е.С. Потехина, Е.С. Надеждина // Успехи биол. химии. – 2002. – Т. 42 – С. 235-256.
  2. Ebisuya M. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. / M. Ebisuya, K. Kondoh, E. Nishida // Journal of Cell Science. – 2005. – Vol. 118 – P. 2997-3002.
  3. Mauer M. Diabetic nephropathy as a model for the use of renal structural endpoints in clinical trials / M. Mauer, P. Fioretto // Kidney Int Suppl. – 1997 – Vol. 63 – P.155-8.
  4. Nangaku M. Mechanisms of tubulointerstitial injury in the kidney: final common pathways to end-stage renal failure / M. Nangaku // Intern Med. – 2004 – Vol. 43 – P.9-17.
  5. Schramke H. MAP Kinases: From Intracellular Signals to Physiology and Disease / H. Schramke // News Physiol Sci. – 2002. – Vol. 17 – P. 62-67.
- Благодаренко Є.А.** Активність внутрішньоклітинних сигнальних шляхів в клітинах проксимальних канальців нирок в умовах змодельованої гіперглікемії in vitro // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 5. – С. 20-21.
- В експерименті апробована in vitro модель гіперглікемії для культури кліток тубулярного епітелію. Виявлені зміни активності внутрішньоклітинних сигнальних шляхів (мітоген-активованих протеїнкиназ, протеїнкинази B) в умовах інкубації в середовищі з підвищеною концентрацією глюкози. Відкрито посилюючий ефект впливу ангиотензину I і II на активність киназ, що вивчалися, в клітинах тубулярного епітелію в умовах гіперглікемії.
- Ключові слова:** гіперглікемія, ангиотензін, МАП кинази, культура клітин НК-2
- Благодаренко Е.А.** Активність внутриклеточных сигнальных путей в клетках проксимальных канальцев почек в условиях смоделированной гипергликемии in vitro // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 5. – С. 20-21.
- В експерименті апробована in vitro модель гіперглікемії для культури кліток тубулярного епітелію. Виявлені зміни активності внутрішньоклітинних сигнальних шляхів (мітоген-активируемых протеинкиназ, протеинкиназы B) в условиях инкубации в среде с повышенной концентрацией глюкозы. Обнаружен усиливающий эффект влияния ангиотензинов I и II на активность изученных киназ в клетках тубулярного эпителия в условиях гипергликемии.
- Ключевые слова:** гипергликемия, ангиотензин, МАП киназы, культура клеток НК-2
- Владаренко Е.А.** Activity of intracellular signal pathways in kidney proximal tubular cells in hyperglycemia conditions in vitro // Український медичний альманах. – 2011. – Том 14, № 5. – С. 20-21.
- In the experiment the in vitro model of hyperglycemia for cultured tubular epithelium cells was approved. Changes of activity of intracellular signal pathways (mitogen-activated protein kinases, protein kinase B) in the conditions of high glucose medium were revealed. Aggravating effect of angiotensin I and II influence at the activity of studied kinases in tubular epithelium cells in hyperglycemia conditions was found.
- Key words:** hyperglycemia, angiotensin, MAP kinases, HK-2 cells culture.

Надійшла 03.06.2011 р.  
Рецензент: проф. І.В.Лоскутова