© Благодаренко Е. А., Ребров Б. А., 2010

УДК 577.171:577.151:616-092.4

Е. А. БЛАГОДАРЕНКО[1], Б. А. РЕБРОВ[2]

ВЛИЯНИЕ АНГИОТЕНЗИНА I И II НА АКТИВНОСТЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В КЛЕТКАХ ПРОКСИМАЛЬНЫХ КАНАЛЬЦЕВ ПОЧЕК В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ IN VITRO

E. BLAGODARENKO, B. REBROV

ANGIOTENSIN I AND II INFLUENCE AT THE ACTIVITY OF INTRACELLULAR SIGNAL PATHWAYS IN THE RENAL PROXIMAL TUBULE CELLS IN HIGH GLUCOSE MEDIUM IN VITRO

Луганский государственный медицинский университет, г. Луганск
[1] - кафедра медицинской химии, [2] - кафедра внутренней медицины ФПО

Ключевые слова: *ангиотензин, внутриклеточные сигнальные пути, митоген-активируемые протеинкиназы, протеинкиназа В, тубулярный эпителий, диабетическая нефропатия.*

Резюме: *В эксперименте in vitro апробирована модель гипергликемии для культуры клеток эпителия проксимальных канальцев почек. Выявлены изменения активности внутриклеточных сигнальных путей (митоген-активируемых протеинкиназ, протеинкиназы В) в условиях инкубирования в среде с повышенной концентрацией глюкозы. Обнаружен негативный эффект воздействия ангиотензинов I и II на активность киназ.*

Summary: *In the experiment 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. Negative effect of angiotensin I and II influence at the activity of kinases was found.*

Вступление. Сахарный диабет (СД) является хроническим эндокринным заболеванием с поражением всех органов и систем. У 20-40% больных СД развивается диабетическая нефропатия с исходом в нефросклероз. Нефросклероз неизбежно приводит к формированию хронической почечной недостаточности и значительно отягощает течение сахарного диабета, являясь одной из основных причин инвалидизации и смерти больных при этой патологии [1].

В основе диабетической нефропатии лежит повреждение сосудов и ткани почек повышенными концентрациями глюкозы и продуктами обмена веществ (кетокислоты, свободные радикалы, лактат), изменённого вследствие гипергликемии и недостатка глюкозы внутри клеток. Повреждение эпителия проксимальных канальцев (ПК) непосредственно влияет на развитие как склероза интерстиция, так и гломерулосклероза - основных составляющих нефросклероза [2].

В настоящее время исследователи большое внимание уделяют изучению изменений активности внутриклеточных сигнальных путей митоген-активированных протеинкиназ (МАПК) и АКТ сигнального пути, как патогенетического звена многих заболеваний [3]. 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. 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 (p38α, p38β, p38γ и p38δ), 4) ERK3/ERK4, 5) ERK5. Передача сигнала от мембранного рецептора до МАПК является каскадной активацией ряда промежуточных киназ, одной из которых является МЕК [4].

Сигнальный путь протеинкиназы В (иначе называемой АКТ) [5] играет важную роль в регуляции метаболизма глюкозы в клетках, ре-

Благодаренко Евгений Анатольевич
e-mail: blagodarenko@ukr.net

гуляции клеточного цикла, ангиогенезе. Одной из целей фосфорилирования для АКТ является киназа GSK.

Целью данной работы явилось изучение состояния внутриклеточных сигнальных путей в клетках эпителия ПК в среде с повышенным содержанием глюкозы (модель сахарного диабета in vitro) в сочетании с воздействием ангиотензинном I и II. Это может иметь значение для раскрытия механизмов терапевтического эффекта применения ингибиторов ангиотензиновых рецепторов и ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента при диабетической нефропатии и развитии эпителиально-мезенхимальной транзиции.

Материалы и методы

Культура клеток. Культуру эпителиоцитов ПК почек НК-2 выращивали при 37 °С во влажном СО2 инкубаторе во флаконах типа Т-75 для обычных пассажей и засевали в 6-луночные планшеты для экспериментальных процедур. Клетки НК-2 выращивали в среде K-SFM, содержащей 5,7 мМ/л глюкозы, с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2мМ L-глутамина, 100Ед/мл:100мкг/мл пенициллина /стрептомицина. Условия гипергликемии создавались путем добавления в инкубационную среду глюкозы до получения концентрации 25 мМоль/л. 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 засевались 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 клеток.

Вестерн-блоттинг. Активность изученных киназ зависит от степени их фосфорилирования/дефосфорилирования в специфических сайтах. Метод вестерн-блоттинга применялся для определения содержания суммарного количества киназ и фосфорилированной их формы. Для получения образцов для анализа лизис клеток и экстракция белков производились 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. Специфические антитела к фосфорилированным киназам (Cell Signaling, Santa Cruz) добавлялись к раствору на ночь в условиях помешивания и температуре 4о С. После трехразового промывания мембрана инкубировалась с пероксидаза-меченными козьими анти-кроличьими вторичными антителами (Amersham Biosciences) 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.

Эксперименты проводились в среде, не содержащей сыворотки, для снижения фонового фосфорилирования киназ. В каждой серии эксперимента в одну из проб добавлялась сыворотка для контроля реактивности клеток.

Статистическая обработка данных выполнялась при помощи программы «Statistica 6» с подсчетом критерия Стьюдента. Статистически значимые различия определяли при уровне $p < 0,05$.

Полученные результаты

Инкубация клеток НК-2 в среде с повышенным содержанием глюкозы 25мМоль/л (моделирующее диабетическую гипергликемию) приводила к снижению степени фосфорилирования киназ ERK1/2, MEK (которая активирует ERK), JNK, то есть к снижению их активности ниже нормального уровня во все экспериментальные сроки: 1, 4, 7 дней инкубации (рис. 1-А, Б, В). Активность киназы p38 на 1 и 4 сутки снижалась сходно с остальными киназами, а к седьмым суткам происходило повышение активности киназы p38, что является показателем пребывания клеток в стрессовом состоянии (рис. 1-Г). Подавление активности киназ ERK1/2 и JNK, и активация киназы p38 являлось фактором, способствующим снижению количества живых клеток в культуре.

Применение ангиотензина I и II (100 нг/мл в течении 10 мин) после инкубации клеток в гипергликемической среде (1 сутки) 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 [6], сигнальные пути которого активируют фосфатазы МАП киназ, т.е. приводят к дефосфорилированию МАП киназ.

Таким образом, применение ангиотензина усугубляло эффект инкубирования в гипергликемической среде на активность МАПК. При этом аналогичное воздействие оказывал как ан-

гиотензин I, так и ангиотензин II. Это указывает на то, что в наших экспериментах ангиотензин I внутриклеточно превращался в ангиотензин II при помощи ангиотензин-превращающего фермента.

Другим внутриклеточным сигнальным путем, исследованным в наших экспериментах был путь PI3K-AKT-GSK3β.

В гипергликемической среде активность AKT киназы снижалась. Но под действием ангиотензина II происходило повышение уровня фосфорилирования AKT. При этом ангиотензин I не оказывал такого эффекта.

Активированная киназа AKT (под действием ангиотензина II) осуществляла последующее фосфорилирование GSK3β. Фосфорилирование GSK3β вызывает подавление ее активности. Подавление GSK3β может способствовать запуску деградации E-кадгеринов с последующим нарушением межклеточных контактов и запуску процессов эпителиально-мезенхимальной транзиции [7].

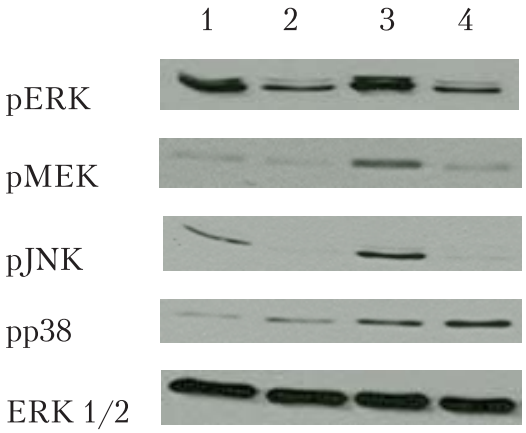
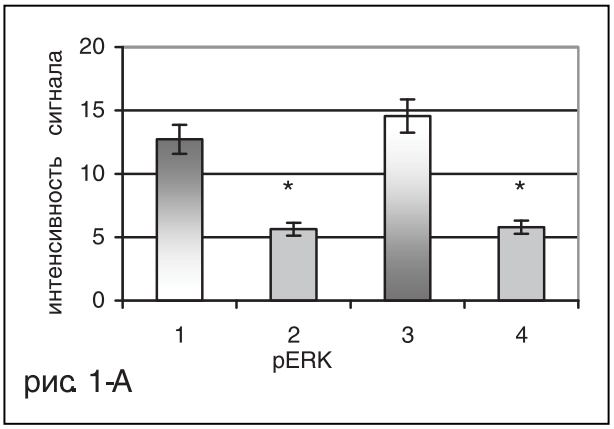
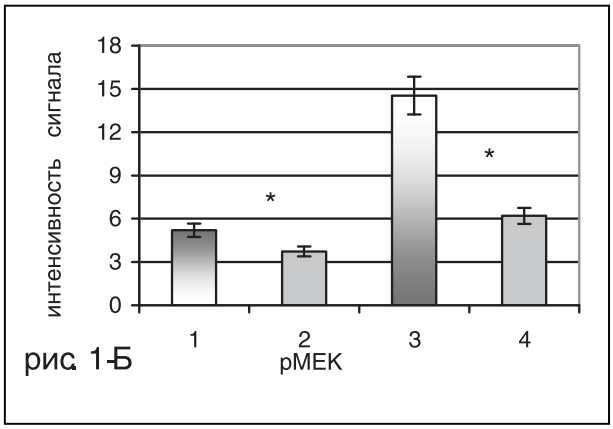
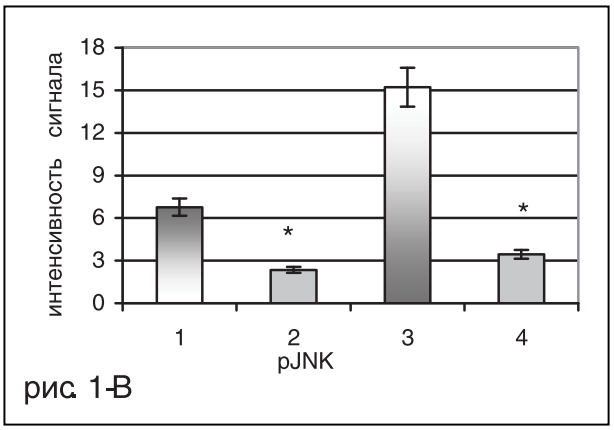


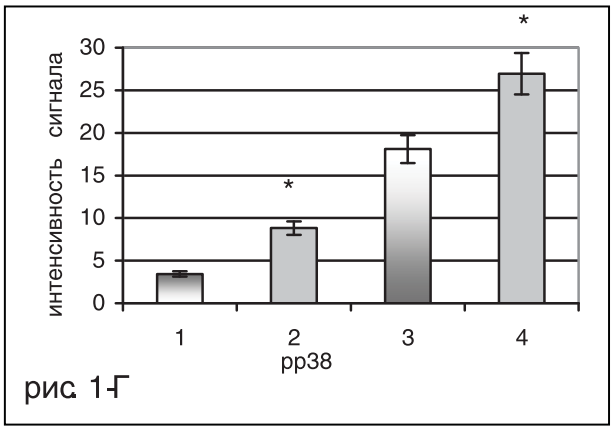
Рис. 1.
Уровень фосфорилирования МАП киназ в НК-2 клетках на 7-й день инкубирования в среде с повышенным содержанием глюкозы.

1 – контроль без сыворотки
2 – без сыворотки + глюкоза 25мМ
3 – контроль в нормальной среде
4 – нормальная среда + глюкоза 25мМ









* - достоверное различие по сравнению с соответствующим контролем.

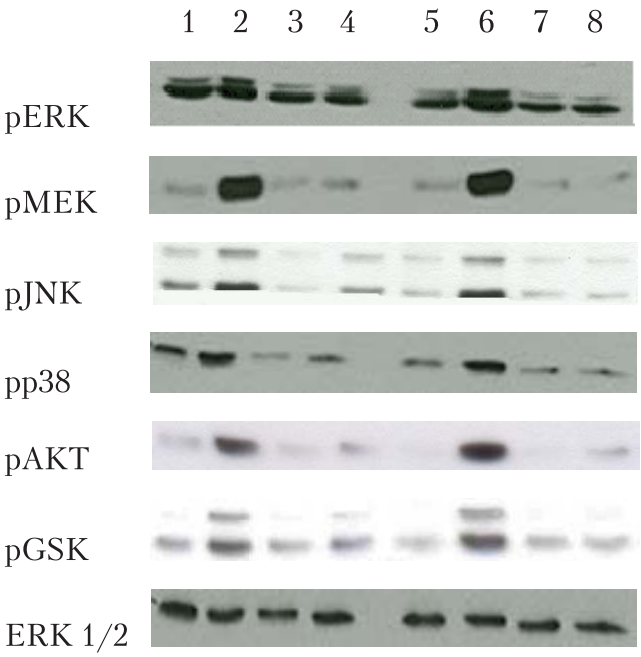
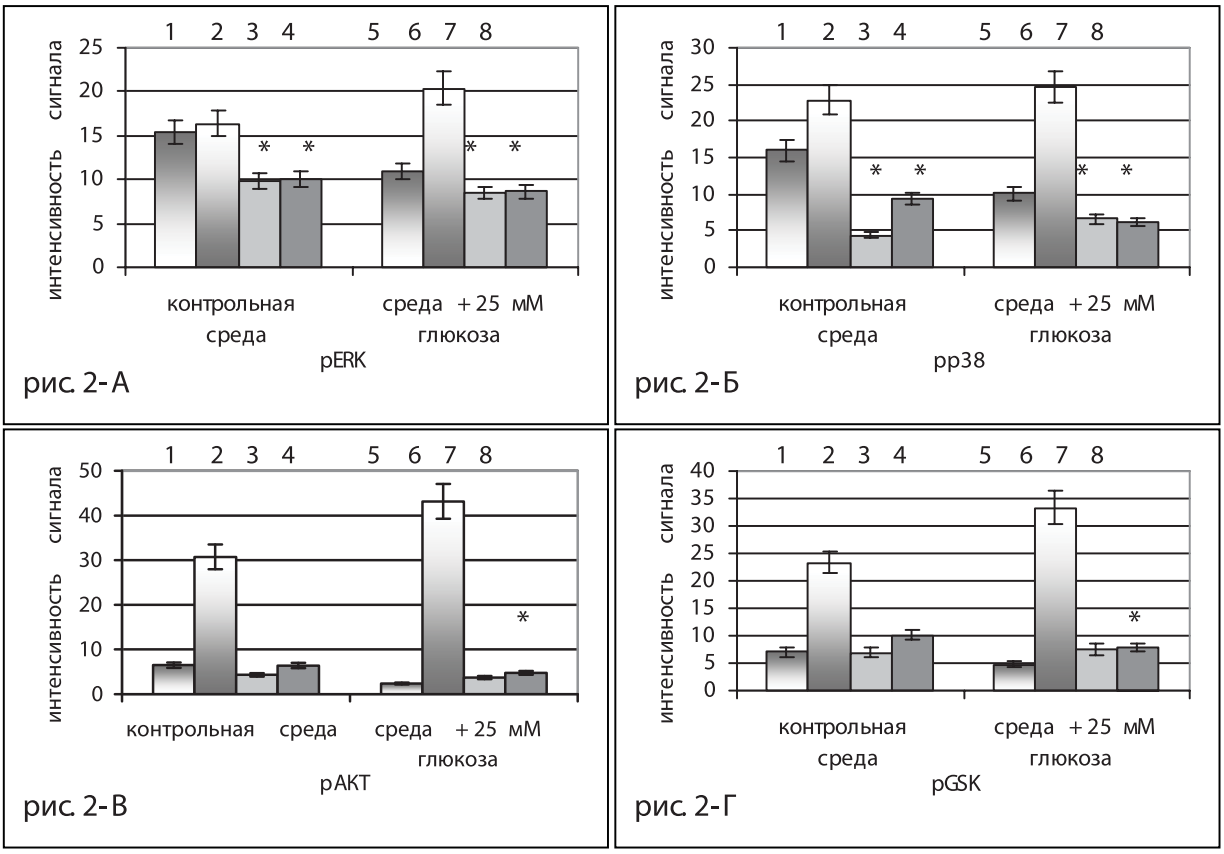


Рис. 2.
Уровень фосфорилирования МАП киназ в НК-2 клетках после 10 мин инкубирования с ангиотензинном I и II в среде с повышенным содержанием глюкозы
1 – контроль без сыворотки,
2 – стимуляция сывороткой,
3 – ангиотензин I, 4 - ангиотензин II,
5 – без сыворотки + глюкоза 25мМ,
6 – глюкоза 25мМ + стимуляция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



* - достоверноеразличиепо сравнениюс соответствующим контролем

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На базе изученной экспериментальной модели выявлено, что инкубирование клеток эпителия ПК в гипергликемической среде подавляет активность сигнальных путей, регулирующих клеточный цикл клеток. Воздействие ангиотензинов I и II усугубляет негативные изменения в сигнальных путях клеток. Выявленные эффекты могут внести вклад в дальнейшее понимание механизмов развития нефропатии при сахарном диабете и совершенствование путей предупреждения и лечения указанной патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Standards of Medical Care in Diabetes – 2007 / American Diabetes Association // Diabetes Care. – 2007, V.30, Suppl. 1. – P. 1-41.
2. *Дедова И. И.* Ведение больных сахарным диабетом с терминальной почечной недостаточностью на диализе. Методические указания / Под ред. И. И. Дедова и Н. А. Томилиной, 2004. - 62 с.
3. *Schramek H.* MAP Kinases : From Intracellular Signals to Physiology and Disease / H. Schramek // News Physiol Sci. – 2002. – Vol. 17 – P. 62-67.
4. *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.
5. *Sen Prosenjit.* Involvement of the Akt/PKB signaling pathway with disease processes / Prosenjit Sen *[et al.]* // Molecular and Cellular Biochemistry. – 2003. – Vol. 253 – P. 241–246.
6. *Inagami Tadashi.* Angiotensin receptors: molecular biology and signaling / Tadashi Inagami *[et al.]* // Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. – 1999. – Vol. 26 – P. 544-549.
7. *Jope Richard S.* Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3) : Inflammation, Diseases, and Therapeutics / Richard S. Jope *[et al.]* // Neurochem Res. – 2007. – Vol. 32 – P. 577–595.

Надійшла до редакції 08.04.10
Прийнята до друку 15.10.10