

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Абрамичева Полина Александровна

**ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ
ПРОЛАКТИНА В МОДЕЛИ ХОЛЕСТАЗА БЕРЕМЕННЫХ**

Специальность – 03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре физиологии человека и животных Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова».

Научный руководитель:

Смирнова Ольга Вячеславовна - доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Рубцов Пётр Михайлович – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта» Российской академии наук, лаборатория клеточных основ развития злокачественных заболеваний, главный научный сотрудник

Мокрышева Наталья Георгиевна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии», исполняющая обязанности директора, главный врач

Попков Василий Андреевич – кандидат биологических наук, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова, отдел функциональной биохимии биополимеров, лаборатория структуры и функции митохондрий, младший научный сотрудник

Защита диссертации состоится «18» ноября 2019 года, в 17:00 на заседании диссертационного совета МГУ.03.06 при биологическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, ауд. М-1.

E-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «Истина»: <https://istina.msu.ru/dissertations/241422958/>

Автореферат разослан «17» октября 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



Б.А. Умарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы и степень ее разработанности. Холестаз – патология печени, характеризующаяся нарушением оттока или секреции желчи. Существует несколько типов заболеваний печени, связанных с беременностью, одно из которых - внутрипеченочный холестаз беременных (ICP - Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy). Для данной патологии характерен зуд, повышение уровня сывороточных аминотрансфераз и желчных кислот во втором или третьем триместре беременности и спонтанное облегчение симптомов в течение 2 или 3 недель после родов [Gabzdyl and Schlaeger, 2015; Lee and Brady, 2009]. В последние годы на это заболевание обратили пристальное внимание, так как увеличилась частота встречаемости случаев фетального дистресса, гестационного диабета, преждевременных родов и даже мертворождения, что связано с патогенезом холестаза беременных [Elferink, 2003; Martineau et al., 2014]. Учитывая тенденцию роста патологий беременности, актуальность данного исследования высока. В связи с этим важной задачей является поиск молекулярных мишеней, которые могут лечь в основу тактики лечения холестаза беременных.

Какие гормоны и их метаболиты ответственны за развитие этого заболевания, остается пока неясно. Известно, что уровень пролактина в плазме крови значительно возрастает в течение беременности, что объясняется стимуляцией материнских лактотрофов гипофиза плацентарными эстрогенами [Ranta et al., 1979]. Что касается патологических состояний, связанных с беременностью, то есть данные, полученные в экспериментах на крысах, о том, что конъюгированные метаболиты эстрогена и прогестерон, скорее всего, связаны с развитием холестаза [Elferink, 2003]. Если говорить о пролактине, то в нашей лаборатории было показано, что в модели холестаза беременных на крысах происходит дополнительный рост его концентрации [Александрова и соавт., 2012] - это подтверждается исследованиями других научных групп на беременных женщинах с данной патологией [Narasaka et al., 2000a; Ranta et al., 1979], - а также наблюдаются нарушения водно-солевого обмена. Изменения водно-солевого гомеостаза могут быть объяснены тем, что при холестазе почка берет на себя функции печени, связанные с экскрецией желчных кислот и билирубина. Что касается пролактина, то у млекопитающих его роль в почках остается неясной, но

известно, что у рыб пролактин выполняет осморегуляторную функцию [О.В. Смирнова, 2011]. Выявлен ряд эффектов пролактина на клетки почки, связанных с регуляцией водно-солевого обмена [Crambert et al., 2010; Ibarra et al., 2005; Molinari et al., 2007], но их механизмы остаются до сих пор не исследованными. Несмотря на то, что в почке найден рецептор пролактина (ПРЛР), только одной группой авторов исследовано соотношение изоформ рецептора в норме [Nagano and Kelly, 1994; Ouhtit, Morel, and Kelly, 1993], а изменение уровня экспрессии и соотношения изоформ ПРЛР почки при холестазах и при беременности остается неясным. Кроме того, неизученной является регуляция пролактином экспрессии транспортеров солей в почке.

Целью данной работы было исследование ключевых молекулярных мишеней и посредников действия пролактина на почку в условиях модели холестаза беременных у крыс для проверки гипотезы о смещении действия пролактина в условиях патологии с его репродуктивной функции в сторону натрийуретической как эволюционно древней.

Задачи работы:

1. Проанализировать экспрессию мРНК длинной и короткой изоформ пролактинового рецептора и мРНК и белка ключевых посредников пролактинового сигналинга этих изоформ в разных зонах почки при холестазах беременных и в группах сравнения.
2. Проанализировать экспрессию мРНК и белка ключевых молекулярных мишеней натрийуретического действия пролактина в разных зонах почки в условиях холестаза беременных.
3. Проанализировать экспрессию ключевых транспортеров бикарбонатов в почке при холестазах беременных и в группах сравнения.

Научная новизна исследования. В настоящей работе впервые показаны особенности изменения пролактинового сигналинга в коре и внешнем мозговом слое почки в условиях холестаза беременных и группах сравнения. Впервые показано, что в условиях данной патологии в реализации эффектов пролактина принимают участие обе изоформы ПРЛР. Произведен поиск молекулярных мишеней натрийуретического действия пролактина в почке в условиях холестаза беременности и группах сравнения и впервые найдены наиболее чувствительные к действию пролактина натриевые и бикарбонатные транспортеры.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты настоящей работы развивают современные представления о пролактиновом сигналинге в условиях холестаза беременных, о динамике изменения соотношения длинной и короткой изоформ ПРЛР в норме и при патологии. Современная терапия холестаза беременных направлена на коррекцию работы печени, но не почек, несмотря на то, что почки в условиях патологии частично берут на себя детоксикационную функцию печени. Прделанная работа открывает перспективы для поиска фармакологических препаратов с целью коррекции работы почки в условиях холестаза беременных, а именно натриевых транспортеров, экспрессирующихся в этом органе.

Методология и методы исследования. Для моделирования патологии холестаз беременных проводили хирургические операции на беспородных половозрелых самках крыс. Для анализа концентрации эстрадиола в крови животных проводили иммуноферментный анализ, для анализа концентрации натрия и бикарбонатов в крови и моче пользовались коммерческими наборами реагентов. Экспрессию интересующих белков исследовали методом вестерн-блоттинга, экспрессию генов – ОТ-ПЦР. Анализ активности Na^+/K^+ -АТФазы проводили методом Ратбуна и Бетлах.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. В реализации эффектов пролактина в модели холестаза беременных участвуют и короткая, и длинная изоформы ПРЛР в коре и во внешнем мозговом слое почки.
2. Пролактин осуществляет тонкую настройку работы различных натриевых транспортеров в разных зонах нефрона в условиях такой патологии, как холестаз беременных.
3. Пролактин оказывает влияние на натриевые и бикарбонатные транспортеры на уровне изменения активности, экспрессии мРНК и белка.

Степень достоверности результатов исследований. Полученные в ходе работы данные статистически достоверны и воспроизводимы. Набор используемых экспериментальных методик оптимален для решения поставленных задач. Обзор литературы написан с использованием ссылок на свежие научные источники.

Апробация материалов диссертации. Результаты данной диссертационной работы были представлены на IV Съезде физиологов СНГ (Дагомыс, Россия, 2014); на XXVII Зимней молодежной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, Россия, 2015); на ISN World

Congress of Nephrology (Кейптаун, ЮАР, 2015); на The 18th World Congress International Society of Gynecological Endocrinology (ISGE, Флоренция, Италия, 2018); на The 43rd Federation of European Biochemical Societies Congress (FEBS, Прага, Чехия, 2018); на 56th European Renal Association - European dialysis and transplantation association (ERA-EDTA) Congress (Будапешт, Венгрия, 2019); на XV Международном Междисциплинарном Конгрессе "Нейронаука для медицины и психологии" (Судак, Крым, Россия, 2019). Диссертационная работа апробирована 7 октября 2019 года на заседании кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 13 печатных работ: 6 статей в периодических изданиях, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web of Science, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06 по специальности 03.03.01 – физиология, и 7 тезисов в сборниках докладов международных и всероссийских научных конференций.

Личный вклад автора. Личный вклад соискателя Абрамичевой П.А. присутствует на каждом этапе выполнения диссертационной работы и заключается в планировании экспериментов, проведении хирургических операций на животных, моделировании патологии холестаза беременных, проведении биохимических и молекулярно-биологических исследований, статистической обработке данных, написании тезисов докладов и статей, представлении результатов работы на конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 143 страницах, содержит 27 рисунков и 4 таблицы. Список цитируемой литературы включает 246 источников, из них 238 на иностранном языке.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные группы животных. Работа проводилась на половозрелых нерожавших самках беспородных белых крыс массой 190-250 г, объединенных в 4 экспериментальные группы: интактные, с гиперпролактинемией (модель псевдобеременности), с холестазом и с холестазом на фоне гиперпролактинемии (модель холестаза беременных). У крыс каждой группы собирали кровь, мочу для определения концентрации натрия, бикарбонатов и эстрадиола, почки (кору и внешний мозговой слой) для анализа экспрессии белка и мРНК различных мишеней и активности Na^+/K^+ -АТФазы, а также гипофизы для анализа экспрессии мРНК различных генов-мишеней.

Хирургические методы. Перевязка общего желчного протока. У наркотизированных крыс извлекали из-под печени часть двенадцатиперстной кишки с впадающим в нее общим желчным протоком. Проток перерезали между заранее наложенными лигатурами, после чего возвращали кишку под печень и зашивали надрез в мышцах и коже. Спустя 2 недели после операции животных декапитировали и забирали биоматериал.

Трансплантация гипофиза под капсулу почки – модель гиперпролактинемии. В данной работе повышенный уровень пролактина у крысы в крови индуцировали в результате пересадки одного гипофиза крысы-донора под почечную капсулу крысы-реципиента. В группе «холестаз беременных» трансплантацию производили сразу после перевязки и перерезки общего желчного протока. Через две недели после операции при заборе крови, почек и гипофизов проводили визуальный контроль приживаемости гипофиза с целью определения успешности моделирования гиперпролактинемии.

Выделение внешнего мозгового и коркового слоев почки. Из почек 4 экспериментальных групп животных выделяли внешний мозговой слой и кору с помощью ножниц, скальпеля и малого пинцета. Образцы белков получали путем лизиса коры и внешнего мозгового слоя почек в RIPA-буфере в присутствии 0,2 mM PMSF и коктейля ингибиторов протеаз. Для дальнейшего выделения РНК ткани помещали в фиксатор для стабилизации РНК в образцах Intact RNA.

Биохимические методы. Дифференциальное центрифугирование и выделение микросомальной фракции из внешнего мозгового слоя и коры почек. Выделение микросом осуществляли по методу Jorgensen с некоторыми изменениями [Jørgensen, 1988]. К извлеченному внешнему мозговому слою и коре почек (около 200 мг) добавляли среду выделения (0,25 M сахара, 1 mM ЭДТА, 20 mM Tris-HCl, pH 7,45), содержащую коктейль ингибиторов протеаз и 0,2 mM PMSF. Суспензию гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера на льду. Гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при 6500 g, а супернатант – 1 ч при 45000 g. Концентрацию белка определяли по методу Лоури.

Определение активности Na^+/K^+ - АТФазы (метод Ратбуна и Бетлах). Активность Na^+/K^+ - АТФазы определяли по количеству неорганического фосфата (в мкмоль высвобождаемого фосфата/(мг белка*ч)), образовавшегося в результате гидролиза АТФ. Для активации «латентной» Na^+/K^+ -АТФазы активность в препаратах микросом измеряли в присутствии дезоксихолата натрия. В расчетах активности натрий-калиевого насоса учитывали значение оптической плотности, полученное путем вычитания из общей оптической плотности значения оптической

плотности, соответствующего Mg^{2+} -АТФазе. Конечный расчет активности Na^+/K^+ - АТФазы проводили по формуле:

$$\text{активность}_{\text{удельная}} = \frac{(A_{660 \text{ общ}} - A_{660 \text{ Mg-АТФазы}}) \times 60 \text{ мин}}{\text{коэфф-т калибровки} \times t \text{ инкуб} \times \text{мг белка}}$$

Вестерн-блоттинг. Лизаты разделяли электрофоретически по методу Лэммли. Для детекции белков использовали следующие антитела: к α_1 -субъединице Na^+/K^+ - АТФазы – разведение 1:1000; к β_1 -субъединице Na^+/K^+ - АТФазы, – 1:100; к глицеральдегидфосфатдегидрогеназе (ГАФД) - 1:60000; к β -актину - 1:12000; к STAT5 -1:1000; к pSTAT5 - 1:1000; к NBCE1 - 1:1000; к пендрину - 1:200. Антитела, связавшиеся с мембраной, детектировали с помощью набора для оценки хемолюминесценции Clarity™ Western ECL Substrate на приборе Endolab ChemiDoc XRS plus («Bio-Rad», Канада). Относительный уровень белка оценивали методом денситометрии с использованием программы ImageLab™ 3.0 Software («Bio-Rad», Канада).

Определение концентрации натрия в моче и сыворотке крови. Концентрацию натрия в моче и сыворотке определяли с помощью набора «Ольвекс диагностикум» по инструкции производителя. Суточный клиренс ионов натрия вычисляли по формуле:

$$K = \frac{C_m \times V_m}{C_k \times m},$$

где C_m — концентрация натрия в моче, C_k – концентрация натрия в крови, V_m — объем суточной мочи, m – масса животного.

Определение концентрации бикарбонатов в моче и сыворотке крови. Концентрацию бикарбонатов в моче и сыворотке определяли с помощью набора «DiaSys» по инструкции производителя. Суточный клиренс бикарбонатов вычисляли по той же формуле, что и клиренс натрия.

Молекулярно-биологические методы: выделение РНК из тканей почки и гипофиза, очистка на колонках, ОТ-ПЦР. Выделение РНК проводили с помощью реагента TRIzol в соответствии с протоколом производителя. Выделенную тотальную РНК всех использованных в исследовании образцов тканей обрабатывали ДНКазой I и очищали с помощью набора колонок для очистки малого количества РНК (The RNeasy Plus Mini Kit, “Qiagen”, США). Обратную транскрипцию проводили с помощью транскриптазы ImProm-IT™ Reverse Transcriptase («Promega», США) согласно инструкции производителя. Синтезированную кДНК использовали как матрицу для проведения ОТ-ПЦР на амплификаторе Bio-rad CFX96 («Bio-Rad», Канада) с набором реактивов, включающим интеркалирующий краситель SYBR Green I, в соответствии с

методикой, рекомендованной производителем. Уровень экспрессии мРНК целевых генов рассчитывался с учетом экспрессии генов «домашнего хозяйства» GAPDH и HPRT. Данные нормировали на геометрическое среднее пороговых циклов генов домашнего хозяйства по формуле:

$$R = \frac{E^{\sqrt{C_{t\ HPRT} \times C_{t\ GAPDH}}}}{E^{C_{t\ \text{измеряемый ген}}}} \times 100\%,$$

где R – условные единицы экспрессии мРНК, E – эффективность амплификации, C_t– соответствующий пороговый цикл, HPRT– ген, кодирующий HPRT, GAPDH–ген, кодирующий GAPDH.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с поправками на множественное сравнение (критерий Sidak) и корреляционного анализа (критерий Pearson) в программе GraphPad Prism 7 («GraphPad Software Inc.», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Пролактиновый сигналинг в почке в модели холестаза беременных

1.1. Анализ экспрессии мРНК длинной и короткой изоформ ПРЛР во внешнем мозговом слое и коре почки при холестазе беременных и в группах сравнения. Во внешнем мозговом слое почки экспрессия мРНК обеих изоформ непропорционально возрастает относительно нормы в группе «холестаз» с преобладанием короткой как доминантной негативной. В условиях холестаза беременных соотношение экспрессии изоформ изменяется в сторону длинной в связи с непропорциональным снижением экспрессии обеих изоформ ПРЛР относительно группы «холестаз» (рис.1а, 2а). В коре почки экспрессия длинной изоформы ПРЛР возрастает при холестазе беременных относительно нормы (рис.1б). Статистически значимых изменений экспрессии короткой изоформы ПРЛР в коре не обнаружено (рис.2б). В коре соотношение экспрессии мРНК длинной изоформы ПРЛР к короткой возрастает при холестазе беременных относительно группы «холестаз» и «норма» в связи с постепенным ростом длинной

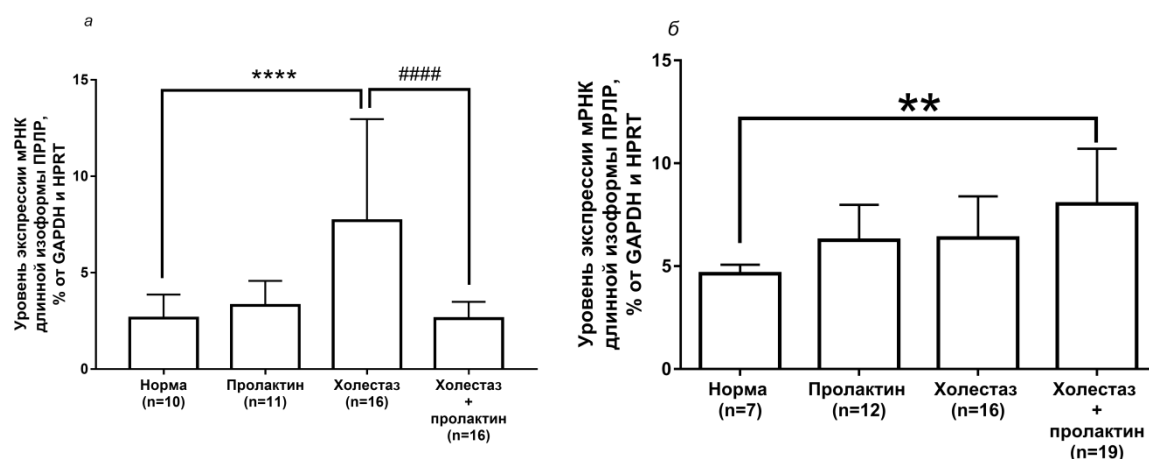


Рис.1. Экспрессия мРНК длинной изоформы ПРЛР у крыс исследуемых групп во внешнем мозговом слое (а) и коре (б) почки. n-количество животных. Данные по группам на этом и последующих рисунках представлены в виде среднего $\pm$ S.D. ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ – статистически значимые различия по сравнению с группой «норма», ##### $p < 0,0001$ – по сравнению с группой «холестаз» (one-way ANOVA, тест Sidak).

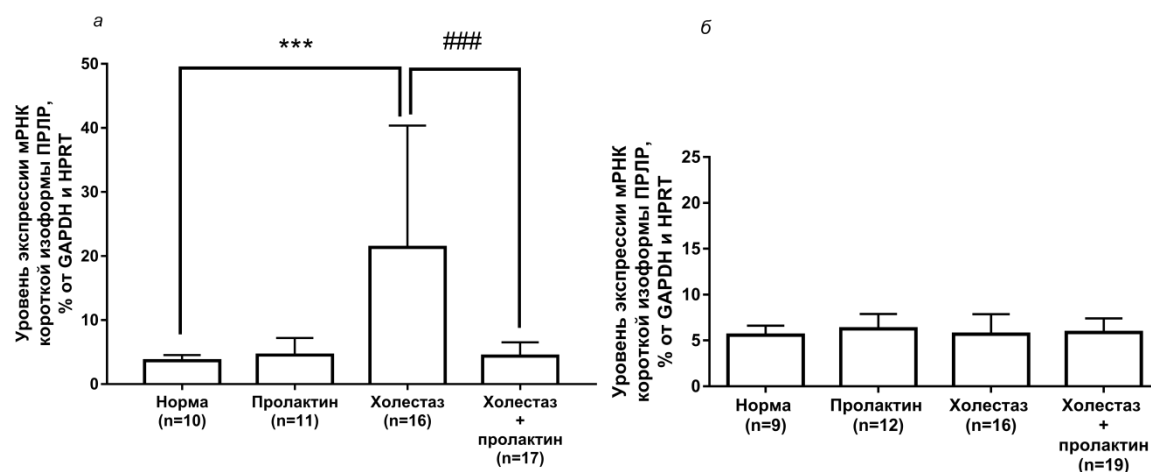


Рис.2. Экспрессия мРНК короткой изоформы ПРЛР у крыс исследуемых групп во внешнем мозговом слое (а) и коре (б) почки. *** $p < 0,001$ – статистически значимые различия по сравнению с группой «норма», ### $p < 0,001$ – по сравнению с группой «холестаз» (one-way ANOVA, тест Sidak).

Заслуживает внимания сам факт резкого увеличения чувствительности почки к пролактину в условиях холестаза. Это может быть связано со смещением функций пролактина в сторону регуляции водно-солевого обмена, в том числе

стимуляции экскреции натрия и бикарбонатов [Абрамичева и соавт., 2017; Булаева и соавт., 2016] и детоксикации [Aleksandrova, Sirotina, Smirnova, 2015]. Кроме того, при холестазах во внешнем мозговом слое почки наблюдается непропорциональный рост короткой изоформы ПРЛР. Учитывая, что короткая изоформа выполняет роль доминантного негативного регулятора в результате образования гетеродимеров с длинной изоформой [Tan et al., 2005; Yonezawa et al., 2015], можно думать, что собственные эффекты короткой изоформы в условиях холестаза особенно хорошо выражены. Вероятно, короткая изоформа в почках выполняет свою самостоятельную роль, значение которой возрастает в условиях патологии.

1.2. Анализ экспрессии белка STAT5, pSTAT5 и экспрессии мРНК STAT5A и STAT5B во внешнем мозговом слое и коре почки при холестазах беременных и в группах сравнения. При холестазах беременных увеличивается экспрессия белкового продукта pSTAT5 (рис.3б, 3в) по сравнению с нормой во внешнем мозговом слое почки, чего не наблюдается в коре почки. Уровень экспрессии белкового продукта STAT5 (рис.3а, 3в) и уровень мРНК STAT5A и STAT5B не изменяется в обоих слоях почки в условиях этой патологии ($p > 0,05$, на рис. не показано). Рост pSTAT5 свидетельствует о проведении сигнала через длинную изоформу ПРЛР в условиях холестаза беременных.

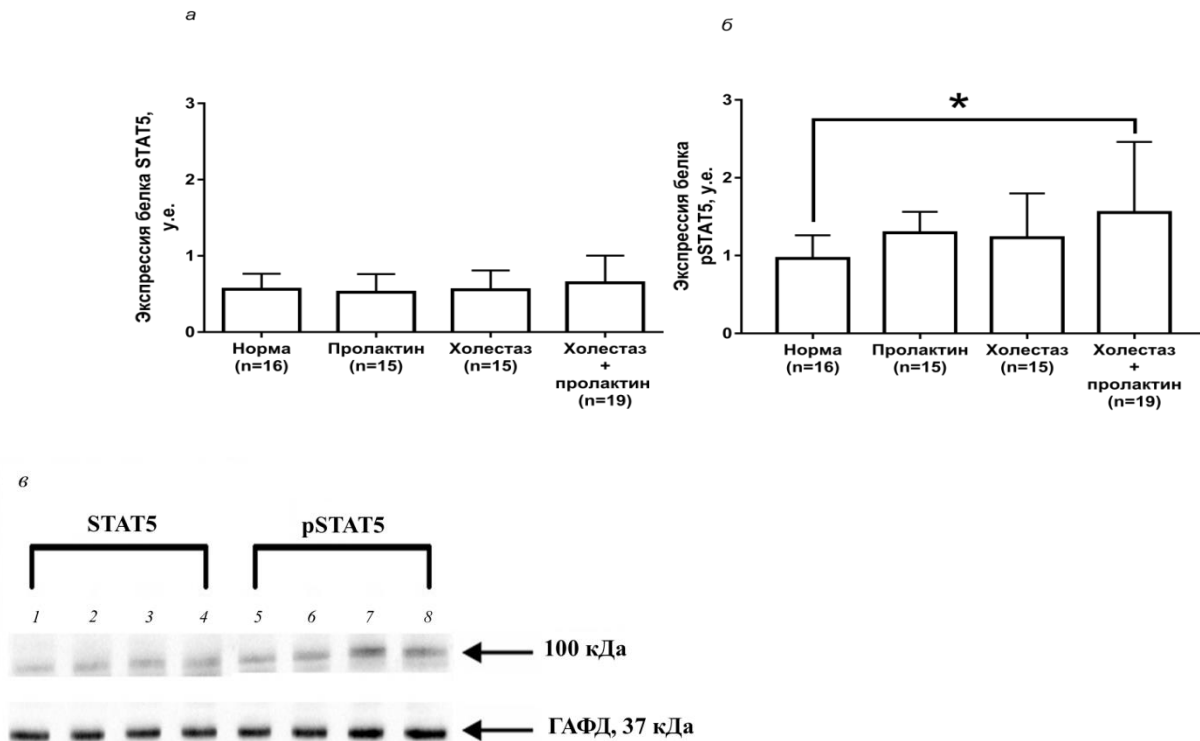


Рис.3. Уровень экспрессии белка STAT5 (а, в) и pSTAT5 (б, в) во внешнем мозговом слое почки у крыс исследуемых групп. * $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с

группой «норма» (one-way ANOVA, тест Sidak). Номера дорожек: 1,5 – норма, 2,6 – пролактин, 3,7 – холестаз, 4,8 – холестаз+пролактин.

1.3. Анализ экспрессии мРНК терминаторов пролактинового сигналинга, обладающих STAT-чувствительным элементом, во внешнем мозговом слое и коре почки при холестазе беременных и в группах сравнения. Во внешнем мозговом слое почки экспрессия генов SOCS3 (рис.4а) и PIAS3 (рис.5а) возрастает при холестазе беременных по сравнению с интактными животными. В коре в условиях холестазы беременных также возрастает экспрессия как SOCS3 (рис.4б), так и PIAS3 относительно нормы (рис.5б), кроме того, экспрессия SOCS3 возрастает в группе «холестаз» относительно интактных крыс. Эти транскрипционные факторы обладают STAT-чувствительными элементами в промоторах своих генов, т.е. в случае роста STAT5 их экспрессия возрастает, и они способствуют подавлению пролактинового сигналинга через длинную изоформу (в случае SOCS3 – и короткую). Для CIS не было выявлено изменений в экспрессии ни в одной из анализируемых структур почки ($p>0,05$, на рис. не показано).

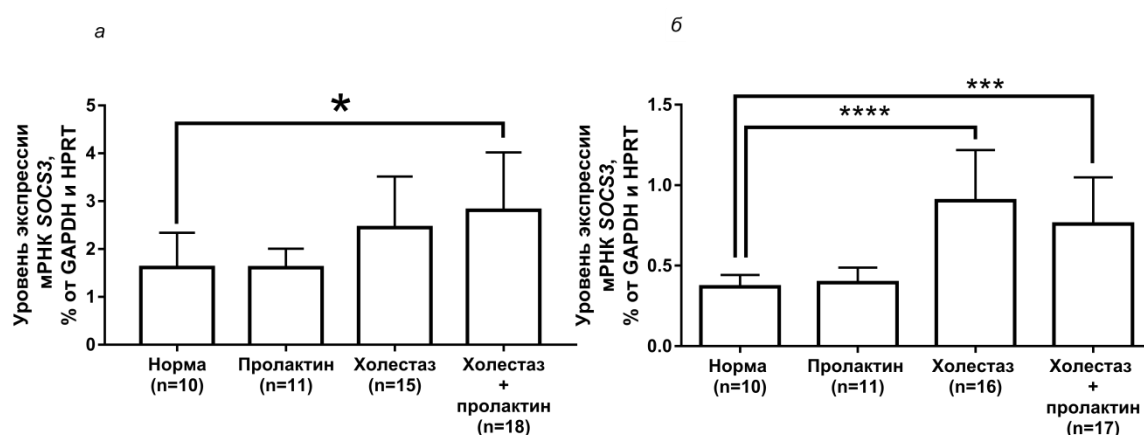


Рис.4. Уровень экспрессии мРНК SOCS3 у крыс исследуемых групп во внешнем мозговом слое (а) и коре (б) почки. * $p<0,05$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$ – статистически значимые различия по сравнению с группой «норма» (one-way

ANOVA,

тест

Sidak).

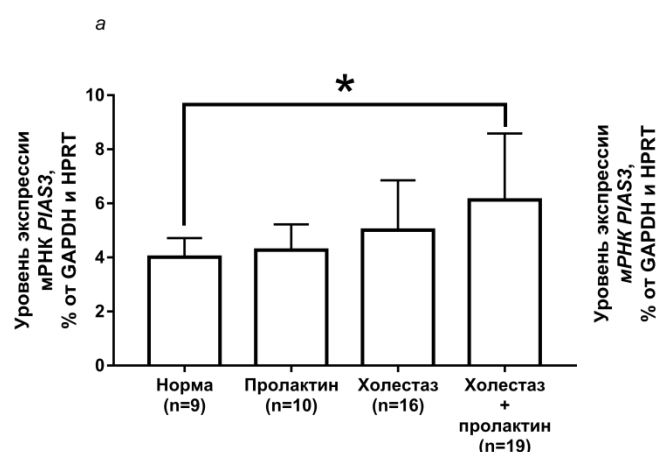
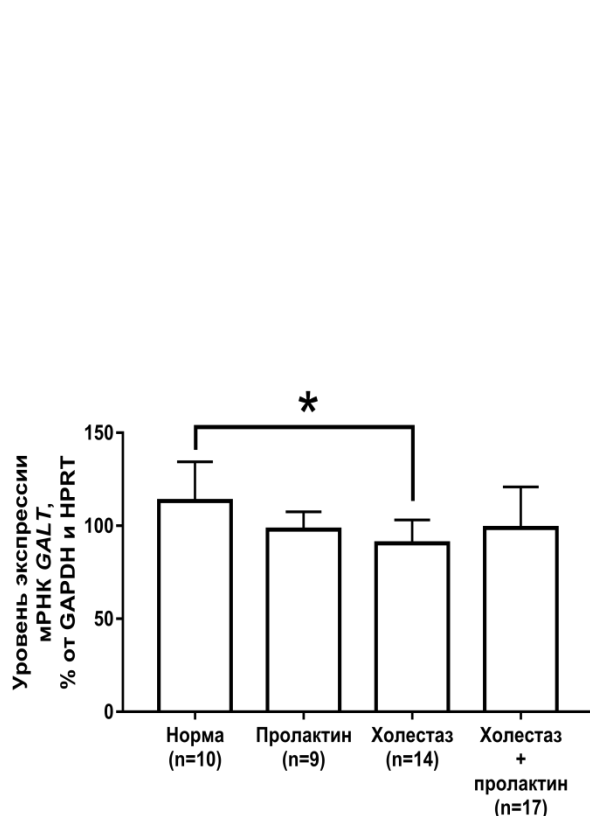


Рис.5. Уровень экспрессии мРНК PIAS3 у крыс исследуемых групп во внешнем мозговом слое (а) и коре (б) почки. * $p < 0,05$, – статистически значимые различия по сравнению с группой «норма» (one-way ANOVA, тест Sidak).

1.4. Анализ экспрессии мРНК ключевых посредников сигналинга короткой изоформы ПРЛР во внешнем мозговом слое и коре почки при холестазе беременных и в группах сравнения. Экспрессия мРНК GALT снижается при холестазе по сравнению с нормой только во внешнем мозговом слое почки (рис. 6). Для FOXO3 не было обнаружено статистически значимых изменений в обоих слоях почки ($p > 0,05$, на рис. не показано). Нами было показано наличие положительной корреляции между экспрессией GALT и FOXO3 ($p < 0,01$, $R^2 = 0,39$) в условиях холестаза беременных и между экспрессией GALT и короткой изоформой ПРЛР у intactных крыс ($p < 0,05$, $R^2 = 0,555$). Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что GALT и FOXO3 вовлечены в сигнальный каскад короткой изоформы ПРЛР не только в яичнике, как показано Halperin и соавт. [Halperin et al., 2008], но и в почке. Наличие положительной, а не отрицательной корреляции между GALT и короткой изоформой ПРЛР может быть связано с тем, что, возможно, наблюдается компенсаторный рост экспрессии GALT в условиях его подавления, так как известны участки промотора GALT, с которыми взаимодействуют позитивные регуляторы экспрессии этого гена [Elsas LJ, Lai K, Saunders CJ, Langley SD., 2001].

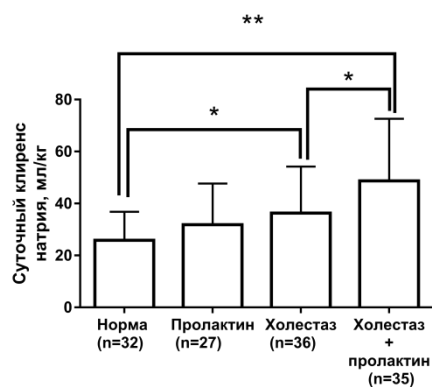
Рис. 6. Уровень экспрессии мРНК GALT во внешнем мозговом слое почки у крыс исследуемых групп. * $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с группой «норма» (one-way ANOVA, тест Sidak).

2. Молекулярные мишени пролактина, участвующие в реализации натрийуретического действия пролактина в модели холестаза беременных в почке

2.1. Суточный клиренс натрия. Клиренс натрия растет в модели холестаза беременных как по сравнению с нормой, так и по сравнению с группой «холестаз», несмотря на то, что в группе «холестаз» клиренс натрия также увеличен по сравнению с нормой (рис. 7). Рост суточного клиренса натрия связан с натрийуретическим влиянием повышенного уровня пролактина.

Рис. 7. Клиренс натрия у крыс исследуемых групп. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ – статистически значимые различия по сравнению с группой «норма»; # $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с группой «холестаз».

2.2. Na^+/K^+ - АТФаза: анализ изменения активности, экспрессии мРНК и белка $\alpha 1$ - и $\beta 1$ -субъединиц в коре и внешнем мозговом слое почки. Во внешнем мозговом слое почки при холестазе беременных (группа «холестаз+пролактин») активность Na^+/K^+ -АТФазы достоверно снижается по сравнению с нормой, что,



очевидно, связано с влиянием пролактина. Сходные закономерности наблюдаются при псевдобеременности, индуцируемой гиперпролактинемией (группа «пролактин») (рис. 8a). Это не сопровождается статистически значимым изменением уровня белка $\alpha 1$ - и $\beta 1$ -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы, измеренного методом вестерн-блоттинга в данной структуре почки/ В аналогичных нашей работе

исследованиях показано влияние пролактина на активность Na^+/K^+ -АТФазы. Одно из них проводилось на изолированных сегментах проксимальных канальцев линии

крыс Sprague-Dawley [Ibarra et al., 2005], что свидетельствует о возможности прямого действия пролактина на почку.

В корковом слое почки выявлено более слабое по сравнению с внешним мозговым слоем снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы у групп животных с гиперпролактинемией относительно нормы, не являющееся статистически значимым (рис. 8б).

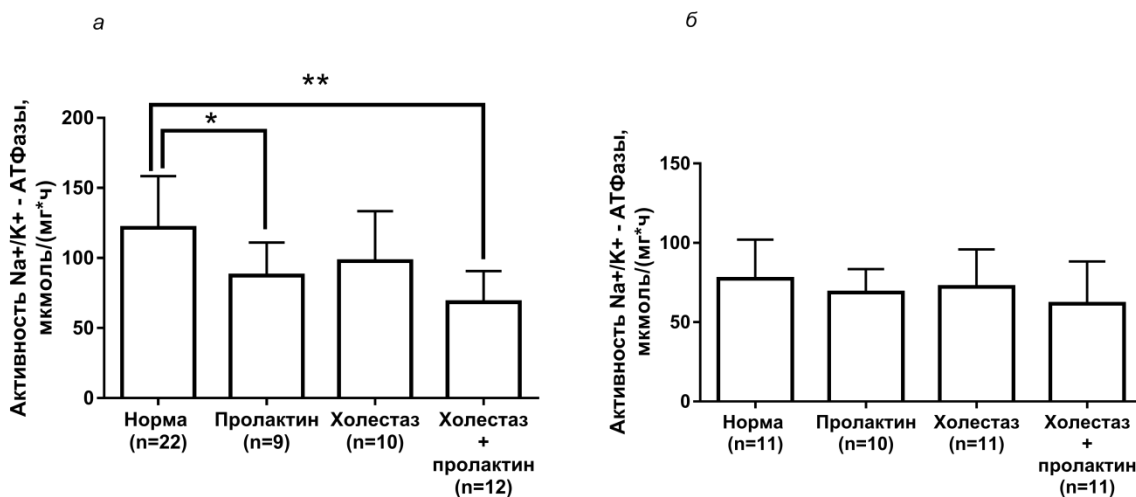


Рис.8. Активность Na^+/K^+ -АТФазы у крыс исследуемых групп в мозговом (а) и корковом (б) слоях почки. Данные по группам представлены в виде среднего $\pm$ s.d. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (one-way ANOVA, тест Sidak).

При этом не обнаружено статистически значимых изменений уровня экспрессии мРНК $\alpha 1$ - и $\beta 1$ -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы в коре почки в модели холестаза беременных и других группах с гиперпролактинемией по сравнению с нормой. В коре почки не выявлено также статистически значимых различий между экспериментальными группами животных в уровне экспрессии белка $\alpha 1$ - и $\beta 1$ -субъединиц Na^+/K^+ -АТФазы, измеренного методом вестерн-блоттинга. Вероятно, Na^+/K^+ -АТФаза является не единственным посредником натрийуретического действия гиперпролактинемии, так как под действием гиперпролактинемии наблюдаются только изменения в активности этого насоса.

2.3. Анализ экспрессии мРНК натриевых транспортеров NHE3, NCC, ENaC и NKCC2 во внешнем мозговом слое и коре почки при холестазе беременных и в группах сравнения. В коре почки показан рост экспрессии мРНК NCC у крыс в группе «холестаз беременных» относительно нормы (рис.9а). В литературе есть указания на то, что перфузия пролактином изолированной почки крыс сопровождалась увеличением соотношения фосфолирированной (активной) и

нефосфолированной форм NCC по сравнению с контролем [Rojas-Vega et al., 2015]. Кроме того, в коре почки крыс отмечался рост экспрессии ENaCa в группе «холестаз беременных» по сравнению с группой «холестаз» (рис. 9б). Имеются сведения о том, что инкубация культуры клеток почечного эпителия А6 в растворе пролактина приводит к усилению трансэпителиального тока через ENaC и увеличению активности канала [Greenlee и др., 2015]. Для NHE3, NKCC2 и других субъединиц ENaC статистически значимых изменений обнаружено не было (табл. 1).

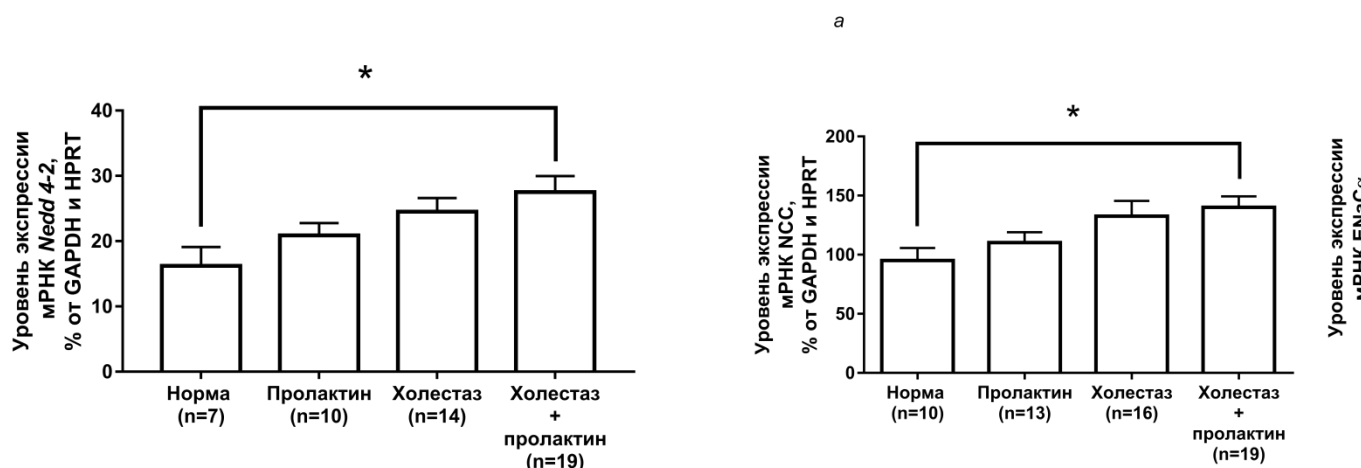


Рис.9. Экспрессия мРНК натриевых транспортеров NCC (а) и ENaCa (б) у крыс исследуемых групп в коре почки. * $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с группой «норма» ## $p < 0,005$ – по сравнению с группой «холестаз» (one-way ANOVA, тест Sidak).

2.4. Анализ экспрессии мРНК регуляторов работы натриевых транспортеров CAII, Nedd 4-2 и SGK1 во внешнем мозговом слое и коре почки при холестазах беременных и в группах сравнения. Во внешнем мозговом слое почки отмечен рост мРНК Nedd 4-2 в группе «холестаз беременных» относительно нормы (рис.10). Данная убиквитинлигаза является одним из основных регуляторов активности ENaC, - она вызывает убиквитинилирование канала, его последующий эндоцитоз и разрушение [Goel, Manning, Kumar, 2015]. Для остальных регуляторов работы натриевых транспортеров статистически значимых изменений не было обнаружено (табл.1).

Рис.10. Уровень экспрессии мРНК Nedd 4-2 у крыс исследуемых групп во внешнем мозговом слое почки. * $p<0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с группой «норма» (one-way ANOVA, тест Sidak).

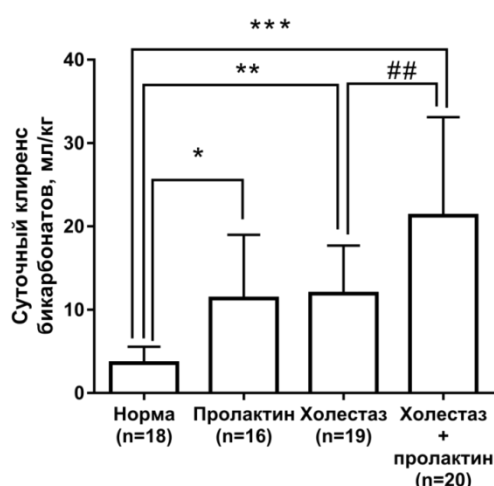
Табл. 1. Экспрессия мРНК натриевых транспортеров и их регуляторов, нормированная на экспрессию мРНК GAPDH и HPRT, во внешнем мозговом слое и коре почки животных разных групп ($M \pm SEM$).

Уровень мРНК, % от GAPDH и HPRT	Группы			
	Норма (n=8)	Пролактин (n=8)	Холестаз (n=16)	Холестаз +пролактин (n=19)
NHE3 (мозговой слой)	37,73 $\pm$ 4,57	34,52 $\pm$ 1,47	37,64 $\pm$ 2,71	42,22 $\pm$ 3,72
NHE3 (кора)	10,12 $\pm$ 1,27	9,79 $\pm$ 0,72	8,46 $\pm$ 0,59	8,74 $\pm$ 0,65
NKCC2 (мозговой слой)	562,2 $\pm$ 56,86	633,1 $\pm$ 56,42	705 $\pm$ 44,95	782,7 $\pm$ 74,18
NKCC2 (кора)	55,74 $\pm$ 7,17	55,41 $\pm$ 4,21	64,26 $\pm$ 7,17	59,43 $\pm$ 4,39
ENaC β (мозговой слой)	6,26 $\pm$ 0,23	5,82 $\pm$ 0,18	6,36 $\pm$ 0,38	7,67 $\pm$ 0,42
ENaC β (кора)	10,56 $\pm$ 0,66	10,08 $\pm$ 0,54	11,78 $\pm$ 0,41	12,76 $\pm$ 0,88
ENaC γ (мозговой слой)	5,34 $\pm$ 0,45	6,08 $\pm$ 0,79	6,02 $\pm$ 0,46	7,42 $\pm$ 0,52
ENaC γ (кора)	7,1 $\pm$ 0,78	5,78 $\pm$ 0,41	7,04 $\pm$ 0,48	8,18 $\pm$ 0,59
CAII (мозговой слой)	255,1 $\pm$ 34,19	252,6 $\pm$ 16,19	246 $\pm$ 12,05	270,7 $\pm$ 18,99
CAII (кора)	131,9 $\pm$ 10,34	109,6 $\pm$ 8,19	109,4 $\pm$ 8,86	117,9 $\pm$ 6,97
Nedd 4-2 (мозговой слой)	16,22 $\pm$ 2,91	20,89 $\pm$ 1,91	24,52 $\pm$ 2,09	27,5 $\pm$ 2,48
Nedd 4-2 (кора)	12,71 $\pm$ 1,4	11,25 $\pm$ 1,23	15,13 $\pm$ 1,56	12,34 $\pm$ 1,11
SGK1 (мозговой слой)	17,27 $\pm$ 2,55	20,25 $\pm$ 2,72	24,2 $\pm$ 2,71	23,41 $\pm$ 1,84
SGK1 (кора)	21,76 $\pm$ 4,12	19,69 $\pm$ 2,62	38,72 $\pm$ 5,39	33,11 $\pm$ 4,22

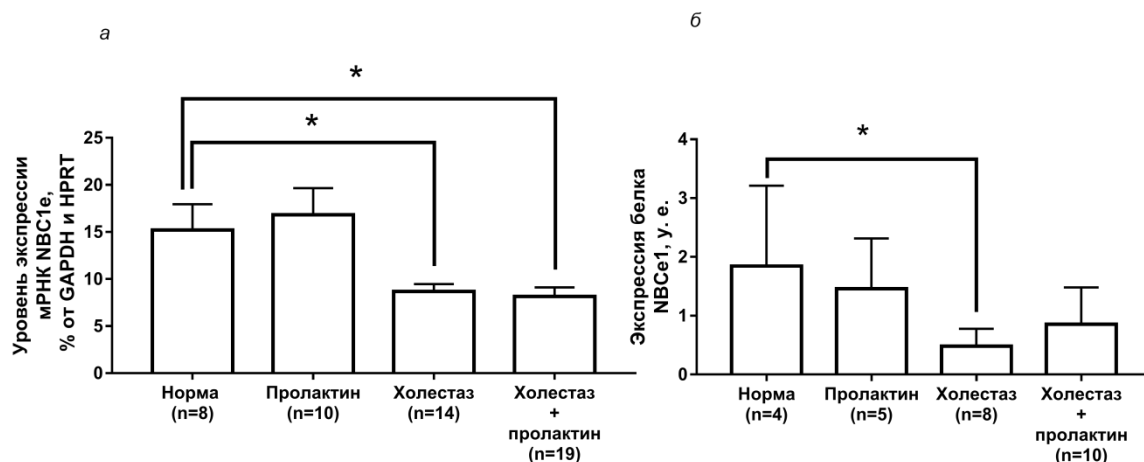
3. Молекулярные мишени пролактина в почке, связанные с бикарбонатным обменом в модели холестаза беременны

3.1. Суточный клиренс и реабсорбция бикарбонатов. Суточный клиренс бикарбонатов увеличивался во всех группах с гиперпролактинемией и с холестазом, а также отмечен дополнительный рост клиренса при холестазе беременных относительно группы «холестаз» (рис.11). Рост клиренса бикарбонатов связан со снижением их реабсорбции, которая статистически значимо снижается при гиперпролактинемии как на фоне нормальной работы печени, так и в модели холестаза беременных. Таким образом, можно предположить, что увеличение клиренса бикарбонатов в группах с гиперпролактинемией обусловлено ингибирующим влиянием пролактина на их реабсорбцию и/или его стимулирующим влиянием на экскрецию бикарбонатов почками.

Рис.11. Суточный клиренс бикарбонатов у крыс исследуемых групп. * $p<0,05$, ** $p<0,005$, *** $p<0,0005$ – статистически значимые различия по сравнению с группой «норма», ## $p<0,005$ – по сравнению с группой «холестаз» (one-way ANOVA, тест Sidak).



(рис.12а) и экспрессия белка NBCe1 (рис.12б, в) как при холестазе, так и холестазе беременных, по сравнению с интактными животными. В коре таких изменений обнаружено не было. Это согласуется с данными по биодинамике бикарбонатов и свидетельствует о том, что данный транспортер меньше реабсорбирует натрий в проксимальном нефроне [Абрамичева и соавт., 2017; Фидченко, Кушнарева, Смирнова, 2013].



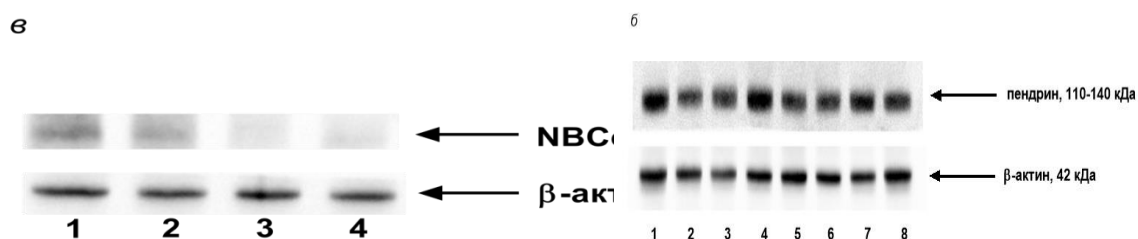


Рис.12. Экспрессия мРНК (а) и белка (б, в) NBCe1 у крыс исследуемых групп во внешнем мозговом слое почки. * $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с группой «норма» (one-way ANOVA, тест Sidak). Номера дорожек: 1-норма, 2-пролактин, 3-холестаз, 4-холестаз+пролактин.

3.3. Анализ экспрессии мРНК и белка пендрина во внешнем мозговом слое и коре почки при холестазе беременных и в группах сравнения. Экспрессия мРНК пендрина не изменяется ни в одной из экспериментальных групп животных в обоих слоях почки. Во внешнем мозговом слое экспрессия белка пендрина статистически значимо снижается в группе «холестаз» по сравнению с нормой (рис.13а, б). В коре почки не было обнаружено изменений ни в экспрессии белка, ни мРНК. Известно, что в дистальных канальцах почки (т.е. преимущественно в коре) пендрин играет важную роль в секреции хлорида и реабсорбции бикарбонатов в почке [Роуах и др., 2001]. Но нами не было обнаружено изменений в экспрессии пендрина в коре. Из этого можно сделать вывод, что пендрин не является ключевым посредником усиления клиренса бикарбонатов под действием пролактина в условиях патологии холестаз беременных.

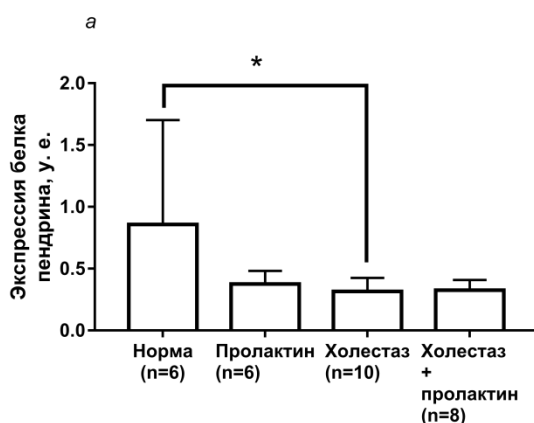


Рис.13. Экспрессия белка (а,б) пендрина у крыс исследуемых групп во внешнем мозговом слое почки. * $p < 0,05$ – статистически значимые различия по сравнению с

группой «норма» (one-way ANOVA, тест Sidak). Номера дорожек: 1, 2-норма, 3, 4-пролактин, 5, 6-холестаза, 7, 8-холестаза+пролактин

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе впервые было изучено изменение экспрессии длинной и короткой изоформ ПРЛР и посредников пролактинового сигналинга в коре и внешнем мозговом слое почки крысы в модели холестаза беременных и группах сравнения с помощью иммуноблоттинга и ОТ-ПЦР. Показано, что в условиях холестаза беременных в реализации эффектов пролактина принимают участие обе изоформы ПРЛР. Доказаны прямые эффекты пролактина на почку, так как: 1) экспрессия мРНК обеих изоформ ПРЛР в почке изменяется при различных патофизиологических состояниях (при холестазе и холестазе беременных) в зависимости от уровня пролактина; 2) показан рост уровня экспрессии pSTAT5 как ключевого посредника сигналинга длинной изоформы ПРЛР при холестазе беременных; 3) продемонстрирован рост экспрессии мРНК терминаторов пролактинового сигналинга SOCS3 и PIAS3, являющихся молекулярными мишенями длинной изоформы ПРЛР и имеющих STAT-чувствительные элементы в промоторах своих генов, в условиях преобладания длинной изоформы ПРЛР; 4) обнаружено снижение экспрессии мРНК *GALT* как молекулярной мишени короткой изоформы ПРЛР в условиях относительного роста ее содержания во внешнем мозговом слое почки.

Был проведен скрининг натриевых и бикарбонатных транспортеров почки в условиях холестаза беременных и группах сравнения. Наиболее чувствительным к условиям холестаза и холестаза беременных оказался натрий-бикарбонатный котранспортер NBCe1, экспрессия белка и мРНК которого снижается по сравнению с нормой во внешнем мозговом слое почки. Все формы холестаза оказывали влияние на экспрессию мРНК натрий-калий хлорного котранспортера NCC, α -субъединицы эпителиального натриевого канала ENaC α , убиквитинлигазы Nedd 4-2 в разных слоях почки. Кроме того, изучена работа Na⁺/K⁺-АТФазы. Активность этого насоса в мозговом слое почки, где происходит активная реабсорбция натрия, снижалась в модели холестаза беременных и других вариантах гиперпролактинемии относительно нормы. Этот эффект не связан с изменением уровня белка α 1- и β -субъединиц Na⁺/K⁺-АТФазы, измеренного методом вестерн-блоттинга. Полученные данные свидетельствуют о том, что пролактин осуществляет тонкую настройку работы различных натриевых транспортеров в разных зонах нефрона в условиях патологии.

Данная работа вносит вклад в понимание того, каким образом изменяется пролактиновый сигналинг в почке, а также как изменяется экспрессия почечных

натриевых транспортеров в условиях холестаза беременных. Вероятно, при этом заболевании проявляются эволюционно древние функции пролактина, связанные с регуляцией водно-солевого обмена, в то время как в норме пролактин не вызывает натрийуретических эффектов, характерных для низших позвоночных.

ВЫВОДЫ

1. Пролактин оказывает прямые эффекты на почку в условиях холестаза беременных и в группах сравнения, так как доказана активация и терминация сигналинга обеих изоформ ПРЛР при данной патологии.
2. При холестазе беременных экспрессия pSTAT5 увеличивается по сравнению с нормой во внешнем мозговом слое почки, что является доказательством проведения сигнала через длинную изоформу ПРЛР.
3. Экспрессия мРНК GALT снижается при холестазе, а также есть корреляция между экспрессией мРНК GALT и FOXO3 при холестазе беременных, что является доказательством проведения сигнала через короткую изоформу ПРЛР.
4. Терминация пролактинового сигналинга в условиях холестаза беременных происходит за счет роста экспрессии PIAS3 и SOCS3 в коре и во внешнем мозговом слое почки.
5. Натрий-бикарбонатный котранспортер NBCe1, а не пендрин является основной причиной роста экскреции бикарбонатов, т.е. наиболее чувствителен к условиям холестаза и холестаза беременных.
6. Оба вида гиперпролактинемии вызывают снижение активности Na^+/K^+ -АТФазы, но не влияют на изменение экспрессии мРНК и белка данного насоса.
7. Среди 5 исследованных транспортеров натрия и 3 регуляторов их работы все формы холестаза оказывают влияние на экспрессию мРНК натрий-калий хлорного котранспортера NCC, α -субъединицы эпителиального натриевого канала ENaC α , убиквитинлигазы Nedd 4-2 в разных слоях почки.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06. по специальности физиология 03.03.01.

1. О. А. Булаева, П. А. Абрамичева, Т. А. Балакина, О. В. Смирнова. 2016. Роль пролактина в регуляции биодинамики бикарбонатов у самок крыс в модели холестаза беременных// Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины -

T.162. - № 11. - С.559–62. (IF=0,546, WoS)

2. **П. А. Абрамичева**, Т. А. Балакина, О. А. Булаева, А. А. Гусева, О. Д. Лопина, О. В. Смирнова. 2017. Роль Na^+ / K^+ АТРазы в натрийуретическом действии пролактина в модели холестаза беременных// Биохимия - Т.82. - № 5. - С.841–51. (IF=1,886, WoS)

3. **П. А. Абрамичева**, О. В. Смирнова. 2017. Гормоны в регуляции работы транспортеров натрия в почке: модуляция фосфорилирования, трафика и экспрессии// Физиология Человека - Т.43. - № 4. - С.1–16. (IF РИНЦ=1,204, WoS)

4. **П. А. Абрамичева**, О. В. Смирнова. 2019. Изоформы рецептора пролактина как основа тканеспецифического разнообразия его эффектов в норме и патологии// Биохимия - Т.84. - № 4. - С.461–80. (IF=1,886, WoS)

5. **П. А. Абрамичева**, Ю.Б. Костенко, Т. А. Балакина, О. В. Смирнова. 2019. Молекулярные мишени натрийуретического действия пролактина в модели холестаза беременных у крыс// Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины - Т.168. - № 8. - С.171–175. (IF=0,546, WoS)

6. **Абрамичева, П. А.**, Т. А. Балакина, И. А. Морозов, О. В. Смирнова. 2019. Сигнальные пути пролактина, детерминирующие его прямые эффекты на почку в модели холестаза беременных// Биохимия - Т.84. - № 7. - С.1500–1510. (IF=1,886, WoS)

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ МЕЖДУНАРОДНЫХ И ВСЕРОССИЙСКИХ КОНФЕРЕНЦИЙ

1. **Abramicheva P.**, Smirnova O.V. Targets of the natriuretic action of prolactin in the kidney in a model of cholestasis of pregnancy// 56th European Renal Association - European dialysis and transplantation association (ERA-EDTA) (Budapest, Hungary, June 13-16, 2019): Nephrology-Dyalysis-Transplantation, Issue Supplement_1, Oxford University Press, V. 34.

2. **Абрамичева П.А.**, Смирнова О.В. Экспрессия гена пролактина и его регуляторов в гипофизе в модели холестаза беременных// Пятнадцатый международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым, Россия, 4-10 июня, 2019).

3. **Abramicheva P.**, Smirnova O.V. Renal prolactin signaling and its termination differ in normal female rat and under condition of cholestasis of pregnancy// The 43rd FEBS Congress (Prague, Czech Republic, July 7-12, 2018): FEBS Open Bio Prague, 2018. — P. 377-377

4. **Abramicheva P.**, Smirnova O.V. Hyperprolactinemia in cholestasis of pregnancy is associated with decreased renal outer medulla Na⁺/K⁺-ATPase activity and elevation of pSTAT5// The 18th World Congress International Society of Gynecological Endocrinology (Florence, Italy, March 7-10, 2018).
5. Smirnova O., **Abramicheva P.**, Bulaeva O., Balakina T. Renal water-salt balance regulation in the animal model of cholestasis of pregnancy// ISN World congress of Nephrology (Capetown, South Africa, March 13-17, 2015).
6. **Абрамичева П.А.**, Балакина Т.А., Смирнова О.В. Исследование участия Na⁺/K⁺-АТФазы почки крысы в натрийуретическом действии пролактина в модели холестаза беременных// XXVII Зимняя молодежная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 9-12 февраля, 2015)/ Институт Биоорганической Химии РАН, Москва, 2015. — С. 146.
7. Смирнова О.В., **Абрамичева П.А.**, Булаева О.А., Сиротина Н.С., Балакина Т.А. Эволюционно древние функции пролактина: влияние на водно-солевой обмен в животной модели холестаза беременных// IV Съезд физиологов СНГ (Дагомыс, 8-12 октября 2014 г.). — Научные труды IV Съезда физиологов СНГ, Сочи-Дагомыс, 2014. — С. 136.