

УДК 577.171.6

СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ ПРОЛАКТИНА, ДЕТЕРМИНИРУЮЩИЕ ЕГО ПРЯМЫЕ ЭФФЕКТЫ НА ПОЧКУ В МОДЕЛИ ХОЛЕСТАЗА БЕРЕМЕННЫХ

© 2019 П.А. Абрамичева^{1*}, Т.А. Балакина¹, И.А. Морозов²,
Т.А. Щелкунова¹, О.В. Смирнова¹

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,
119991 Москва, Россия; электронная почта: abramicheva.polina@gmail.com

² Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН,
119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 29.01.2019

После доработки 21.06.2019

Принята к публикации 21.06.2019

Холестаз беременных — патология беременности, связанная с нарушением оттока желчи и водно-солевым обменом. Пролактин — это один из важнейших регуляторов водно-солевого баланса. Изучено изменение экспрессии длинной и короткой изоформ рецептора пролактина (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 физиологических 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.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: короткая и длинная изоформы пролактинового рецептора, STAT5, SOCS3, PIAS3, холестаз беременных, гиперпролактинемия, почка.

DOI: 10.1134/S0320972519100117

Холестаз беременных — патология беременности, сопровождающаяся не только повышением уровней билирубина, желчных кислот и печеночных ферментов в крови, но и нарушениями водно-солевого обмена. Данное заболевание характеризуется неблагоприятным прогнозом для плода, связанным с поступлением к плоду токсических продуктов обмена от матери [1–5]. Известно, что уровень пролактина в плазме крови значительно возрастает в течение беременности, что объясняется стимуляцией материнских лактотрофов гипофиза плацентарными эстрогенами [6]. При холестазе беременных уро-

вень пролактина существенно повышен по сравнению с выявляемым при нормально протекающей беременности [4], что также подтверждено нашей лабораторией на экспериментальной модели холестаза беременных [7]. Пролактин регулирует >300 функций организма, которые можно сгруппировать в две большие категории: связанные с регуляцией размножения и с поддержанием гомеостаза [8–10]. Если роль пролактина в регуляции репродуктивной функции хорошо изучена, то исследования его участия в регуляции процессов метаболизма, в частности водно-солевого обмена у млекопитаю-

Принятые сокращения: ПРЛР — рецептор пролактина, JAK2 — нерецепторная тирозинкиназа 2 семейства Janus, STAT5A — трансдуктор сигнала и активатор транскрипции 5A, STAT5B — трансдуктор сигнала и активатор транскрипции 5B, FOXO3 — транскрипционный фактор семейства Forkhead 3, GALT — галактоза-1-фосфат уридилтрансфераза, CIS — супрессор цитокинового сигналинга, SOCS3 — супрессор цитокинового сигналинга 3, PIAS3 — белковый ингибитор активированного STAT, HPRT — гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза, GAPDH — глициральдегидфосфат-дегидрогеназа.

* Адресат для корреспонденции.

ших, только начинают развиваться. Нами было показано, что суточный клиренс натрия возрастает в условиях гиперпролактинемии при холестазах беременных по сравнению с нормальными животными [11, 12].

В тканях млекопитающих, регулирующих гомеостаз воды и солей, обнаружен высокий уровень экспрессии рецептора пролактина (ПРЛР). В нашей лаборатории с помощью метода иммуногистохимии было показано, что уровень ПРЛР в разных отделах почки по-разному меняется в модели холестаза беременных: в проксимальных канальцах он не отличается от контрольных групп, в дистальных канальцах уровень ПРЛР падает, а в канальцах мозгового слоя — растет [13].

ПРЛР относится к классу 1 суперсемейства рецепторов цитокинов. Наиболее хорошо описаны изоформы, обнаруженные у крысы: длинная (80–85 кДа), короткая (45 кДа) и мутантная средняя форма (65 кДа), обнаруженная в пролактин-зависимой линии Т-клеточной лимфомы Nb2 крысы [14, 15]. Считается, что большинство известных путей передачи сигнала связано с длинной изоформой ПРЛР и обусловлено активацией нерецепторной тирозинкиназы 2 семейства Janus (JAK2) и последующим фосфорилированием, главным образом транскрипционных факторов STAT5A и STAT5B (Signal Transducers and Activators of Transcription), и транслокацией димеризованных фосфорилированных STAT5-белков в ядро, где они взаимодействуют со специфическими STAT-чувствительными элементами (GAS-элементами) в промоторах генов-мишеней [8, 16]. Функции и сигналинг короткой изоформы ПРЛР пока мало изучены. Известно, что она выступает в роли доминантного негативного регулятора, образуя гетеродимеры с длинной изоформой ПРЛР, тем самым подавляя проведение сигнала через длинную изоформу. К молекулярным посредникам сигналинга короткой изоформы относят транскрипционный фактор FOXO3 (Forkhead Transcription Factor 3), который стимулирует экспрессию гена фермента метаболизма галактозы GALT (галактоза-1-фосфат уридилтрансфераза). Halperin et al. [17] показали, что у трансгенных мышей, экспрессирующих только короткие изоформы ПРЛР, под действием пролактина происходит подавление FOXO3, и, соответственно, ингибирование экспрессии GALT в яичниках, в результате чего происходит ускоренная инициация роста фолликулов яичников и их последующая гибель.

К основным транскрипционным факторам, подавляющим проведение сигнала через длинную изоформу ПРЛР, относят CIS (cytokine-

inducible SH-2 domain proteins), SOCS3, относящийся к семейству SOCS-белков (Suppressors of Cytokine Signaling), и PIAS3 (protein inhibitor of activated STAT), причем SOCS3 может подавлять сигналинг и короткой изоформы ПРЛР. Все перечисленные терминаторы пролактинового сигналинга обладают STAT-чувствительными элементами. Например, в промоторе гена *CIS* содержится 4 STAT5-связывающих сайта. Есть данные о том, что у мышей с нокаутом по STAT5A и STAT5B исчезает экспрессия *CIS* в яичнике [18].

Цель нашего исследования — установить, являются ли эффекты пролактина в коре и мозговом слое почки прямыми в норме и в модели холестаза беременных. О возможности прямых эффектов мы судили по ряду параметров: 1) наличию и уровню экспрессии мРНК короткой и длинной изоформ ПРЛР; 2) возможности роста фосфорилирования белка STAT5 в условиях гиперпролактинемии в модели холестаза беременных при контроле стабильности экспрессии мРНК *STAT5A* и *STAT5B*; 3) по наличию изменений экспрессии мРНК терминаторов пролактинового сигналинга, таких как *CIS*, *SOCS3* и *PIAS3*, являющихся молекулярными мишенями длинной изоформы ПРЛР и имеющих STAT-чувствительные элементы в промоторах своих генов; 4) по наличию изменений экспрессии мРНК молекулярных мишеней короткой изоформы ПРЛР, таких как *FOXO3* и *GALT*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Модели животных. Работа выполнена на группах белых беспородных половозрелых самок крыс (масса 250–300 г): интактных («норма», $n = 16$), с гиперпролактинемией, вызывающей ложную беременность («пролактин», $n = 15$), с холестазом («холестаз», $n = 16$) и с моделью холестаза беременных (обструктивный холестаз в сочетании с гиперпролактинемией — «холестаз + пролактин», $n = 19$). Гиперпролактинемию моделировали с помощью трансплантации гипофиза крысы-донора под капсулу почки крысы-реципиента (производился надрез капсулы почки у крысы-реципиента, параллельно из турецкого седла извлекали гипофиз крысы-донора; гипофиз помещали под капсулу почки), что приводило к повышению продукции гомологичного пролактина [7, 19–21], холестаз — путем перевязки общего желчного протока. Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном световом режиме и свободном доступе к воде и пище. Приживаемость гипофиза оценивали по визуальным критериям — по

степени васкуляризации данного транспланта. Индукция гиперпролактинемии при трансплантации гипофиза в модели холестаза беременных и при изолированной гиперпролактинемии доказана нами ранее.

Фидченко и соавт. показали [7], что в группах «пролактин» ($n = 6$) и «холестаз + пролактин» ($n = 17$) при успешной приживаемости трансплантата гипофиза концентрация пролактина составляла $12,90 \pm 2,93$ и $48,80 \pm 5,78$ нг/мл и была достоверно ($p < 0,05$) выше, чем в соответствующем контроле – «норма» ($n = 10$) – $2,30 \pm 0,74$ нг/мл, «холестаз» ($n = 31$) – $11,8 \pm 2,65$ нг/мл. Кроме того, концентрация пролактина при холестазе была достоверно ($p < 0,05$) выше по сравнению с нормой.

Через 2 недели после проведенной операции внешний мозговой слой и кору почки выделяли с целью получения материала для определения уровня мРНК изоформ PRLR, вторичных посредников и терминаторов пролактинового сигналинга и белка STAT5 и pSTAT5.

ОТ-ПЦР. Кору и внешний мозговой слой почки отделяли при помощи скальпеля, гомогенизировали в соответствующем объеме реагента

Trizol («Invitrogen», США) с целью дальнейшего выделения суммарной РНК. Препарат обрабатывали ДНКазой I RQ1 DNase («Promega», США). Для удаления ДНКазы I РНК очищали на колонках с использованием набора RNeasy Plus Mini Kit («Qiagen», США), после чего проводили реакцию обратной транскрипции с помощью набора ImProm-ITM Reverse Transcription System («Promega», США). Во всех случаях процедуры выполняли по инструкции производителя. Для проведения ПЦР в реальном времени использовали амплификатор Bio-Rad CFX96 («Bio-Rad», Канада) и наборы реакционных смесей («Синтол», Россия), праймеры (таблица) добавляли до конечной концентрации 160 нМ. Режимы амплификации: $95^\circ\text{C} - 5$ мин; $95^\circ\text{C} - 10$ с; $58^\circ\text{C} - 17$ с; $72^\circ\text{C} - 20$ с, 40 циклов; кривая плавления $72-95^\circ\text{C}$, инкремент $0,5^\circ\text{C} - 5$ с. Подбор праймеров производили с помощью программы Beacon Designer 7, а также с использованием баз данных NCBI, BLAT Search. В качестве генов домашнего хозяйства использовали гены глицеральдегидфосфатдегидрогеназы

Последовательности олигонуклеотидов, использованные в ПЦР

Название гена	Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида	Длина ПЦР-продукта, п.н.
Длинная изоформа пролактинового рецептора	PRLR for PRLR(L) rev	5'-CTGGGCACTGGCTTTGAAG-3' 5'-CCAAGGCACTCAGCAGCTCT-3'	131
Короткая изоформа пролактинового рецептора	PRLR for PRLR(S) rev	5'-CTGGGCACTGGCTTTGAAG-3' 5'-AAGGGCCAGGTACAGATCCA-3'	143
Трансдуктор сигнала и активатор транскрипции 5A	STAT5A for STAT5A rev	5'-ATTCACCACTCGGGATTTCTC-3' 5'-ACAACTCAGGGACCACTTG-3'	186
Трансдуктор сигнала и активатор транскрипции 5B	STAT5B for STAT5B rev	5'-GAACACCCGCAATGATTATAGC-3' 5'-TTCTCTTCCGTGACCGACTC-3'	159
Транскрипционный фактор семейства Forkhead 3	FOXO3 for FOXO3 rev	5'-TGTCCTACGCTGACCTGATC-3' 5'-TTCTGAACCCGCATGAAACG-3'	196
Галактоза-1-фосфат уридилтрансфераза	GALT for GALT rev	5'-AAGGAAGGTTACAGTAGATGG-3' 5'-GACTTTCAACTCTCCAGGGTAG-3'	185
Супрессор цитокинового сигналинга	CIS for CIS rev	5'-ATGAACCGAAGGTGCTAGAC-3' 5'-TCACTGGCTGTAATGGAACC-3'	106
Супрессор цитокинового сигналинга 3	SOCS3 for SOCS3 rev	5'-CCTGGACTCCTATGAGAAAGTG-3' 5'-CCTATCTTCTGCTGGGCTAAC-3'	200
Белковый ингибитор активированного STAT	PIAS3 for PIAS3 rev	5'-AGGAGCCAAGTGCGATTATAC-3' 5'-TGATGTTGATTGGACGACTAGG-3'	194
Гипоксантингуанинфосфорибозил-трансфераза (ГПРТ)	HPRT for HPRT rev	5'-GCTATAAGTTCTTTGCTGACCTG-3' 5'-ATCTCCACCAATAACTTTTATGTCC-3'	149
Глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (ГАФД)	GAPDH for GAPDH rev	5'-GCAAGAGAGAGGCCCTCAG-3' 5'-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3'	74

(GAPDH) и гипоксантинфосфорибозилтрансферазы (HPRT). Данные нормировали на геометрическое среднее пороговых циклов генов домашнего хозяйства, т.к. данный метод расчета позволяет нивелировать индивидуальные различия между генами домашнего хозяйства в одной группе животных [22] по формуле:

$$R = \frac{E\sqrt{C_{tHPRT} \times C_{tGAPDH}}}{E^{C_{tmeasured\ gene}}} \times 100\%,$$

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

Вестерн-блоттинг. Методика получения лизатов тканей почки и особенности электрофоретического разделения белков описаны в нашей работе ранее [11]. Для детекции STAT5 и pSTAT5 использовали поликлональные антитела кролика (ab68465, 1 : 1000 и ab97734, 1 : 1000 соответственно («Abcam», Канада)), для детекции референсного белка GAPDH – моноклональные антитела мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (ab9482, 1 : 15000, («Abcam», Канада)). В качестве вторичных антител использовали поликлональные антитела козы против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 6000, («Bio-Rad», Канада)). Антитела, связавшиеся с мембраной, детектировали с помощью набора для оценки хемолюминесценции Clarity™ Western ECL Substrate («Bio-Rad», Канада) 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).

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Установлено, что 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. 1, *а*, и 2, *а*). В коре почки экспрессия длинной изоформы ПРЛР возрастает при холестазе беременных относительно нормы (рис. 1, *б*). Статистически значимых изменений экспрессии короткой изоформы ПРЛР в коре не обнаружено (рис. 2, *б*). В коре соотношение экспрессии мРНК длинной изоформы ПРЛР и короткой возрастает при холестазе беременных относительно группы «холестаз» и «норма» в связи с постепенным ростом длинной изоформы ПРЛР.

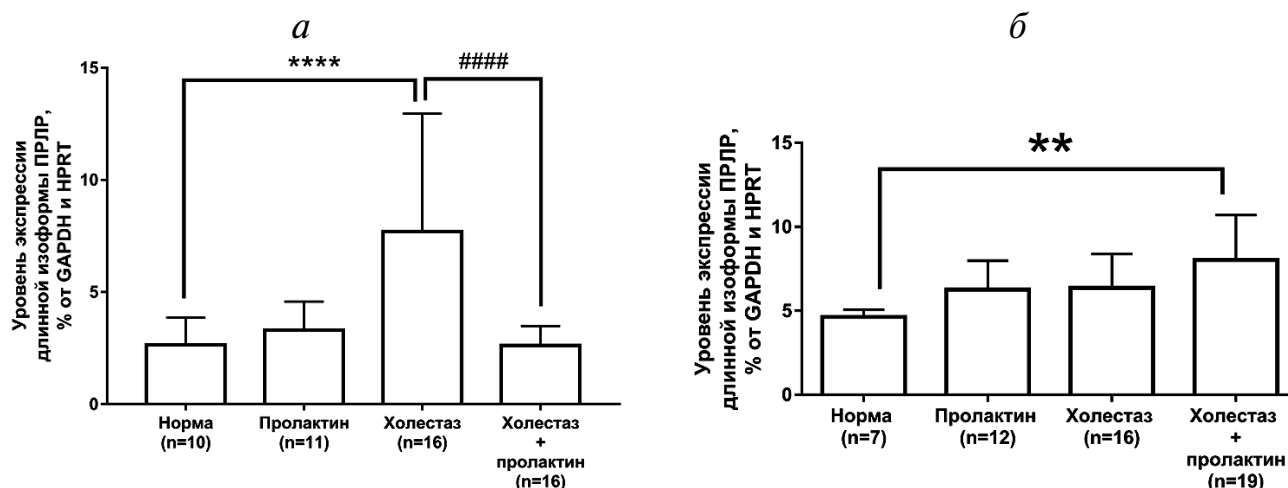


Рис. 1. Экспрессия мРНК длинной изоформы ПРЛР у крыс исследуемых групп во внешнем мозговом слое (*а*) и коре (*б*) почки, n – количество животных. В связи с ограниченностью материала для исследования конкретное количество животных в отдельных экспериментах отличается от суммарно указанного количества. 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)

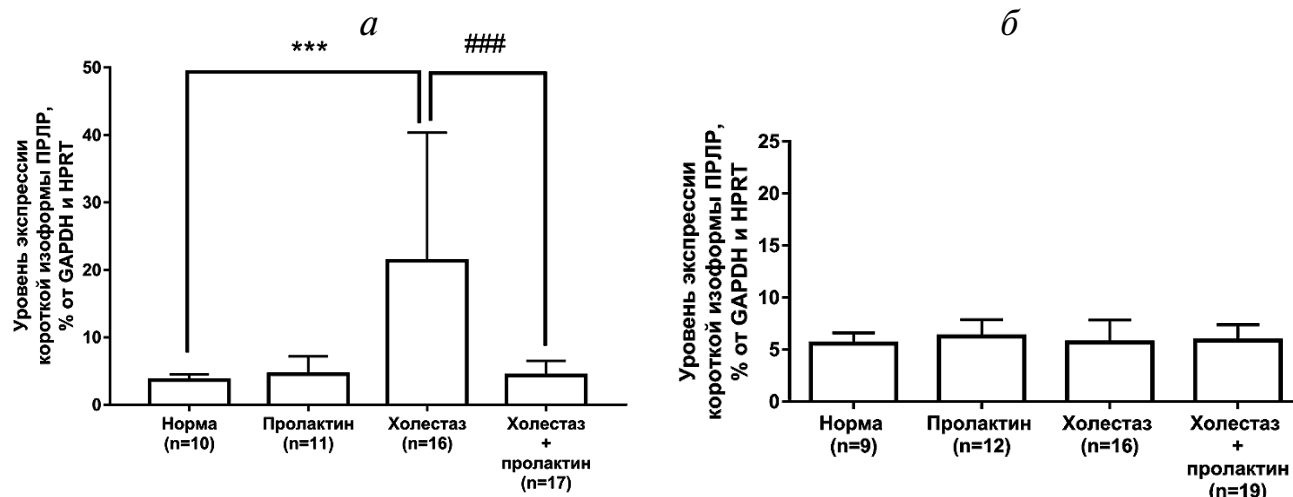


Рис. 2. Экспрессия мРНК короткой изоформы ПРЛР у крыс исследуемых групп во внешнем мозговом слое (а) и коре (б) почки. *** $p < 0,001$ – Статистически значимые различия по сравнению с группой «норма», ### $p < 0,001$ – по сравнению с группой «холестаз» (one-way ANOVA, тест Sidak)

Была проанализирована экспрессия белка STAT5 и его фосфорилированной формы pSTAT5. При холестазе беременных увеличивается экспрессия белкового продукта pSTAT5 (рис. 3, б и в) по сравнению с нормой во внешнем мозговом

слое почки, чего не наблюдается в коре почки. Уровень экспрессии белкового продукта STAT5 (рис. 3, а и в) и уровень мРНК *STAT5A* и *STAT5B* не изменяется в обоих слоях почки в условиях этой патологии ($p > 0,05$, на рис. не показано).

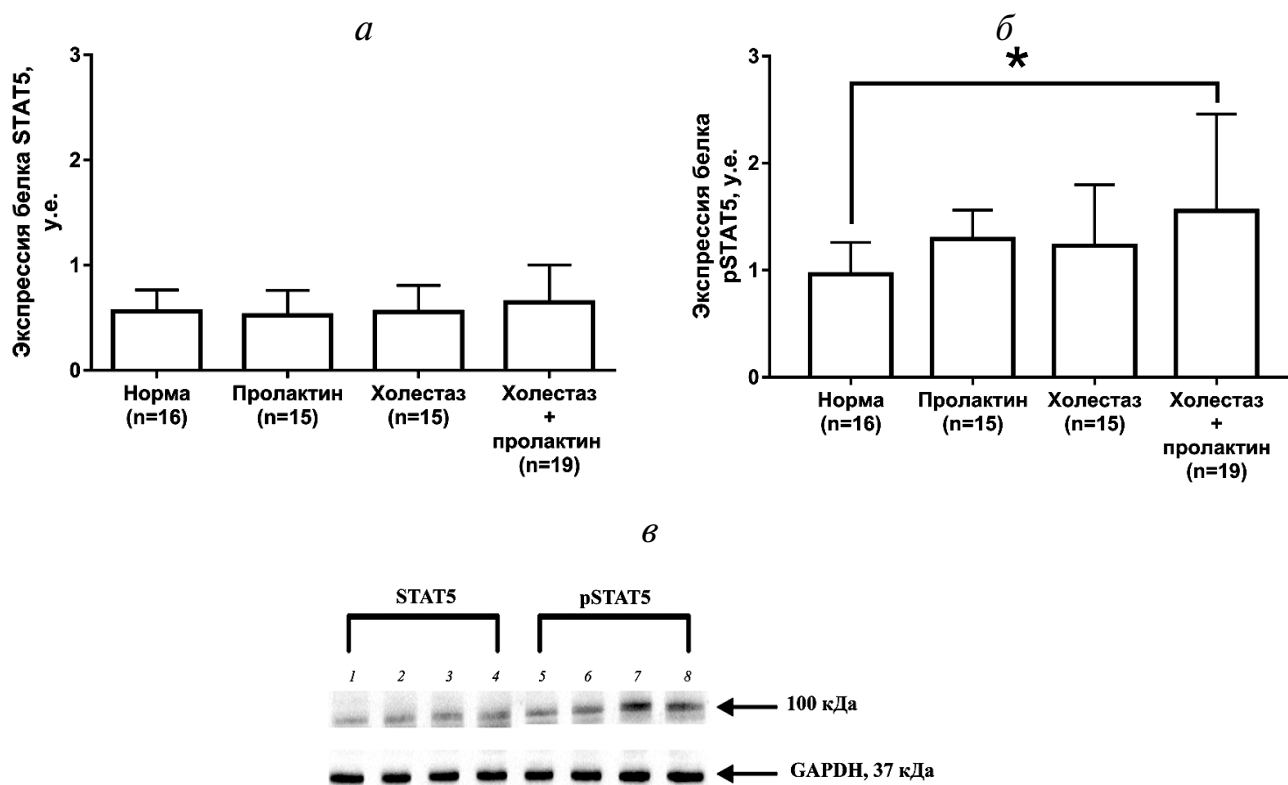


Рис. 3. Уровень экспрессии белка STAT5 (а и в) и pSTAT5 (б и в) во внешнем мозговом слое почки у крыс исследуемых групп. * $p < 0,05$ – Статистически значимые различия по сравнению с группой «норма» (one-way ANOVA, тест Sidak). Номера дорожек: 1 и 5 – норма, 2 и 6 – пролактин, 3 и 7 – холестаз, 4 и 8 – холестаз + пролактин

Во внешнем мозговом слое почки экспрессия генов *SOCS3* (рис. 4, *а*) и *PIAS3* (рис. 5, *а*) возрастает при холестазах беременных по сравнению с интактными животными. В коре в условиях холестаза беременных также возрастает экспрессия как *SOCS3* (рис. 4, *б*), так и *PIAS3* относительно нормы (рис. 5, *б*), кроме того, экспрессия *SOCS3* возрастает в группе «холестаз» относительно интактных крыс. Для *CIS* не было выявлено изменений в экспрессии ни в одной из анализируемых структур почки ($p > 0,05$, на рис. не показано).

Что касается участников сигнального каскада короткой изоформы ПРЛР, то экспрессия мРНК *GALT* снижается при холестазах 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 интактных крыс ($p < 0,05$; $R^2 = 0,555$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Нами было установлено, что во внешнем мозговом слое почки при холестазах экспрессия длинной изоформы ПРЛР возрастает в 3 раза, короткой — в 5,8 раз, а в коре растет экспрессия только длинной изоформы — в 1,4 раза по сравнению с интактными животными. Заслуживает внимания сам факт резкого увеличения

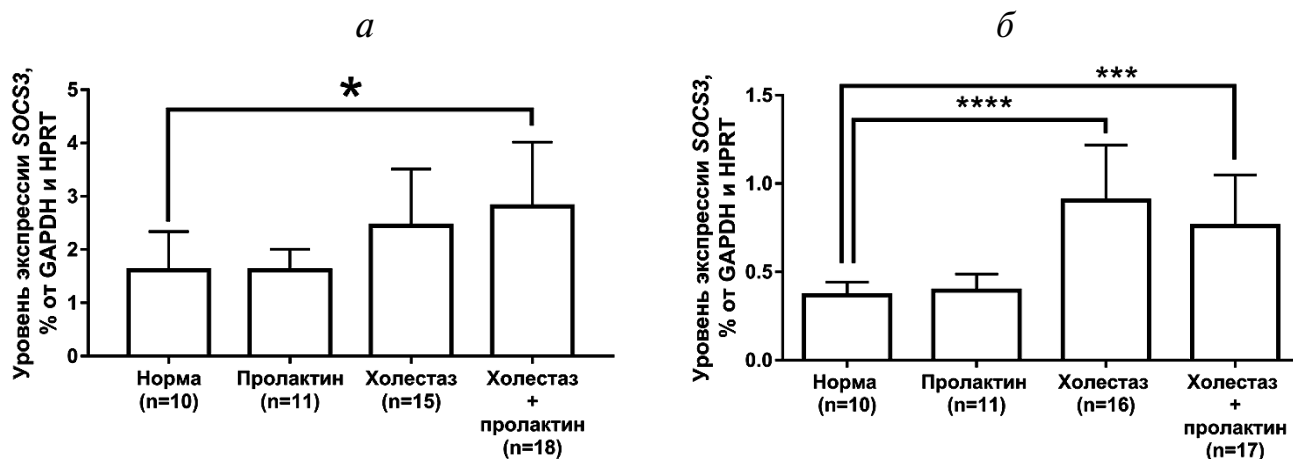


Рис. 4. Уровень экспрессии мРНК *SOCS3* у крыс исследуемых групп во внешнем мозговом слое (*а*) и коре (*б*) почки. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ — Статистически значимые различия по сравнению с группой «норма» (one-way ANOVA, тест Sidak)

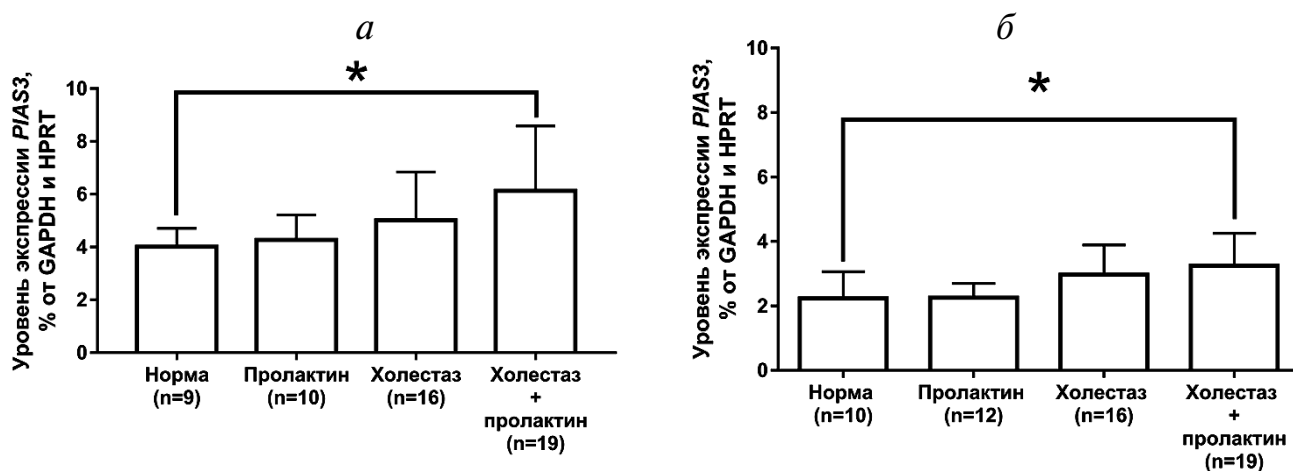


Рис. 5. Уровень экспрессии мРНК *PIAS3* у крыс исследуемых групп во внешнем мозговом слое (*а*) и коре (*б*) почки. * $p < 0,05$ — Статистически значимые различия по сравнению с группой «норма» (one-way ANOVA, тест Sidak)

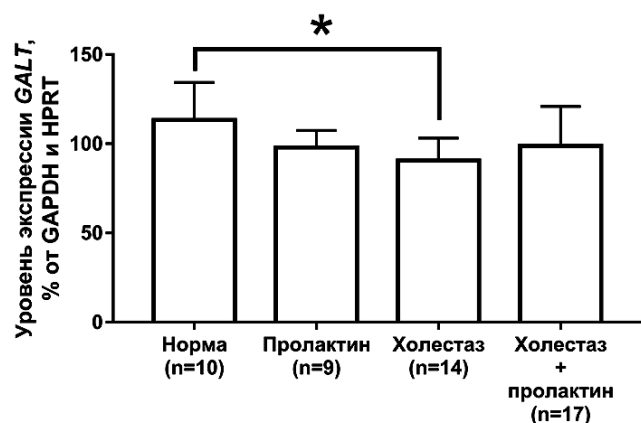


Рис. 6. Уровень экспрессии мРНК *GALT* во внешнем мозговом слое почки у крыс исследуемых групп. * $p < 0,05$ — Статистически значимые различия по сравнению с группой «норма» (one-way ANOVA, тест Sidak)

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 [11, 12] и детоксикации [23].

Кроме того, при холестазе 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 [24, 25], можно думать, что собственные эффекты короткой изоформы в условиях холестаза особенно хорошо выражены. Но нами получены данные об изменении экспрессии *GALT* и ее корреляции с *FOXO3* только в условиях холестаза беременности, но не холестаза. Вероятно, короткая изоформа в почках выполняет свою самостоятельную роль, значение которой возрастает в условиях патологии. На данный момент об индивидуальных функциях короткой изоформы ПРЛР известно только для яичников мыши: группой Devi было выявлено ингибирование MAPK, передающей сигнал от короткой изоформы, за счет ее ассоциации с DUPD1 (dual specific phosphatase) — фосфатазой, дефосфорилирующей участников каскада, а также ингибирование транскрипционных факторов Sp1 и *FOXO3* и гена фермента метаболизма галактозы *GALT*, экспрессию которого стимулирует *FOXO3* [17, 26, 27]. Нами было показано снижение экспрессии мРНК *GALT* в группе «холестаз» относительно нормы во внешнем мозговом слое почки, а также наличие корреляций между экспрессией *GALT* и *FOXO3* в условиях холестаза беременных и между экспрессией *GALT* и короткой изоформой ПРЛР у интактных крыс.

Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что *GALT* и *FOXO3* вовлечены в сигнальный каскад короткой изоформы ПРЛР не только в яичнике, 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 [28]. Интересно отметить, что в других пролактин-зависимых нерепродуктивных тканях также изменяется соотношение экспрессии изоформ ПРЛР при холестазе по сравнению с нормой. Ранее в нашей лаборатории было показано, что в печени самок крыс в условиях обструктивного холестаза наблюдается снижение экспрессии доминирующей короткой изоформы ПРЛР и повышение длинной [29]. Кроме того, в условиях холестаза у самок крыс в клетках желчного протока (холангиоцитах) продемонстрировано значительное увеличение экспрессии длинной изоформы по сравнению с нормой, а также присутствие короткой изоформы [30]. Видимо, такие реципрокные изменения соотношения экспрессии изоформ ПРЛР в почке и печени в условиях холестаза позволяют организму лучше справляться с выведением токсичных продуктов обмена через почки.

Нами показано, что во внешнем мозговом слое почки в условиях холестаза беременных экспрессия обеих изоформ снижается относительно группы «холестаз», и начинает преобладать экспрессия длинной изоформы. Такое изменение паттерна экспрессии изоформ свидетельствует об усилении проведения сигнала через длинную изоформу ПРЛР. Механизм активации длинной изоформы ПРЛР под действием молекулы пролактина включает димеризацию двух молекул рецептора, взаимное фосфорилирование и активацию двух молекул JAK2, фосфорилирование остатков тирозина доменов рецептора box 2, образование сайтов докинга STAT5, включающих SH2-домены, фосфорилирование STAT5 под действием JAK2. Гомодимеры pSTAT5 транслоцируются в ядро, где активируют гены, имеющие в своем промоторе STAT-чувствительные элементы [31, 32]. В наших опытах функциональная активность длинной изоформы подтверждается фосфорилированием ключевого посредника проведения ее сигнала — STAT5 в условиях холестаза беременных относительно интактных животных (изменений в экспрессии мРНК и белка STAT5 нами не было обнаружено). На данный момент в литературе не встречаются данные о том, какую роль в про-

лактиновом сигналинге в почках играют STAT5-белки. Выделяют две изоформы STAT5 — STAT5A и STAT5B, которые кодируются 2-мя различными генами [33, 34]. Считается, что STAT5A играет ключевую роль в пролактиновом сигналинге, в то время как STAT5B необходим для поддержания полового диморфизма в скорости роста тела, экспрессии генов печени и других функций, связанных с поддержанием иммунитета [35–39].

Помимо снижения экспрессии длинной изоформы ПРЛР в условиях холестаза беременных во внешнем мозговом слое по сравнению с группой «холестаз», мы наблюдали рост экспрессии терминаторов пролактинового сигналинга SOCS3 и PIAS3 в данной экспериментальной группе крыс по сравнению с интактными крысами. В коре в условиях холестаза беременных также возрастает экспрессия как SOCS3, так и PIAS3 относительно нормы, 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). SOCS3 ингибирует проведение сигнала за счет связывания с проксимальным сайтом киназы Janus класса 2, с которой сопряжены и короткая, и длинная изоформы ПРЛР [40, 41], а PIAS3 взаимодействует с ДНК-связывающим доменом STAT5, что препятствует связыванию STAT5 с таргетными генами [42, 43]. Известно, что белки семейства SOCS, в том числе SOCS3, вовлечены в иммунный ответ, являясь негативными регуляторами цитокинового сигналинга [18, 44]. Есть данные о том, что в условиях такой патологии, как воспалительное заболевание кишечника (IBD — Inflammatory Bowel Disease), смоделированной на мышах, был показан рост мРНК *SOCS3* по сравнению с нормой [45]. Дело в том, что SOCS3 ингибирует также JAK2/STAT3-путь, через который проходит сигнал IL-6 и IL-22 в эпителиальных клетках тонкого кишечника (данные интерлейкины способствуют пролиферации эпителиальных клеток и заживлению ран) [44]. Прямые эффекты SOCS3 на сигналинг с участием STAT3 были показаны на эпителиальных клетках кожи, где избыточная экспрессия SOCS3 вызывала затрудненное заживление ран, усиливающее воспаление [46–48]. Известно, что STAT3 экспрессируется в почке и связан с развитием хронических почечных заболеваний, фиброзом и провоспалительным ответом [49, 50]. Связыванию STAT3 с таргетными генами

препятствует PIAS3, как и в случае с STAT5 [51]. PIAS3 играет важную роль в иммунном ответе: известно, что он контролирует экспрессию таких транскрипционных факторов, как MITF (microphthalmia-associated transcription factor) и NF- κ B, влияющих на клеточное выживание и воспалительный ответ [51, 52]. Возможно, рост экспрессии SOCS3 и PIAS3, продемонстрированный нами при холестазе беременных и в коре, и во внешнем мозговом слое почки, может способствовать провоспалительному статусу почки в условиях этой патологии.

Полученные нами данные свидетельствуют в пользу того, что в реализации эффектов пролактина в модели холестаза беременных участвуют и короткая, и длинная изоформы ПРЛР во внешнем мозговом слое почки, а в коре — главным образом длинная изоформа. В целом следует заключить, что нами впервые получены доказательства наличия прямых эффектов пролактина на почку: 1) выявлено наличие экспрессии обеих изоформ ПРЛР и изменение их экспрессии в зависимости от физиологического состояния и разного уровня пролактина; 2) показан рост фосфорилирования белка STAT5, как ключевого посредника сигналинга длинной изоформы в условиях уменьшения доминирования короткой изоформы ПРЛР; 3) продемонстрирован рост экспрессии мРНК терминаторов пролактинового сигналинга, являющихся молекулярными мишенями длинной изоформы ПРЛР и имеющих STAT-чувствительные элементы в промоторах своих генов, в условиях преобладания длинной изоформы; 4) обнаружено снижение экспрессии мРНК *GALT*, как молекулярной мишени короткой изоформы ПРЛР в условиях относительного роста ее содержания.

Кроме того, следует обратить внимание на то, что в условиях такой патологии, как холестаз, экспрессия изоформ ПРЛР в почках существенно возрастает по сравнению с нормой. Это может быть связано не только с реализацией эволюционно древних осморегуляторных функций пролактина, но, возможно, имеет отношение к усилению детоксицирующей функции почки и к регуляции пролактином ее воспалительного ответа.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все хирургические и экспериментальные протоколы были одобрены комитетом биоэтики биологического факультета МГУ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gabzdyl, E.M., and Schlaeger, J.M. (2015) Intrahepatic cholestasis of pregnancy, *J. Perinat. Neonatal Nurs.*, **29**, 41–50, doi: 10.1097/JPN.0000000000000077.
- Lo, J.O., Shaffer, B.L., Allen, A.J., Little, S.E., Cheng, Y.W., and Caughey, A.B. (2015) Intrahepatic cholestasis of pregnancy and timing of delivery, *J. Matern. Fetal Neonatal Med.*, **28**, 2254–2258, doi: 10.3109/14767058.2014.984605.
- Simjak, P., Parizek, A., Vitek, L., Cerny, A., Adamcova, K., Koucky, M., and Starka, L. (2015) Fetal complications due to intrahepatic cholestasis of pregnancy, *J. Perinat. Med.*, **43**, 133–139, doi: 10.1515/jpm-2014-0089.
- Geenes, V., and Williamson, C. (2009) Intrahepatic cholestasis of pregnancy, *World J. Gastroenterol.*, **15**, 2049–2066, doi: 10.3748/wjg.15.2049.
- Lee, N.M., and Brady, C.W. (2009) Liver disease in pregnancy, *World J. Gastroenterol.*, **15**, 897–906, doi: 10.3748/wjg.15.897.
- Ranta, T., Unnerus, H.A., Rossi, J., and Seppala, M. (1979) Elevated plasma prolactin concentration in cholestasis of pregnancy, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **134**, 1–3.
- Фидченко Ю.М., Кушнарева Н.С., Смирнова О.В. (2013) Влияние пролактина на водно-солевой обмен у самок крыс в модели холестаза беременных, *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **156**, 767–770.
- Goffin, V., and Touraine, P. (2015) The prolactin receptor as a therapeutic target in human diseases: browsing new potential indications, *Expert Opin. Ther. Targets*, **19**, 1229–1244, doi: 10.1517/14728222.2015.1053209.
- Marano, R.J., and Ben-Jonathan, N. (2014) Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions, *Mol. Endocrinol.*, **28**, 622–633, doi: 10.1210/me.2013-1349.
- Ignacak, A., Kasztelnik, M., Sliwa, T., Korbut, R.A., Rajda, K., and Guzik, T.J. (2012) Prolactin—not only lactotrophin. A «new» view of the «old» hormone, *J. Physiol. Pharmacol.*, **63**, 435–443.
- Abramicheva, P., Balakina, T., Bulaeva, O., Guseva, A., Lopina, O., and Smirnova, O. (2017) Role of Na⁺/K⁺ ATPase in natriuretic effect of prolactin in a model of cholestasis of pregnancy, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 632–641, doi: 10.1134/S000629791705011X.
- Булаева О.А., Абрамичева П.А., Балакина Т.А., Смирнова О.В. (2016) Роль пролактина в регуляции биодинамики бикарбонатов у самок крыс в модели холестаза беременных, *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **162**, 559–562.
- Александрова М.И., Кушнарева Н.С., Смирнова О.В. (2012) Особенности манифестации рецептора пролактина в ткани почки самок крыс при холестазе: влияние гиперпролактинемии, *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, **153**, 434–437.
- Boudreau, R.T.M., Sangster, S.M., Johnson, L.M., and Dauphinee, S. (2002) Implication of 4 phosphoprotein and the rapamycin-sensitive mammalian target-of-rapamycin pathway in prolactin receptor signaling, *J. Endocrinol.*, **173**, 493–506.
- Ali, S., Pellegrini, I., and Kelly, P.A. (1991) A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor, *J. Biol. Chem.*, **266**, 20110–20117.
- Bernard, V., Bouilly, J., Beau, I., Broutin, I., Chanson, P., Young, J., and Binart, N. (2016) Germline prolactin receptor mutation is not a major cause of sporadic prolactinoma in humans, *Neuroendocrinology*, **103**, 738–745, doi: 10.1159/000442981.
- Halperin, J., Devi, S. Y., Elizur, S., Stocco, C., Shehu, A., Rebourcet, D., and Gibori, G. (2008) Prolactin signaling through the short form of its receptor represses forkhead transcription factor FOXO3 and its target gene galt causing a severe ovarian defect, *Mol. Endocrinol.*, **22**, 513–522, doi: 10.1210/me.2007-0399.
- Krebs, D.L., and Hilton, D.J. (2001) SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling, *Stem Cells*, **19**, 378–387.
- Moreno-Carranza, B., Goya-Arce, M., Vega, C., Adan, N., Triebel, J., Lopez-Barrera, F., and Clapp, C. (2013) Prolactin promotes normal liver growth, survival, and regeneration in rodents: effects on hepatic IL-6, suppressor of cytokine signaling-3, and angiogenesis, *Am. J. Physiol.*, **305**, R720–R726, doi: 10.1152/ajpregu.00282.2013.
- Asad, M., Shewade, D.G., Koumaravelou, K., Abraham, B.K., Balasinar, N., and Ramaswamy, S. (2001) Effect of hyperprolactinaemia as induced by pituitary homografts under kidney capsule on gastric and duodenal ulcers in rats, *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**, 1541–1547, doi: 10.1211/0022357011777918.
- Ose, K., Miyata, K., Yoshioka, K., and Okuno, Y. (2009) Effects of hyperprolactinemia on toxicological parameters and proliferation of islet cells in male rats, *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 151–162, doi: 10.2131/jts.34.151.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.*, **3**, 1–12, doi: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- Aleksandrova, M.I., Sirotina, N.S., and Smirnova, O.V. (2015) Possible recovery of manifestation of prolactin receptor and some of its target proteins in the liver and kidney cells of female rats after relief of cholestasis complicated and not complicated by hyperprolactinemia, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **159**, 361–364, doi: 10.1007/s10517-015-2963-0.
- Yonezawa, T., Chen, K.H., Ghosh, M.K., Rivera, L., Dill, R., Ma, L., and Walker, A.M. (2015) Anti-metastatic outcome of isoform-specific prolactin receptor targeting in breast cancer, *Cancer Lett.*, **366**, 84–92, doi: 10.1016/j.canlet.2015.06.010.
- Tan, D., Johnson, D.A., Wu, W., Zeng, L., Chen, Y.H., Chen, W.Y., and Walker, A.M. (2005) Unmodified prolactin (PRL) and S179D PRL-initiated bioluminescence resonance energy transfer between homo- and hetero-pairs of long and short human PRL receptors in living human cells, *Mol. Endocrinol.*, **19**, 1291–1303, doi: 10.1210/me.2004-0304.
- Devi, Y.S., Seibold, A.M., Shehu, A., Maizels, E., Halperin, J., Le, J., and Gibori, G. (2011) Inhibition of MAPK by prolactin signaling through the short form of its receptor in the ovary and decidua: involvement of a novel

- phosphatase, *J. Biol. Chem.*, **286**, 7609–7618, doi: 10.1074/jbc.M110.166603.
27. Devi, Y.S., Shehu, A., Stocco, C., Halperin, J., Le, J., Seibold, A.M., and Gibori, G. (2009) Regulation of transcription factors and repression of Sp1 by prolactin signaling through the short isoform of its cognate receptor, *Endocrinology*, **150**, 3327–3335, doi: 10.1210/en.2008-1719.
 28. Elsas, L.J., Lai, K., Saunders, C.J., and Langley, S.D. (2001) Functional analysis of the human galactose-1-phosphate uridylyltransferase promoter in Duarte and LA variant galactosemia, *Mol. Genet. Metab.*, **72**, 297–305.
 29. Bogorad, R.L., Smyslova, V.S., Smirnov, A.N., Rubtsov, P.M., and Smirnova, O.V. (2002) The ratio of prolactin receptor isoforms in rat hepatocytes: the effect of obstructive cholestasis, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **36**, 91–93.
 30. Bogorad, R.L., Ostroukhova, T.Y., Orlova, A.N., Rubtsov, P.M., and Smirnova, O.V. (2006) Prolactin receptors in rat cholangiocytes: Regulation of level and isoform ratio is sex independent, *Biochemistry (Moscow)*, **71**, 178–184, doi: 10.1134/S0006297906020106.
 31. Ben-Jonathan, N., LaPensee, C.R., and LaPensee, E.W. (2008) What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrinol. Rev.*, **29**, 1–41, doi: 10.1210/er.2007-0017.
 32. Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., and Kelly, P.A. (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice, *Endocrinol. Rev.*, **19**, 225–268.
 33. Hennighausen, L., and Robinson, G.W. (2008) Interpretation of cytokine signaling through the transcription factors, *Genes Dev.*, **22**, 711–721, doi: 10.1101/gad.1643908.
 34. Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Schindler, C., Zhong, Z., Wen, Z., Darnell, J.E., and Ihle, J.N. (1995) Distribution of the mammalian Stat gene family in mouse chromosomes, *Genomics*, **29**, 225–228, doi: 10.1006/geno.1995.1235.
 35. Smirnov, A.N. (2009) Hormonal mechanisms of sex differentiation of the liver: the modern concepts and problems, *Ontogenez*, **40**, 334–354.
 36. Endo, T., Sasaki, A., Minoguchi, M., Joo, A., and Yoshimura, A. (2003) CIS1 interacts with the Y532 of the prolactin receptor and suppresses prolactin-dependent STAT5 activation, *J. Biochem.*, **133**, 109–113.
 37. Matsumoto, A., Seki, Y., Kubo, M., Ohtsuka, S., Suzuki, A., Hayashi, I., Tsuji, K., Nakahata, T., Okabe, M., Yamada, S., and Yoshimura, A. (1999) Suppression of STAT5 functions in liver, mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2-containing protein 1 transgenic mice, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 6396–6407, doi: 10.1128/MCB.19.9.6396.
 38. Liu, X., Robinson, G.W., Wagner, K.U., Garrett, L., Wynshaw-Boris, A., and Hennighausen, L. (1997) Stat5a is mandatory for adult mammary gland development and lactogenesis, *Genes Dev.*, **11**, 179–186, doi: 10.1101/gad.11.2.179.
 39. Ormandy, C.J., Camus, A., Barra, J., Damotte, D., Lucas, B., Buteau, H., and Kelly, P.A. (1997) Null mutation of the prolactin receptor gene produces multiple reproductive defects in the mouse, *Genes Dev.*, **11**, 167–178, doi: 10.1101/gad.11.2.167.
 40. Tonko-Geymayer, S., Goupille, O., Tonko, M., Soratroi, C., Yoshimura, A., Streuli, C., and Doppler, W. (2002) Regulation and function of the cytokine-inducible SH-2 domain proteins, CIS and SOCS3, in mammary epithelial cells, *Mol. Endocrinol.*, **16**, 1680–1695.
 41. Tomic, S., Chughtai, N., and Ali, S. (1999) SOCS-1, -2, -3: selective targets and functions downstream of the prolactin receptor, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **158**, 45–54, doi: 10.1016/S0303-7207(99)00180-X.
 42. Ryszczyn, M.A., and Clevenger, C.V. (2002) The intranuclear prolactin/cyclophilin B complex as a transcriptional inducer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 6790–6795, doi: 10.1073/pnas.092160699.
 43. Russell, D.L., and Richards, J.S. (1999) Differentiation-dependent prolactin responsiveness and stat (signal transducers and activators of transcription) signaling in rat ovarian cells, *Mol. Endocrinol.*, **13**, 2049–2064, doi: 10.1210/mend.13.12.0389.
 44. Li, Y., Haar, C., Peppelenbosch, M.P., and van der Woude, C.J. (2012) SOCS3 in immune regulation of inflammatory bowel disease and inflammatory bowel disease-related cancer, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **23**, 127–138, doi: 10.1016/j.cytogfr.2012.04.005.
 45. Suzuki, A., Hanada, T., Mitsuyama, K., Yoshida, T., Kamizono, S., Hoshino, T., and Yoshimura, A. (2001) CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation, *J. Exp. Med.*, **193**, 471–482, doi: 10.1084/jem.193.4.471.
 46. Linke, A., Goren, I., Bo, M.R., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2010) The suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 determines keratinocyte proliferative and migratory potential during skin repair, *J. Invest. Dermatol.*, **130**, 876–885, doi: 10.1038/jid.2009.344.
 47. Linke, A., Goren, I., Bo, M.R., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2010) Epithelial overexpression of SOCS-3 in transgenic mice exacerbates wound inflammation in the presence of elevated TGF- β 1, *J. Invest. Dermatol.*, **130**, 866–875, doi: 10.1038/jid.2009.345.
 48. Ivory, C.P.A., Wallace, L.E., McCafferty, D.-M., and Sigale, D.L. (2008) Interleukin-10-independent anti-inflammatory actions of glucagon-like peptide 2, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **295**, G1202–G1210, doi: 10.1152/ajpgi.90494.2008.
 49. Ni, J., Shen, Y., Wang, Z., Shao, D.C., Liu, J., Fu, L.J., and Lu, L.M. (2014) Inhibition of STAT3 acetylation is associated with attenuated renal fibrosis in the obstructed kidney, *Acta Pharmacol. Sin.*, **35**, 1045–1054, doi: 10.1038/aps.2014.42.
 50. Ma, J.Q., Ding, J., Xiao, Z.H., and Liu, C.M. (2014) Ursolic acid ameliorates carbon tetrachloride-induced oxidative DNA damage and inflammation in mouse kidney by inhibiting the STAT3 and NF- κ B activities, *Int. Immunopharmacol.*, **21**, 389–395, doi: 10.1016/j.intimp.2014.05.022.
 51. Yagil, Z., Nechushtan, H., Kay, G., Yang, C.M., Kemeny, D.M., and Razin, E. (2010) The enigma of the role of Protein inhibitor of Activated STAT3 (PIAS3) in the immune response, *Trends Immunol.*, **31**, 199–204, doi: 10.1016/j.it.2010.01.005.
 52. Shuai, K. (2006) Regulation of cytokine signaling pathways by PIAS proteins, *Cell Res.*, **16**, 196–202, doi: 10.1038/sj.cr.7310027.

**EXPRESSION OF PROLACTIN RECEPTOR ISOFORMS, MEMBERS
OF PROLACTIN SIGNALLING, AND FACTORS OF RECEPTOR
CYCLE TERMINATION IN THE KIDNEY IN THE CHOLESTASIS
OF PREGNANCY MODEL**

**P. A. Abramicheva^{1*}, T. A. Balakina¹, I. A. Morozov²,
T. A. Schelkunova¹, and O. V. Smirnova¹**

¹ *Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 199991 Moscow,
Russia; E-mail: abramicheva.polina@gmail.com*

² *Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia*

Received January 29, 2019

Revised June 21, 2019

Accepted June 21, 2019

Expression of the long and short isoform of prolactin receptor (PrIR) and mediators of prolactin signaling in cortex and outer medulla of rat kidney in the model of cholestasis of pregnancy and in control animals was studied. The direct effects of prolactin on kidney have been proven, since: 1) mRNA expression of both isoforms of PrIR in kidney changes under different physiological conditions and different levels of prolactin; 2) expression level of pSTAT5 as a key mediator of signaling of the long PrIR isoform increases in cholestasis of pregnancy; 3) mRNA expression of the SOCS3 and PIAS3 prolactin signaling terminators increases under predominance of the long isoform; 4) expression of GALT mRNA as a molecular target of the short PrIR isoform decreases in the outer medulla of kidney.

Keywords: short and long isoforms of prolactin receptor, STAT5, SOCS3, PIAS3, cholestasis of pregnancy, hyperprolactinemia, kidney