

УДК 576

## УБАИН И МАРИНОБУФАГЕНИН: ВОЗМОЖНЫЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ НА КЛЕТКИ ЭПИТЕЛИЯ И ЭНДОТЕЛИЯ ЧЕЛОВЕКА

© 2020 Е.А. Климанова\*, Д.А. Федоров, С.В. Сидоренко,  
П.А. Абрамичева, О.Д. Лопина, С.Н. Орлов

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет,  
119234 Москва, Россия; электронная почта: klimanova.ea@yandex.ru

Поступила в редакцию 19.12.2019

После доработки 18.02.2020

Принята к публикации 18.02.2020

Продолжительные исследования, направленные на поиск эндогенных ингибиторов Na,K-АТФазы в тканях млекопитающих, привели к идентификации в биологических жидкостях убаина, маринобуфагенина (МБГ) и других кардиотонических стероидов (КТС). Известно, что продукция убаина и МБГ увеличивается при гипертонической болезни и других заболеваниях, сопровождающихся гиперволемией. Был проведен сравнительный анализ действия этих двух КТС на активность Na,K-АТФазы, измеренную по транспорту  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  и  $\text{Rb}^+$ , пролиферацию и гибель клеток почечного эпителия (HREC) и эндотелия пупочной вены человека (HUVES), экспрессирующих  $\alpha 1$ -Na,K-АТФазу. Концентрация убаина, обеспечивающая полумаксимальное ингибирование входа  $\text{Rb}^+$  ( $\text{IC}_{50}$ ) в HREC и HUVES, составляла 0,07 мкМ. В обоих типах клеток  $\text{IC}_{50}$  для МБГ было на порядок выше, чем для убаина. Инкубация HREC и HUVES с убаином в диапазоне концентраций 1–10 нМ в течение 30 ч приводила к росту включения [ $^3\text{H}$ ]-тимидина в ДНК до 40%, при этом увеличение концентрации убаина до 0,1 мкМ полностью ингибировало синтез ДНК. МБГ в концентрации 0,1 мкМ активировал синтез ДНК на 25% в HREC, но не в HUVES; 1 мкМ МБГ полностью подавлял синтез ДНК в HREC и на 50% – в HUVES. В отличие от HREC, инкубация HUVES в бессывороточной среде провоцировала апоптоз, который практически полностью подавлялся убаином и МБГ в концентрациях 0,1 и 3 мкМ соответственно. Суммируя эти данные, можно сделать два основных заключения: 1) эффекты МБГ в концентрациях, детектируемых в плазме крови (< 10 нМ), на HREC и HUVES не опосредованы изменением соотношения  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ ; 2) влияние убаина в физиологическом диапазоне концентраций на эти клетки связано, скорее всего, с активацией Na,K-АТФазы, что приводит к клеточной пролиферации.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** убаин, маринобуфагенин, Na,K-АТФаза, соотношение  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ , эпителий, эндотелий.

DOI: 10.31857/S0320972520040119

Благоприятное действие отвара из листьев наперстянки (*Digitalis purpurea* и *Digitalis lanata*) при лечении хронической сердечной недостаточности, описанное более 200 лет назад сэром William Withering [1], привело к идентификации растительных КТС, или карденолидов. К этой группе соединений относится также убаин, полученный из африканской лианы *Strophanthus gratus*, который благодаря своей гидрофильности использовали в подавляющем большинстве исследований *in vitro*. Позже из амфибий были

изолированы другие члены суперсемейства КТС, буфадииенолиды [2].

Ранние исследования показали, что добавление КТС в окружающую клетки среду ингибирует энергозависимое выведение  $\text{Na}^+$  из клетки [3] и блокирует Na,K-АТФазу [4], фермент, обнаруженный Skou J. Chr. в 1957 г. [5]. Еще в 1953 г. Szent Gyorgyi предположил, что в организме человека и других млекопитающих существуют так называемые «эндогенные» КТС, и дал этому физиологическое обоснование [6]. В настоящее время существует большое количество данных, свидетельствующих о том, что подобные соединения присутствуют во многих тканях млекопитающих, а их содержание в плазме человека колеблется в пределах субнанолярных концентраций, достигая значения нескольких нМ при некоторых патологиях [7].

Na,K-АТФаза – это гетеродимерный белок, находящийся в плазматической мембране всех

Принятые сокращения: КТС – кардиотонические стероиды; МБГ – маринобуфагенин; Ac-DEVD-AMC – *N*-ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-7-амидо-4-метилкумарин; HREC – клетки почечного эпителия человека; HUVES – клетки эндотелия пупочной вены человека; PAEC – клетки эндотелия артерий свиньи; REC – клетки почечного эпителия.

\* Адресат для корреспонденции.

клеток животных. Каталитическая  $\alpha$ -субъединица Na,K-АТФазы (~110 кДа) в ходе каталитического цикла претерпевает конформационный переход E1–E2, обеспечивая электрогенный ( $3\text{Na}^+$  vs  $2\text{K}^+$ ) транспорт ионов против электрохимического градиента за счет энергии, освобождающейся при гидролизе АТФ. За исключением повсеместно присутствующей  $\alpha 1$ -изоформы, три другие изоформы  $\alpha$ -субъединицы экспрессируются тканеспецифичным образом и встречаются в значительных количествах в клетках нейронов и скелетных мышц ( $\alpha 3$  и  $\alpha 2$ ), кардиомиоцитах ( $\alpha 2$ ) и семенниках ( $\alpha 4$ ). Три изоформы  $\beta$ -субъединицы, кодирующей ~35 кДа белок, сильно гликозилированы. Они контролируют доставку, конформационную стабильность  $\alpha$ -субъединицы, а также влияют на ее сродство к  $\text{K}_o^+$ ,  $\text{Na}_i^+$  и КТС [8–10].  $\alpha 1$ -Субъединица Na,K-АТФазы является единственной изоформой, экспрессируемой в эпителиальных клетках почек (REC) [11, 12] и в клетках эндотелия [13, 14].

КТС, взаимодействуя с Na,K-АТФазой, влияют на клеточные функции, связанные с активностью фермента и поддержанием трансмембранного градиента  $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ , такие как электрический мембранный потенциал, клеточный объем,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  и  $\text{Na}^+(\text{K}^+)/\text{Ca}^{2+}$ -обмен, симпорт  $\text{Na}^+$  и неорганического фосфата, глюкозы, аминокислот, нуклеотидов и др. Кроме того, вне зависимости от ингибирования Na-насоса, связывание с ним КТС может активировать сигнальные пути, вовлеченные в регуляцию процессов транскрипции и трансляции, клеточной адгезии, пролиферации и гибели клеток [15]. Таким образом, эти ответы клеток могут быть обусловлены как изменением соотношения  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$ , так и/или конформационными переходами Na, K-АТФазы, опосредованными ее связыванием с КТС. Следует учитывать, что изменение соотношения  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$  может быть следствием не только ингибирования Na-насоса, но и его активации, которая наблюдается в области более низких концентраций КТС, чем те, что вызывают его ингибирование [15].

Известно, что различные представители семейства КТС по-разному влияют не только на разные типы клеток, они могут оказывать также различное действие на одну и ту же клетку [16, 17]. При условии, что Na,K-АТФаза является единственным рецептором КТС, это явление может быть обусловлено: 1) различным сродством разных изоформ Na,K-АТФазы к ее специфическим ингибиторам [18] и/или 2) различными конформационными переходами Na,K-АТФазы, вызванными связыванием с разными КТС [19], что приводит к инициации различных сигнальных путей.

Для установления взаимосвязи физиологических эффектов, вызываемых двумя различными КТС, с изменением внутриклеточного соотношения  $[\text{Na}^+]_i/[\text{K}^+]_i$  в нашем исследовании проведен сравнительный анализ действия убаина и маринобуфагенина на транспорт одновалентных катионов, пролиферацию и гибель эндотелиальных клеток (HUVEC) и клеток почечного эпителия (HREC) человека, экспрессирующих только  $\alpha 1$ -Na,K-АТФазу.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культура клеток.** Клетки почечного эпителия (HREC) и эндотелия человека (HUVEC), приобретенные у фирмы «Clonetics» (США) и у фирмы «Cell Applications» (США) соответственно, культивировали в соответствии с инструкциями производителя с использованием ростовой среды для почечного эпителия (REGM) и эндотелиальной ростовой среды (ECGM). Для HREC в качестве бессывороточной среды использовали DMEM. Все исследования проводили на клетках 4–8-го пассажей. В этом диапазоне количество пассажей клеток существенно не влияет на максимальную активность Na,K-АТФазы (данные не приведены), а также на передачу сигналов, вызванную рецептором эпидермального фактора роста [20]. Морфологию клеток оценивали с помощью фазово-контрастной микроскопии при увеличении в 100 раз без предварительной фиксации.

**Оценка жизнеспособности клеток.** Для оценки гибели клеток, обработанных КТС, анализировали степень их открепления от подложки, расщепление хроматина и активность каспазы-3. Для количественной оценки открепления клетки выращивали в 24-луночных планшетах в отсутствие или присутствии КТС. Общее содержание белка и содержание белка в клетках, прикрепленных к пластиковым подложкам, измеряли после 3-кратного промывания 2 мл среды W с помощью модифицированного метода Lowry et al. [21]. Среда W содержала 100 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 10 мМ буфер Hepes-Tris, pH 7,4.

Анализ расщепления хроматина проводили как описано ранее [22]. Клетки, выращенные в 24-луночных планшетах, помещали в ростовую среду, содержащую 0,2–0,5 мкКи/мл  $^3\text{H}$ -тимидина. Через 24 ч их дважды промывали 2 мл ростовой среды и инкубировали в течение 24 ч в обычных условиях. Затем клетки промывали PBS и инкубировали в 0,5 мл среды различного состава (таблица), не содержащей  $^3\text{H}$ -тимидин, в течение следующих 18–24 ч. Для определения фрагментации хроматина планшеты пе-

Влияние бессывороточной среды, убаина и МБГ на активность каспазы-3 и расщепление хроматина в HUVEC

Условия инкубации	Активность каспазы-3, нмоль (мг белка) <sup>-1</sup> ·ч <sup>-1</sup>	Фрагменты хроматина, %
Ростовая среда	0,8 ± 0,3	6 ± 2
Среда без сыворотки	4,5 ± 0,7	27 ± 6
Среда без сыворотки + 0,1 мкМ убаин	1,4 ± 0,3	12 ± 4
Среда без сыворотки + 3 мкМ маринобуфагенин	1,6 ± 0,5	10 ± 4
P <sub>1,2</sub>	<0,01	<0,02
P <sub>1,3</sub>	Н/Д	Н/Д
P <sub>1,4</sub>	Н/Д	Н/Д

Примечание. Клетки инкубировали в указанных условиях в течение 24 ч. Общее содержание ДНК, меченой [<sup>3</sup>H]-тимидином, принимали за 100%. Результаты представлены в виде среднего значения ± S.E., n = 3 (активность каспазы-3), n = 4 (расщепление хроматина).

реносили на лед и добавляли 1 мл ледяного буфера для лизиса (10 мМ ЭДТА, 10 мМ Tris-HCl, 0,5%-ный Triton X-100, pH 8,0). Через 15 мин клеточный лизат собирали, центрифугировали (16 000 g, 10 мин) и переносили для измерения радиоактивности в жидкостный сцинтиллятор (фракция F1). Оставшуюся в осадках и лунках радиоактивность экстрагировали с помощью раствора 1%-ного Ds-Na, 4 мМ ЭДТА (фракция F2). Относительное содержание фрагментов внутриклеточного хроматина определяли как процент от общего количества [<sup>3</sup>H]-меченой ДНК:  $F1 / (F1 + F2) \times 100\%$ . Активность каспазы-3 определяли по гидролизу флуоресцентного субстрата каспазы-3 (Ac-DEVD-AMC, N-ацетил-Asp-Glu-Val-Asp-AMC) в присутствии и в отсутствие ее ингибитора Ac-DEVD-CHO, как описано ранее [23].

**Внутриклеточное содержание Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> и Rb<sup>+</sup>.** Активность Na,K-АТРазы оценивали по скорости КТС-чувствительного входа Rb<sup>+</sup> или <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup>, устойчивого к буметаниду (ингибитор Na,K,Cl-котранспортера) [22]. Клетки предварительно инкубировали в 0,5 мл среды REGM (HREC) или ECGM (HUVEC), содержащей различные концентрации убаина или МБГ. Через 3 ч добавляли 0,5 мл той же среды, содержащей 2 мкКи/мл <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> (HREC) или 2,5 мМ RbCl (HUVEC), 10 мкМ буметанида и КТС, и инкубировали в течение 10 мин.

Внутриклеточное содержание Na<sup>+</sup> и K<sup>+</sup> в HREC определяли как стационарное распределение внеклеточного и внутриклеточного <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> и <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> [23], в HUVEC – с помощью метода пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии, как это описано в [24]. HREC предварительно инкубировали в 0,5 мл среды REGM, содержащей различные концентрации убаина или МБГ. Через 3 ч добавляли 0,5 мл той же среды,

содержащей 0,5 мкКи/мл <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> или 2 мкКи/мл <sup>22</sup>Na<sup>+</sup> и КТС, и инкубировали в течение 10 мин.

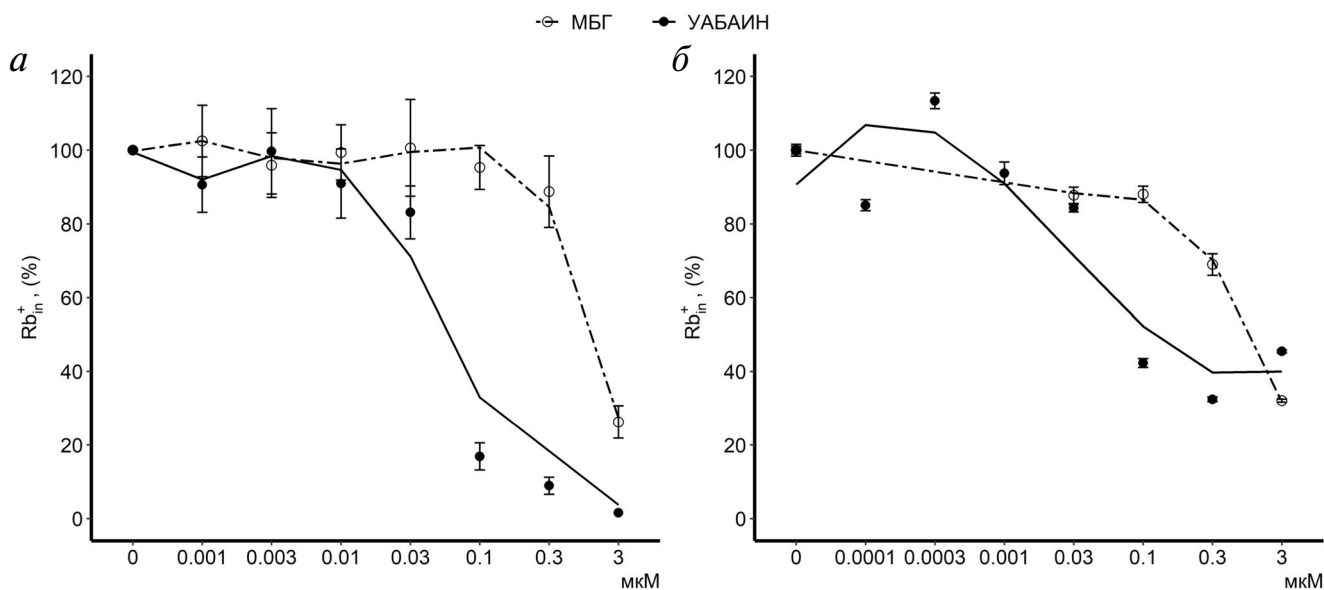
Для определения внутриклеточного содержания ионов клетки трижды промывали 1,5 мл холодного раствора 0,1 М MgCl<sub>2</sub>, после чего лизировали их 5%-ной ТХУ. Полученные лизаты центрифугировали, в супернатанте определяли содержание ионов методами жидкостной сцинтилляции («LKB», Финляндия) и пламенной атомно-абсорбционной спектроскопии («Кортек», Россия). Осадок белка растворяли в 0,1 М NaOH и определяли его концентрацию модифицированным методом Lowry et al. [21]. Содержание ионов нормировали на общее количество белка в образце.

**Статистическая обработка данных.** Анализ данных и их визуализацию проводили с использованием пакета ggplot2 в языке R [25]. Все значения представлены в виде среднего ± стандартная ошибка.

**Материалы.** Метил- [<sup>3</sup>H]-тимидин, <sup>22</sup>NaCl и <sup>86</sup>RbCl были приобретены у «PerkinElmer» (США), «ICN Biomedicals Inc.» (США) и «Amersham» (Канада) соответственно. DEVD-AMC и DEVD-CHO были получены от «BIO-MOL Research Laboratories» (США). Остальные реактивы были приобретены у фирм «Sigma-Aldrich» (США), «Gibco «Thermo Fisher Scientific» (США) и «Anachemia» (Канада).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Ионные потоки.** Взаимодействие Na,K-АТРазы с КТС является относительно медленным процессом. Например, в клетках эпителия почки собаки (MDCK) насыщение участков связывания убаином в концентрации 0,13 мкМ происходит в течение 1 ч [26]. Учитывая этот



**Рис. 1.** Дозозависимое влияние убаина и МБГ на транспорт  $Rb^+$  в HREC (а) и HUVEC (б). Клетки предварительно инкубировали в 0,5 мл ростовой среды, содержащей различные концентрации убаина или МБГ. Через 3 ч добавляли 0,5 мл той же среды, содержащей 2 мкКи/мл  $^{86}Rb^+$  (HREC) или 2,5 мМ  $RbCl$  (HUVEC), 10 мкМ буметанида и КТС, и инкубировали в течение 10 мин. Результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.,  $n = 3-6$

факт, клетки предварительно инкубировали с различными концентрациями убаина и МБГ в течение 3 ч, после чего добавляли к ним  $Rb^+$  (HUVEC) или  $^{86}Rb^+$  (HREC), используемый в качестве аналога  $K^+$  для оценки активности Na,K-АТФазы в стандартных условиях. На рис. 1 показано, что в HREC и HUVEC убаин в концентрации 0,07 мкМ приводил к полумаксимальному ингибированию скорости входа  $Rb^+$ . В обоих типах клеток МБГ обеспечивал такой же эффект в концентрациях, минимум на порядок больше ( $IC_{50} \sim 2$  и 0,7 мкМ в HREC и HUVEC соответственно). Кроме того, в присутствии 0,3 нМ убаина наблюдали достоверное увеличение буметанид-чувствительного входа  $Rb^+$  в HUVEC, что, скорее всего, связано с активацией Na,K-АТФазы. Активация Na,K-АТФазы наномолярными концентрациями убаина — явление, описанное еще в 1960-х гг. [27, 28]. Механизм этого явления обсуждается в литературе. Поскольку это явление неоднократно наблюдалось не только на клетках, но и на очищенном ферменте, предполагается, что это явление обусловлено олигомерной структурой фермента ( $\alpha\beta$ )<sub>2</sub>, когда насыщение только одного центра за счет наличия кооперативных взаимодействий вызывает активацию, а последующее насыщение второго центра олигомера приводит к ингибированию активности.

Инкубация HREC в течение 3 ч в присутствии убаина и МБГ приводила к полумаксимальному ингибированию активности Na,K-АТФазы со значениями  $IC_{50} \sim 0,08$  и 3 мкМ соот-

ветственно (рис. 2, а, б). Существенные различия были зафиксированы также при анализе действия этих КТС на внутриклеточное содержание  $Na^+$  и  $K^+$  в HUVEC ( $IC_{50} \sim 0,3$  и 1 мкМ для убаина и МБГ соответственно) (рис. 2, в, г). Суммируя эти данные, можно заключить, что сродство Na,K-АТФазы к убаину существенно выше (минимум на порядок), чем к МБГ, в обоих типах исследуемых клеток, что согласуется с нашими данными, полученными ранее с использованием высокоочищенной  $\alpha 1\beta 1$ -изоформы Na,K-АТФазы [29]. При этом значительное изменение внутриклеточного содержания  $Na^+$  и  $K^+$  вследствие ингибирования Na-насоса происходило при концентрациях обоих КТС, превышающих физиологический диапазон.

**Синтез ДНК.** Как в случае HREC, так и в случае HUVEC, 30-часовая преинкубация клеток с убаином в диапазоне концентраций от 1 до 10 нМ увеличивала включение [ $^3H$ ]-тимидина в ДНК до 40% (рис. 3). Это наблюдение согласуется с полученными ранее данными об увеличении синтеза ДНК и клеточной пролиферации, полученными на гладкомышечных клетках сосудов (VSMC) собаки, быка и человека [30–32], клетках гладких мышц предстательной железы человека [33], REC крысы и опоссума [12, 34] и HUVEC [35, 36]. В отличие от низких доз убаина, повышение его концентрации до 0,03 и 0,1 мкМ полностью ингибировало включение [ $^3H$ ]-тимидина в ДНК в HREC и HUVEC соответственно. Не было обнаружено какой-либо активации синтеза ДНК под действием

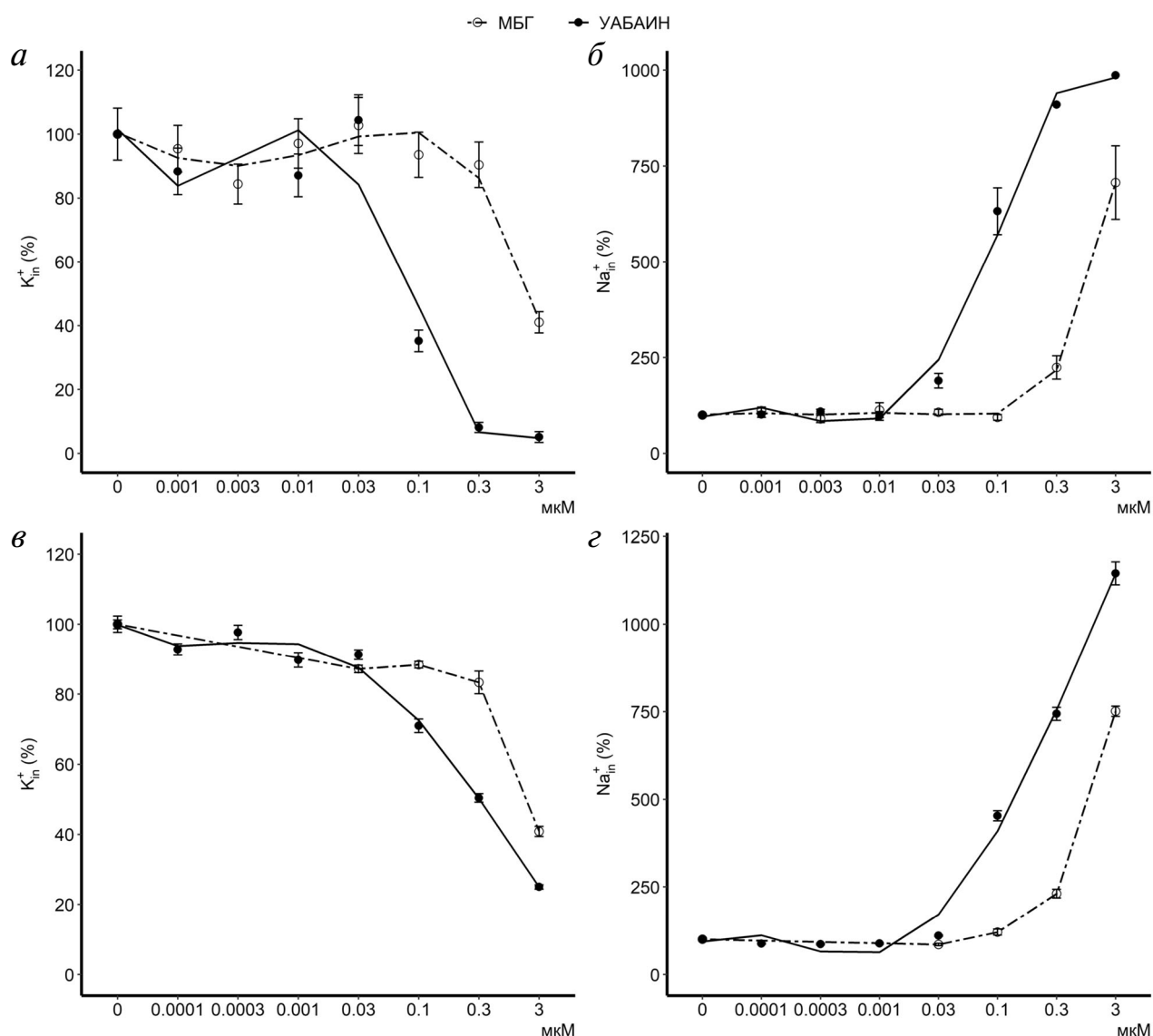
МБГ в HUVEC, тогда как в HREC наблюдали ~ 25% активацию включения метки в ДНК при концентрации этого КТС 0,1 мкМ. При повышении концентрации до 1 мкМ МБГ полностью ингибировал синтез ДНК в HREC, а в HUVEC происходило его снижение на 50% (рис. 3).

Эти результаты коррелируют с данными о том, что инкубация HUVEC в присутствии 1–3 нМ убаина, которая сопровождается уменьшением соотношения  $[Na^+]_i/[K^+]_i$  за счет активации Na,K-АТФазы, приводит к увеличению клеточной пролиферации. При этом сни-

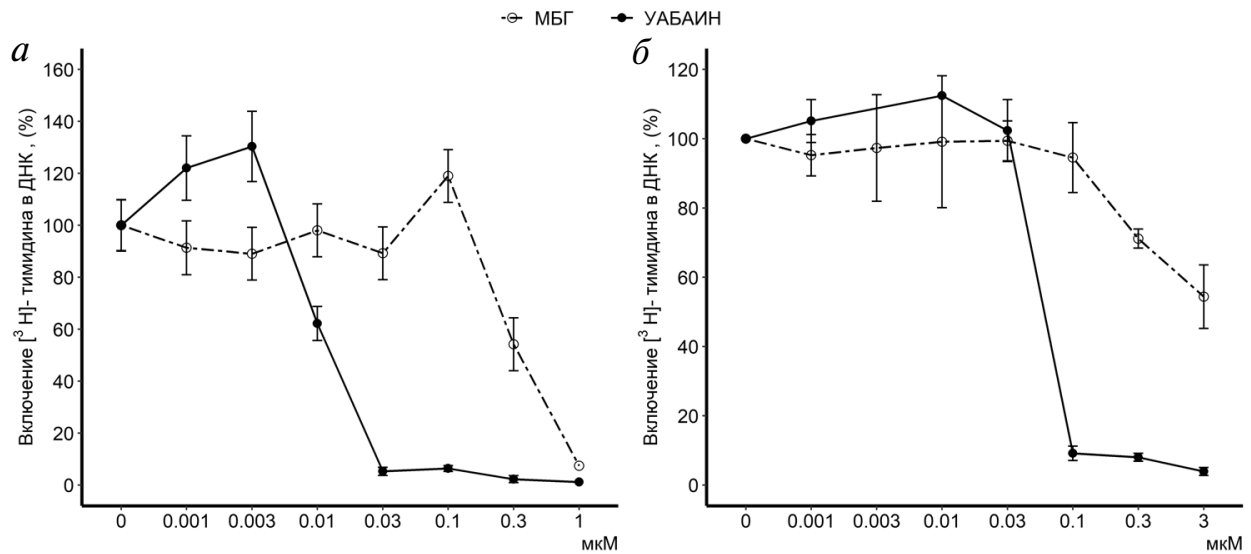
жение роста клеток наблюдали при более высоких концентрациях убаина, вызывающих диссипацию трансмембранного градиента  $Na^+$  и  $K^+$  [37].

Действительно, максимальное увеличение синтеза ДНК в HREC было отмечено в присутствии 3 нМ убаина (рис. 3), тогда как значительное снижение входа  $^{86}Rb^+$  и повышение  $[Na^+]_i$  были обнаружены при его концентрациях >10 нМ (рис. 1 и 2).

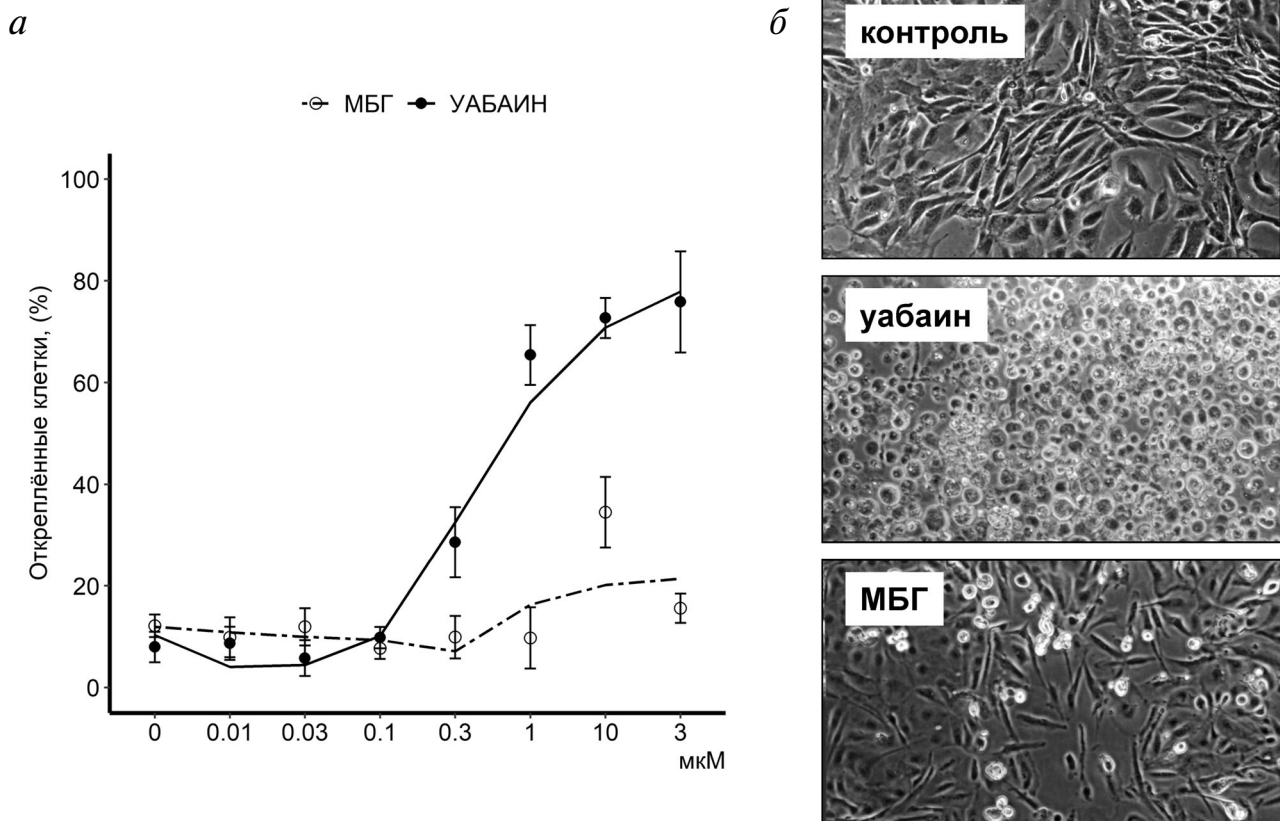
**Гибель клеток.** Наряду со снижением синтеза ДНК существенное ингибирование включения  $[^3H]$ -тимидина в ДНК в HREC и HUVEC, обра-



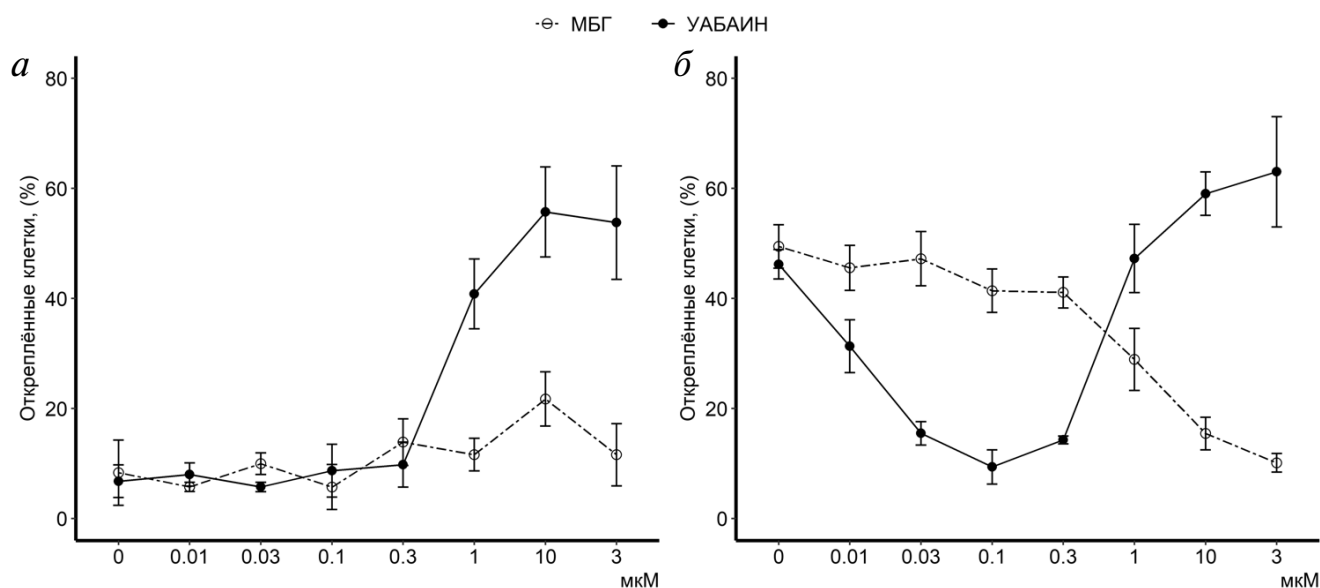
**Рис. 2.** Дозозависимое влияние убаина и МБГ на внутриклеточное содержание  $K^+$  и  $Na^+$  в HREC (а, б) и HUVEC (в, г). HREC предварительно инкубировали в 0,5 мл ростовой среды, содержащей различные концентрации убаина или МБГ. Через 3 ч добавляли 0,5 мл той же среды, содержащей 0,5 мкКи/мл  $^{86}Rb^+$  или 2 мкКи/мл  $^{22}Na^+$  и КТС, и инкубировали в течение 10 мин. Внутриклеточное содержание  $Na^+$  и  $K^+$  в отсутствие КТС было принято за 100%. Результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.,  $n = 3-6$



**Рис. 3.** Дозозависимое влияние уабаина и МБГ на включение  $[^3\text{H}]$ -тимидина в ДНК HREC (а) и HUVEC (б). Клетки инкубировали в течение 30 ч в 1 мл ростовой среды, содержащей различные концентрации уабаина или МБГ, а затем добавляли 50 мкл той же среды, содержащей 1 мкг  $[^3\text{H}]$ -тимидина, и инкубировали в течение 15 ч. Результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.,  $n = 4$



**Рис. 4.** Влияние уабаина и МБГ на выживаемость HREC. а – Доля открепившихся клеток в зависимости от концентрации уабаина и МБГ. HREC инкубировали в бессывороточной среде, содержащей различные концентрации уабаина или МБГ, в течение 45 ч. Общее количество прикрепленных и открепившихся клеток было принято за 100%. Результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.,  $n = 4$ ; б – фазово-контрастная микроскопия HREC, обработанных бессывороточной средой, содержащей 3 мкМ уабаина или МБГ, в течение 45 ч ( $\times 100$  увеличение)



**Рис. 5.** Влияние убаина и МБГ на выживаемость HUVEC. Доля открепившихся HUVEC в зависимости от концентрации убаина и МБГ. Клетки инкубировали в ростовой (а) или в бессывороточной среде (б), содержащей различные концентрации убаина или МБГ, в течение 45 ч. Общее количество прикрепленных и открепившихся клеток было принято за 100%. Результаты представлены в виде среднего значения  $\pm$  S.E.,  $n = 4$

ботанных убаином в концентрациях  $>0,03$  мкМ, может быть обусловлено снижением выживаемости клеток. Чтобы оценить это, была использована фазово-контрастная микроскопия и проанализировано прикрепление клеток к подложкам. Не было обнаружено увеличения смертности HREC по отношению к контролю при их выдерживании в течение 45 ч в бессывороточной среде с 0,1 мкМ убаина, тогда как повышение его концентрации с 0,3 до 3 мкМ приводило к отслоению и массивному увеличению количества набухших плавающих клеток (рис. 4). Этот тип гибели клеток впервые был обнаружен в обработанных убаином клетках MDCK [38] и эндотелия из аорты свиньи (РАЕС) [39] и назван онкозом [40]. В отличие от убаина 45-часовая инкубация с 3 мкМ МБГ не влияла на выживаемость HREC (рис. 4). Аналогичные результаты были получены при исследовании дозозависимого действия убаина и МБГ на открепление HUVEC, содержащихся в ростовой среде (рис. 5, а).

В отличие от REC и РАЕС [38,39] отсутствие сыворотки в среде вызывало апоптоз HUVEC, о чем свидетельствуют данные по активации каспазы-3 [41]. На рис. 5, б показано, что открепление апоптотических клеток в бессывороточной среде практически полностью устранялось под действием убаина и МБГ в концентрациях 0,1 и 3 мкМ соответственно. Антиапоптотическое действие убаина и МБГ было подтверждено фазово-контрастной микроскопией, а также

анализом расщепления хроматина и активности каспазы-3 (таблица). Увеличение концентрации убаина до 3 мкМ приводило к массовому откреплению клеток (рис. 5, б).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В течение последних трех десятилетий многие исследовательские группы сообщали, что концентрация убаина, МБГ и других КТС в плазме крови в норме изменяется от 0,1 до 1 нМ и увеличивается до 10 нМ при некоторых патологических состояниях [7]. Последние данные свидетельствуют в пользу того, что эндогенные КТС наряду с повышением  $[Na^+]_i$  за счет ингибирования Na-насоса могут участвовать в патогенезе гипертонической болезни и других нарушений, вызывая также  $Na^+$ -независимую передачу сигналов, которая приводит к тканеспецифической модуляции клеточной пролиферации и смерти [15]. Стоит отметить, что в настоящий момент существует несколько основных вопросов, связанных с функционированием Na,K-АТФазы, относительно которых отсутствует единое мнение среди различных групп исследователей. К таким вопросам относится и проблема «эндогенных КТС» [42]. Данные, полученные в нашем исследовании, привели нас к четырем выводам:

1) МБГ в физиологических концентрациях не может влиять на функцию клеток почечного

эпителия и сосудистого эндотелия человека, экспрессирующих  $\alpha 1$ -Na,K-АТФазу, посредством изменения  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -соотношения. Действительно, существенную модуляцию активности Na,K-АТФазы (рис. 1), изменение внутриклеточного содержания  $Na^+$  и  $K^+$  (рис. 2), а также влияние на пролиферацию и смерть HREC и HUVEC (рис. 3 и 5) мы наблюдали при концентрациях МБГ  $> 100$  нМ, что как минимум в 50 раз выше его максимальной концентрации, детектированной в плазме крови [34]. Следует подчеркнуть, что наши результаты не исключают возможного влияния маринobufагенина на функции этих клеток из-за его локального накопления в ограниченных в пространстве клеточных компартментах. Дозозависимый эффект этого КТС на  $Na^+_i$ ,  $K^+_i$ -опосредованные и -независимые сигналы в других типах клеток заслуживает дальнейшего изучения;

2) убаин в физиологических концентрациях влияет на пролиферацию клеток почечного эпителия, что не связано с ингибированием Na,K-АТФазы и увеличением соотношения  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ . Действительно, максимальное увеличение синтеза ДНК в HREC наблюдалось в присутствии 3 нМ убаина (рис. 3), тогда как значительное снижение входа  $^{86}Rb^+$  и увеличение  $[Na^+]_i$  было обнаружено при концентрациях убаина, превышающих 10 нМ (рис. 1 и 2). В отличие от HREC, в HUVEC в присутствии наномолярных концентраций убаина происходило снижение входа  $Rb^+$  (рис. 1). Для оценки относительного влияния эндогенного убаина на регуляцию  $Na^+_i, K^+_i$ -опосредованных функций клеток эндотелия также требуются дополнительные эксперименты;

3) убаин и МБГ ингибировали апоптоз HUVEC, индуцированный их инкубацией в среде без сыворотки (т. е., без ростовых факторов), в концентрациях, превышающих 10 и 1000 нМ соответственно (рис. 5). При этих концентрациях они ингибировали Na,K-АТФазу (рис. 1) и увеличивали соотношение  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ . Это наблюдение согласуется с  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -опосредованным механизмом антиапоптотического действия убаина, выявленным у VSMC крыс [22] и PAEC [39];

4) убаин при концентрациях выше 0,1 мкМ вызывал смерть HREC и HUVEC, классифицированную ранее как онкоз. Несмотря на значительное ингибирование Na,K-АТФазы и увеличение отношения  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ , 3 мкМ МБГ не оказывало цитотоксического действия на оба типа клеток (рис. 4, рис. 5). Это наблюдение согласуется с отчетливым влиянием убаина и МБГ на выживаемость клеток MDCK [43]. Механиз-

мы, лежащие в основе этого интригующего явления, остаются неизвестными.

Таким образом, активация синтеза ДНК в обоих исследуемых типах клеток наблюдалась при концентрации убаина  $< 10$  нМ, при этом полное ингибирование синтеза ДНК происходило в присутствии 30 и 100 нМ убаина в HREC и HUVEC соответственно. Смерть клеток обоих типов наблюдалась при концентрации убаина, превышающей 0,3 мкМ. Концентрации убаина, обеспечивающие полумаксимальное ингибирование Na,K-АТФазы в HREC и HUVEC, составляли  $\sim 0,08$  и 0,3 мкМ соответственно. По всей видимости, ингибирование синтеза ДНК и смерть клеток обусловлены увеличением  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -соотношения в результате ингибирования Na,K-АТФазы.

Активацию синтеза ДНК в HREC наблюдали при 0,1 мкМ МБГ, на синтез ДНК в HUVEC МБГ подобного действия не оказывал, при этом 1 мкМ этого стероида полностью подавлял синтез ДНК в HREC и на 50% – в HUVEC. Однако не была обнаружена гибель обоих типов клеток при воздействии на них МБГ. Концентрация этого КТС, при которой происходило полумаксимальное ингибирование Na,K-АТФазы в HREC и HUVEC, составляла  $\sim 1$  мкМ.

Разницу в эффектах, обусловленных разными стероидами на один и тот же тип клеток, можно объяснить различием в сродстве этих КТС к Na,K-АТФазе [29]. Различия в эффектах одного КТС на разные типы клеток опосредованы, по всей видимости, изоферментным составом Na,K-АТФазы, присутствующей в мембранах этих клеток. Так, в HREC экспрессируется только  $\alpha 1\beta 1$ -изофермент, тогда как в HUVEC присутствует также  $\alpha 1\beta 3$  (собственные неопубликованные данные).

Принято считать, что Na,K-АТФаза является единственным рецептором для КТС. Однако в последнее время появились данные, свидетельствующие, что эти соединения влияют на метаболизм клетки (например, на синтез холестерина), воздействуя на синтез белков через белки-регуляторы [16, 44, 45]. Стоит отметить, что прямых доказательств того, что КТС взаимодействуют с этими регуляторными белками, локализованными внутри клетки, в цитируемых работах нет. Ранее нами было показано, что изменение  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -соотношения влияет на экспрессию многих генов даже в присутствии внутри- и внеклеточных хелаторов  $Ca^{2+}$  [46], т.е. изменение метаболизма, обнаруженное в указанных выше работах, может быть обусловлено именно изменением  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -соотношения, которое авторы этих работ не контролировали. С другой стороны, мы обнаружили, что инкуба-



ция HUVEC с убаином и МБГ в концентрациях, не оказывающих влияния на  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -соотношение, не приводит к изменению транскриптома этих клеток [47]. Таким образом, вопрос о наличии иных мишеней для КТС, помимо Na,K-АТРазы, остается открытым.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 18-34-00344).

**Благодарности.** Мы выражаем глубокую признательность профессору А.Я. Багрову (Санкт-Петербург, Россия) за любезно предоставленный маринобуфагенин.

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

**Соблюдение этических норм.** Настоящая работа не содержит каких-либо исследований, в которых были использованы в качестве объектов люди и животные.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Krikler, D. M. (1985) The foxglove, "the old woman from Shropshire" and William Withering, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **5**, 3-9, doi: 10.1016/s0735-1097(85)80457-5.
- Krenn, L., and Kopp, B. (1998) Bufadienolides from animal and plant sources, *Phytochemistry*, **48**, 1-29, doi: 10.1016/s0031-9422(97)00426-3.
- Schatzmann, H. J. (1953) Cardiac glycosides as inhibitors of active potassium and sodium transport by erythrocyte membrane, *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, **11**, 346-354.
- Skou, J. Chr. (1960) Further investigations on a  $Mg^{++} Na^+$ -activated adenosinetriphosphatase, possibly related to the active, linked transport of  $Na^+$  and  $K^+$  across the nerve membrane, *Biochim. Biophys. Acta*, **42**, 6-23, doi: 10.1016/0006-3002(60)90746-0.
- Skou, J. Chr. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves, *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 394-401.
- Szent-Györgyi, A. (1953) Chemical physiology of contraction in body and heart muscle, *Science*, **119**, 803, doi: 10.1126/science.119.3101.803.
- Khalaf, F. K., Dube, P., Mohamed, A., Tian, J., Malhotra, D., Haller, S. T., and Kennedy, D. J. (2018) Cardiotonic steroids and the sodium trade balance: new insights into trade-off mechanisms mediated by the  $Na^+/K^+$ -ATPase, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 2576, doi: 10.3390/ijms19092576.
- Blanco, G., and Mercer, R. W. (1998) Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function, *Am. J. Physiol.*, **275**, 633-650, doi: 10.1152/ajprenal.1998.275.5.F633.
- Therien, A. G. and Blostein, R. (2000) Mechanisms of sodium pump regulation, *Am. J. Physiol.*, **279**, 541-566, doi: 10.1152/ajpcell.2000.279.3.C541.
- Rajasekaran, S. A., Gopal, J., Willis, D., Espineda, C., Twiss, J. L., and Rajasekaran, A. K. (2004) Na,K-ATPase  $\beta$ 1-subunit increases the translation efficiency of the  $\alpha$ 1-subunit in MSV-MDCK cells, *Mol. Biol. Cell*, **15**, 3224-3232, doi: 10.1091/mbc.E04-03-0222.
- Herrera, V. L., Emanuel, J. R., Ruiz-Opazo, N., Levenson, R., and Nadal-Ginard, B. (1987) Three differentially expressed Na, K-ATPase alpha subunit isoforms: structural and functional implications, *J. Cell Biol.*, **105**, 1855-1865, doi: 10.1083/jcb.105.4.1855.
- Dmitrieva, R. I., and Doris, P. A. (2003) Ouabain is a potent promoter of growth and activator of ERK1/2 in ouabain-resistant rat renal epithelial cells, *J. Biol. Chem.*, **278**, 28160-28166, doi: 10.1074/jbc.M303768200.
- Pierre, S., Compe, E., Grillasca, J. P., Plannells, R., Sampol, J., Pressley, T. A., and Maixent, J. M. (2001) RT-PCR detection of Na,K-ATPase subunit isoforms in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC): evidence for the presence of alpha1 and beta3, *Cell. Mol. Biol.*, **47**, 319-324.
- Zahler, R., Sun, W., Ardito, T., and Kashgarian, M. (1996) Na-K-ATPase alpha-isoform expression in heart and vascular endothelia: cellular and developmental regulation, *Am. J. Physiol.*, **270**, 361-371, doi: 10.1152/ajpcell.1996.270.1.C361.
- Orlov, S. N., Klimanova, E. A., Tverskoi, A. M., Vladychenskaya, E. A., Smolyaninova, L. V., and Lopina, O. D. (2017)  $Na^+i, K^+i$ -dependent and -independent signaling triggered by cardiotonic steroids: facts and artifacts., *Mol. Basel Switz.*, **22**, 635, doi: 10.3390/molecules22040635.
- Riganti, C., Campia, I., Kopecka, J., Gazzano, E., Doublier, S., Aldieri, E., Bosia, A., and Ghigo, D. (2011) Pleiotropic effects of cardioactive glycosides, *Curr. Med. Chem.*, **18**, 872-885, doi: 10.2174/092986711794927685.
- Dvela, M., Rosen, H., Feldmann, T., Neshet, M., and Lichtstein, D. (2007) Diverse biological responses to different cardiotonic steroids, *Pathophysiology*, **14**, 159-166, doi: 10.1016/j.pathophys.2007.09.011.
- Katz, A., Lifshitz, Y., Bab-Dinitz, E., Kapri-Pardes, E., Goldshleger, R., Tal, D. M., and Karlish, S. J. D. (2010) Selectivity of digitalis glycosides for isoforms of human Na,K-ATPase, *J. Biol. Chem.*, **285**, 19582-19592, doi: 10.1074/jbc.M110.119248.
- Тверской А. М., Локтева В. А., Орлов С. Н., Лопина О. Д. (2019) Изменение конформации резистентной и чувствительной к кардиотоническим стероидам  $\alpha$ 1-Na,K-АТРазы при связывании убаина, дигоксина и маринобуфагенина, *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация*, **1**, 181-185.
- Reich, H., Tritchler, D., Herzenberg, A. M., Kassiri, Z., Zhou, X., Gao, W., and Scholey, J. W. (2005) Albumin activates ERK via EGF receptor in human renal epithelial cells, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **16**, 1266-1278, doi: 10.1681/ASN.2004030222.
- Hartree, E. F. (1972) Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response, *Anal. Biochem.*, **48**, 422-427, doi: 10.1016/0003-2697(72)90094-2.
- Orlov, S. N., Thorin-Trescases, N., Kotelevtsev, S. V., Tremblay, J., and Hamet, P. (1999) Inversion of the intracellular  $Na^+/K^+$  ratio blocks apoptosis in vascular smooth muscle at a site upstream of caspase-3, *J. Biol. Chem.*, **274**, 16545-16552, doi: 10.1074/jbc.274.23.16545.
- Pchejetski, D., Taurin, S., Der Sarkissian, S., Lopina, O. D., Pshezhetsky, A. V., Tremblay, J., deBlois, D., Hamet, P., and Orlov, S. N. (2003) Inhibition of  $Na^+, K^+$ -ATPase by

- ouabain triggers epithelial cell death independently of inversion of the  $[Na^+]_i/[K^+]_i$  ratio, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **301**, 735-744, doi: 10.1016/s0006-291x(02)03002-4.
24. Shiyani, A. A., Sidorenko, S. V., Fedorov, D., Klimanova, E. A., Smolyaninova, L. V., Kapilevich, L. V., Grygorczyk, R., and Orlov, S. N. (2019) Elevation of intracellular  $Na^+$  contributes to expression of early response genes triggered by endothelial cell shrinkage, *Cell. Physiol. Biochem.*, **53**, 638-647, doi: 10.33594/000000162.
  25. Wickham, H. (2009) Ggplot2: elegant graphics for data analysis, 2nd edn., Springer Publishing Company, Incorporated.
  26. Akimova, O. A., Hamet, P., and Orlov, S. N. (2007)  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -independent death of ouabain-treated renal epithelial cells is not mediated by  $Na^+, K^+$ -ATPase internalization and de novo gene expression, *Pflug. Arch. Eur. J. Physiol.*, **455**, 711, doi: 10.1007/s00424-007-0283-6.
  27. Palmer, R. F., Lasseter, K. C., and Melvin, S. L. (1966) Stimulation of  $Na^+$  and  $K^+$  dependent adenosine triphosphatase by ouabain, *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**, 629-633, doi: 10.1016/0003-9861(66)90240-2.
  28. Godfraind, T., and Ghysel-Burton, J. (1977) Binding sites related to ouabain-induced stimulation or inhibition of the sodium pump, *Nature*, **265**, 165, doi: 10.1038/265165a0.
  29. Klimanova, E. A., Petrushanko, I. Y., Mitkevich, V. A., Anashkina, A. A., Orlov, S. N., Makarov, A. A., and Lopina, O. D. (2015) Binding of ouabain and marinobufagenin leads to different structural changes in  $Na, K$ -ATPase and depends on the enzyme conformation, *FEBS Lett.*, **589**, 2668-2674, doi: 10.1016/j.febslet.2015.08.011.
  30. Aydemir-Koksoy, A., Abramowitz, J., and Allen, J. C. (2001) Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation, *J. Biol. Chem.*, **276**, 46605-46611, doi: 10.1074/jbc.M106178200.
  31. Abramowitz, J., Dai, C., Hirschi, K., Dmitrieva, R. I., Doris, P. A., Liu, L., and Allen, J. C. (2003) Ouabain- and marinobufagenin-induced proliferation of human umbilical vein smooth muscle cells and a rat vascular smooth muscle cell line, *A7r5*, *Circulation*, **108**, 3048-3053, doi: 10.1161/01.CIR.0000101919.00548.86.
  32. Li, M., Wang, Q., and Guan, L. (2007) Effects of ouabain on proliferation, intracellular free calcium and c-myc mRNA expression in vascular smooth muscle cells, *J. Comp. Physiol.*, **177**, 589-595, doi: 10.1007/s00360-007-0157-4.
  33. Chueh, S. C., Guh, J. H., Chen, J., Lai, M. K., and Teng, C. M. (2001) Dual effects of ouabain on the regulation of proliferation and apoptosis in human prostatic smooth muscle cells, *J. Urol.*, **166**, 347-353, doi: 10.1016/S0022-5347(05)66157-5.
  34. Khundmiri, S. J., Metzler, M. A., Ameen, M., Amin, V., Rane, M. J. and Delamere, N. A. (2006) Ouabain induces cell proliferation through calcium-dependent phosphorylation of Akt (protein kinase B) in opossum kidney proximal tubule cells, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **291**, 1247-1257, doi: 10.1152/ajpcell.00593.2005.
  35. Saunders, R. and Scheiner-Bobis, G. (2004) Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 1054-1062, doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04012.x.
  36. Qiu, J., Gao, H.-Q., Zhou, R.-H., Liang, Y., Zhang, X.-H., Wang, X.-P., You, B.-A., and Cheng, M. (2007) Proteomics analysis of the proliferative effect of low-dose ouabain on human endothelial cells., *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 247-253, doi: 10.1248/bpb.30.247.
  37. Tverskoi, A. M., Sidorenko, S. V., Klimanova, E. A., Akimova, O. A., Smolyaninova, L. V., Lopina, O. D., and Orlov, S. N. (2016) Effects of ouabain on proliferation of human endothelial cells correlate with  $Na^+, K^+$ -ATPase activity and intracellular ratio of  $Na^+$  and  $K^+$ , *Biochemistry (Moscow)*, **81**, 876-883, doi: 10.1134/S0006297916080083.
  38. Bolivar, J. J., Lazaro, A., Fernandez, S., Stefani, E., Pena-Cruz, V., Lechene, C., and Cerejido, M. (1987) Rescue of a wild-type MDCK cell by a ouabain-resistant mutant, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **253**, 151-161, doi: 10.1152/ajpcell.1987.253.1.C151.
  39. Orlov, S. N., Thorin-Trescases, N., Pchejetski, D., Taurin, S., Farhat, N., Tremblay, J., Thorin, E., and Hamet, P. (2004)  $Na^+/K^+$  pump and endothelial cell survival:  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -independent necrosis triggered by ouabain, and protection against apoptosis mediated by elevation of  $[Na^+]_i$ , *Pflug. Arch.*, **448**, 335-345, doi: 10.1007/s00424-004-1262-9.
  40. Orlov, S. N., and Hamet, P. (2005) Apoptosis vs. oncosis: role of cell volume and intracellular monovalent cations. In cell volume and signaling (Lauf, P. K., and Adragna, N. C., eds) Springer, US, pp. 219-233, doi: 10.1007/0-387-23752-6\_21.
  41. Trevisi, L., Visentin, B., Cusinato, F., Pighin, I., and Luciani, S. (2004) Antiapoptotic effect of ouabain on human umbilical vein endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **321**, 716-721, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.07.027.
  42. Askari, A. (2019) The sodium pump and digitalis drugs: dogmas and fallacies, *Pharmacol. Res. Perspect.*, **7**, e00505, doi: 10.1002/prp2.505.
  43. Akimova, O. A., Bagrov, A. Y., Lopina, O. D., Kamernitsky, A. V., Tremblay, J., Hamet, P., and Orlov, S. N. (2005) Cardiotoxic steroids differentially affect intracellular  $Na^+$  and  $[Na^+]_i/[K^+]_i$ -independent signaling in C7-MDCK cells, *J. Biol. Chem.*, **280**, 832-839, doi: 10.1074/jbc.M411011200.
  44. Campia, I., Gazzano, E., Pescarmona, G., Ghigo, D., Borgia, A. and Riganti, C. (2009) Digoxin and ouabain increase the synthesis of cholesterol in human liver cells, *Cell. Mol. Life Sci.*, **66**, 1580-1594, doi: 10.1007/s00018-009-9018-5.
  45. Campia, I., Sala, V., Kopecka, J., Leo, C., Mitro, N., Costamagna, C., Caruso, D., Pescarmona, G., Crepaldi, T., and Ghigo, D. et al. (2012) Digoxin and ouabain induce the efflux of cholesterol via liver X receptor signalling and the synthesis of ATP in cardiomyocytes, *Biochem. J.*, **447**, 301-311, doi: 10.1042/BJ20120200.
  46. Sidorenko, S., Klimanova, E., Milovanova, K., Lopina, O. D., Kapilevich, L. V., Chibalin, A. V., and Orlov, S. N. (2018) Transcriptomic changes in C2C12 myotubes triggered by electrical stimulation: role of  $Ca^{2+}$ -mediated and  $Ca^{2+}$ -independent signaling and elevated  $[Na^+]_i/[K^+]_i$  ratio, *Cell Calcium*, **76**, 72-86, doi: 10.1016/j.ceca.2018.09.007.
  47. Klimanova, E. A., Tverskoi, A. M., Koltsova, S. V., Sidorenko, S. V., Lopina, O. D., Tremblay, J., Hamet, P., Kapilevich, L. V., and Orlov, S. N. (2017) Time- and dose-dependent actions of cardiotoxic steroids on transcriptome and intracellular content of  $Na^+$  and  $K^+$ : a comparative analysis, *Sci. Rep.*, **7**, 45403, doi: 10.1038/srep45403.

**OUABAIN AND MARINOBUFAGENIN: A POSSIBLE PHYSIOLOGICAL EFFECTS ON HUMAN EPITHELIAL AND ENDOTHELIAL CELLS****E. A. Klimanova\*, D. A. Fedorov, S. V. Sidorenko,  
P. A. Abramicheva, O. D. Lopina, and S. N. Orlov***Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234 Moscow, Russia; E-mail: klimanova.ea@yandex.ru*

Received December 19, 2019

Revised February 18, 2020

Accepted February 18, 2020

Longtime study focused on the search of Na,K-ATPase (NKA) endogenous inhibitors of mammalian tissues resulted in the purification of ouabain, marinobufagenin (MBG) and other cardiotoxic steroids (CTS) from blood plasma. Production of ouabain and MBG is known to increase during essential hypertension and other diseases coupled to hypervolemia. We carried out comparative analysis of the effect of these two CTS on the Na,K-ATPase activity measured as transport of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Rb<sup>+</sup>, proliferation and death of human renal epithelial cells (HREC) and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) expressing  $\alpha 1$ -Na,K-ATPase. Ouabain concentrations which provide half-maximal inhibition of Rb<sup>+</sup> influx (IC<sub>50</sub>) into HREC and HUVEC were 0,07  $\mu$ M. In both types of cells, the values of IC<sub>50</sub> for MBG were by a factor of 10 higher than for ouabain. Incubation of HREC and HUVEC with ouabain in the range of concentrations 0,001-0,01  $\mu$ M for 30 h led to the growth of [<sup>3</sup>H]-thymidine incorporation into DNA by 40%, further increase of ouabain concentration up to 0,1  $\mu$ M completely suppressed DNA synthesis. MBG at concentration 0,1  $\mu$ M activated DNA synthesis by 25% in HREC, but not in HUVEC; 1  $\mu$ M MBG completely inhibited DNA synthesis in HREC, and by 50% in HUVEC. In contrast to HREC, HUVEC incubation in free serum media provoked apoptosis, which was almost completely suppressed by ouabain and MBG at concentrations 0,1 and 3  $\mu$ M respectively. Taking into account all these data we can conclude: 1) in HREC and HUVEC MBG effects at concentrations detected in blood plasma (< 0,01  $\mu$ M) are not due to the [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-ratio change; 2) ouabain effect on these cells in physiological concentrations range is mediated probably by activation of Na,K-ATPase that leads to cell proliferation.

**Keywords:** ouabain, marinobufagenin, Na,K-ATPase, [Na<sup>+</sup>]<sub>i</sub>/[K<sup>+</sup>]<sub>i</sub>-ratio, epithelium, endothelium