УДК 577.1

УВЕЛИЧЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ НАТРИЯ КАК ФАКТОР РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ В ЭНДОТЕЛИИ

© 2022 Д.А. Федоров, С.В. Сидоренко, А.И. Юсипович, О.В. Букач, А.М. Горбунов, О.Д. Лопина, Е.А. Климанова*

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

> Поступила в редакцию 17.02.2022 После доработки 26.04.2022 Принята к публикации 26.04.2022

Гиперосмотическая стимуляция клеток эндотелия часто приводит к его дисфункции, сопровождающейся в том числе возникновением провоспалительного ответа. Механизмы этого явления до конца не ясны. Оно может возникать вследствие увеличения концентрации Na⁺ в плазме за счёт повышения осмолярности внеклеточной среды, увеличения внутриклеточного соотношения Na_i⁺/K_i⁺ и/или изменения «жёсткости» клетки. В настоящей работе исследованы эффекты кратковременного повышения осмолярности внеклеточной среды на количество мРНК некоторых генов, важных для функционирования эндотелия (включая Na_i/K_i-чувствительные), и эквивалентную константу упругости мембран клеток эндотелия пупочной вены человека. Гиперосмотическая стимуляция этих клеток с помощью NaCl, но не маннитола приводила к накоплению ионов Na⁺ внутри клеток, несмотря на активацию Na,K-ATPaзы, а также сопровождалась уменьшением их эквивалентной константы упругости. Количество мРНК IL1 а снижалось при увеличении осмолярности внеклеточной среды, а количество мРНК ATF3, PAR2 и PTGS2 увеличивалось только в ответ на повышение концентрации NaCl. При этом в условиях наших экспериментов мы не детектировали изменения экспрессии осмопротекторного транскрипционного фактора NFAT5. Полученные данные свидетельствуют о том, что увеличение внеклеточной концентрации Na⁺ в физиологическом диапазоне является независимым фактором, который влияет на внутриклеточное соотношение Na_i^+/K_i^+ и регулирует экспрессию некоторых генов (в частности, ATF3, PAR2, PTGS2) в клетках эндотелия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: натрий, калий, Na,K-ATPaзa, эндотелий, регуляция транскрипции. **DOI**: 10.31857/S0320972522050062, **EDN:** ATKDKW

введение

Градиент ионов Na⁺_i и K⁺_i на плазматической мембране является основой жизни любой клетки животных. Он поддерживается работой Na,K-ATPaзы, и его диссипация опосредует различные ответы клеток. Изменение внутриклеточного соотношения Na⁺_i/K⁺_i может возникать в ответ на такие стимулы, как гипоксия, воспаление, изменение осмолярности внеклеточной жидкости. Это, в свою очередь, влияет на клеточный метаболизм через процессы, регулирующие экспрессию генов.

В настоящее время в литературе представлено множество данных о том, что обработка различных типов клеток высокими концентрациями NaCl приводит к приобретению ими провоспалительного фенотипа [1]. С этой точки зрения эндотелий представляет особый интерес, так как он, выстилая стенки сосудов, находится в непосредственном контакте с плазмой крови, где концентрация ионов [Na⁺]_о колеблется обычно в пределе 128-140 мМ [2]. В то же время концентрация ионов [Na⁺]_о при некоторых состояниях организма (обезвоживание, старение, перенесённые инфекции, оперативное вмешательство), именуемых гипо- и гипернатриемией, может быть меньше 128 мМ, а также превышать 165 мМ соответственно [3-5]. Несмотря на то что этот параметр строго контролируется и в физиологических нормальных состояниях практически постоянен, концентрация ионов Na⁺ в тканях варьирует. Так, в обширном исследовании Minegishi et al. [6] было показано, что при долговременном потреблении чрезмерного количества NaCl (5 г/день) избыток Na⁺ не вы-

Принятые сокращения: OPX – оптическая разность хода; TXУ – трихлоруксусная кислота; ФИ – фазовое изображение; ATF3 – транскрипционный фактор 3, зависимый от циклического AMP; FOS – транскрипционный фактор семейства AP-1; IL1 α – интерлейкин 1 α ; NFAT5 – ядерный фактор активированных T-клеток 5; NOS3 – эндотелиальная синтаза оксида азота; PAR2 – активируемый протеазой рецептор 2; PTGS2 – простагландин-эндопероксид синтаза 2.

^{*} Адресат для корреспонденции.

водится почками, а накапливается в тканях, клетки которых имеют обширную сеть гликозаминогликанов (в частности, в коже и мышцах). При некоторых патологических состояниях (например, диабет 1-типа и хроническая почечная недостаточность) наблюдается нарушение целостности сети гликозаминогликанов, что сопровождается высвобождением ионов Na⁺ и изменением его локальной концентрации [7]. Для нормального функционирования эндотелия его клетки должны обладать определённой поверхностной жёсткостью. Это физическая характеристика клеток, которая зависит в первую очередь от состояния гликокаликса (у эндотелиальных клеток эта структура хорошо развита и представляет собой обширную сеть прикреплённых к мембране клетки гликозаминогликанов). Считается, что он выполняет роль своеобразного «натриевого буфера». Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что избыток ионов $[Na^+]_0$ нарушает целостность эндотелиального гликокаликса, что влечёт за собой вход Na⁺ внутрь клетки с последующей полимеризацией примембранного G-актина. Суммарно эти события приводят к увеличению жёсткости эндотелиальной клетки, сопровождающейся нарушением барьерной функции мембраны эндотелия и снижением продукции оксида азота [8].

Повышение внеклеточной концентрации [Na⁺]₀, в свою очередь, будет приводить к увеличению осмолярности внеклеточной среды, что повлечёт за собой уменьшение объёма клетки с последующим регуляторным его увеличением за счёт работы различных транспортёров, обеспечивающих внутриклеточный транспорт ионов и воды. Вследствие этих событий происходит увеличение внутриклеточной ионной силы, что не может не сказаться на функционировании макромолекул [9]. Одним из самых известных механизмов адаптации клетки к таким условиям можно считать регуляцию экспрессии генов с участием транскрипционного фактора NFAT5, который, как считается, чувствителен к увеличению внутриклеточной ионной силы. NFAT5 впервые был идентифицирован в клетках почечной медуллы как осмопротекторный фактор, позже было показано, что он обеспечивает клеточный ответ на различные стимулы, не связанные с увеличением осмолярности внеклеточной среды, такие как ишемия, гипоксия, метаболический стресс и др. [10].

Наши предыдущие исследования убедительно свидетельствуют о том, что дисбаланс Na⁺_i/K⁺_i вследствие ингибирования Na,K-ATPaзы уабаином или за счёт инкубации клеток в бескалиевой среде сам по себе вызывает обширные изменения транскриптома в различных типах клеток через Ca_i^{2+} -независимые механизмы [11, 12]. Эти эксперименты позволили нам идентифицировать Na_i^+/K_i^+ -чувствительные гены. Среди них есть гены раннего ответа, многие из которых кодируют белки, являющиеся транскрипционными факторами (*FOS*, *ATF3*), а также гены провоспалительного ответа (*IL1* α , *PTGS2*, *PAR2*).

Ингибирование Na,K-ATPазы существенно увеличивает внутриклеточное соотношение Na⁺_i/K⁺_i, в связи с этим целью настоящей работы было определение характера и механизма воздействия кратковременных изменений концентрации NaCl во внеклеточной среде в физиологическом диапазоне на экспрессию отдельных транскрипционных факторов (*FOS*, *ATF3*, *NFAT5*), провоспалительных генов (*IL1* α , *PTGS2*, *PAR2*), а также эндотелиальной NO синтазы (*NOS3*), которая необходима для нормального функционирования сердечно-сосудистой системы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В работе были использованы реактивы следующих фирм-производителей: RbCl («Chemimpex», США); ТХУ, набор для усиленной хемилюминесценции SuperSignal[™] West Femto Maximum Sensitivity Substrate, pearent Trizol, коктейль ингибиторов фосфатаз 100X Halt[™], буфер RIPA («Thermofisher Scientific», коктейль США): ингибиторов протеаз («Amresco», США); тиорфан («Cayman Chemical», США); NaCl и KCl («MP Biomedicals», США); маннитол («AppliChem», Германия); MgCl₂ («Honeywell», США); вторичные антикроличьи антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена («Millipore», США); антитела против NFAT5 («Thermofisher Scientific»); антитела против β-актина, ATF3 и PTGS2 («Cell Signaling Technology», США); колонки для выделения PHK Quick-RNA MicroPrep («Zymo Research», США); набор для проведения обратной транскрипции ImProm-IITM Reverse Transcription System («Promega», США); набор для выделения ДНК из гелей QIAquick Gel Extraction Kit («Qiagen», США). Если не указано иное, все реактивы были особо чистой квалификации.

Культура клеток. Эндотелиальные клетки пупочной вены человека (HUVEC) («Cell Applications», США) культивировали до 4-го пассажа при 37 °C в атмосфере 5% CO₂, заменяя ростовую среду («Cell Applications») каждые 48 ч. Затем клетки высевали в 6-луночные планшеты, содержащие среду для роста эндотелиальных клеток при плотности 2×10^4 клеток на лунку, и

выдерживали при 37 °C в атмосфере 5% CO₂, заменяя ростовую среду каждые 48 ч. Через 5-7 дней после посева клетки достигали 80-85%-ной конфлюентности и далее инкубировались в присутствии нормальной (в стандартной среде для культивирования клеток, содержащей 125 мМ Na⁺) или повышенной концентрации Na⁺ в течение 3 ч. С целью увеличения концентрации Na⁺ до 150, 160 и 170 мМ в контрольную ростовую среду вносили дополнительно 25, 35 и 45 мМ NaCl соответственно. Так как добавление NaCl в среду вызывает не только увеличение концентрации Na⁺ и Cl⁻ в среде, но и повышает её осмолярность, в качестве контроля мы также использовали маннитол, который, в отличие от NaCl, является непроникающим в клетку и недиссоциирующим осмолитом. В связи с этим контроль изоосмолярности осуществляли путём внесения в лунки, содержащие ростовую среду, дополнительно 50, 70 и 90 мМ маннитола с последующей инкубацией клеток в течение 3 ч. Для ингибирования Na, K-ATPазы и внутриклеточной увеличения концентрации Na⁺ к клеткам, содержащимся в контрольной среде, добавляли 0,1 мкМ уабаина и инкубировали в течение 3 ч.

Определение внутриклеточного содержания Na⁺, K⁺ и Rb⁺ методом атомно-абсорбционной спектрометрии. После окончания инкубации планшеты помещали в лёд, среду отбрасывали, а клетки промывали трижды 3 мл ледяного раствора 0,1 М MgCl₂. Затем в каждую лунку вносили по 1,5 мл 5%-ной трихлоруксусной кислоты (ТХУ) и инкубировали в течение нескольких часов при 4 °С, после чего содержимое лунок соскребали и переносили под ламинарным воздушным потоком в пробирки типа эппендорф. Полученные образцы центрифугировали в течение 20 мин при 18 000 g, супернатант отбирали в отдельные пробирки под ламинарным потоком воздуха, остатки ТХУ аспирировали вакуумным насосом, после чего осадок растворяли в 0,1 М NaOH при 65 °C в течение 1 ч и определяли в нём концентрацию белка методом Лоури [13].

Содержание Na⁺ и K⁺ в экстрактах ТХУ измеряли методом пламенной атомно-абсорбционной спектрометрии на спектрометре «Квант-2м1» («Кортек», Россия) в пропано-воздушной смеси при длине волны 589 нм и 766,5 нм соответственно. Для калибровки использовали растворы KCl (0,5–4 мг/литр K⁺) и NaCl (0,05–2 мг/литр Na⁺), содержащие 5% ТХУ. Содержание Rb⁺ определяли тем же методом при длине волны 780 нм, используя в качестве калибровки раствор RbCl (0,2–4 мг/литр Rb⁺), содержащий 5% ТХУ.

В части экспериментов мы оценивали внутриклеточный вход Rb⁺, который является аналогом К⁺. В отличие от К⁺, внутриклеточная концентрация [Rb⁺], крайне низка, в связи с этим зафиксировать незначительные изменения его входа в клетку легче. Кроме того, основная часть транспорта Rb⁺ обеспечивается Na.K-АТРазой (которая связывает К⁺ и активируется им так же, как и ионами Rb^+), а дополнительный транспорт производится Na,K,2Cl-котранспортёром и К-каналами [14]. Таким образом, вход Rb⁺ по большей мере отражает активность Na, K-AT Paзы. Клетки эндотелия пупочной вены человека инкубировали при условиях, указанных выше, после чего вносили в каждую лунку 2,5 мМ RbCl и инкубировали в течение 10 мин, поскольку область линейной зависимости входа Rb⁺ внутрь клетки от времени составляет ~10 мин [14]. После окончания инкубации планшеты помещали в лёд, среду отбрасывали, а клетки промывали трижды 3 мл ледяного раствора 0,1 M MgCl₂, и далее проводили подготовку проб вышеописанным способом. Содержание Na_i^+ , K_i^+ и Rb_i^+ в каждой лунке нормировали на количество белка в той же лунке.

Измерение клеточного объема HUVEC проводили с помощью метода DISUR (Double Image Surface Reconstruction Technique), используя прикреплённые клетки, которые предварительно инкубировали в течение 1 ч в гиперосмотических средах, содержащих 180 мМ Na⁺ или 125 мМ Na⁺ в присутствии 110 мМ маннитола. В качестве контрольных образцов использовали клетки, инкубированные в течение 1 ч в среде, содержащей 125 мМ Na⁺. Метод DISUR предполагает трёхмерную реконструкцию формы клеток на основе двух обычных микроскопических изображений клеток, полученных в двух перпендикулярных направлениях [15]. Изображения клеток с бокового и верхнего ракурсов получали с помощью двух независимых миниатюрных камер Moticam 350 с зарядовой связью («Motic Instruments Inc.», Канада) с программным обеспечением Motic с интервалом 10-60 с, чтобы тщательно отслеживать быстрые изменения объёма. Изображения служили для создания набора топографических кривых поверхности клетки из оцифрованного профиля бокового вида и контура основания. Объём клетки рассчитывали по реконструированной топографической модели клетки с помощью программы MATLAB («Math Works, Inc.», США).

Оценка флуктуаций и определение эквивалентной константы упругости мембран клеток эндотелия с использованием лазерного интерференционного микроскопа. Исследование проводилось с

помощью автоматизированного интерференционного микроскопа МИА-Д, сконструированного на основе интерферометра Линника МИИ-4 («ЛОМО», Россия) во Всероссийском научно-исследовательском институте оптикофизических измерений. Данная методика позволяет получить фазовое изображение (ФИ) объекта (можно количественно оценить значение фазы или пропорциональное значение – разность оптических путей в каждой точке ФИ). Среднеквадратичная амплитуда колебаний толщины клеточной мембраны, *s*_t, используется для оценки величины колебаний мембраны живой клетки. Процедура измерения подробно описана в работе Yusipovich et al. [16]. Вкратце процедура измерений выглядит следующим образом: (а) запись серии ФИ (512 изображений с частотой 25 Гц); (б) расчёт z-проекции серии ФИ, представляющей собой проекцию сложенных изображений вдоль оси, перпендикулярной плоскости изображения, и содержащей среднеквадратичное значение амплитуды колебаний временной разности оптических путей (ОРХ) каждого пикселя проекции; (в) вычисление среднего значения среднеквадратичного колебания амплитуды временного колебания ОРХ для всей z-проекции клетки (без значений от границы клетки); (г) вычисление среднего значения среднеквадратичного колебания амплитуды временного колебания ОРХ s_{cell} только для клетки без шума; (д) вычисление значения *s*_t [17]:

$$s_{\rm t} = s_{\rm cell}/(n-n_0),$$

где n — показатель преломления клетки (1,404); n_0 — показатель преломления среды (1,335) [18]. Затем значение среднеквадратичной амплитуды колебаний клеточной мембраны, s_t , использовали для расчёта константы упругости мембран, k_e , по формуле [19]:

$$k_{\rm e} = k_{\rm B} T/s_{\rm t}^2,$$

где $k_{\rm B}$ — константа Больцмана, T — температура (в Кельвинах). Вертикальное разрешение было равно 1,9 нм; горизонтальное разрешение составляло ~0,5 мкм; повторяемость результатов измерений составляла менее 0,1 нм. По окончании инкубации клеток в гиперосмотических условиях (см. выше) измерения проводили при 37 °C, помещая покровное стекло с прикреплёнными клетками на зеркальную поверхность (клетки к зеркалу).

Анализ транскрипции генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени. По окончании эксперимента планшеты пе-

БИОХИМИЯ том 87 вып. 5 2022

реносили на лёд, клетки HUVEC (10×10^4 клеток) промывали 2 мл ледяного раствора Хэнкса без солей Ca²⁺ и Mg²⁺, фенолового красного и добавляли 400 мкл реагента Trizol для выделения тотальной РНК. После выделения водной фазы, содержащей нуклеиновые кислоты, с помощью хлороформа и обработки 96%-ным этанолом дальнейшие этапы выделения РНК и обработки ДНКазой осуществляли на колонках Quick-RNA MicroPrep microkit. Для реакции обратной транскрипции использовали набор ImProm-IITM Reverse Transcription System в соответствии с инструкциями производителя. ПЦР в реальном времени проводили с помощью Bio-Rad Real-Time PCR System («Bio-Rad», CША). Праймеры («Синтол», Россия, таблица) добавляли до конечной концентрации 160 нМ.

Режимы амплификации: 95 °С – 5 мин; 95 °C − 10 с, 58 °C − 17 с, 72 °C − 20 с, 40 циклов; кривая плавления – от 72 до 95 °C, приращение 0,5 °C − 5 с. Подбор праймеров осуществляли с помощью программы Beacon Designer 7, а также с использованием поисковых баз данных NCBI и BLAT. Уровень экспрессии каждого интересующего гена рассчитывали по эталонному гену ГАФД (глицеральдегид-3фосфатдегидрогеназа) и выражали в виде $\Delta C_t = C_t$ (тестируемый ген) — C_t (ГАФД) [20]. Экспрессию гена в контрольных образцах принимали за 100%. Для проверки продуктов ПЦР их секвенировали. Электрофорез проводили в 2%-ном агарозном геле с использованием буфера ТВЕ (890 мМ Tris-(гидроксиметил) аминометан, 890 мМ борная кислота, 20 мМ ЭДТА, pH 8,3) в присутствии бромистого этидия в течение ~1 ч при напряжении 75 мВ. Продукты ПЦР извлекали из геля с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit в соответствии с протоколом производителя. Секвенирование ДНК проводилось компанией «Геном», Россия. Последовательности были выровнены с помощью программы BLAST. Все последовательности ДНК соответствовали заявленным.

Оценка экспрессии ATF3, PTGS2 и NFAT5 методом Вестерн-блоттинга. После окончания инкубации клетки трижды промывали 2 мл ледяного фосфатно-солевого буфера. Затем в лунку вносили 200 мкл буфера RIPA, содержащего 0.2 мМ фенилметилсульфонилфторида 5 мкМ тиорфана, а также коктейль ингибиторов протеаз. Полученную суспензию переносили в пробирку типа эппендорф и подвергали её обработке ультразвуковом («Marshall Scientific», США) для разрушения геномной ДНК. В полученных образцах измеряли концентрацию белка методом Лоури [13]. Разделение белков проводили методом электрофореза в ПААГ в денату-

ФЕДОРОВ и др.

Символьное обозначение гена	Название продукта гена	Последовательность олигонуклеотида	Длина ПЦР-продукта, п.н.
FOS	транскрипционный фактор семейства АР-1	For: 5'-GCAAGGTGGAACAGTTATCTC3'; Rev: 5'-GCAGACTTCTCATCTTCTAGTTG-3'	154
ATF3	фактор транскрипции 3, зависимый от циклического АМР	For: 5'-GAGGCGACGAGAAAGAAATAAG-3'; Rev: 5'-CCTTCAGTTCAGCATTCACAC-3'	119
PAR2	рецептор, активируемый протеазой 2	For: 5'-CCATCCAAGGAACCAGTAGATC-3'; Rev: 5'-GTGAGGACAGATGCAGAAAAC-3'	136
NOS3	эндотелиальная синтаза оксида азота	For: 5'-GCAACCACATCAAGTATGCC-3'; Rev: 5'-TGTTCCAGATTCGGAAGTCTC-3'	102
PTGS2	простагландин- эндопероксид синтаза 2	For: 5'-GTATGTATGAGTGTGGGATTTGAC-3'; Rev: 5'-CTTGAAGTGGGTAAGTATGTAGTG-3'	156
IL1α	интерлейкин-1α	For: 5'-GAAGAAGACAGTTCCTCCATTG-3'; Rev: 5'-TTCAGAGATACTCAGAGACACAG-3'	120
NFAT5	ядерный фактор активированных Т-клеток 5	For: 5'-GCTTACCACGGACAACAAAG-3'; Rev: 5'-GCCTTGCTGTGTTCTATCTTC-3'	220
GAPDH	глицеральдегидфосфат- дегидрогеназа	For: 5'-CCTGGTATGACAACGAATTTG-3'; Rev: 5'-CAGTGAGGGTCTCTCTCTCC-3'	131

Последовательности используемых в исследовании праймеров

рирующих условиях [21], используя 4%-ный концентрирующий и 10%-ный разделяющий гели. Затем белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США) методом полусухого электропереноса (режим «Standard SD mode» в течение 30 мин) в Tris-глициновом буфере (25 мМ Tris-HCl, 192 мМ глицин, 10% этанола, pH 8,3) на приборе Trans-blot Turbo («Bio-Rad», США). По окончании электропереноса нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,1% (v/v) Tween-20 и 5% сухого молока, в течение 1 ч, после чего проводили инкубацию в солевом Tris-HCl-буфере, TBS (20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,6), содержащем 5% сухого молока и антитела против ATF3 (в разведении 1:500), PTGS2 (в разведении 1:500) или NFAT5 (в разведении 1: 1000), при 4 °С и постоянном перемешивании в течение ночи. Общее количество детектируемых белков нормировали на содержание β-актина. Для этого мембрану инкубировали, как описано выше, используя антитела против β-актина (разведение 1 : 1000). После этого мембраны трижды промывали 15 мл буфера TBS, содержащего 0,1% (v/v) Tween-20, и инкубировали в растворе TBS в присутствии 5% сухого молока и вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (в разведении 1:25 000), в течение 1 ч при постоянном перемешивании и комнатной температуре. Визуализацию комплексов антиген—антитело проводили методом усиленной хемилюминесценции с помощью набора SuperSignal[™] West Femto Maximum Sensitivity Substrate ECL и прибора Endolab ChemiDoc XRSplus («Bio-Rad»). Относительное содержание белка оценивали путём денситометрии, используя программное обеспечение ImageLab[™] 3.0 («Bio-Rad»).

Статистический анализ данных, полученных с использованием микроскопии, проводили с помощью программного обеспечения Graphpad Prism 9.0 («GraphPad Software», США). Для проверки нормальности данных применяли обобщённый тест Д'Агостино—Пирсона (p < 0,05). Остальные статистические процедуры указаны в подписях к рисункам.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Поверхностная жёсткость клеток эндотелия пупочной вены человека зависит от концентрации [Na⁺]_o, а не от осмолярности внеклеточной среды. Поддержание нормального объёма клетки является необходимым условием для её выживания. Изменение этого параметра достигается за счёт регуляции транспорта воды через плазматическую мембрану, что, в свою очередь,



Рис. 1. Изменение объёма клеток эндотелия пупочной вены человека в зависимости от осмолярности внеклеточной среды. Клетки инкубировали в культуральной среде, содержащей 125 мМ Na⁺ (*1*); в культуральной среде, содержащей 180 мМ Na⁺ (*2*); в культуральной среде, содержащей 125 мМ Na⁺ и 110 мМ маннитола (*3*) в течение 1 ч. Исходный объём клеток принят за 100%. Представлены средние значения и стандартное отклонение (SD) четырёх независимых экспериментов

опосредовано изменением активности различных переносчиков [22]. Увеличение или уменьшение осмолярности внеклеточной среды приводит к изменению объёма клеток, что влечёт за собой изменение экспрессии ряда генов. Для создания гиперосмотических условий мы использовали два подхода: в первом случае в культуральную среду добавляли NaCl так, чтобы концентрация [Na⁺]_о была равной 180 мМ, во втором - 110 мМ маннитола поверх 125 мМ [Na⁺]_о для контроля изоосмолярности среды (см. «Материалы и методы»). В обоих случаях происходило одинаковое уменьшение объёма клеток (до 50% от исходного значения), которое достигало максимума через 10 мин после помещения клеток в гиперосмотические условия. По мере увеличения времени инкубации мы регистрировали так называемое регуляторное увеличение объёма (RVI) клеток (рис. 1).

Известно, что для живых клеток характерны локальные колебания мембраны, называемые также динамическими флуктуациями [23]. Амплитуда колебаний определяется свойствами са-

мой клеточной мембраны, она зависит также от осмолярности, бокового поверхностного натяжения, клеточной адгезии [24]. Кроме того, колебания мембран могут быть обусловлены работой ионных насосов и состоянием цитоскелета клетки [25]. Регистрируя колебания мембран, можно оценить эквивалентную константу упругости клеточных мембран, $k_{\rm e}$, которая зависит от модуля упругости, бокового поверхностного натяжения и в меньшей степени от других параметров [19]. Таким образом, получив значения констант упругости клеточных мембран в ответ на исследуемые стимулы, мы можем оценить изменения поверхностной жёсткости клетки. Ранее мы показали, что для изучения этого параметра метод лазерной интерференционной микроскопии также применим, как и метод силовых кривых [26].

Для нормального функционирования эндотелиальных клеток важна их «пластичность» [27]. Исследование влияния повышенной осмолярности внеклеточной среды на константу упругости мембран клеток эндотелия пупочной вены человека показало, что инкубация HUVEC в среде, содержащей 150–170 мМ $[Na^+]_o$, приводит к уменьшению значения k_e . В то же время увеличение осмолярности внеклеточной среды посредством добавления маннитола не оказывало влияния на этот параметр (рис. 2). Таким образом, несмотря на изменение клеточного объёма в результате увеличения ионной силы внеклеточной среды, поверхностная жёсткость эндотелиальных клеток зависела именно от внеклеточной концентра-

ции [Na⁺]_o, а не от осмолярности внеклеточной среды.

Увеличение концентрации [Na⁺]_о активирует Na,K-ATPaзу в клетках эндотелия пупочной вены человека. В предыдущих работах было показано, что диссипация градиента Na⁺_i/K⁺_i за счёт ингибирования Na,K-ATPaзы приводит к транскриптомным изменениям в различных типах клеток [11, 12]. Логично предположить, что в ответ на увеличение [Na⁺]_о происходит усиление входа этого иона внутрь клетки и увеличе-



Рис. 2. Влияние осмолярности внеклеточной среды на значение эквивалентной константы упругости клеточных мембран клеток эндотелия пупочной вены человека. Данные представлены в виде экспериментальных значений (точки) и медианы с межквартильным размахом (черные линии). Значимые различия были рассчитаны с помощью теста Краскела–Уоллиса, p < 0.05. * p < 0.05 по сравнению с контрольными клетками, инкубированными в течение 3 ч



Рис. 3. Зависимость содержания ионов Na⁺_i (*a*), K⁺_i (*b*), Rb⁺_i (*b*) в клетках эндотелия пупочной вены человека от концентрации Na⁺ во внеклеточной среде. Клетки инкубировали в среде, содержащей 150, 160 и 170 мM Na⁺, в течение 3 ч. Значимые различия были рассчитаны с помощью теста Краскела–Уоллиса, p < 0.05. * p = 0.0192; ** p = 0.0017; *** p = 0.0003 по сравнению с контрольными образцами

ние внутриклеточного соотношения Na_i^+/K_i^+ . настоящей работе исследовано влия-B ние [Na⁺]_о в концентрации 150–170 мМ в течение 3 ч на содержание одновалентных катионов в клетках эндотелия пупочной вены человека (рис. 3). При выдерживании клеток в среде с концентрацией натрия в диапазоне 150–160 мМ мы не обнаружили статистически достоверного изменения содержания этого иона в клетках. Однако инкубация клеток в присутствии 170 мМ Na⁺ приводила к увеличению внутриклеточного содержания натрия примерно на 20% (рис. 3, а). В то же время внутриклеточное содержание К⁺ в условиях наших экспериментов практически не изменялось (рис. 3, б). Поскольку содержание этого иона в клетке велико, то небольшие изменения этого параметра сложно детектировать. Поэтому мы оценили вход Rb⁺ в клетки, так как Rb⁺ является аналогом К⁺, и его используют для изучения транспорта К⁺ [14]. Инкубация HUVEC в присутствии 150, 160 и 170 мМ [Na⁺]_о сопровождалась достоверным усилением входа Rb⁺ в клетки на 35, 39 и 27% соответственно (рис. 3, в). В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что при увеличении внеклеточной концентрации [Na⁺]_о происходит его усиленный транспорт внутрь клетки с последующей активацией Na,K-АТРазы, что согласуется с нашими предыдущими наблюдениями [26].

В качестве контроля осмолярности внеклеточной среды мы использовали непроникающий осмолит маннитол. Однако мы не обнаружили никаких изменений во внутриклеточном содержании и транспорте одновалентных катионов в присутствии дополнительно добавленного маннитола до концентрации 30—90 мМ (данные не представлены). Таким образом, можно заключить, что увеличение внеклеточной концентрации [Na⁺]_o (но не осмолярности) оказывает влияние на транспорт Na⁺ и K⁺ через плазматическую мембрану и сопровождается активацией Na,K-ATPaзы.

Гиперосмотическая стимуляция клеток эндотелия пупочной вены человека в течение 3 ч изменяет количество мРНК некоторых Na_i⁺/K_i⁺чувствительных генов и не оказывает влияния на экспрессию NFAT5. Задачей данного исследования было изучение эффекта диссипации градиента Na⁺_i/K⁺_i на транскрипцию некоторых генов в клетках эндотелия в ответ на гиперосмотическую стимуляцию. Ранее мы показали, что количество мРНК генов раннего ответа (EGR1, FOS, ATF3, ZFP36, JUN) в клетках эндотелия, инкубируемых в гиперосмотических условиях, возрастает за счёт увеличения [Na⁺]_i, а не уменьшения клеточного объёма [28]. В этой работе мы изучили, как инкубация клеток в присутствии [Na⁺]_о в концентрации 150–170 мМ в течение 3 ч влияет на транскрипцию генов FOS, ATF3, *PAR2*, NOS3, PTGS2 и IL1 α . В качестве контроля влияния осмолярности внеклеточной среды на транскрипцию этих генов использовали 50-90 мМ маннитол, который добавляли в среду инкубации. Положительным контролем служили клетки, инкубированные в присутствии 0,1 мкМ уабаина в течение 3 ч. Такое воздействие приводит к ингибированию Na.K-АТРазы и увеличению внутриклеточного соотношения Na_i^+/K_i^+ [28].

В условиях наших экспериментов уабаин увеличивал количество мРНК FOS в 4 раза, а ATF3, PTGS2 и IL1 α – в 1,5–2 раза, при этом уровень мРНК NOS3 и PAR2 не изменялся (рис. 4). Количество мРНК ATF3 и PAR2 увеличилось в 3 и в 1,5 раза соответственно только в присутствии 170 мМ [Na⁺]₀ (рис. 4, 5, *a*). Количество мРНК PTGS2 возросло примерно в 2 раза в ответ на увеличение $[Na^+]_0$ в диапазоне 160–170 мМ. Ни 150 мМ [Na⁺]_о, ни маннитол не оказывали никакого эффекта на транскрипцию этого гена (рис. 5, e). Количество мРНК *IL1* α уменьшилось примерно в 2 раза как при действии 150-170 мМ [Na⁺]_о, так и в присутствии дополнительно добавленного маннитола в концентрации 50-90 мМ. Увеличение осмолярности внеклеточной среды за счёт добавления NaCl или маннитола в среду инкубации не повлияло на транскрипцию генов FOS и NOS3 (рис. 4). Таким образом, мы можем заключить, что транскрипция *PTGS2* и *ATF3* имеет Na⁺₁-зависимый характер, тогда как транскрипция $IL1\alpha$ зависит от осмолярности внеклеточной среды. Регуляция транскрипции PAR2, по всей видимости, определяется внеклеточной концентрацией Na⁺. В то же время количество белка ATF3 увеличивалось в присутствии 160 и 170 мM Na⁺ (рис. 5, δ), тогда как существенного изменения экспрессии PTGS2 не наблюдалось (рис. 5, ϵ).

Одним из участников сигнального каскада, приводящего к изменению транскрипции генов в клетках, подверженных осмотическому стрессу, является осмопротекторный транскрипционный фактор NFAT5 [9, 29]. Его мишенью, в частности, может являться *PTGS2* [30]. Несмотря на то что мы детектировали увеличение мРНК этого гена в клетках, подверженных действию уабаина и 160–170 мМ [Na⁺]_о, нам не удалось зафиксировать достоверного изменения экспрессии NFAT5 как на уровне мРНК (рис. 6, *a*), так и на уровне содержания белка (рис. 6, *б*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе были исследованы эффекты кратковременного увеличения внеклеточной концентрации [Na⁺]₀ на экспрессию от-



Рис. 4. Влияние осмолярности и уабаина на уровень мРНК генов *FOS*, *PAR2*, *NOS3* и *IL1* α в эндотелиальных клетках пупочной вены человека. Для повышения концентрации Na⁺ до 150, 160 и 170 мМ к контрольной ростовой среде, содержащей 125 мМ Na⁺, добавляли 25, 35 и 45 мМ NaCl соответственно. Изоосмолярность контролировали путём добавления 50, 70 и 90 мМ маннитола в контрольную среду. Для ингибирования Na,K-ATPaзы и увеличения внутриклеточной концентрации Na⁺ в клетки, содержащиеся в контрольной среде, добавляли 0,1 мкМ уабаина. Инкубацию проводили в течение 3 ч. Значимые различия рассчитывали с помощью One-way ANOVA, *p* < 0,05. * *p* < 0,05 по сравнению с контрольными образцами



Рис. 5. Влияние осмолярности и уабаина уровень мРНК гена и количество белка ATF3 (*a* и *b*) и PTGS2 (*в* и *г*) в эндотелиальных клетках пупочной вены человека. Для повышения концентрации Na⁺ до 150, 160 и 170 мМ к контрольной ростовой среде, содержащей 125 мМ Na⁺, добавляли 25, 35 и 45 мМ NaCl соответственно. Изоосмолярность контролировали путём добавления 50, 70 и 90 мМ маннитола в контрольную среду. Для ингибирования Na,K-ATPaзы и увеличения внутриклеточной концентрации Na⁺ в клетки, содержащиеся в контрольной среде, добавляли 0,1 мкМ уабаина. Инкубацию проводили в течение 3 ч. Значимые различия рассчитывали с помощью One-way ANOVA, p < 0,05. * p < 0,05 по сравнению с контрольными образцами

дельных транскрипционных факторов (FOS, ATF3, NFAT5), провоспалительных генов ($IL1\alpha$, PTGS2, PAR2), а также эндотелиальной NO синтазы (NOS3) и эквивалентную константу упругости мембран клеток эндотелия, характеризующую их жёсткость. Роль транскрипционного фактора NFAT5 в регуляции экспрессии генов в клетках, подверженных гиперосмотическому стрессу, хорошо описана в литературе [29]. Однако стоит иметь в виду, что NFAT5-опосредованная регуляция не может рассматриваться как универсальный механизм адаптации клеток к гиперосмотическим условиям. Действительно, сайленсинг NFAT5 в макрофагах мыши не влиял на некоторые гены, транскрипция которых изменялась в условиях повышенной концентрации NaCl [31]. Кроме того, активация NFAT5 может происходить независимо от изменений осмолярности среды, также как и ответ клеток на гиперосмотическую стимуляцию может происходить с участием других факторов, таких как NO, ангиотензин II, фактор некроза опухоли α (TNF- α), трансформирующий фактор роста β (TGF-β) и др. [32].

Мы показали, что гиперосмотическая стимуляция клеток эндотелия пупочной вены человека за счёт добавления во внеклеточную среду дополнительного количества NaCl или маннитола приводит к уменьшению их объёма с последующим его регуляторным увеличением. В то же время мы детектировали увеличение поверхностной жёсткости клеток в основном в ответ на увеличение $[Na^+]_o$, а не маннитола. Таким образом, мы можем заключить, что жёсткость эндотелиальных клеток зависит от концентрации $[Na^+]_0$, а не от осмолярности внеклеточной среды. В пользу этого свидетельствуют также экспериментальные данные, которые показывают, что увеличение концентрации $[K^+]_0$ во внеклеточной среде оказывает противоположный по сравнению с [Na⁺]₀ эффект на поверхностную жёсткость клеток эндотелия аорты быка GM7373 [33].

Инкубация HUVEC в среде, содержащей 150–170 [Na⁺]_o, в течение 3 ч изменяла внутриклеточный ионный состав и сопровождалась усиленным входом Rb⁺ в клетки, т.е. активацией Na,K-ATPaзы, что мы показали и ранее [26]. При действии 160–170 мМ [Na⁺]_о наблюдалась тенденция к накоплению ионов Na⁺ внутри клетки (рис. 3). Вероятно, это связано с увеличением поверхностной жёсткости эндотелиаль-

ных клеток: в таких условиях нарушается целостность гликокаликса, который является своеобразным буфером для ионов Na^+ [8], что приводит к усиленному входу этого иона внутрь клет-



Рис. 6. Влияние осмолярности и уабаина на количество мРНК (*a*) и общее содержание белка (*б*) NFAT5 в эндотелиальных клетках пупочной вены человека. Для повышения концентрации Na⁺ до 150, 160 и 170 мМ к контрольной ростовой среде, содержащей 125 мМ Na⁺, добавляли 25, 35 и 45 мМ NaCl соответственно. Изоосмолярность контролировали путём добавления 50, 70 и 90 мМ маннитола в контрольную среду. Для ингибирования Na,K-ATPaзы и увеличения внутриклеточной концентрации Na⁺ в клетки, содержащиеся в контрольной среде, добавляли 0,1 мкМ уабаина. Инкубацию проводили в течение 3 ч

ки, несмотря на активацию Na,K-ATPaзы. Поскольку увеличение осмолярности внеклеточной среды за счёт маннитола не оказывало влияния на внутриклеточное содержание ионов Na⁺ и K⁺, мы можем заключить, что изменение транспорта одновалентных катионов через плазматическую мембрану зависит, скорее, от концентрации этих ионов во внеклеточной среде, чем от её осмолярности.

Поскольку поддержание градиента Na⁺_i/K⁺_i является критически важным для функционирования клетки животного, логично предположить, что даже незначительное его изменение может затронуть процессы экспрессии генов. Действительно, из шести тестируемых генов (FOS, ATF3, PAR2, NOS3, PTGS2 и IL1 α) четыре оказались чувствительны к увеличению осмолярности внеклеточной среды (ATF3, PAR2, *PTGS2* и *IL1* α). Нашего особого внимания заслуживают гены ATF3 и PTGS2, поскольку уровень их мРНК увеличивался как в ответ на увевнутриклеточного соотношения личение Na⁺_i/K⁺_i при ингибировании Na,K-ATPaзы уабаином, так и в ответ на увеличение осмолярности внеклеточной среды с помощью NaCl, но не маннитола. Эти результаты совпадают с нашими предыдущими наблюдениями того, что регуляция транскрипции упомянутых выше генов опосредована Na_i⁺/K_i⁺-зависимыми механизмами [11, 28]. Любопытным является тот факт, что транскрипция *IL1*α увеличивается при ингибировании Na, K-ATРазы, но уменьшается в ответ на увеличение осмолярности внеклеточной среды. При этом мы не регистрировали изменение экспрессии NFAT5 как на уровне транскрипции, так и на уровне белка. Тогда как в работе Kim et al. [34] показано, что NFAT5 ингибирует транскрипцию $IL1\alpha$ в эпителиальных клетках хрусталика человека. Не исключено, что в условиях наших экспериментов происходила транслокация NFAT5 в ядро, но мы не изучали этот аспект в данной работе. Можно предположить, что именно изменение жёсткости эндотелиальной клетки и активация механочувствительных сигнальных путей опосредует изменение транскрипции исследуемых генов [35]. Однако ранее мы показали, что увеличение [Na⁺]₀ от 125 до 140 мМ влияет на транскрипцию генов, но не оказывает никакого эффекта на поверхностную жёсткость эндотелиальных клеток [26]. В литературе описаны данные о том, что представленность NFAT5 в клетках почечного эпителия увеличивается под действием механочувствительной нерецепторной тирозинкиназы FAK (Focal adhesion kinase) в ответ на осмотический стресс [36]. Однако мы не детектировали достоверное увеличение NFAT5 экспрессии как в присутствии 150-170 мМ [Na⁺]₀, так и в присутствии дополнительного 50-90 мМ маннитола, несмотря на то что жёсткость клеток увеличивалась в присутствии 150–170 мМ [Na⁺]₀.

Все эти данные демонстрируют, что увеличение $[Na^+]_o$ (и, как следствие, дисбаланс Na^+_i/K^+_i) само по себе, а не только увеличение осмолярности внеклеточной среды и/или изменение поверхностной жёсткости клетки может независимо регулировать экспрессию некоторых генов в эндотелиальных клетках.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-75-10009).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wenzel, U. O., Bode, M., Kurts, C., and Ehmke, H. (2019) Salt, inflammation, IL-17 and hypertension, *Br. J. Pharmacol.*, **176**, 1853-1863, doi: 10.1111/bph. 14359.
- Aramburu, J., and López-Rodríguez, C. (2019) Regulation of inflammatory functions of macrophages and T lymphocytes by NFAT5, *Front.Immunol.*, **10**, 535, doi: 10.3389/ fimmu.2019.00535.
- Zimmer, M. A., Zink, A. K., Weißer, C. W., Vogt, U., Michelsen, A., et al. (2020) Hypernatremia – a manifestation of COVID-19: A case series, *A A Pract.*, 14, e01295, doi: 10.1213/XAA.00000000001295.
- Hawkins, R. C. (2003) Age and gender as risk factors for hyponatremia and hypernatremia, *Clin. Chim. Acta*, 337, 169-172, doi: 10.1016/j.cccn.2003.08.001.

- Staiger, R. D., Sarnthein, J., Wiesli, P., Schmid, C., and Bernays, R. L. (2013) Prognostic factors for impaired plasma sodium homeostasis after transsphenoidal surgery, *Br. J. Neurosurg.*, 27, 63-68, doi: 10.3109/02688697.2012. 714013.
- Minegishi, S., Luft, F.C., Titze, J., and Kitada, K. (2020) Sodium handling and interaction in numerous organs, *Am. J. Hypertens.*, 33, 687-694, doi: 10.1093/ajh/ hpaa049.
- Olde Engberink, R. H. G., Rorije, N. M. G., van den Born, B.-J. H., and Vogt, L. (2017) Quantification of nonosmotic sodium storage capacity following acute hypertonic saline infusion in healthy individuals, *Kidney Int.*, 91, 738-745, doi: 10.1016/j.kint.2016.12.004.

- Oberleithner, H., and Wilhelmi, M. (2015) Vascular glycocalyx sodium store – determinant of salt sensitivity? *Blood Purif.*, **39**, 7-10, doi: 10.1159/000368922.
- Burg, M. B., Ferraris, J. D., and Dmitrieva, N. I. (2007) Cellular response to hyperosmotic stresses, *Physiol. Rev.*, 87, 1441-1474, doi: 10.1152/physrev.00056.2006.
- Choi, S. Y., Lee-Kwon, W., and Kwon, H. M. (2020) The evolving role of TonEBP as an immunometabolic stress protein, *Nat. Rev. Nephrol.*, 16, 352-364, doi: 10.1038/s41581-020-0261-1.
- Koltsova, S. V., Trushina, Y., Haloui, M., Akimova, O.A., Tremblay, J., et al. (2012) Ubiquitous [Na⁺]_i/[K⁺]_i-sensitive transcriptome in mammalian cells: Evidence for Ca²⁺_i-independent excitation-transcription coupling, *PLoS One*, 7, e38032, doi: 10.1371/journal.pone. 0038032.
- Klimanova, E. A., Sidorenko, S. V., Smolyaninova, L. V., Kapilevich, L. V., Gusakova, S. V., et al. (2019) *Current Topics in Membranes*, Academic Press.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, doi: 10.1016/0304-3894(92)87011-4.
- Vereninov, A., Rubashkin, A., Goryachaya, T., Moshkov, A., Rozanov, Y., et al. (2008) Pump and channel K⁺ (Rb⁺) fluxes in apoptosis of human lymphoid cell line U937, *CPB*, 22, 187-194, doi: 10.1159/000149796.
- Ponomarchuk, O. O., Boudreault, F., Shiyan, A. A., Maksimov, G. V., Grygorczyk, R., et al. (2018) A method to simultaneously detect changes in intracellular Ca²⁺ concentration and cell volume, *Biophysics*, 63, 369-374, doi: 10.1134/S000635091803020X.
- Yusipovich, A. I., Parshina, E. Yu., Baizhumanov, A. A., Pirutin, S. K., Ivanov, A. D., et al. (2021) Use of a laser interference microscope for estimating fluctuations and the equivalent elastic constant of cell membranes, *Instr. Exp. Tech.*, 64, 877-885, doi: 10.1134/S0020441221060129.
- Rappaz, B., Barbul, A., Hoffmann, A., Boss, D., Korenstein, R., et al. (2009) Spatial analysis of erythrocyte membrane fluctuations by digital holographic microscopy, *Blood Cells Mol. Dis.*, 42, 228-232, doi: 10.1016/j.bcmd. 2009.01.018.
- Yusipovich, A. I., Parshina, E. Yu., Brysgalova, N. Yu., Brazhe, A. R., Brazhe, N. A., et al. (2009) Laser interference microscopy in erythrocyte study, *J. Appl. Phys.*, 105, 102037, doi: 10.1063/1.3116609.
- Popescu, G., Ikeda, T., Goda, K., Best-Popescu, C. A., Laposata, M., et al. (2006) Optical measurement of cell membrane tension, *Phys. Rev. Lett.*, **97**, 218101, doi: 10.1103/PhysRevLett.97.218101.
- Chandra, S., Narang, R., Sreenivas, V., Bhatia, J., Saluja, D., et al. (2014) Association of angiotensin II type 1 receptor (A1166C) gene polymorphism and its increased expression in essential hypertension: A casecontrol study, *PloS one*, 9, e101502, doi: 10.1371/journal. pone.0101502.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.

- 22. Lang, F. (2007) Mechanisms and significance of cell volume regulation, *J. Am. College Nutr.*, **26**, 613S-623S, doi: 10.1080/07315724.2007.10719667.
- Brochard, F., and Lennon, J. F. (1975) Frequency spectrum of the flicker phenomenon in erythrocytes, *J. Phys. France*, 36, 1035-1047, doi: 10.1051/jphys:0197500360110103500.
- 24. Kononenko, V. L. (2009) Flicker in erythrocytes. II. Results of experimental studies, *Biochem. Moscow Suppl.* Ser. A, **3**, 372-387, doi: 10.1134/S1990747809040035.
- 25. Turlier, H., and Betz, T. (2018) Fluctuations in active membranes, ArXiv: 1801.00176.
- Fedorov, D. A., Sidorenko, S. V., Yusipovich, A. I., Parshina, E. Y., Tverskoi, A. M., et al. (2021) Na⁺_i/K⁺_i imbalance contributes to gene expression in endothelial cells exposed to elevated NaCl, *Heliyon*, 7, e08088, doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e08088.
- Lang, F. (2011) Stiff endothelial cell syndrome in vascular inflammation and mineralocorticoid excess, *Hypertension*, 57, 146-147, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110. 164558.
- Shiyan, A. A., Sidorenko, S. V., Fedorov, D., Klimanova, E. A., Smolyaninova, L. V., et al. (2019) Elevation of intracellular Na⁺ contributes to expression of early response genes triggered by endothelial cell shrinkage | cell physiol biochem, *Cell. Physiol. Biochem.*, 53, 638-647.
- Neuhofer, W. (2010) Role of NFAT5 in inflammatory disorders associated with osmotic stress, *Curr. Genomics*, 11, 584-590, doi: 10.2174/138920210793360961.
- Favale, N. O., Casali, C. I., Lepera, L. G., Pescio, L. G., and Fernández-Tome, M. C. (2009) Hypertonic induction of COX2 expression requires TonEBP/NFAT5 in renal epithelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 381, 301-305, doi: 10.1016/j.bbrc.2008.12.189.
- Neubert, P., Weichselbaum, A., Reitinger, C., Schatz, V., Schröder, A., et al. (2019) HIF1A and NFAT5 coordinate Na⁺-boosted antibacterial defense via enhanced autophagy and autolysosomal targeting, *Autophagy*, 15, 1899-1916, doi: 10.1080/15548627.2019.1596483.
- Halterman, J. A., Kwon, H. M., and Wamhoff, B. R. (2011) Tonicity-independent regulation of the osmosensitive transcription factor TonEBP (NFAT5), *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **302**, C1-C8, doi: 10.1152/ajpcell.00327.2011.
- Oberleithner, H., Callies, C., Kusche-Vihrog, K., Schillers, H., Shahin, V., et al. (2009) Potassium softens vascular endothelium and increases nitric oxide release, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 2829-2834, doi: 10.1073/ pnas.0813069106.
- Kim, G.-N., Hah, Y.-S., Seong, H., Yoo, W.-S., Choi, M.-Y., et al. (2021) The role of nuclear factor of activated T cells 5 in hyperosmotic stress-exposed human lens epithelial cells, *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 6296, doi: 10.3390/ijms22126296.
- Chien, S. (2007) Mechanotransduction and endothelial cell homeostasis: the wisdom of the cell, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **292**, H1209-H1224, doi: 10.1152/ ajpheart.01047.2006.
- Neuhofer, W. (2014) Focal adhesion kinase regulates the activity of the osmosensitive transcription factor TonEBP/ NFAT5 under hypertonic conditions, *Front. Physiol.*, 5, 123, doi: 10.3389/fphys.2014.00123.

INCREASED EXTRACELLULAR SODIUM CONCENTRATION AS A FACTOR REGULATING GENE EXPRESSION IN ENDOTHELIUM

D. A. Fedorov, S. V. Sidorenko, A. I. Yusipovich, O. V. Bukach, A. M. Gorbunov, O. D. Lopina, and E. A. Klimanova*

Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; E-mail: klimanova.ea@yandex.ru

There is a positive correlation between high table salt intake and endothelial dysfunction, as well as with the development of many socially significant diseases. Despite the obvious pathophysiological consequences, the early responses of the endothelium to increased NaCl in the extracellular medium remain poorly understood. Consumption of excessive amounts of salt may contribute to pathologies through signals induced by increases in extracellular sodium $[Na^+]_o$, chloride $[Cl^-]_i$ and/or increases in the osmolarity of the extracellular fluids determined by combined increases in $[Na^+]_o$ and $[Cl^-]_i$. In the present study we investigated the effects of a short-term increase in the osmolarity of the extracellular medium on gene transcription and mechanical properties of human umbilical vein endothelial cells. Hyperosmotic stimulation of these cells with NaCl but not mannitol led to the accumulation of Na⁺ ions inside the cells and Na,K-ATPase activation and was accompanied by an increase in cell stiffness. Transcription of *IL1a* decreased only in response to increasing NaCl concentration. At the same time, the amount of *ATF3*, *PTGS2*, and *IL1a* mRNA increased upon Na,K-ATPase inhibition by ouabain. However, under the conditions of our experiments, we did not detect significant changes in the expression of the osmoprotective transcription factor NFAT5. The data obtained allow us to conclude that an increase in $[Na^+]_o$ can regulate gene expression in endothelial cells independently of the extracellular medium and/or an increase in cell stiffness.

Keywords: sodium, potassium, Na,K-ATPase, endothelium, transcription regulation