

УДК 576.32/.36

## УЧАСТИЕ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛКИНАЗ В ДЕЙСТВИИ ОКИСЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА И ПРЕПАРАТА ГЛУТОКСИМ НА ТРАНСПОРТ $\text{Na}^+$ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ

© 2009 г. З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, А. В. Мельницкая,  
В. Г. Антонов, академик А. Д. Ноздрачёв

Поступило 13.02.2009 г.

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. Транспорт  $\text{Na}^+$  в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, работа которой обеспечивает создание и поддержание электролитического и водного гомеостаза. Различные белковые компоненты этой системы могут являться мишенью для окислительного стресса. Ранее нами было показано, что транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки модулируется различными окисляющими агентами [1]. Впервые обнаружено, что окисленный глутатион (GSSG) и его фармакологический аналог препарат глутоксим® (“ФАРМА-ВАМ”, Москва), приложенные к базолатеральной поверхности кожи лягушки, имитируют действие инсулина и стимулируют трансэпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$ . Кроме того, с использованием ингибитора тирозинкиназ генистейна нами впервые выявлено участие тирозинкиназ в стимулирующем действии GSSG и глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки [2].

Известно, что влияние инсулина на транспорт  $\text{Na}^+$  инициируется связыванием гормона с рецептором с собственной тирозинкиназной активностью, локализованным в базолатеральной мембране эпителиальных клеток [3]. Ранее нами было показано, что действие инсулина на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки зависит от активности тирозинкиназ и тирозинфосфатаз и осуществляется при участии фосфатидилинозитолкиназ (ФИ-киназ) и протеинкиназы C [3]. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать возможную роль ФИ-киназ в регуляции GSSG и глутоксимом транспорта  $\text{Na}^+$  в коже лягушки *Rana temporaria* с использованием двух структурно различных ингибиторов фосфатидилинозитол-3-ки-

наз (ФИ-3-киназ) и фосфатидилинозитол-4-киназ (ФИ-4-киназ) вертманнина и LY 294002 [4].

Для регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ) кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала [5]. Из ВАХ определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания  $I_{SC}$  ( $I_{SC} = I_T$  при  $V_T = 0$ , где  $I_T$  – трансэпителиальный ток), потенциал открытой цепи  $V_{OC}$  ( $V_{OC} = V_T$  при  $I_T = 0$ , где  $V_T$  – трансэпителиальный потенциал) и трансэпителиальную проводимость  $g_T$ . Транспорт  $\text{Na}^+$  оценивали как амилоридчувствительный  $I_{SC}$  [5]. На рисунках приведены результаты типичных

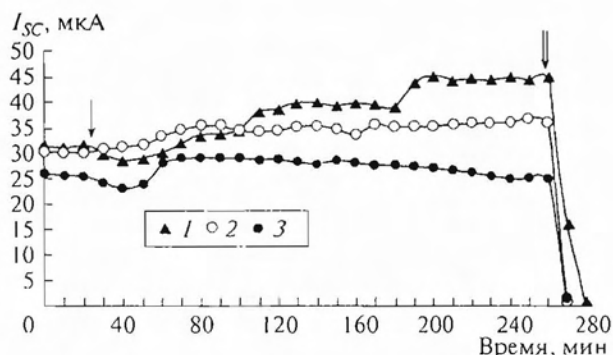


Рис. 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания ( $I_{SC}$ ) после добавления 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности интактной и обработанной блокаторами фосфатидилинозитолкиназ кожи лягушки и последующего приложения блокатора эпителиальных  $\text{Na}^+$ -каналов (ENaC) амилорида. 1 – изменения  $I_{SC}$  после добавления глутоксима к интактной коже; 2 – изменения  $I_{SC}$  после добавления глутоксима к коже, предварительно обработанной в течение 30 мин со стороны апикальной поверхности 200 нМ LY 294002; 3 – изменения  $I_{SC}$  после добавления глутоксима к коже, предварительно обработанной в течение 30 мин со стороны базолатеральной поверхности 1 мкМ вертманнином. Одинарная стрелка соответствует моменту введения в раствор глутоксима; двойная стрелка – моменту введения в раствор со стороны апикальной поверхности кожи 20 мкМ амилорида.

Санкт-Петербургский государственный университет

экспериментов с использованием глутоксима (100 мкг/мл). Аналогичные данные были получены для GSSG (100 мкг/мл).

Показано, что добавление 100 мкг/мл GSSG или 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности интактной кожи лягушки вызывает увеличение транспорта  $\text{Na}^+$ . В среднем (по результатам 10 экспериментов)  $I_{SC}$  возрастает на  $40.37 \pm 11.24$  ( $P < 0.05$ ) и  $20.31 \pm 1.04\%$  ( $P < 0.01$ ), а  $V_{OC}$  на  $48.05 \pm 10.34$  ( $P < 0.05$ ) и  $19.64 \pm 1.13\%$  ( $P < 0.01$ ) для GSSG и глутоксима соответственно. Величина  $g_T$  при этом не меняется. Ранее нами было показано, что влияние блокаторов ФИ-киназ на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки зависит от концентрации и приложения агентов со стороны апикальной или базолатеральной поверхностей кожи [6]. В связи с этим были проведены четыре серии экспериментов для каждого из окисляющих агентов. В первой и третьей серии экспериментов апикальную поверхность кожи лягушки предварительно инкубировали в течение 30 мин с вертманнином (500 нМ и 1 мкМ для первой серии) или соединением LY 294002 (100 нМ и 200 нМ для третьей серии). Во второй и четвертой сериях вертманнин и LY 294002 в аналогичных концентрациях добавляли со стороны базолатеральной поверхности кожи. После этого в каждой серии экспериментов 100 мкг/мл GSSG или 100 мкг/мл глутоксима вводили со стороны базолатеральной поверхности кожи лягушки.

Обнаружено, что предварительная инкубация кожи лягушки с вертманнином или LY 294002 существенно снижает стимулирующее действие глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  (рис. 1). Так, в первой серии экспериментов увеличение электрических характеристик кожи лягушки после добавления глутоксима к коже, предварительно обработанной вертманнином в различных концентрациях, составило:  $I_{SC}$  увеличился на  $8.45 \pm 1.29$  ( $P < 0.01$ ) и  $3.36 \pm 0.24\%$  ( $P < 0.01$ ), а  $V_{OC}$  на  $9.34 \pm 2.08$  ( $P < 0.01$ ) и  $4.01 \pm 1.23\%$  ( $P < 0.01$ ) для 500 нМ и 1 мкМ вертманнина соответственно. В третьей серии экспериментов увеличение  $I_{SC}$  составило  $13.84 \pm 3.48$  ( $P < 0.01$ ) и  $11.42 \pm 4.04\%$  ( $P < 0.01$ ), а  $V_{OC}$  —  $15.01 \pm 3.43$  ( $P < 0.01$ ) и  $12.34 \pm 4.32\%$  ( $P < 0.01$ ) для 100 и 200 нМ LY 294002 соответственно. Во второй серии экспериментов  $I_{SC}$  увеличился на  $10.45 \pm 2.48$  ( $P < 0.01$ ) и  $6.33 \pm 2.24\%$  ( $P < 0.01$ ), а  $V_{OC}$  на  $11.31 \pm 3.33$  ( $P < 0.01$ ) и  $7.12 \pm 2.28\%$  ( $P < 0.01$ ) для 500 нМ и 1 мкМ вертманнина соответственно. В четвертой серии экспериментов  $I_{SC}$  увеличился на  $22.73 \pm 9.48$  ( $P < 0.01$ ) и  $19.39 \pm 8.01\%$  ( $P < 0.01$ ), а  $V_{OC}$  на  $26.51 \pm 9.14$  ( $P < 0.01$ ) и  $21.34 \pm 9.21\%$  ( $P < 0.01$ ) для 100 и 200 нМ LY 294002 соответственно. Во всех экспериментах величина  $g_T$  не менялась. Сходные результаты были получены при приложении к коже лягушки, предварительно обработанной ингибиторами ФИ-киназ, 100 мкг/мл GSSG.

Полученные данные свидетельствуют о том, что во всех вариантах экспериментов блокаторы ФИ-киназ оказывают дозозависимое влияние на эффект GSSG и глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. Так, предварительная инкубация кожи с низкими концентрациями блокаторов ФИ-киназ приводит к значительно меньшему (по сравнению с действием более высоких доз) подавлению стимулирующего действия глутоксима или GSSG на транспорт  $\text{Na}^+$ . Известно, что вертманнин и LY 294002 являются высокоэффективными блокаторами ФИ-киназ. Низкие концентрации этих агентов необратимо ингибируют все известные типы ФИ-3-киназ, тогда как в более высоких (субмикромольных) концентрациях вертманнин и LY 294002 ингибируют и ФИ-4-киназы [7]. Таким образом, результаты наших экспериментов свидетельствуют об участии ФИ-киназ в регуляторном действии GSSG и глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. Однако то, что оба блокатора действуют менее эффективно в малых концентрациях, которые специфически ингибируют ФИ-3-киназы, позволяет предположить, что ФИ-4-киназы в большей степени, чем ФИ-3-киназы, вовлечены в этот процесс, или же активация ФИ-4-киназ является более ранним этапом в реализации стимулирующего действия GSSG и глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки *R. temporaria*. Возможно также, что ФИ-4-киназы могут ослаблять ингибирование ФИ-3-киназы, фосфорилируя фосфатидилинозитол-3-фосфат, остающийся в клетке.

Известно, что различные ключевые  $\text{Na}^+$ -транспортирующие белки, такие как амилоридчувствительные эпителиальные белки  $\text{Na}^+$ -каналов (ENaC) или  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы, содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенью для внутри- и внеклеточных окисляющих и восстанавливающих агентов [8, 9]. Однако введение в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, блокатора ENaC — амилорида (20 мкМ) вызывало полное подавление  $I_{SC}$  (рис. 1), что свидетельствует о том, что влияние GSSG и глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  связано преимущественно с модуляцией активности ENaC.

Таким образом, нами впервые показано участие ФИ-киназ в стимулирующем действии GSSG и глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки *R. temporaria*. На основании результатов настоящей работы и ранних работ [1, 2] можно предположить, что GSSG и глутоксим могут взаимодействовать с богатыми цистеином доменами рецептора инсулина в базолатеральной мембране эпителиальных клеток, вызывать его трансактивацию и запускать сигнальный каскад, включающий тирозинкиназы и ФИ-киназы. Это приводит к стимуляции ENaC и увеличению транспорта  $\text{Na}^+$  в коже лягушки.

