ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК, 2009, том 427, № 3, с. 417–419

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 576.32/.36

УЧАСТИЕ ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛКИНАЗ В ДЕЙСТВИИ ОКИСЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА И ПРЕПАРАТА ГЛУТОКСИМ НА ТРАНСПОРТ 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 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 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 Na^+. Кроме того, с использованием ингибитора тирозинкиназ генистейна нами впервые выявлено участие тирозинкиназ в стимулирующем действии GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки [2].

Известно, что влияние инсулина на транспорт 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 Na^+ в коже лягушки зависит от активности тирозинкиназ и тирозинфосфатаз и осуществляется при участии фосфатидилинозитолкиназ (ФИ-киназ) и протеинкиназы С [3]. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать возможную роль ФИ-киназ в регуляции GSSG и глутоксимом транспорта Na^+ в коже лягушки Rana temporaria с использованием двух структурно различных ингибиторов фосфатидилинозитол-3-киназ (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 Na^+ оценивали как амилоридчувствительный I_{SC} [5]. На рисунках приведены результаты типичных

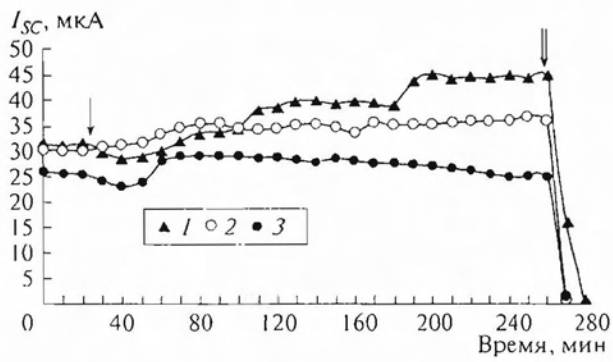

Рис. 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания (I_{SC}) после добавления 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности интактной и обработанной блокаторами фосфатидилинозитолкиназ коже лягушки и последующего приложения блокатора эпителиальных Na^+-каналов (ENaC) амилорида. *1* – изменения 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 Na^+. В среднем (по результатам 10 экспериментов) I_{SC} возрастает на 40.37 ± 11.24 ($P < 0.05$) и 20.31 ± 1.04% ($P < 0.01$), а V_{OC} на 48.05 ± 10.34 ($P < 0.05$) и 19.64 ± 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 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 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 ± 1.29 ($P < 0.01$) и 3.36 ± 0.24% ($P < 0.01$), а V_{OC} на 9.34 ± 2.08 ($P < 0.01$) и 4.01 ± 1.23% ($P < 0.01$) для 500 нМ и 1 мкМ вертманнина соответственно. В третьей серии экспериментов увеличение I_{SC} составило 13.84 ± 3.48 ($P < 0.01$) и 11.42 ± 4.04% ($P < 0.01$), а V_{OC} – 15.01 ± ± 3.43 ($P < 0.01$) и 12.34 ± 4.32% ($P < 0.01$) для 100 и 200 нМ LY 294002 соответственно. Во второй серии экспериментов I_{SC} увеличился на 10.45 ± 2.48 ($P < 0.01$) и 6.33 ± 2.24% ($P < 0.01$), а V_{OC} на 11.31 ± 3.33 ($P < 0.01$) и 7.12 ± 2.28% ($P < 0.01$) для 500 нМ и 1 мкМ вертманнина соответственно. В четвертой серии экспериментов I_{SC} увеличился на 22.73 ± 9.48 ($P < 0.01$) и 19.39 ± 8.01% ($P < 0.01$), а V_{OC} на 26.51 ± 9.14 ($P < 0.01$) и 21.34 ± 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 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 Na^+. Известно, что вертманнин и LY 294002 являются высоко эффективными блокаторами ФИ-киназ. Низкие концентрации этих агентов необратимо ингибируют все известные типы ФИ-3-киназ, тогда как в более высоких (субмикромолярных) 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 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 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 Na^+-транспортирующие белки, такие как амилоридчувствительные эпителиальные белки Na^+-каналов (ENaC) или Na^+/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 Na^+ связано преимущественно с модуляцией активности ENaC.

Таким образом, нами впервые показано участие ФИ-киназ в стимулирующем действии GSSG и глутоксима на транспорт 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 Na^+ в коже лягушки.