

УЧАСТИЕ ТИРОЗИНКИНАЗ И ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛКИНАЗ ВО ВЛИЯНИИ ОКИСЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА И ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ

© А. В. Мельницкая, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев,
В. Г. Антонов, С. Н. Бутов

Кафедра биофизики С.-Петербургского государственного университета;
электронный адрес: simelnitsky@hotmail.ru

С использованием метода фиксации потенциала исследовано участие тирозинкиназ и фосфатидилинозитолкиназ во влиянии окисленного глутатиона (GSSG) и его фармакологического аналога препарата глутоксим на транспорт Na^+ в коже лягушки *Rana temporaria*. Впервые показано, что предварительная обработка кожи лягушки ингибитором тирозинкиназ генестейном или двумя структурно различными блокаторами фосфатидилинозитолкиназ вортманнином и LY294002 существенно снижает стимулирующее влияние GSSG или глутоксима на транспорт Na^+ . Полученные данные свидетельствуют о том, что GSSG и глутоксим могут вызывать трансактивацию рецептора инсулина в базолатеральной мембране эпителиальных клеток и запускать сигнальный каскад, включающий в себя тирозинкиназы и фосфатидилинозитолкиназы, что приводит к стимуляции транспорта Na^+ в коже лягушки.

Ключевые слова: транспорт Na^+ , окисленный глутатион, глутоксим, тирозинкиназы, фосфатидилинозитолкиназы

Принятые сокращения: ENaC — амилорид-чувствительные эпителиальные Na^+ -каналы, GSH и GSSG — восстановленный и окисленный глутатион соответственно, ФИ-3-киназы — фосфатидилинозитол-3-киназы, ФИ-4-киназы — фосфатидилинозитол-4-киназы.

Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевой пузырь амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев (Наточин, 1982), что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов транспорта воды и ионов в клетках почки. 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.

Функционирование окислительно-восстановительных (редокс) систем клетки и влияние окислителей и восстановителей на различные клеточные процессы в норме и при патологии давно интересуют исследователей. Накапливающиеся экспериментальные данные свидетельствуют о том, что регуляция редокс-состояния клетки может быть применима при лечении некоторых заболеваний, в том числе СПИДа и некоторых форм рака (Sen, 1998).

Влияние окисляющих и восстанавливающих агентов на транспорт Na^+ показано для ряда эпителиальных тканей. Так, в эпителиальных клетках почки лягушки (клетки А6) пероксид водорода стимулирует транспорт Na^+

(Markadieu et al., 2005), тогда как в эпителиальных клетках карциномы человека (Wang et al., 2000) активные формы кислорода ингибируют транспорт Na^+ .

Известно, что ключевые Na^+ -транспортирующие белки, такие как амилорид-чувствительные эпителиальные Na^+ -каналы (ENaC), Na^+/K^+ -АТФазы и Na^+/H^+ -обменники, являются мишенями для окисляющих и восстанавливающих агентов (Boldyrev, Bulygina, 1997; Firsov et al., 1999), однако молекулярные механизмы влияния окислителей и восстановителей на различные компоненты системы трансэпителиального транспорта Na^+ практически не изучены.

В реабсорбирующих эпителиях ключевую роль в транспорте Na^+ играют ENaC. В экстраклеточных доменах α -, β - и γ -субъединиц ENaC обнаружены высококонсервативные фрагменты, содержащие остатки цистеина, которые играют важную роль в поддержании третичной структуры канала и транслокации ENaC к плазмалемме (Benos, Stanton, 1999; Firsov et al., 1999). Трансмембранные, а также N- и C-терминальные домены субъединиц ENaC содержат остатки цистеина, доступные для действия SH-реактивных соединений со стороны цитозоля (Kellenberger et al., 2005). Многочисленные остатки цистеина, локализованные в различных сегментах ENaC, определяют его редокс-чувствительность и являются мишенью внутри- и внеклеточных окисляющих и восстанавливающих агентов. Экстраклеточные и цитоплазматические домены α - и β -субъединиц рецептора инсулина в базолатеральной мембране эпителиальных клеток тоже

содержат многочисленные остатки цистеина, редокс-модификация которых модулирует аутофосфорилирование рецептора и последующее тирозинное фосфорилирование белковых субстратов (Wilden, Pessin, 1987; Ullrich, Schlessinger, 1990; Garant et al., 1999).

Глутатион (γ -глутамилцистеинилглицин) существует в восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) формах (Sies, 1999) и является универсальным трипептидом, присутствующим в большинстве растений, микроорганизмов и во всех тканях млекопитающих. Глутатионированию подвергается большое число клеточных белков: рецепторов, каналов, ферментов, транскрипционных факторов и онкогенов (Ghezzi, 2005; Biswas et al., 2006). Глутатионирование регулирует активность важнейших сигнальных белков: протеинкиназы C (Ward et al., 2002), протеинкиназы A (Brennan et al., 2006), рецепторных и цитоплазматических тирозинкиназ и тирозинфосфатаз (Staal et al., 1994; Rao et al., 2000), Ras-белков (Mallis et al., 2001), элементов актинового цитоскелета (Wang et al., 2001). GSH выступает в клетках как восстанавливающий агент и как антиоксидант (Hayes, McLellan, 1999), тогда как GSSG способен оказывать рецепторопосредованное влияние на клеточные процессы (Бурова и др., 2005; Василенко и др., 2006).

Глутоксим представляет собой синтезированное биологически активное соединение — динатриевую соль GSSG с нанодобавкой платины. Глутоксим нашел широкое клиническое применение как иммуномодулятор и гемостимулятор в комплексной терапии бактериальных и вирусных заболеваний (Жуков и др., 2004), псориаза (Корсунская и др., 2003), в лучевой и химиотерапии онкологических заболеваний (Филатова и др., 2004). Другой аналог GSSG — препарат NOV-002 (GSSG в сочетании с цисплатиной в соотношении 1000 : 1), являющийся миметиком GSSG, также оказывает рецепторопосредованное действие на клетки, вызывает активацию белков, участвующих в гематопозе (Townsend et al., 2008).

Ранее нами было показано, что транспорт Na^+ в коже лягушки модулируется различными окисляющими агентами, такими как цистамин, цистин, GSSG и его синтетический аналог препарат глутоксим® (ФАРМА-ВАМ, Москва) (Крутецкая и др., 2008). Впервые обнаружено, что GSSG и глутоксим, приложенные к базолатеральной поверхности кожи лягушки, имитируют действие инсулина и стимулируют трансэпителиальный транспорт Na^+ . Однако механизмы влияния GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ остаются неясными.

Известно, что влияние инсулина на транспорт Na^+ инициируется связыванием гормона с рецептором, имеющим собственную тирозинкиназную активность и локализованным в базолатеральной мембране эпителиальных клеток (Cox, Singer, 1977). Ранее нами показано, что влияние инсулина на транспорт Na^+ в коже лягушки зависит от активности тирозинкиназ и тирозинфосфатаз и осуществляется при участии фосфатидилинозитолкиназ (ФИ-киназ) и протеинкиназы C (Мельническая и др., 2006а). Кроме того, данные из литературы свидетельствуют о том, что в клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 GSSG и глутоксим вызывают трансактивацию рецептора эпидермального фактора роста и активацию его собственной тирозинкиназной активности (Бурова и др., 2005; Василенко и др., 2006).

В связи с этим задача настоящей работы заключалась в изучении возможной роли тирозинкиназ и ФИ-киназ в регуляции GSSG и глутоксимом транспорта Na^+ в коже

лягушки *Rana temporaria*. Для этого использовали ингибитор тирозинкиназ генистейн (Akiyama, Ogawara, 1991) и два структурно различных ингибитора фосфатидилинозитол-3-киназ (ФИ-3-киназ) и фосфатидилинозитол-4-киназ (ФИ-4-киназ) вортманнина и LY294002 (Vlahos et al., 1994; Pacold et al., 2000).

Материал и методика

Эксперименты проводили на самцах лягушки *R. temporaria* в период с ноября по март. Кожу с брюшка срезали и навязывали на полую полиэтиленовую трубку с внутренним диаметром 0.8 см. Трубку с кожей помещали в модифицированную камеру Уссинга таким образом, чтобы апикальная поверхность кожи была обращена к наружному раствору. Камеру заполняли раствором Рингера для холоднокровных, содержащим (в мМ): 110 NaCl, 2.5 KCl, 3 CaCl₂ и 5 Tris-HCl, pH 7.4. Опыты проводили при комнатной температуре (22—23 °C).

Для измерения электрических параметров кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрации вольт-амперных характеристик (Крутецкая и др., 2003). Для измерения вольт-амперных характеристик на кожу подавали линейно изменяющееся напряжение (ramp) со скоростью 20 мВ/с. В интервалах между измерениями вольт-амперных характеристик трансэпителиальный потенциал (V_T) кожи поддерживали при 0 мВ (режим короткого замыкания) или при потенциале открытой цепи V_{OC} ($V_{OC} = V_T$ при трансэпителиальном токе $I_T = 0$). Из вольт-амперных характеристик определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания I_{SC} ($I_{SC} = I_T$ при $V_T = 0$), V_{OC} и трансэпителиальную проводимость g_T .

Транспорт Na^+ оценивали как амилорид-чувствительный I_{SC} . В связи с этим традиционно в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ). Известно, что в концентрации 20—100 мкМ амилорид избирательно блокирует ENaC (Bentley, 1968). Вся получаемая в ходе опыта информация регистрировали на ЭВМ с использованием оригинального программного обеспечения.

Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Маточные растворы генистейна (100 мМ), вортманнина (1 мМ) и соединения LY294002 (50 мМ) готовили в диметилсульфоксиде. Маточный раствор амилорида (10 мМ), GSSG (50 мг/мл) и глутоксима (50 мг/мл) готовили на воде. Фармакологические агенты добавляли к апикальной или базолатеральной поверхности кожи. Ингибиторы тирозинкиназ (генистейн) и фосфатидилинозитолкиназ (вортманнин) и соединения LY294002 добавляли за 30—40 мин до введения в раствор окислителей (глутоксима или GSSG).

Статистический анализ проводили с применением t -критерия Стьюдента. Данные представлены в виде $\bar{x} \pm s_x$. На рисунках приведены результаты типичных экспериментов.

Результаты и обсуждение

Влияние GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем, по данным 10 экспериментов, составляют: $I_{SC} = 14.58 \pm$

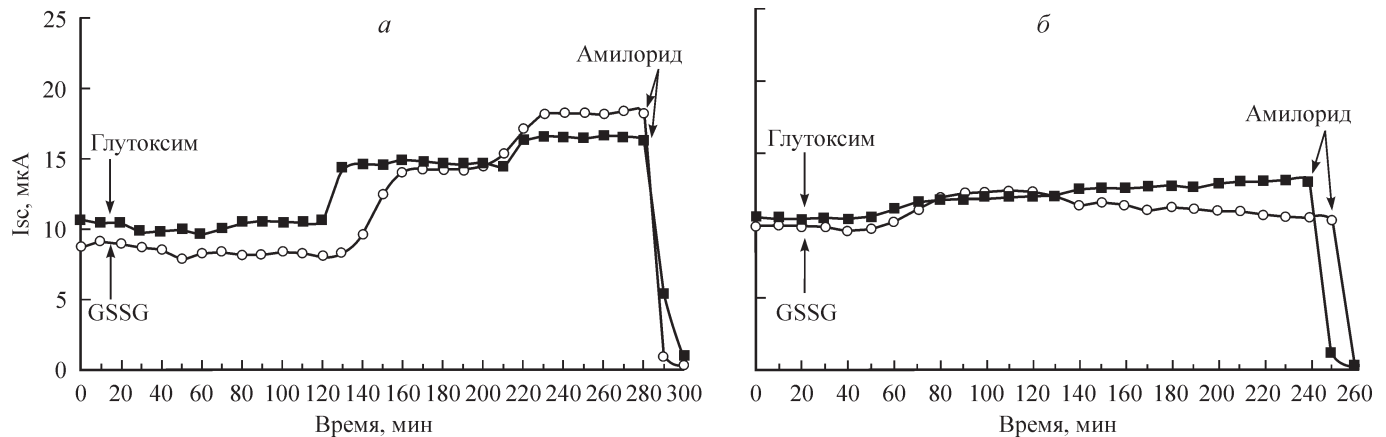


Рис. 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{sc} через кожу лягушки после добавления к базолатеральной поверхности кожи глутоксима (100 мкг/мл) или GSSG (100 мкг/мл) и последующего приложения со стороны апикальной поверхности кожи блокатора эпителиальных Na^+ -каналов амилорида (20 мкМ).

а — I_{sc} после добавления глутоксима или GSSG к интактной коже лягушки, б — I_{sc} после предварительной инкубации в течение 30 мин апикальной поверхности кожи с ингибитором тирозинкиназ генистеином (100 мкМ).

± 0.91 мкА; $V_{oc} = -38.01 \pm 2.74$ мВ; $g_T = 0.36 \pm 0.01$ мСм. Показано, что GSSG или глутоксим (100 мкг/мл), приложенный к базолатеральной поверхности интактной кожи лягушки, подобно инсулину, стимулирует транспорт Na^+ . В среднем (по результатам 10 экспериментов) I_{sc} возрастает на 40.37 ± 11.24 и 30.31 ± 1.04 %, а V_{oc} возрастает на 48.05 ± 10.34 и 29.64 ± 1.13 % для GSSG и глутоксима соответственно (рис. 1, а). Величина g_T при этом не меняется.

Действие GSSG и глутоксима в присутствии ингибитора тирозинкиназ генистеина. Известно, что влияние инсулина на трансэпителиальный транспорт Na^+ связано с активацией рецептора с собственной тирозинкиназной активностью в базолатеральной мембране эпителиальных клеток (Rodriguez-Commes et al., 1994). Специфические ингибиторы тирозинкиназ (генистеин, тирфостин-23 и лавендустин А) вызывают значительное снижение стимулирующего влияния инсулина на транспорт Na^+ в различных эпителиях (Hagiwara et al., 1992; Matsumoto et al., 1993; Rodriguez-Commes et al., 1994; Крутецкая, Лебедев, 1998; Мельницкая и др., 2006б). Для выяснения возможного участия тирозинкиназ во влиянии GSSG или глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки применяли специфический ингибитор тирозинкиназ изофлавоноид генистеин (Akiyama, Ogawara, 1991). Известно, что генистеин конкурирует с АТФ за связывание с тирозинкиназами. При этом генистеин блокирует широкий спектр рецепторных и цитоплазматических тирозинкиназ, что обусловлено, по-видимому, тем, что АТФ-связывающий домен является высоко консервативным у различных тирозинкиназ (Akiyama, Ogawara, 1991).

Показано, что генистеин существенно снижает стимулирующее действие GSSG или глутоксима на транспорт Na^+ (рис. 1, б). Так, после предварительной обработки апикальной поверхности кожи лягушки 100 мкМ генистеина в течение 30 мин перед добавлением окислителей I_{sc} увеличился на 10.05 ± 2.11 и 16.81 ± 3.48 %, а V_{oc} на 11.05 ± 1.25 и 18.25 ± 4.32 % для GSSG и глутоксима (100 мкг/мл) соответственно. Изменения величины g_T не наблюдали. Полученные данные позволяют предположить, что влияние GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки связано с активацией тирозинкиназ.

Выделяют два типа тирозинкиназ — рецепторные и цитоплазматические (Hunter, 1996). Активированные рецепторные тирозинкиназы передают информацию путем фосфорилирования белков и путем белок-белковых взаимодействий с молекулами, содержащими SH2- и SH3-домены (Schlessinger, Ullrich, 1992). Цитоплазматические тирозинкиназы обнаружены как в цитоплазме, так и в клеточном ядре. Многие из них участвуют в процессах внутриклеточной сигнализации. Например, тирозинкиназы семейств Src, Jak и Fak прямо участвуют в процессах трансмембранной передачи сигнала, выступая в качестве каталитических субъединиц мембранных рецепторов, не имеющих собственной тирозинкиназной активности (Hunter, 1996).

Известно, что рецепторные и цитоплазматические тирозинкиназы и тирозинфосфатазы участвуют в регуляции трансэпителиального транспорта Na^+ и активности ENaC (Tilly et al., 1993; Davis et al., 2001). В различных реабсорбирующих эпителиях тирозинкиназы опосредуют регуляторное действие на ENaC инсулина (Hagiwara et al., 1992; Matsumoto et al., 1993; Rodriguez-Commes et al., 1994) и факторов роста (инсулиноподобного и эпидермального) (Davis et al., 2001; Tong, Stockand, 2005). В клетках почки амфибий (клетки А6) тирозинкиназы вовлечены также в увеличение транспорта Na^+ , стимулированное уменьшением осмотического давления раствора, омывающего апикальную поверхность клетки (Niisato et al., 2000). Результаты многих экспериментов свидетельствуют о том, что в клетках А6 тирозинкиназы участвуют преимущественно в регуляции процесса встраивания ENaC в мембрану (Matsumoto et al., 1993; Niisato et al., 2000). Тогда как в клеточных культурах дистальных сегментов нефрона млекопитающих активация эпидермальным фактором роста рецепторных тирозинкиназ вызывает снижение транспорта Na^+ , обусловленное значительным уменьшением вероятности открытого состояния ENaC (Tong, Stockand, 2005). Учитывая то, что генистеин блокирует широкий спектр тирозинкиназ, полученные данные позволяют предположить, что в регуляторном влиянии GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ принимают участие как рецепторные, так и цитоплазматические тирозинкиназы.

Данные, полученные в ряде лабораторий при исследовании влияния на клетки GSSG в концентрациях, близ-

ких или превышающих те, которые определяются вне клеток, показали способность GSSG оказывать рецепторопосредованное влияние на клеточные процессы (Filomeni et al., 2002, 2005; Бурова и др., 2005). Так, на клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 установлено, что GSSG и глутоксим вызывают трансактивацию рецептора эпидермального фактора роста, приводящую к активации его собственной тирозинкиназной активности (Бурова и др., 2005; Василенко и др., 2006). Можно предположить, что в коже лягушки, так же как и в клетках A431, GSSG и глутоксим могут вызывать трансактивацию рецепторных тирозинкиназ, например рецептора инсулина, локализованного в базолатеральных мембранах эпителиальных клеток. По-видимому, мишенью для действия GSSG и глутоксима со стороны базолатеральной поверхности кожи лягушки могут являться богатые цистеином экстраклеточные домены инсулинового рецептора.

Известно, что тирозинкиназы и тирозинфосфатазы принадлежат к наиболее редокс-чувствительным ферментам. Окислительный стресс и уменьшение соотношения GSH/GSSG в клетке приводят к изменению активности тирозинкиназ и тирозинфосфатаз (Rao et al., 2000; Forman, Torres, 2002) и увеличению фосфорилирования белков по тирозину. Кроме того, тирозинфосфатазы могут сами являться мишенями GSSG и глутоксима для ковалентной модификации. Ингибирование тирозинфосфатаз включает в себя окисление консервативного остатка цистеина в каталитическом домене и остатков цистеина в функционально важных SH2-доменах тирозинфосфатаз (Fischer et al., 1991; Walton, Dixon, 1993; Barford et al., 1994; Filomeni et al., 2002). Ингибирование тирозинфосфатаз может приводить к активации тирозинкиназ и увеличению фосфорилирования белков по остаткам тирозина.

С другой стороны, согласно данным литературы, в клетках различных типов активация рецепторных тирозинкиназ приводит к активации процессов фагоцитоза (Wang et al., 2000). Следовательно, можно предположить, что трансактивация рецепторных тирозинкиназ при действии GSSG и глутоксима может стимулировать фагоцитоз и проникновение молекул GSSG и глутоксима внутрь клеток эпителия, что в свою очередь может приводить к модификации активности широкого спектра редокс-чувствительных молекул.

Действие GSSG и глутоксима в присутствии ингибиторов ФИ-киназ. Известно, что аутофосфорилирование инсулинового рецептора вызывает высвобождение участков для связывания белков, содержащих SH2- и SH3-домены, и создает условия для фосфорилирования по остаткам тирозина различных эндогенных субстратов (Cadena, Gill, 1992; Saltiel, 1996). Важнейшим эндогенным субстратом тирозинкиназы инсулинового рецептора является субстрат инсулинового рецептора (IRS). Фосфорилированный IRS связывается с белками, содержащими SH2-домены, такими как ФИ-3-киназы, тирозинфосфатазы и фосфолипаза $\text{C}\gamma$ (Cadena, Gill, 1992). Есть данные о важной роли ФИ-киназ в регуляции инсулином транспорта Na^+ в различных эпителиальных системах (Markadieu et al., 2004), в том числе в эпителии кожи лягушки (Мельницкая и др., 2006а).

Ранее нами показано, что влияние блокаторов ФИ-киназ на транспорт Na^+ в коже лягушки зависит от концентрации агентов и поверхности кожи, к которой они приложены (апикальной или базолатеральной) (Крутецкая

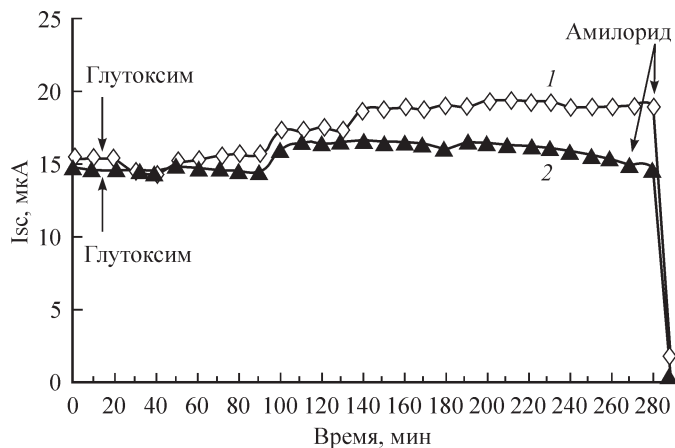


Рис. 2 Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{sc} через кожу лягушки после добавления глутоксима (100 мкг/мл) к базолатеральной поверхности кожи, предварительно обработанной блокаторами фосфатидилинозитолкиназ, и последующего приложения со стороны апикальной поверхности кожи блокатора эпителиальных Na^+ -каналов амилорида (20 мкМ).

1 — I_{sc} после предварительной инкубации апикальной поверхности кожи с соединением LY294002 (200 нМ, 30 мин), 2 — I_{sc} после предварительной инкубации базолатеральной поверхности кожи с вортманнином (1 мкМ, 30 мин).

и др., 2006). В связи с этим для выявления возможного участия ФИ-киназ в регуляции GSSG и глутоксимом транспорта Na^+ в коже лягушки для каждого из окисляющих агентов были проведены серии экспериментов, в которых вортманнин (500 нМ и 1 мкМ) и соединение LY294002 (100 и 200 нМ) предварительно добавляли в раствор, омывающий апикальную или базолатеральную поверхность кожи лягушки, после чего, в каждой серии экспериментов GSSG или глутоксим (100 мкг/мл) вводили со стороны базолатеральной поверхности кожи лягушки.

Обнаружено, что предварительная инкубация в течение 30–40 мин кожи лягушки с вортманнином или соединением LY294002 существенно снижает стимулирующее влияние GSSG или глутоксима на транспорт Na^+ . На рис. 2 представлено влияние 200 нМ LY294002, приложенного со стороны апикальной поверхности кожи, и влияние 1 мкМ вортманнина, добавленного со стороны базолатеральной поверхности кожи, на эффект глутоксима на I_{sc} в коже лягушки. Видно, что в обоих случаях наблюдается значительное уменьшение стимулирующего влияния глутоксима на транспорт Na^+ . В среднем (по данным 10 экспериментов) изменение электрических характеристик кожи лягушки после добавления глутоксима к коже, предварительно обработанной со стороны апикальной поверхности вортманнином в различных концентрациях, было следующим. I_{sc} увеличился на 8.45 ± 1.29 и 3.36 ± 0.24 %, а V_{oc} — на 9.34 ± 2.08 и 4.01 ± 1.23 % для вортманнина в концентрациях 500 нМ и 1 мкМ соответственно. В случае предварительной инкубации апикальной поверхности кожи лягушки с соединением LY294002 увеличение I_{sc} после добавления глутоксима составило 13.84 ± 3.48 и 11.42 ± 4.04 %, а V_{oc} — 15.01 ± 3.43 и 12.34 ± 4.32 % для LY294002 в концентрациях 100 и 200 нМ соответственно.

Введение глутоксима после предварительной обработки базолатеральной поверхности кожи лягушки вортманнином в различных концентрациях вызывало увели-

чение I_{SC} на 10.45 ± 2.48 и 6.33 ± 2.24 %, а V_{OC} — на 11.31 ± 3.33 и 7.12 ± 2.28 % для вортманнина в концентрациях 500 нМ и 1 мкМ соответственно. Изменение электрических характеристик после приложения глутоксима к коже лягушки, предварительно обработанной со стороны базолатеральной поверхности кожи соединением LY294002 в различных концентрациях, было следующим. I_{SC} увеличился на 22.73 ± 9.48 и 19.39 ± 8.01 %, а V_{OC} — на 26.51 ± 9.14 и 21.34 ± 9.21 % для LY294002 в концентрациях 100 и 200 нМ соответственно. Во всех экспериментах величина g_T не менялась. Сходные результаты были получены при приложении к коже лягушки, предварительно обработанной со стороны апикальной или базолатеральной поверхности ингибиторами ФИ-киназ, 100 мкг/мл GSSG.

Полученные данные свидетельствуют о том, что влияние GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки зависит от присутствия блокаторов ФИ-киназ и их дозы. Так, блокаторы ФИ-киназ в низких концентрациях вызывают значительно меньшее (по сравнению с действием более высоких доз) подавление стимулирующего влияния глутоксима или GSSG на транспорт Na^+ . Известно, что вортманнин и LY294002 являются высокоэффективными блокаторами ФИ-киназ. Низкие концентрации этих агентов необратимо ингибируют все известные типы ФИ-3-киназ, тогда как в более высоких (субмикромольных) концентрациях вортманнин и LY294002 ингибируют и ФИ-4-киназы (Vlahos et al., 1994). Таким образом, результаты наших экспериментов свидетельствуют об участии ФИ-киназ в регуляторном влиянии GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. Однако незначительное действие обоих блокаторов при низких концентрациях, при которых специфически ингибируются 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 влияния GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки *Rana temporaria*. Возможно также, что ФИ-4-киназы могут ослаблять ингибирование ФИ-3-киназы, фосфорилируя ФИ-3-фосфат, остающийся в клетке.

Известно, что различные ключевые Na^+ -транспортирующие белки содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенью для внутри- и внеклеточных окисляющих и восстанавливающих агентов (Boldyrev, Bulygina, 1997; Benos, Stanton, 1999; Firsov et al., 1999; Kellenberger et al., 2005). Однако введение в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) вызывает полное подавление I_{SC} (рис. 1, 2), что свидетельствует о том, что влияние GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ связано преимущественно с модуляцией активности ENaC.

Таким образом, нами впервые показано участие тирозинкиназ и ФИ-киназ во влиянии GSSG и глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки *R. temporaria*. На основании результатов настоящей работы и ранних работ (Крутецкая и др., 2008; Melnitskaya et al., 2008) 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 в себя тирозинкиназы и ФИ-киназы. Это приводит к стимуляции ENaC и увеличению транспорта Na^+ в коже лягушки.

Список литературы

- Бурова Е. Б., Василенко К. П., Антонов В. Г., Никольский Н. Н. 2005. Трансактивация рецептора эпидермального фактора роста окисленным глутатионом и его фармакологическим аналогом Глутоксим в клетках A431. Докл. РАН. 404 (1) : 122—124.
- Василенко К. П., Бурова Е. Б., Антонов В. Г., Никольский Н. Н. 2006. Окисленный глутатион вызывает активацию рецептора эпидермального фактора роста и MAP-киназ ERK 1, 2. Цитология. 48 (6) : 500—507.
- Жуков О. Б., Зубарев А. Р., Мезенцева М. В., Андрюшкова Ю. А., Осе И. В. 2004. Современные аспекты иммуномодулирующей терапии у больных с рецидивирующими инфекциями, передаваемыми половым путем, и антибиотикорезистентным бактериальным простатитом. Врачебное сословие. 5—6 : 51—56.
- Корсунская И. М., Резникова М. М., Путинцев А. Ю., Аветикян С. С. 2003. Опыт применения препарата Глутоксим в дерматологии. Лечащий врач. 4 : 78—79.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 1998. Роль тирозинового фосфорилирования в регуляции активности ионных каналов клеточных мембран. СПб.: Айно. 244 с.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Мельницкая А. В. 2003. Роль протеинкиназы С в регуляции трансэпителиального транспорта Na^+ в коже взрослых особей и головастиков лягушки *Rana temporaria*. Цитология. 45 (6) : 590—595.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Мельницкая А. В., Антонов В. Г., Ноздрачев А. Д. 2008. Влияние дисульфидсодержащих соединений на транспорт Na^+ в коже лягушки. Докл. РАН. 421 (5) : 709—712.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Мельницкая А. В., Ноздрачев А. Д. 2006. Роль актинового цитоскелета в регуляции фосфатидилинозитолкиназами транспорта Na^+ в коже лягушки. Докл. РАН. 410 (4) : 568—570.
- Мельницкая А. В., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 2006а. Вортманнин модулирует влияние инсулина на транспорт Na^+ в коже лягушки. Морфология. 129 (2) : 61.
- Мельницкая А. В., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 2006б. Структурно-функциональная организация транспорта Na^+ в эпителиальных системах. I. Эпителиальные Na^+ -каналы. Цитология. 48 (10) : 817—840.
- Наточин Ю. В. 1982. Основы физиологии почки. Л.: Наука. 184 с.
- Филатова Е. И., Былинская Е. Н., Алаберг С. Д. 2004. Применение глутоксима в сопровождении лучевой терапии распространенного рака шейки матки. В кн.: Тезисы III съезда онкологов и радиологов СНГ. Минск. II : 354.
- Akiyama T., Ogawara H. 1991. Use and specificity of genistein as an inhibitor of protein tyrosine kinases. Methods Enzymol. 201 : 362—370.
- Barford D., Flint A. J., Tonks N. K. 1994. Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. Science. 263 : 1397—1404.
- Benos D. J., Stanton B. A. 1999. Functional domains within the degenerin/epithelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels. J. Physiol. 520 : 631—644.
- Bentley P. J. 1968. Amiloride: a potent inhibitor of sodium transport across the toad bladder. J. Physiol. 195 : 317—333.
- Biswas S., Chida A.S., Rahman I. 2006. Redox modifications of protein-thiols: emerging roles in cell signaling. Biochem. Pharmacol. 71 : 551—564.
- Boldyrev A. A., Bulygina E. R. 1997. Na/K-ATPase and oxidative stress. Ann. N. Y. Acad. Sci. 834 : 666—668.
- Brennan J. P., Bardswell S. C., Burgoyne J. R., Fuller W., Schroder E., Wait R., Begum S., Kentish J. C., Eaton P. 2006. Oxidant-induced activation of type I protein kinase A is mediated by RI subunit inter protein disulfide bond formation. J. Biol. Chem. 281 : 21 827—21 836.
- Cadena D. L., Gill G. N. 1992. Receptor tyrosine kinases. FASEB J. 6 : 2332—2337.
- Cox M., Singer I. 1977. Insulin-mediated Na^+ transport in the toad urinary bladder. Amer. J. Physiol. 232 : F270—F277.

- Davis M. J., Wu X., Nurkiewicz T. R., Kawasaki J., Gui P., Hill M. A., Wilson E. 2001. Regulation of ion channels by protein tyrosine phosphorylation. *Amer. J. Physiol.* 281 : H1835—H1862.
- Filomeni G., Aquilano K., Civitareale P., Rotilio G., Ciriolo M. R. 2005. Activation of c-jun-N-terminal kinase is required for apoptosis triggered by glutathione disulfide in neuroblastoma cells. *Free Rad. Biol. Med.* 39 : 345—354.
- Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M. R. 2002. Cell signaling and glutathione redox system. *Biochem. Pharmacol.* 64 : 1057—1064.
- Firsov D., Robert-Nicoud M., Gruender S., Schild L., Rossier B. C. 1999. Mutational analysis of cysteine-rich domain of the epithelium sodium channel (ENaC) : identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface. *J. Biol. Chem.* 274 : 2743—2749.
- Fischer E. H., Charbonneau H., Tonks N. K. 1991. Protein tyrosine phosphatases : a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science.* 253 : 401—406.
- Forman J. H., Torres M. 2002. Reactive oxygen species and cell signaling. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 166 : S4—S8.
- Garant M. J., Kole S., Maksimova E. M., Bernier M. 1999. Reversible change in thiol redox status of the insulin receptor β -subunit in intact cells. *Biochemistry.* 38 : 5896—5904.
- Ghezzi P. 2005. Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic. Res.* 39 : 573—580.
- Hagiwara N., Tohda H., Doi Y., O'Brodovich H., Marunaka Y. 1992. Effect of insulin and tyrosine kinase inhibitor on ion transport in the alveolar cell of the fetal lung. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 187 : 802—808.
- Hayes J. D., McLellan L. I. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radic. Res.* 31 : 273—300.
- Hunter T. 1996. Tyrosine phosphorylation: past, present and future. *Bioch. Soc. Trans.* 24 : 307—327.
- Kellenberger S., Gautschi I., Pfister Y., Schild L. 2005. Intracellular thiol-mediated modulation of epithelial sodium channel activity. *J. Biol. Chem.* 280 : 7739—7747.
- Mallis F. J., Buss J. E., Thomas J. A. 2001. Oxidative modification of H-ras: S-thiolation and S-nitrosylation of reactive cysteines. *Biochem. J.* 355 : 145—153.
- Markadieu N., Blero D., Boom A., Erneux C., Beauwens R. 2004. Phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate: an early mediator of insulin-stimulated sodium transport in A6 cells. *Amer. J. Physiol.* 287 : F319—F328.
- Markadieu N., Crutzen R., Blero D., Erneux C., Beauwens R. 2005. Hydrogen peroxide and epidermal growth factor activate phosphatidylinositol 3-kinase and increase sodium transport in A6 cell monolayers. *Amer. J. Physiol.* 288 : F1201—F1212.
- Matsumoto P. S., Ohara A., Duchatelle P., Eaton D. C. 1993. Tyrosine kinase regulates epithelial sodium transport in A6 cells. *Amer. J. Physiol.* 264 : C246—C250.
- Melnitskaya A. V., Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Antonov V. G., Butov S. N., Krutetskaya N. I., Roschina N. G. 2008. The role of tyrosine kinases in the effect of oxidized glutathione and glutoxim on Na^+ transport in frog skin. In: *Biological motility: achievements and perspectives.* Pushchino: Foton-Vek. 164—166.
- Niisato N., Van Driessche W., Liu M., Marunaka Y. 2000. Involvement of protein tyrosine kinase in osmoregulation of Na^+ transport and membrane capacitance in renal A6 cells. *J. Membr. Biol.* 175: 63—77.
- Pacold M. E., Perisic O., Stephens L., Hawkins Ph. T., Wymann M. P., Williams R. L. 2000. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin and staurosporine. *Mol. Cell.* 6 : 909—919.
- Rao R. K., Li L., Baker R. D., Baker S. S., Gupta A. 2000. Glutathione oxidation and PTPase inhibition by hydrogen peroxide in Caco-2 cell monolayer. *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279 : G332—G340.
- Rodriguez-Commes J., Isales C., Kalghati L., Gasalla-Herraziz J., Hayslett J. P. 1994. Mechanism of insulin-stimulated electrogenic sodium transport. *Kidney International.* 46 : 666—674.
- Saltiel A. R. 1996. Diverse signaling pathways in the cellular actions of insulin. *Amer. J. Physiol.* 270 : E375—E385.
- Schlessinger J., Ullrich A. 1992. Growth factor signaling by receptor tyrosine kinases. *Neuron.* 9 : 383—391.
- Sen C. K. 1998. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* 55 : 1747—1758.
- Sies H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic. Biol. Med.* 27 : 916—921.
- Staal F. J. T., Anderson M. T., Staal G. E. J., Herzenberg L. A., Gitler C., Herzenberg L. A. 1994. Redox regulation of signal transduction: tyrosine phosphorylation and calcium influx. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91 : 3619—3622.
- Tilly B. C., Van Den Berghe N., Tertoolen L. G., Edixhoven M. J., De Jonge H. R. 1993. Protein tyrosine phosphorylation is involved in osmoregulation of ionic conductances. *J. Biol. Chem.* 268 : 19 919—19 922.
- Tong Q., Stockand J. 2005. Receptor tyrosine kinase mediate epithelial Na^+ channel inhibition by epidermal growth factor. *Amer. J. Physiol.* 288 : F150—F161.
- Townsend D. M., He L., Hutches S., Garrett T. E., Pazoles C. J., Tew K. D. 2008. NOV-002, a glutathione disulfide mimetic, as a modulator of cellular redox balance. *Cancer Res.* 68 : 2870—2877.
- Ullrich A., Schlessinger J. 1990. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 61 : 203—212.
- Vlahos C. J., Matter W. F., Hui K. Y., Brown R. F. 1994. A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269 : 5241—5248.
- Walton K. M., Dixon J. E. 1993. Protein tyrosine phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 62 : 101—120.
- Wang H.-Ch., Fung H.-L., Chen Y.-Q. 2000. Regulation of the RON receptor tyrosine kinase expression in macrophages: blocking the RON gene transcription by endotoxin-induced nitric oxide. *J. Immunol.* 164 : 3815—3821.
- Wang J., Boja E. S., Tan W., Tekle E., Fales H. M., English S., Mieryl J. J., Chock P. B. 2001. Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells. *J. Biol. Chem.* 276 : 47 763—47 766.
- Ward N. E., Chu F., O'Brian C. A. 2002. Regulation of protein kinase C isozyme activity by S-glutathiolation. *Methods Enzymol.* 353 : 89—100.
- Wilden P. A., Pessin J. E. 1987. Differential sensitivity of the insulin-receptor kinase to thiol and oxidizing agents in the absence and presence of insulin. *Biochem. J.* 245 : 325—331.

THE INVOLVEMENT OF TYROSINE KINASES AND PHOSPHATIDYLINOSITOL KINASES
IN THE EFFECT OF OXIDIZED GLUTATHIONE AND GLUTOXIM
ON Na⁺ TRANSPORT IN FROG SKIN

*A. V. Melnitskaya, Z. I. Krutetskaya, O. E. Lebedev,
V. G. Antonov, S. N. Butov*

Chair of Biophysics, St. Petersburg State University;
e-mail: simelnitsky@hotmail.ru

Using voltage-clamp technique, the role of tyrosine kinases and phosphatidylinositol kinases in the effect of oxidized glutathione (GSSG) and its pharmacological analogue, drug glutoxim, on Na⁺ transport in the frog *Rana temporaria* skin was investigated. It was shown for the first time that preincubation of the skin with tyrosine kinase inhibitor genistein or with two structurally distinct phosphatidylinositol kinase inhibitors, wortmannin and LY294002, significantly decreased the stimulatory effect of GSSG or glutoxim on Na⁺ transport. The data suggest that GSSG and glutoxim might transactivate insulin receptor in the basolateral membrane of epithelial cells and trigger the signaling cascade, involving tyrosine kinases and phosphatidylinositol kinases, which lead to Na⁺ transport stimulation in frog skin.

Key words: Na⁺ transport, oxidized glutathione, glutoxim, tyrosine kinases, phosphatidylinositol kinase.
