

## ВЛИЯНИЕ ПРЕПАРАТА ГЛУТОКСИМ НА ТРАНСПОРТ $\text{Na}^+$ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ: РОЛЬ СТРУКТУР ЦИТОСКЕЛЕТА

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

Кафедра биофизики С.-Петербургского государственного университета;  
электронный адрес: avm242@hotmail.ru

С использованием метода фиксации потенциала исследовано возможное участие элементов цитоскелета во влиянии фармакологического аналога окисленного глутатиона (GSSG) препарата глутоксим на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки *Rana temporaria*. Впервые показано, что предварительная обработка кожи лягушки деполимеризатором микротрубочек нокодазолом, деполимеризатором микрофиламентов цитохалазином D или ингибитором протеинфосфатаз PP1/PP2A каликулином А существенно снижает стимулирующее влияние глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$ . Полученные данные свидетельствуют о важной роли микротрубочек и микрофиламентов в действии глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки, а также о том, что любые изменения в структуре актинового и тубулинового цитоскелета приводят к снижению стимулирующего влияния глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки.

Ключевые слова: глутоксим, трансэпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$ , цитоскелет.

Принятые сокращения: ENaC — амилорид-чувствительные эпителиальные  $\text{Na}^+$ -каналы, GSH и GSSG — восстановленный и окисленный глутатион, PP1 и PP2A — серин/треониновые протеинфосфатазы типов PP1 и PP2A соответственно.

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.

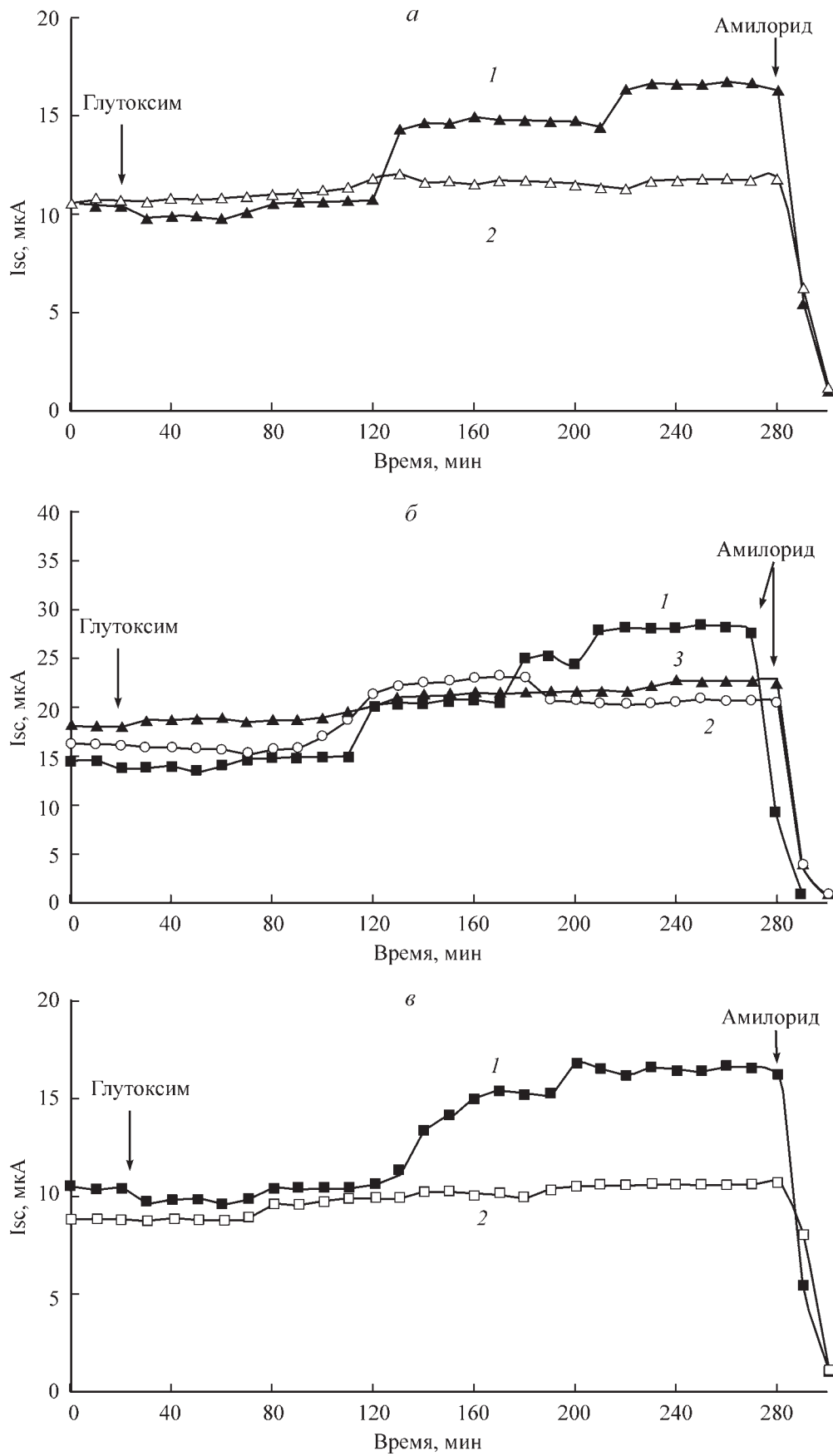
Функционирование окислительно-восстановительных (редокс) систем клетки и влияние окислителей и восстановителей на различные клеточные процессы в норме и при патологии давно интересуют исследователей. Накопивающиеся экспериментальные данные свидетельствуют о том, что регуляция редокс-состояния клетки важна при лечении ряда заболеваний, в том числе СПИДа и некоторых форм рака (Sen, 1998). Влияние окисляющих и восстанавливающих агентов на транспорт  $\text{Na}^+$  показано для ряда эпителиальных тканей. Известно, что ключевые  $\text{Na}^+$ -транспортирующие белки, такие как амилорид-чувствительные эпителиальные  $\text{Na}^+$ -каналы (ENaC),  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -АТФазы и  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -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  $\text{Na}^+$  практически не изучены.

В последнее время в клинической практике широко применяются новые биядерные каталитические соедине-

ния, содержащие нанодобавки d-металлов. Глутоксим представляет собой синтезированное биологически активное соединение — динатриевую соль окисленного глутатиона (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, оказывает рецепторопосредованное действие на клетки, вызывает активацию белков, участвующих в гематопозе (Townsend et al., 2008).

Ранее нами было показано, что транспорт  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+$ , однако механизмы влияния GSSG и глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  остаются неясными.

Известно, что инсулин стимулирует трансэпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$ . Влияние инсулина на транспорт  $\text{Na}^+$  инициируется связыванием гормона с рецептором, имеющим собственную тирозинкиназную активность и локализованным в базолатеральной мембране эпителиальных клеток (Cox, Singer, 1977). Ранее нами показано, что влия-



ние инсулина на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки зависит от активности тирозинкиназы и тирозинфосфатаз и осуществляется при участии фосфатидилинозитолкиназы и протеинкиназы C (Мельницкая и др., 2006а). Важную роль в сигнальных каскадах, запускаемых инсулином, играют элементы цитоскелета. Актиновый цитоскелет опосредует морфологические, метаболические и ядерные эффекты инсулина (Tsakiridis et al., 1994). Известно также, что белки цитоскелета, такие как актин (Dalle-Donne et al., 2003) или тубулин (Burchill et al., 1978; Wang et al., 2001), имеют высокую редокс-чувствительность и легко подвергаются глутатионилрованию. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать возможную роль микрофиламентов и микротрубочек в регуляции глутоксимом транспорта  $\text{Na}^+$  в коже лягушки *Rana temporaria*. В экспериментах использовали деполимеризатор микротрубочек нокодазол, деполимеризатор микрофиламентов цитохалазин D и ингибитор протеинфосфатаз PP1/PP2A каликулин А. Известно, что в клетках различных типов каликулин А индуцирует перестройки актинового (Yano et al., 1995; Rosado, Sage, 2000) и микротубулинового (Yano et al., 1995) цитоскелета.

### Материал и методика

Эксперименты проводили на самцах лягушки *R. temporaria* в период с ноября по март. Кожу с брюшка лягушки срезали и помещали в камеру Уссинга «World Precision Instruments, Inc.» (Германия) с диаметром внутреннего отверстия 12 мм. Камеру заполняли раствором Рингера для холоднокровных, содержащим (в мМ): 110 NaCl, 2.5 KCl, 3 CaCl<sub>2</sub>, 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  $\text{Na}^+$  оценивали как амилорид-чувствительный  $I_{SC}$ . В связи с этим 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). Всю получаемую в ходе опыта информацию регистрировали с помощью компьютера, имеющего оригинальное программное обеспечение.

Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Маточные растворы цитохалазина D (2 мг/мл), каликулина А

(25 мкМ) и нокодазола (5 мМ) готовили в диметилсульфоксиде. Маточный раствор амилорида (10 мМ) и глутоксима (50 мг/мл) готовили на воде. Фармакологические агенты добавляли к апикальной или базолатеральной поверхности кожи. Агенты, вызывающие реорганизацию микротрубочек или микрофиламентов, добавляли за 30—40 мин до введения в раствор глутоксима.

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

### Результаты и обсуждение

Влияние глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляют:  $I_{SC} = 14.58 \pm 0.91$  мкА,  $V_{OC} = -38.01 \pm 2.74$  мВ,  $g_T = 0.38 \pm 0.01$  мСм. Показано, что глутоксим (100 мкг/мл), приложенный к базолатеральной поверхности интактной кожи лягушки, подобно инсулину стимулирует транспорт  $\text{Na}^+$ . В среднем (по результатам 10 экспериментов) после приложения глутоксима  $I_{SC}$  возрастает на  $31.24 \pm 8.32$  %, а  $V_{OC}$  — на  $38.04 \pm 5.15$  %. Величина  $g_T$  при этом не меняется. На основании результатов, полученных в настоящей работе и ранее (Мельницкая и др., 2006а, 2006б; Крутецкая и др., 2008), можно предположить, что глутоксим может взаимодействовать с богатыми цистеином экстраклеточными доменами рецептора инсулина в базолатеральной мембране эпителиальных клеток, вызывать его трансактивацию и запускать сигнальный каскад, приводящий к увеличению транспорта  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. Полученные данные хорошо согласуются с литературными: так, 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).

Влияние деполимеризатора микротрубочек нокодазола. Показано, что нокодазол практически полностью предотвращает стимулирующее влияние глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки (см. рисунок, а). Так, в среднем (по данным 10 экспериментов) после предварительной обработки апикальной поверхности кожи 25 мкМ нокодазола в течение 30 мин перед добавлением 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности кожи лягушки  $I_{SC}$  увеличился лишь на  $9.01 \pm 1.02$  %, а  $V_{OC}$  — на  $10.12 \pm 1.21$  %. Изменения величины  $g_T$  не наблюдали.

Ранее нами было выявлено, что транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки зависит от структурно-функциональной организации актинового и тубулинового цитоскелета (Крутецкая и др., 2006; Мельницкая и др., 2006б). Было показано, что антимиотические препараты (колхицин, колцемид и винбластин) подавляют  $I_{SC}$  в коже лягушки *R. temporaria*. Известно, что колхицин, колцемид и нокодазол связываются

Зависимость изменения тока короткого замыкания  $I_{SC}$  через кожу лягушки в ответ на действие глутоксима от целостности цитоскелета и активности серин/треониновых протеинфосфатаз PP1 и PP2A.

Кривая 1 (а—в) —  $I_{SC}$  после добавления (приложения) глутоксима (100 мкг/мл) к базолатеральной поверхности интактной кожи; кривая 2 —  $I_{SC}$  после предварительной обработки в течение 30 мин апикальной поверхности кожи 25 мкМ нокодазола (а), 5 мкг/мл цитохалазина D (б) или 25 нМ каликулина А (в); кривая 3 (б) — цитохалазин D в концентрации 20 мкг/мл; в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ).

с одним и тем же участком тубулинового димера, повышая нуклеотидтрифосфатазную активность тубулина. Присоединение к быстрорастущему концу микротрубочек комплекса этих препаратов с тубулиновым димером снижает скорость дальнейшего присоединения мономеров к этому концу. Однако по сравнению с колхицином нокодазол более специфичен и его связывание более обратимо (Фултон, 1987).

Согласно данным литературы, нарушение структуры микротрубочек антимиотическими агентами снижает стимулирующее влияние на трансэпителиальный транспорт  $\text{Na}^+$  различных гормонов (альдостерона и вазопрессина) (Vetgey et al., 1995). По-видимому, микротрубочки играют важную роль в процессах экзо- и эндоцитоза, участвуя в регуляции плотности ENaC в апикальной мембране. Разрушение микротрубочек также полностью предотвращает многие клеточные эффекты инсулина (Eyster et al., 2006). В то же время имеются данные о том, что сульфгидрильные остатки тубулина являются мишенью для действия окислителей. Показано, что *in vitro* в концентрациях выше физиологических GSSG ингибирует сборку микротрубочек (Burchill et al., 1978). Полученные нами данные также свидетельствуют о том, что тубулиновый цитоскелет участвует в регуляции глутоксима транспорта  $\text{Na}^+$  в коже лягушки.

Влияние деполимеризатора микрофиламентов цитохалазина D. Показано, что предварительная обработка цитохалазином D (5 или 20 мкг/мл) также существенно снижает стимулирующее влияние глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки (см. рисунок, б). В среднем (по данным 10 экспериментов) изменение электрических характеристик кожи лягушки после добавления глутоксима к базолатеральной поверхности кожи, предварительно обработанной в течение 30 мин со стороны апикальной поверхности цитохалазином D в различных концентрациях, было следующим:  $I_{SC}$  увеличился на  $25.25 \pm 2.12$  и  $12.12 \pm 1.14$  %, а  $V_{OC}$  — на  $28.31 \pm 3.31$  и  $16.14 \pm 4.08$  % для цитохалазина D в концентрациях 5 и 20 мкг/мл соответственно. Изменения величины  $g_T$  не наблюдали. Полученные данные свидетельствуют о том, что эффект цитохалазина D зависит от его концентрации. Так, в концентрации 20 мкг/мл цитохалазин D вызывает значительно большее подавление стимулирующего влияния глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$ , чем цитохалазин D в концентрации 5 мкг/мл. Кроме того, цитохалазин D в низких концентрациях изменяет также кинетику влияния глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$ : наблюдаются незначительное усиление начальной и существенное подавление второй фазы стимулирующего действия глутоксима (см. рисунок, б, кривая 2). В то же время предварительная обработка кожи лягушки цитохалазином D в высокой концентрации (20 мкг/мл) вызывает существенное подавление обеих фаз стимулирующего действия глутоксима, характерных для влияния этого окисляющего агента на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки (см. рисунок, б, кривая 3).

Ранее нами было обнаружено, что цитохалазин D, цитохалазин В и дигидроцитохалазин В вызывают дозозависимое снижение транспорта  $\text{Na}^+$  в коже лягушки *R. temporaria* (Крутецкая и др., 2006; Мельницкая и др., 2006б). В настоящей работе показано, что перестройки в структуре актинового цитоскелета модулируют также влияние глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки.

Известно, что актиновый цитоскелет участвует в регуляции трансэпителиального транспорта  $\text{Na}^+$  и активно-

сти многих  $\text{Na}^+$ -транспортирующих белков. Ведущую роль в транспорте ионов  $\text{Na}^+$  через эпителиальные системы играют ENaC. В последнее время появляется все больше информации о важной роли элементов цитоскелета в регуляции активности каналов данного типа. Известно, что ENaC локализованы с актиновыми филаментами и актинсвязывающими белками (анкирином и спектрином) (Cantiello et al., 1991; Smith et al., 1991). Кроме того, показано непосредственное взаимодействие между ENaC и SH<sub>3</sub>-доменом  $\alpha$ -спектрина благодаря наличию богатого пролином участка на С-терминальном конце  $\alpha$ -субъединицы ENaC (Rotin et al., 1994). Согласно данным литературы, для регуляции активности ENaC наиболее важны короткие актиновые филаменты, а не мономерный G- или фибриллярный F-актин. Влияние микрофиламентов на активность ENaC также может быть опосредовано изменением состояния липидного микроокружения канала (Cantiello et al., 1991; Prat et al., 1992) или связано с ролью актина как важного компонента сигнальных каскадов (Cantiello et al., 1993; Janmey, 1998). Кроме того, наблюдается существенное различие во влиянии архитектуры актинового цитоскелета на активность ENaC в зависимости от типа экспериментального объекта. Так, для клеток А6 показано, что воздействие фармакологических агентов, способных разрушать F-актин, например цитохалазинов, приводит к стимуляции транспорта  $\text{Na}^+$  (Cantiello et al., 1991; Prat et al., 1992; Rehn et al., 1998), тогда как в коже и мочевом пузыре амфибий разрушение микрофиламентов под действием цитохалазинов приводит к ингибированию транспорта  $\text{Na}^+$  и сопровождается снижением трансэпителиального потенциала (Els, Chou, 1993; Chou, Els, 1995).

Влияние ингибитора протеинфосфатаз каликулина А. На рисунке, в представлена кинетика изменения  $I_{SC}$  при последовательном добавлении к коже лягушки каликулина А, глутоксима и блокатора ENaC амилориды. Видно, что обработка апикальной поверхности кожи 25 нМ каликулина А в течение 30 мин перед введением в раствор, омывающий базолатеральную поверхность кожи, 100 мкг/мл глутоксима практически полностью предотвращает стимулирующее действие этого препарата на  $I_{SC}$  через кожу лягушки. В среднем (по данным 10 экспериментов) после комбинированного воздействия каликулина А и глутоксима увеличение  $I_{SC}$  составило  $10.14 \pm 2.08$  %, а  $V_{OC}$  —  $14.44 \pm 3.67$  %. Изменения величины  $g_T$  не наблюдали. Полученные данные свидетельствуют о том, что ингибитор протеинфосфатаз типов PP1 и PP2A каликулин А модулирует эффект глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки.

Известно, что протеинфосфатазы регулируют активность широкого спектра структурных и регуляторных белков, изменяя уровень их фосфорилирования/дефосфорилирования. Результаты наших ранних работ и данные литературы свидетельствуют о том, что регуляция активности ENaC и транспорта  $\text{Na}^+$  в эпителиальных системах осуществляется при участии различных типов серин/треониновых и тирозиновых киназ, а также фосфатидилинозитолкиназ (Garty, Palmer, 1997; Vecchetti et al., 2002; Крутецкая и др., 2003; Мельницкая и др., 2006б). Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Так, в экспериментах на культуре клеток дистальных сегментов почки лягушки *Xenopus laevis* (клетки А6) было показано, что два структурно различных ингибитора протеинфосфатаз типов PP1 и PP2A оокадаиновая кислота и каликулин А модулируют транспорт  $\text{Na}^+$ . При этом обнаружено, что оокадаиновая кислота и каликулин А вызыва-

ют изменения кинетических характеристик и плотности экспрессированных ENaC, практически не изменяя уровень фосфорилирования субъединиц канала (Benos, Stanton, 1999). Результаты этой и некоторых других работ свидетельствуют о том, что влияние ингибиторов протеинфосфатаз типов PP1 и PP2A на  $\text{Na}^+$ -проницаемость мембран эпителиальных клеток связано преимущественно не с прямой модуляцией активности ENaC, а осуществляется при участии ряда других белков. Данные литературы свидетельствуют также о том, что в качестве возможного посредника в этом процессе могут выступать белки цитоскелета. Известно, что различные ингибиторы протеинфосфатаз PP1/PP2A, такие как окадаиновая кислота, каликулин А и микроцистин, вызывают динамические перестройки в структуре актинового и тубулинового цитоскелета. Так, в тромбоцитах, нейтрофилах и клетках других типов эти агенты индуцируют реорганизацию микротрубочек с образованием пучков коротких микротрубочек (Yano et al., 1995). Каликулин А и окадаиновая кислота влияют также и на архитектуру актинового цитоскелета, облегчая фосфорилирование актинсвязывающих ERM-белков, таких как эзрин, радиксин или моззин, регулируя, таким образом, ассоциацию этих белков с актиновыми филаментами и плазматической мембраной (Rosado, Sage, 2000).

Нами показано, что каликулин А, так же как и деполимеризатор микротрубочек нокодазол, практически полностью предотвращают стимулирующее влияние глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. Это позволяет предположить, что влияние каликулина А на эффект глутоксима реализуется при участии элементов цитоскелета.

Известно, что различные  $\text{Na}^+$ -транспортирующие белки содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенью для внутри- и внеклеточных окисляющих и восстанавливающих агентов. В реабсорбирующих эпителиях ключевую роль в транспорте  $\text{Na}^+$  играют ENaC. В экстраклеточных доменах  $\alpha$ -,  $\beta$ - и  $\gamma$ -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; Firssov 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. Введение в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) вызывало полное подавление  $I_{\text{sc}}$  (см. рисунок), что свидетельствует о том, что влияние глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  связано преимущественно с модуляцией активности ENaC.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что любые изменения в структуре актинового и тубулинового цитоскелета приводят к снижению стимулирующего влияния глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. Результаты настоящей работы и ранних работ (Мельницкая и др., 2006а, 2006б, 2009, 2010; Крутецкая и др., 2008) позволяют предположить, что глутоксим может взаимодействовать с богатыми цистеином доменами рецептора инсулина в базолатеральной мембране эпителиальных клеток, вызывать его трансактивацию и запускать

сигнальный каскад, включающий в себя тирозинкиназы, фосфатидилинозитолкиназы, протеинкиназу С, протеинфосфатазы и элементы цитоскелета, что приводит к стимуляции транспорта  $\text{Na}^+$  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., Андрюшко-ва 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., Мельницкая А. В. 2003. Роль протеинкиназы С в регуляции трансэпителиального транспорта  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+$  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  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. Докл. РАН. 410 (4) : 568—570.
- Мельницкая А. В., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 2006а. Воргманнин модулирует влияние инсулина на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. Морфология. 129 (2) : 61.
- Мельницкая А. В., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 2006б. Структурно-функциональная организация транспорта  $\text{Na}^+$  в эпителиальных системах. I. Эпителиальные  $\text{Na}^+$ -каналы. Цитология. 48 (10) : 817—840.
- Мельницкая А. В., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 2009. Участие протеинкиназы С в действии окисленного глутатиона и препарата глутоксим на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. Биол. мембраны. 26 (4) : 320—321.
- Мельницкая А. В., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Антонов В. Г., Бутов С. Н. 2010. Участие тирозинкиназ и фосфатидилинозитолкиназ во влиянии окисленного глутатиона и глутоксима на транспорт  $\text{Na}^+$  в коже лягушки. Цитология. 52 (4) : 342—348.
- 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.
- Фултон А. 1987. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки. М.: Мир. 117 с.
- Becchetti A., Malik B., Yue G., Duchatelle P., Al-Khalili O., Kleymann T. R., Eaton D. C. 2002. Phosphatase inhibitors increase the open probability of ENaC in A6 cells. Amer. J. Physiol. Renal Physiol. 283 : F1030—F1045.
- 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.
- Boldyrev A. A., Bulygina E. R. 1997. Na/K-ATPase and oxidative stress. Ann. N. Y. Acad. Sci. 834 : 666—668.

- Burchill B. R., Oliver J. M., Pearson C. B., Leinbach E. D., Berlin R. D. 1978. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.* 76 : 439—447.
- Cantiello H. F., Prat A. G., Bonventre J. V., Cun-Ningham C. C., Hartwig J. H., Ausiello D. 1993. Actin-binding protein contributes to cell volume regulatory ion channel activation in melanoma cells. *J. Biol. Chem.* 268 : 4596—4599.
- Cantiello H. F., Stow J., Prat A. G., Ausiello D. 1991. Actin filaments control epithelial Na<sup>+</sup> channel activity. *Amer. J. Physiol.* 261 : C882—C888.
- Chou K. Y., Els W. J. 1995. Distribution of actin microfilaments in frog skin epithelial granular cells. *Biol. Cell.* 83 : 61—68.
- Cox M., Singer I. 1977. Insulin-mediated Na<sup>+</sup> transport in the toad urinary bladder. *Amer. J. Physiol.* 232 : F270—F277.
- Dalle-Donne I., Giustarini D., Rossi R., Colombo R., Milzani A. 2003. S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Rad. Biol. Med.* 34 : 23—32.
- Els W. J., Chou K. Y. 1993. Sodium-dependent regulation of epithelial sodium channel densities in frog skin; a role for the cytoskeleton. *J. Physiol.* 462 : 447—464.
- Eyster C. A., Duggins Q. S., Gorbsky G. J., Olson A. L. 2006. Microtubule network is required for insulin signaling through activation of Akt/protein kinase B. *J. Biol. Chem.* 281 : 39 719—39 727.
- 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.
- Garty H., Palmer L. G. 1997. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol. Rev.* 77 : 359—396.
- Janmey P. A. 1998. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol. Rev.* 78 : 763—781.
- Kellenberger S., Gautschi I., Pfister Y., Schild L. 2005. Intracellular thiol-mediated modulation of epithelial sodium channel activity. *J. Biol. Chem.* 280 : 7739—7747.
- Prat A. G., Ausiello D., Cantiello H. 1992. Vasopressin and protein kinase A activate G protein-sensitive epithelial Na<sup>+</sup> channels. *Amer. J. Physiol.* 265 : C218—C223.
- Rehm M., Weber W.-M., Clauss W. 1998. Role of the cytoskeleton in stimulation of Na<sup>+</sup> channels in A6 cells by changes in osmolality. *Eur. J. Physiol.* 436 : 270—279.
- Rosado J. A., Sage S. O. 2000. The actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry. *J. Physiol.* 526 : 221—229.
- Rotin D. D., Bar-Sagi D., O'Brodoovich H., Merilainen J., Lehto V. P., Canessa C. M., Rossier B. C., Downey G. P. 1994. An SH<sub>3</sub> binding region in the epithelial Na<sup>+</sup> channel (arENaC) mediated localization at the apical membrane. *EMBO J.* 13 : 4440—4450.
- Sen C. K. 1998. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* 55 : 1747—1758.
- Smith P. R., Saccomani G., Joe E., Angelides K. J., Benos D. J. 1991. Amiloride-sensitive sodium channel is linked to the cytoskeleton in renal epithelial cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88 : 6971—6975.
- 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.
- Tsakiridis T., Vranic M., Klip A. 1994. Disassembly of the actin network inhibits insulin-dependent stimulation of glucose transport and prevents recruitment of glucose transporters to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 269 (47) : 29 934—29 942.
- Verrey F., Groscurth P., Bolliger U. 1995. Cytoskeletal disruption in A6 kidney cells: impact on endo/exocytosis and NaCl transport regulation by antidiuretic hormone. *J. Membr. Biol.* 145 : 193—204.
- Wang J., Boja E. S., Tan W., Tekle E., Fales H. M., English S., Miyeal J. J., Chock P. B. 2001. Reversible glutathionylation regulates actin polymerization in A431 cells. *J. Biol. Chem.* 276 : 47 763—47 766.
- Yano Y., Sakon M., Kambayashi J., Kawasaki T., Senda T., Tanaka K., Yamada F. 1995. Cytoskeleton reorganization of human platelets induced by the protein phosphatase 1/2A inhibitors okadaic acid and calyculin A. *Biochem. J.* 307 : 439—449.

Поступила 1 IX 2011

#### THE EFFECT OF GLUTOXIM ON Na<sup>+</sup> TRANSPORT IN FROG SKIN: THE ROLE OF CYTOSKELETON

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

Chair of Biophysics of St. Petersburg State University;  
e-mail: avm242@hotmail.ru

Using voltage-clamp technique, the possible role of the cytoskeleton in the effect of pharmacological analogue of oxidized glutathione (GSSG), drug glutoxim, on Na<sup>+</sup> transport in the frog *Rana temporaria* skin was investigated. It was shown for the first time that preincubation of the skin with the microtubular disrupter, nocodazole, actin filament disrupter, cytochalasin D or protein phosphatase PP1/PP2A inhibitor, calyculin A, significantly decrease the stimulatory effect of glutoxim on Na<sup>+</sup> transport. The data suggest the involvement of microtubules and microfilaments in the regulatory effect of glutoxim on Na<sup>+</sup> transport in frog skin and that reorganization of actin filaments or microtubules leads to inhibition of stimulatory effect of glutoxim on Na<sup>+</sup> transport in frog skin epithelia.

Key words: glutoxim, transepithelial Na<sup>+</sup> transport, cytoskeleton.