

ВЛИЯНИЕ ЛАДАСТЕНА НА АКТИВНОСТЬ ПРОТЕИНКИНАЗЫ С В КЛЕТКАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС

Ю. В. Вахитова^{1, 2}, М. Х. Салимгареева², С. Б. Середенин¹

Исследовано влияние ладастена на активность протеинкиназы С (РКС) в клетках головного мозга крыс в зависимости от продолжительности его действия. Показано, что на начальных этапах действия ладастена в цитозольной фракции белков головного мозга крыс активность РКС увеличивается более чем в два раза. При этом активность РКС не зависит от наличия экзогенных Ca^{2+} , ингибируется циннаризином и нифедипином, оптимальная концентрация Ca^{2+} поддерживается путем активации Ca^{2+} -АТФазы. Сделан вывод, что фармакологическое действие ладастена связано с активацией Ca^{2+} -фосфолипидзависимых протеинкиназ.

Ключевые слова: ладастен, протеинкиназа С, Ca^{2+} -АТФаза, мозг, Ca^{2+}

ВВЕДЕНИЕ

Особенностью фармакокинетики ладастена³ является его быстрое распределение по органам и тканям. Установлено, что уже через 10 мин после введения экспериментальным животным он обнаруживается в клетках головного мозга [3]. Этому, вероятно, способствует его липофильность и мембранотропность, что, несомненно, имеет определяющее значение для быстрого преодоления гематоэнцефалического барьера. С этими физико-химическими свойствами ладастена, возможно, связана и скорость клеточного ответа. Известно, что некоторые особенности поведенческой реакции, а также определенные биохимические изменения в отдельных органах животных под влиянием ладастена проявляются уже через 1,5 – 2 ч [3]. Относительно раннее проявление биологических эффектов ладастена предполагает использование клеткой быстродействующих систем, к которым, как известно, относятся Ca^{2+} -активируемые пути переноса сигнала. Изменения в транспорте и внутриклеточной концентрации Ca^{2+} играют ключевую роль в запуске и регуляции общих и специализированных клеточных функций, таких как пролиферация, рост, секреция, передача нервного импульса, иммунный ответ и др. [1]. Подробно особенности этой системы внутриклеточной передачи сигнала рассматриваются в ряде обзоров [2, 6].

Цель работы — изучить влияние ладастена на активность Ca^{2+} -фосфолипидзависимых протеинкиназ (протеинкиназа С, РКС) в клетках головного мозга крыс в зависимости от продолжительности действия препарата.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 200 – 250 г, содержавшихся в стандартных условиях лабораторного вивария. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с “Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных”.

Все исследуемые препараты вводили внутрь в виде суспензии с твин-80 (0,04 %), контрольным животным — соответствующий объем дистиллированной воды с твин-80 в следующих дозах: ладастен (ГУ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН) 50 мг/кг, циннаризин (“ICN”, США) 50 мг/кг, нифедипин (“ICN”, США) 10 мг/кг.

Крыс декапитировали после однократного введения препаратов через 15 мин, 0,5; 1,5; 4; 6; 8 и 12 ч, извлекали мозг и быстро помещали в жидкий азот, затем растирали до порошкообразного состояния.

Биохимические исследования проводили при температуре 0 – 4 °С. Экстракцию белков осуществляли в буфере, содержащем 20 мМ Hepes, pH 7,5; 0,2 % Triton X-100, 2 мМ ЭДТА, 0,5 мМ ДТТ, 0,5 мМ PMSF, 10 мкг/мл леупептина, 10 мкг/мл апротинина. Гомогенат центрифугировали при 8000 g. Содержание белка в супернатанте определяли по методу Брэдфорда [7].

Активность протеинкиназ определяли по методу U. Kikkawa и соавт. [8]. Реакционная смесь (100 мкл) содержала: 10 мМ Hepes, pH 7,5, 0,1 % Triton X-100, 2 мМ ЭДТА, 0,5 мМ ДТТ, 0,5 мМ PMSF, 5 мкг/мл леупептина, 5 мкг/мл апротинина, 5 мМ MgCl_2 , 0,2 мг/мл фосфотидилсерина, 0,2 мг/мл гистона III-SS в качестве субстрата, $\pm 1,5$ мМ CaCl_2 , 0,01 мМ γ -[³³P] АТФ (5 мкКи) и 30 – 80 мкг исследуемого белка. Пробы инкубировали 10 мин при 37 °С и останавливали реакцию замораживанием при – 20 °С. Одну часть реакционной смеси после размораживания сразу же наносили на фильтры Watman 3 ММ и промывали 4 раза 5 – 10 % ТХУ по 20 мин. Фильтры обезвоживали в смеси этанол-ацетон (1:1) и в ацетоне. Затем фильтры сушили при 80 °С и радиоактивность просчитывали на

¹ НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

² Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра РАН, Уфа, 450054, Пр. Октября, 69.

³ Середенин С. Б., Ярков М. А., Бадыштов Б. А., Пятин Б. М., Авдюнина Н. И., Морозов И. С., Воронина Т. А., Бюллетень изобретений, № 30 27.10.2001.

жидкостном сцинтилляционном счетчике “Изокап-300” (США).

Ca^{2+} -АТФазную активность определяли по количеству неорганического фосфора, отщепляемого от АТФ при его гидролизе в течение 15 мин при 34 °С по методу В. П. Скулачева [4]. Реакционная среда объемом 1 мл содержала: 50 мМ трис-НСl (рН 7,5); 1 мМ CaCl_2 ; 1,5 мМ АТФ; 50 мкМ MgCl_2 ; 350 мкг белка. Ферментативную реакцию останавливали добавлением ТХУ (холодной) в конечной концентрации 5 %, затем выдерживали на холоде 30 мин для более полного осаждения белков. Ca^{2+} -АТФазную активность выражали в мкМ неорганического фосфора на мг белка в минуту. В каждом варианте был контроль на неферментативный распад АТФ.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли в рамках стандартного пакета методов статистического анализа Statistica для Windows, версия 5. Различия считали существенными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Определение активности РКС проводили в растворимой фракции белков головного мозга крыс в системе *in vitro* с использованием в качестве субстрата гистона III-SS (“Sigma”), а также с введением в реакционную среду Ca^{2+} и без него.

Как видно из рис. 1, в исследованном интервале времени ладастен оказывает существенное влияние на активность РКС в клетках исследованных органов. В клетках головного мозга нами выявлены три пика увеличения активности РКС, а именно через 0,5, 4 и 8 ч. На наш взгляд, особого внимания заслуживает более чем 2,5-кратное увеличение активности РКС через 30 мин после введения ладастена. Она ингибируется стауроспорином при концентрации 2,5 нМ. Резкое увеличение активности РКС в данном случае может быть связано со значительным повышением концентрации ионов кальция в цитоплазме под действием ладастена и активация именно этой сигнальной системы может определить последовательность изменения экспрессионного статуса генов-мишеней и биохимических процессов, определяющих фармакологический эффект препарата. О кальцийзависимом эффекте увеличения активности РКС через 30 мин после введения ладастена свидетельствуют два обстоятельства: во-первых, введение дополнительных ионов кальция в реакционную среду не приводит к адекватному увеличению активности РКС; во-вторых, резкое повышение активности РКС на начальных этапах действия ладастена сопровождается столь же резким ее снижением к 1,5 ч, что характерно для кальцийзависимых сигнальных систем [1]. Подтверждением вышеизложенному служит некоторое повышение активности РКС через 1,5 час в присутствии избытка Ca^{2+} .

Изменение концентрации Ca^{2+} в клетках головного мозга крыс под действием ладастена может быть свя-

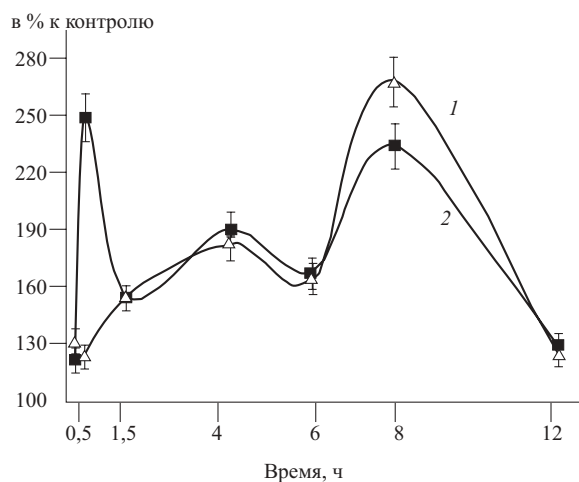


Рис. 1. Динамика активности протеинкиназы С в цитозольной фракции белков головного мозга крыс при разовом введении ладастена внутрь (50 мг/кг). Субстрат — гистон III-SS.

1 — наличие Ca^{2+} , 2 — отсутствие Ca^{2+} .

зано как с высвобождением ионов кальция из митохондрий, кальциесом эндоплазматического ретикулама, так и их поступлением из межклеточного пространства вследствие активации мембранных кальциевых каналов. С целью проверки данного предположения активность РКС в растворимой фракции белков головного мозга крыс определяли после селективного блокирования Ca^{2+} -каналов кальциесом циннаризином (50 мг/кг) и мембранных — нифедипином (10 мг/кг) на фоне действия ладастена и без него. Принимая во внимание активацию РКС на ранних этапах действия ладастена, блокаторы вводили внутрь практически одновременно с препаратом.

Результаты исследований показали, что оба блокатора кальциевых каналов в использованных нами концентрациях ингибируют активность РКС в клетках головного мозга и гепатоцитах, причем действие циннаризина носит более выраженный характер (рис. 2). Следовательно, ладастен на начальных этапах действия на клетку способствует развитию кратковременной “кальциевой вспышки” в цитоплазме путем мобилизации ионов кальция из внутри- и межклеточных источников. Ингибирование активности РКС при блокаде Ca^{2+} -каналов производным дигидропиридина в клетках мозга свидетельствует о том, что ладастен активирует мембранные кальциевые каналы L-типа, характеризующиеся высокой проводимостью Ca^{2+} . Как известно, оба источника Ca^{2+} находятся в функционально взаимосвязанном состоянии: снижение концентрации Ca^{2+} в кальциесомах за счет инозитол-1,4,5-трифосфат активируемого выброса Ca^{2+} в цитоплазму служит сигналом для активации мембранных кальциевых каналов, что способствует поддержанию необходимой концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. Механизм активации кальциевых каналов плазмалеммы в данном случае не совсем понятен. В то же время в литературе

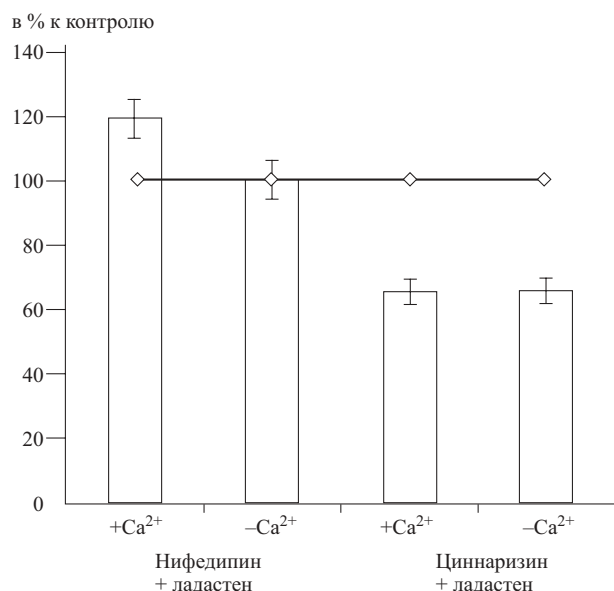


Рис. 2. Влияние нифедипина и циннаризина на активность протеинкиназы С в цитозольной фракции белков головного мозга крыс на фоне действия ладастена (50 мг/кг) через 30 мин после разового введения внутрь. Контроль — нифедипин (10 мг/кг); циннаризин (50 мг/кг). Субстрат — гистон III-SS.

Столбики — опыт, горизонтальная прямая — контроль.

имеются сведения о том, что инозитол-1,4,5-трифосфат или продукт его фосфорилирования — инозитол-тетраakisфосфат может повышать концентрацию Ca²⁺ в цитозоле, открывая и кальциевые каналы плазмалеммы [5].

Ca²⁺-зависимое увеличение активности РКС под действием ладастена, ингибирование ее функционального состояния при блокаде Ca²⁺-каналов, активируемых продуктами гидролиза фосфатидинозитолфосфатов — фосфолипазой С, свидетельствует о том, что действие ладастена на клетки животных связано с активацией через G-белки кальциевой сигнальной системы в результате взаимодействия какой-то эффекторной молекулы с рецепторным белком. Следовательно, ладастен оказывает влияние на функциональное состояние кальциевых каналов. Как известно, внутриклеточная концентрация Ca²⁺ в клетках головного мозга в основном зависит от функционального состояния четырех типов рецепторов: адренорецепторов, NMDA, дофаминовых и холинергических [1]. Адреномиметические, а также M- и H-холинолитические эффекты ладастена выражены слабо [3]. В механизме действия ладастена центральная роль отводится первичным дофаминопозитивным эффектам. Установлено, что ладастен, проникая в клетки, первоначально усиливает выброс дофамина из пресинаптических терминалей, возможно, блокирует обратный захват нейромедиатора и, тем самым, способствует его увеличению в синаптической щели [3]. Определенная пороговая концентрация дофамина, связываясь с гомологичными рецепторами (D₁ и D₅?) может активировать аденилатциклазную си-

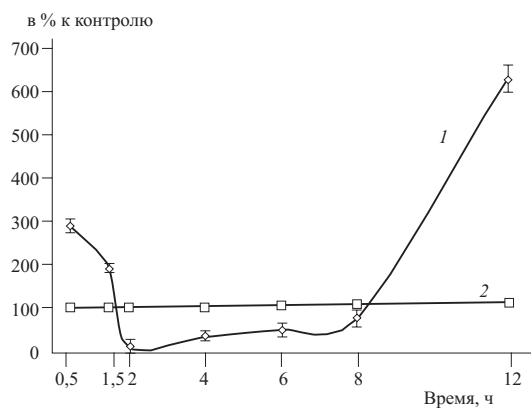


Рис. 3. Динамика активности Ca²⁺-АТФазы в растворимой фракции белков головного мозга крыс при разовом введении ладастена внутрь (50 мг/кг).

1 — опыт, 2 — контроль.

стему, которая, как известно, стимулирует рецепторзависимое увеличение концентрации Ca²⁺ в цитоплазме [1, 2]. Основанием для данного предположения служат недавно полученные нами данные об активации протеинкиназы А в клетках головного мозга крыс, сопоставимые во времени с увеличением активности РКС после введения ладастена внутрь.

Как видно из рис. 1, активность РКС в клетках головного мозга носит осциллирующий характер и до 6-и часов после введения ладастена она не потенцируется при добавлении в реакционную среду Ca²⁺. Выраженная зависимость активности РКС от экзогенных ионов кальция выявляется только через 8 ч после введения ладастена. Сходная динамика РКС, вероятно, отражает специфику клеточного ответа на введение ладастена, определяет последовательность метаболических процессов и, соответственно, его фармакологический эффект. Оптимальная концентрация ионов кальция в цитоплазме при этом может поддерживаться разными механизмами, в том числе за счет изменения активности Ca²⁺-АТФазы. Из данных рис. 3 видно, что в клетках головного мозга крыс наблюдается резкое увеличение активности Ca²⁺-АТФазы через 0,5 ч после введения ладастена, что, вероятно, связано с необходимостью удаления избыточной концентрации Ca²⁺ из цитоплазмы для исключения их цитотоксического действия. В клетках головного мозга следующий пик активности Ca²⁺-АТФазы выявляется в интервале времени от 8 до 12 ч после введения ладастена, что фактически совпадает со вторым максимумом увеличения активности РКС в этом органе. Стимуляция активности Ca²⁺-АТФазы под действием ладастена еще раз подтверждает его влияние на функциональное состояние Ca²⁺-каналов клетки.

ВЫВОДЫ

1. Ладастен при однократном введении внутрь в дозе 50 мг/кг увеличивает активность протеинкина-

зы С в цитозольной фракции белков головного мозга крыс более чем в два раза.

2. Ладастен оказывает влияние на функциональное состояние кальциевых каналов клетки. Активируемые им Ca^{2+} -каналы блокируются нифедипином (10 мг/кг) и циннаризином (50 мг/кг).

3. В первые часы действия ладастена в поддержании оптимальной концентрации Ca^{2+} в клетках головного мозга крыс участвуют Ca^{2+} -АТФазы.

Работа выполнена по программе “Физико-химическая биология” Президиума РАН, при частичной поддержке гранта РФФИ № 02-04-97904 и программы государственной поддержки ведущих научных школ РФ № 00-15-97810 и НШ 2217.2003.4.

ЛИТЕРАТУРА

1. П. В. Авдонин, В. А. Ткачук, *Рецепторы и внутриклеточный кальций*, Наука, Москва (1994).
2. З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, *Цитология*, **43**(1), 5–32 (2001).
3. И. С. Морозов, В. И. Петров, С. А. Сергеева, *Фармакология адамантанов*, Волгоградская медицинская академия, Волгоград (2001).
4. В. П. Скулачев, *Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи*, Наука, Москва (1962).
5. И. А. Тарчевский, *Сигнальные системы клеток растений*, Наука, Москва (2002).
6. Б. С. Утешев, *Эксперим. и клин. фармакол.*, **55**(4), 69–74 (1992).
7. M. M. Bradford, *Anal. Biochem.*, **72**, 248–254 (1976).
8. U. Kikkawa, R. Minakuchi, Y. Takoi, and Y. Nishizuka, *Methods Enzymology*, **99**, 288–289 (1983).

Поступила 17.06.03

THE EFFECT OF LADASTEN ON THE PROLIFERATIVE ACTIVITY AND APOPTOSIS OF T-LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD

Yu. V. Vakhitova^{1,2}, M. Kh. Salimgareeva², and S. B. Seredenin¹

¹ Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

² Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Bashkortostan, 450054 Russia

The effect of ladasten (50 mg/kg) on the activity of protein kinase C (PKC) in rat brain was studied depending on the duration of drug action. In the initial stage of the drug action, the PKC activity in the cytosol fraction of rat brain proteins exhibits a more than twofold increase. The effect is independent of the presence of exogenous Ca^{2+} and is inhibited by cinnarizine and nifedipine. The optimum Ca^{2+} concentration is maintained due to the activation of Ca^{2+} ATPase. It is concluded that the pharmacological activity of ladasten is related to activation of Ca^{2+} phospholipid-dependent protein kinases.