

Вплив модуляторів сигнальних систем клітини на ферментативний гідроліз фосфоліпідів ленгмюрівських мономолекулярних плівок

О.М. Ляхов*, В.В. Прокопенко, С.Є. Могилевич

*Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії НАН України
вул. Мурманська, 1, Київ, 02094, Україна*

Резюме. Досліджено вплив двох груп біорегуляторів, яким властива протилежна спрямованість дії на аденілатциклазну та фосфоінозитидну сигнальні системи клітини, на гідроліз фосфоліпазою A_2 синтетичного дистеароїлфосфатидилхоліну моношарових плівок. Встановлено, що біорегулятори, які активують аденілатциклазну та(або) інгібують фосфоінозитидну сигнальні системи клітини, у концентрації $1 \cdot 10^{-4}$ М достовірно пригнічують ферментативне розщеплення фосфоліпідів (найбільш сильно — ізадрин, йохімбін, ніфедипін). Для фізіологічно активних речовин, які інгібують аденілатциклазну та(або) активують фосфоінозитидну сигнальні системи, достовірного впливу на перебіг ферментативної реакції не виявлено.

Ключові слова: фосфоліпаза A_2 , фосфоінозитидна сигнальна система клітини, аденілатциклазна сигнальна система клітини, ленгмюрівські моношарові плівки, дистеароїлфосфатидилхолін.

Вступ. Тривалий час при вивченні молекулярних механізмів взаємодії фізіологічно активних речовин (ФАР) із мембранами зусилля фахівців здебільшого зосереджувались на виявленні закономірностей впливу препаратів на білкові компоненти, а ліпідному оточенню при цьому не приділяли достатньої уваги. На сьогодні накопичено велику кількість даних про те, що регуляторна дія ФАР на клітину значною мірою зумовлена їх впливом саме на ліпідний матрикс біомембран [1-3]. Як неспецифічна дія, так і деякі риси специфічної дії ФАР, що модулюють активність аденілатциклазної та фосфоінозитидної сигнальних систем клітини, можуть бути пов'язані із взаємодією біорегуляторів із фосфоліпідами, які відіграють значну роль у клітинній сигналізації [4-6]. Особливо важливими є такі фосфоліпіди, як фосфатидилінозит і фосфатидилхолін, обмін яких регулює проведення зовніш-

нього сигналу в клітину за допомогою фосфоінозитидної сигнальної системи [4-6].

У результаті аналізу впливу найширшого спектра ФАР різних фармакологічних груп встановлено функціональну спільність ксенобіотиків, які подібним чином впливають на активність сигнальних систем клітини [6-8]. Ця подібність виявляється у наявності в різних у хімічному та фармакологічному відношеннях ФАР стереотипного компонента в механізмах їх дії на сигнальні системи клітини. Відповідно до концепції біорегуляторної стереотипії [4-8], більшість відомих ФАР можуть бути поділені на дві великі групи за спрямованістю їх впливу на функціональні ланки аденілатциклазної та фосфоінозитидної сигнальних систем клітини: 1) активатори аденілатциклазної та(або) блокатори фосфоінозитидної сигнальної системи (біорегуляторний клас +I/-II); 2) ФАР, які є інгібіторами аденілатциклазної та(або) активаторами фосфоінозитидної сигнальної системи (біорегуляторний клас -I/+II).

Наявність структурних відмінностей, специфічних для кожної з досліджуваних груп [4-

* Corresponding author.

Tel.: +38044-5732590, fax: +38044-5435152

E-mail address: alexey@bpci.kiev.ua

8], дає змогу припустити, що речовини наведених груп можуть мати певні загальні відмінності дії ФАР при їх взаємодії з молекулярними та надмолекулярними мішенями, безпосередньо не пов'язаними із системами клітинної сигналізації. Зокрема, раніше нами було показано, що біорегуляторний стереотип ФАР може проявлятися при взаємодії з моношаровими плівками з дистеароїлфосфатидилхоліну (ДСФХ) і його еквімолярної суміші з диміристоїлфосфатидилхоліном (ДМФХ) [9, 10], природного лецитину [11], а також із моношаровими плівками із сироваткового альбуміну бика [12].

У цій роботі досліджено характер впливу модуляторів аденілатциклазної та фосфоїнозитидної сигнальних систем на ферментативне розщеплення фосфоліпазою A_2 мономолекулярних плівок Ленгмюра із синтетичного дистеароїлфосфатидилхоліну (ДСФХ).

Матеріали і методи. Для досліджень було відібрано ФАР (Sigma, Serva та Aldrich, США), що модулюють активність зазначених сигнальних систем клітини: активатор β -адренорецепторів ізадрин, блокатор α_2 -адренорецепторів йохімбін, агоніст A_1 -аденозинових рецепторів теофілін; блокатори аденілатциклазної системи неселективний антагоніст β -адренорецепторів пропранолол; активатори фосфоїнозитидної системи: активатор α_1 -адренорецепторів мезатон, агоніст М-холінорецепторів карбахолін, імуностимулятор левамізол, протидіабетичний препарат толбутамід та блокатори цієї системи: H_1 -гістаміноблокатор димедрол, блокатор М-холінорецепторів атропін, неспецифічний блокатор кальцієвих каналів ніфедипін.

У роботі використовували трис-(гідроксиметил)-амінометану гідрохлорид (Tris), дистеароїлфосфатидилхолін (ДСФХ) — х.ч. (Sigma, США); препарат фосфоліпази A_2 (КФ 3.1.1.4) — BioChemika (США). Модулятори сигнальних систем клітини виробництва Sigma, Serva та Aldrich (США). Інші реактиви — виробництва Укрреакхім (Україна).

Модифікація установки. Досліди проведено на модифікованій ленгмюрівській ванні «Mini Trough» фірми «Joyce Loebel Automation» (Велика Британія) з використанням змінної тефлонової ванни об'ємом 120 мл. У ванну вносили субфазу — 0,005 М буферний розчин Tris, рН $8,0 \pm 0,05$, 10 мМ $CaCl_2$ та 35 мМ KCl,

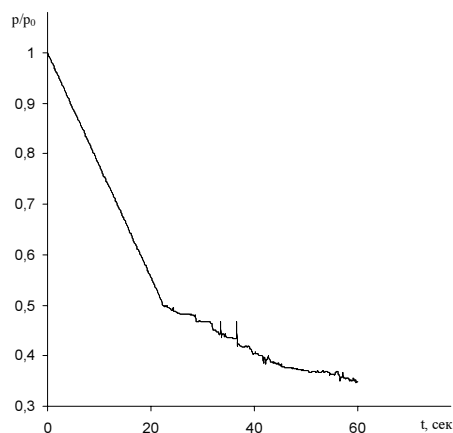


Рис. 1. За прямолінійною ділянкою залежності «поверхневий натяг — час» при дії фосфоліпази A_2 на моношарову плівку з дистеароїлфосфатидилхоліну оцінювали швидкість ферментативного розщеплення ДСФХ.

20 °С [13], у якій розчинено ФАР у концентрації $1 \cdot 10^{-4}$ М. Важкорозчинні у воді ФАР розчиняли, додаючи до розчину диметилсульфоксид (1 мл ДМСО на 0,5 л розчину). Маточний розчин ферменту готували на буферному розчині (20 °С) [13]. Кінцевий вміст ферменту у ванні становив 30 нг (0,006 U).

Ванну було розділено на два нерівні відсіки непроникною перегородкою з тефлону з отвором у верхній частині, який давав змогу проникати молекулам ліпиду моношару і перешкоджав перемішуванню субфаз сусідніх відсіків. На поверхню субфази за допомогою шприца Гамільтона наносили розчин ДСФХ у хлороформі (2 мг ліпиду в 1 мл хлороформу): у менший відсік — 2 мкл розчину, у більший — 4 мкл. Після формування моношару (5 хв) поверхневий натяг моношарової плівки встановлювали на рівні 60 мН/м. Оскільки під час пересування бар'єра поверхня субфази зазнавала нерівномірних збурень, після встановлення поверхневого тиску на рівні 60 мН/м ванну залишали на 5 хв. У менший відсік крізь отвір у непроникній перегородці, який було розміщено нижче поверхні субфази, за допомогою шприца Гамільтона вносили розчин ферменту. Одразу після введення ферменту перемішували субфазу спеціально сконструйованим пристроєм таким чином, щоб запобігти збуренню її поверхні. Зміну поверхневого натягу моношарової плівки вимірювали за допомогою мікротерезів Вільгельмі.

Розрахунок швидкості розщеплення фо-

Таблиця 1

Вплив досліджених ФАР на ферментативне розщеплення фосфоліпазою A_2 дистеароїлфосфатидилхоліну моношарових плівок ($M \pm m, n=34$)

Сполука	Кінетична константа, $k, \text{сек}^{-1}$
Буфер (Tris+CaCl ₂ +KCl, рН 8,0)	0,222±0,003
Буфер (Tris+CaCl ₂ +KCl +ДМСО, рН 8,0)	0,203±0,009*
Ізадрин	0,208±0,007*
Геофілін	0,221±0,005
Йохімбін+ДМСО	0,184±0,006**
Празозин+ДМСО	0,188±0,009
Атропін	0,223±0,004
Димедрол	0,224±0,008
Ніфедипін+ДМСО	0,155±0,016**
Пропранолол	0,224±0,007
Толбутамід	0,221±0,006
Клонідин	0,218±0,009
Мезатон	0,223±0,012
Карбахолін	0,209±0,007*
Левамізол	0,222±0,010

Примітки: * — значення достовірно ($p < 0,05$) відрізняється від значення для буферного розчину; ** — значення достовірно ($p < 0,05$) відрізняється від значення для буферного розчину + ДМСО.

сфоліпідів. Швидкість ферментативного розщеплення ліпідів визначали за зменшенням початкового поверхневого натягу (π_0) через рівні проміжки часу (через кожен 0,1 сек) (t). Розрахунки проводили на прямолінійній ділянці залежності «поверхневий натяг — час», яка становила близько 20-22 сек (рис. 1), за допомогою програми Microcal Origin v. 5.0.

Отримані значення зміни поверхневого натягу (π) від часу (t) можна описати рівнянням реакції нульового порядку $\alpha = \pi/\pi_0 = kt$, де π_0 — початковий поверхневий натяг, 60 мН/м; α — відповідає фракції ще не гідролізованих молекул ліпідів, k — кінетична константа реакції, сек^{-1} [14].

Здобуті дані представлені у вигляді середніх значень плюс-мінус стандартна похибка середнього ($M \pm m$). Оцінка достовірності різниці середніх значень проводилась за t -критерієм Стьюдента при рівні значимості $p < 0,05$.

Результати та обговорення. Результати досліджень розщеплення фосфатидилхоліну фосфоліпазою A_2 у присутності біорегуляторів наведено в таблиці 1.

Достовірно пригнічують ферментативний гідроліз фосфатидилхоліну ізадрин, йохімбін, ніфедипін і карбахолін. Можна припустити, що ці препарати або впливають на конформацію молекули білка, або сприяють видаленню продуктів реакції розщеплення фосфоліпідів із моношарової плівки, що таким чином уповільнює перебіг ферментативної реакції.

Молекула ізадрину, за умов дослідів, може зазнавати хімічного перетворення внаслідок протонування ізопропіламінової групи, що спричиняє появу в атома азоту позитивного заряду. Взаємодія додаткового зарядженого центра із зарядженими бічними групами молекули білка може призводити до електростатичної взаємодії між амінокислотними залишками і спричиняти зміну конформації активного центра ферменту, послаблюючи таким чином розщеплення фосфоліпідів ферментом.

Аналогічно може зменшуватися швидкість ферментативного розщеплення фосфоліпідів під дією карбахоліну, зокрема внаслідок взаємодії зарядженого четвертинного атома азоту з амінокислотними залишками активного центру фосфоліпази. І навпаки, молекула клонідину може набувати часткового негативного заряду завдяки поляризації атомів хлору [15].

Найбільший вплив на ферментативне розщеплення фосфоліпідів серед досліджуваних препаратів виявлено для ніфедипіну, дію якого не можна пояснити лише наявністю денатуруючого агента ДМСО. Під впливом ніфедипіну швидкість розщеплення фосфоліпідів достовірно зменшувалася на 24 %. Здатність ніфедипіну пригнічувати досліджувану ферментативну реакцію можна пов'язати з його властивістю зв'язувати йони кальцію [16], які є кофактором фосфоліпази.

Висновки. З огляду на те, що досліджувані препарати не є селективними активаторами чи інгібіторами фосфоліпаз, слід відзначити, що ФАР, які належать до біорегуляторного класу +I/-II, у концентрації $1 \cdot 10^{-4}$ М достовірно змінюють швидкість ферментативного розщеплення фосфоліпідів, на відміну від ФАР біорегуляторного класу -I/+II.

У попередніх дослідженнях нами показано, що розглянуті ФАР впливають на лентгюрівські мономолекулярні плівки з різних фосфоліпідів. Так, встановлено, що представники двох класів біорегуляторів по-різному впливають на термодинамічні та структурні параметри моношарових плівок з природного лецити-

ну [11], ДСФХ і його еквімолярної суміші з диміристоїлфосфатидилхоліном [9], плівок із ДСФХ за різних температур [10] і моношарових плівок із сироваткового альбуміну бика [12], причому біорегулятори класу +I/-II достовірно змінювали значення обчислених параметрів моношарових плівок, на відміну від біорегуляторів класу -I/+II.

Дослідження впливу ФАР на перебіг ферментативного гідролізу ДСФХ фосфоліпазою A₂ продемонструвало, що дія речовин, які ак-

тивують аденілатциклазну систему та(або) інгібують фосфоінозитидний сигнальний каскад (біорегуляторний клас +I/-II), призводить до уповільнення швидкості ферментативної реакції. Біорегулятори з іншою спрямованістю дії по відношенню до згаданих сигнальних систем (біорегуляторний клас -I/+II) достовірно не впливають на перебіг ферментативного розщеплення фосфоліпідів.

Надійшла в редакцію 02.11.2009 р.

Influence of the cell signaling systems modulators on enzymatic hydrolysis of phospholipids in langmuir monolayer films

A.M. Lyakhov, V.V. Prokopenko, S.Ye. Mogilevich

Institute of Bioorganic Chemistry and Petrochemistry, NAS of Ukraine
1 Murmanska Str., Kyiv, 02094, Ukraine

Summary. The actions of two groups of bioregulators, which have opposite effect to adenylate cyclase and phosphoinositide cellular signaling systems, on enzymatic hydrolysis of the synthetic distearoylphosphatidylcholine of Langmuir monolayer films by phospholipase A₂, were studied. It was found, that bioregulators, which activate adenylate cyclase and(or) inhibit phosphoinositide signaling systems of the cell, in the 10⁻⁴ M concentration, significantly reduce enzymatic cleavage of phospholipids (most strongly — isoprenaline, yohimbine, nifedipine). For physiologically active substances, which inhibit adenylate cyclase and(or) activate phosphoinositide signaling systems, of authentic influence on current of fermentative reaction is not revealed.

Keywords: phospholipase A₂, phosphoinositide and adenylate cyclase signaling systems, Langmuir monolayer films, distearoylphosphatidylcholine, physiologically active substances.

Перелік літератури

1. Sung W.S., Lee J., Lee D.G. Fungicidal effect of piscidin on *Candida albicans*: pore formation in lipid vesicles and activity in fungal membranes // *Biol. Pharm. Bull.* — 2008. — Vol. 31, No. 10. — P. 1906-1910.
2. Flaten G.E., Skar M., Luthman K., Brandl M. Drug permeability across a phospholipid vesicle based barrier: 3. Characterization of drug-membrane interactions and the effect of agitation on the barrier integrity and on the permeability // *Eur. J. Pharm. Sci.* — 2007. — Vol. 30, No. 3-4. — P. 324-332.
3. Suwalsky M., Villena F., Sotomayor C.P. et al. Human cells and cell membrane molecular models are affected *in vitro* by chlorpromazine // *Biophys. Chem.* — 2008. — Vol. 135, No. 1-3. — P. 7-13.
4. Луйк А.И., Могилевич С.Е. Некоторые принципы классификации лекарств // *Эксп. и клин. фармакол.* — 1992. — Т. 55, № 1. — С. 64-67.
5. Химия биорегуляторных процессов / Под ред В.П. Кухаря и А.И. Луйка. — К.: Наукова думка, 1992. — 368 с.
6. Луйк А.И. Иерархическая классификация физиологически активных веществ // *Теор. и эксп. химия.* — 1998. — Т. 34, № 4. — С. 199-212.
7. Танчук В.Ю. Пошук наборів дескрипторів, що підвищують ефективність прогнозування фізіологічної активності речовин на основі їх структури. — Автореф. дис. ... канд. хім. наук. — К., 1996. — 21 с.
8. Пода Г.И., Димогло А.С., Танчук В.Ю. и др. Исследование «структура — активность» физиологически активных веществ, объединенных по общей направленности влияния на клеточную сигнализацию // *Хим.-фарм. журн.* — 1996. — № 6. — С. 29-35.
9. Прокопенко Р.А., Ляхов О.М., Могилевич С.Є., Луйк О.І. Взаємодія модуляторів фосфоліпідної та аденілатциклазної сигнальних систем клітини з фосфоліпідними моношарами // *Доп. НАН України.* — 2001. — № 3. — С. 189-193.
10. Ляхов О.М., Прокопенко В.В., Прокопенко Р.А., Могилевич С.Є. Взаємодія модуляторів фосфоліпідної та аденілатциклазної сигнальних систем клітини з фосфоліпідними моношарами при різних температурах // *Доп. НАН України.* — 2002. — № 12. — С. 113-118.
11. Ляхов О.М., Прокопенко В.В., Прокопенко Р.А., Могилевич С.Є. Особливості взаємодії модуляторів аденілатциклазної та фосфоінозитидної сигнальних систем клітини з ліпідними лангмюрівськими моношарами // *Укр. біохім. журн.* — 2006. — Т. 78, № 6. — С. 64-69.
12. Ляхов О.М., Прокопенко В.В., Могилевич С.Є., Прокопенко Р.А. Взаємодія модуляторів аденілатциклазної та фосфоліпідної сигнальних систем клітини з моношаровими плівками з альбуміну сироватки людини // *Доп. НАН України.* — 2004. — № 4. — С. 179-183.
13. Muderhwa J.M., Brockman H.L. Binding of pancreatic carboxylester lipase to mixed lipid films. Implications for surface organization // *J. of Biol. Chem.* — 1990. — Vol. 265, No. 32. — P. 19644-19651.
14. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. — М.: Мир, 1982. — Т. 1. — 392 с.
15. Ishiyama T., Dohi S., Iida H. The vascular effects of topical and intravenous alpha2-adrenoceptor agonist clonidine on canine pial microcirculation // *Anesth. Analg.* — 1998. — Vol. 86. — Apr. — P. 766-772.
16. Liu H., Zhang L., Li P., Cukier R.I., Bu Y. Exploration of the Ca²⁺ interaction modes of the nifedipine calcium channel antagonist // *Chemphyschem.* — 2007. — Vol. 8, No. 2. — P. 304-314.