

О. М. Ляхов, В. В. Прокопенко

Взаємодія модуляторів аденілатциклазної та фосфоінозитидної сигнальних систем клітини з ленгмюрівськими моношарами, що сформовані з 1-стеароїлфосфатидилхоліну

(Представлено академіком НАН України В. П. Кухарем)

Досліджено взаємодію двох груп біорегуляторів, яким властива протилежна спрямованість дії на аденілатциклазну та фосфоінозитидну сигнальні системи клітини з ленгмюрівськими моношарами, що сформовані з 1-стеароїлфосфатидилхоліну. Виявлено, що біорегулятори, які активують аденілатциклазну та (або) інгібують фосфоінозитидну сигнальні системи, концентрацією $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л достовірно змінюють значення структурних і термодинамічних параметрів ліпідних моношарів.

В результаті аналізу найбільш широкого спектра фармакологічних ефектів лікарських засобів та інших фізіологічно активних речовин (ФАР) було встановлено функціональну спільність ксенобіотиків, які певним чином впливають на активність сигнальних систем клітини — аденілатциклазну та фосфоінозитидну [1–5]. Подібність впливу виявляється в наявності в різних у хімічному й фармакологічному відношеннях ФАР стереотипного компонента в механізмах їх біорегуляторної дії. Згідно з концепцією біорегуляторної стереотипії [1–3], більшість відомих ФАР можна поділити на дві великі групи з урахуванням спрямованості їх впливу на функціональні ланки аденілатциклазної та фосфоінозитидної сигнальних систем клітини: 1) активатори аденілатциклазної та (або) блокатори фосфоінозитидної сигнальних систем (біорегуляторний клас +I/–II); 2) ФАР є інгібітори аденілатциклазної та (або) активатори фосфоінозитидної сигнальних систем (біорегуляторний клас –I/+II).

Наявність загальних структурних відмінностей в межах цих груп біорегуляторів [1–5] дозволяє припустити, що у речовин наведених груп можуть бути певні загальні відмінності й при їх взаємодії з молекулярними та надмолекулярними мішенями, безпосередньо не пов'язаними з системами клітинної сигналізації. Зокрема, як було зазначено раніше, біорегуляторний стереотип ФАР проявлятиметься при взаємодії з моношаровими плівками з природного лецитину [6], дистеароїлфосфатидилхоліну (ДСФХ) та його еквімолярної суміші з димиристоїлфосфатидилхоліном (ДМФХ) [7, 8], а також з моношаровими плівками з ДСФХ за умов його ферментативного гідролізу фосфоліпазою A_2 [9].

Актуальність застосування моношарів з фосфоліпідів для вивчення біорегуляторної дії ФАР зумовлена важливістю врахування впливу ксенобіотиків на ліпідний компонент біомембран. Значну роль у прояві біорегуляторного стереотипу дії ФАР та механізмі фармакологічної дії препаратів може відігравати зміна структурних і термодинамічних параметрів ліпідного оточення рецепторних білків [1, 10].

Утилізація фосфоліпідів у клітині здійснюється за допомогою мембранних фосфоліпаз, які, зокрема, відщеплюють від молекули фосфатидилхоліну вуглеводневі радикали. Утворені при цьому лізоформи ліпідів зменшують мікрров'язкість клітинних мембран, підвищують

їх проникність для речовин міжклітинного середовища, впливають на ліпідне оточення мембранних білків, змінюють активність мембранозв'язаних ферментів [11, 12].

Виходячи з викладеного вище, метою роботи було дослідження впливу модуляторів аденілатциклазної та фосфоінозитидної сигнальних систем клітини на термодинамічні й структурні параметри моношарових плівок Ленгмюра з 1-стеароїлфосфатидилхоліну, продукту ферментативного розщеплення ДСФХ фосфоліпазою A_2 , за умов формування плівок та їх повільного рівномірного стиснення від газоподібної фази до твердотілого стану.

Для досліджень було відібрано широко відомі ФАР (“Sigma”, “Serva” та “Aldrich”, США), які модулюють активність сигнальних систем клітини: активатор β -адренорецепторів ізадрин, блокатор α_2 -адренорецепторів йохімбін, агоніст A_1 -аденозинових рецепторів теофілін, неселективний антагоніст β -адренорецепторів пропранолол, активатор α_1 -адренорецепторів мезатон, агоніст М-холінорецепторів карбахолін, імуностимулятор левамізол, гіпоглікемічний препарат толбутамід, H_1 -гістаміноблокатор димедрол, блокатор М-холінорецепторів атропін, неспецифічний блокатор кальцієвих каналів ніфедипін.

Досліди проводили в модифікованій ленгмюрівській ванні “Mini Trough” фірми “Joyce Loebel Automation” (Великобританія) з використанням з'ємної тefлонової ванни об'ємом 120 мл. У ванну додавали субфазу (0,005 моль/л *трис*-HCl, рН $7,4 \pm 0,1$) при температурі 20 °С, в якій було розчинено ФАР концентрацією $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Важкорозчинні у воді препарати розчиняли з використанням диметилсульфоксиду (ДМСО): 1 мл ДМСО на 0,5 л розчину. На поверхню субфази за допомогою шприцу Гамільтона наносили 5 мкл розчину 1-стеароїлфосфатидилхоліну (“Sigma”, США) у “х. ч.” хлороформі (“Укрреакхім”, Україна) з концентрацією 2 мг ліпиду в 1 мл розчинника. Після формування моношару (7 хв) проводили його стиснення за допомогою рухомого тefлонового бар'єру. Поверхневий тиск вимірювали з використанням мікротерезів Вільгельмі. Ізотермічну стисливість реєстрували самописцем.

Обробка ізотерм стиснення базувалася на результатах досліджень Si-shen Feng та ін. [13]. Детальніше використовувана нами методика розрахунків була описана раніше [7]. Розраховували зміни вільної енергії межі розподілу субфаза — повітря (ΔG), які виникають при появі ліпиду, та енергетичні коефіцієнти, що відповідають взаємодіям субфаза — субфаза, субфаза — ліпід та ліпід — ліпід (H_{11} , H_{12} та H_{22} відповідно).

Результати впливу досліджених ФАР на структурні та енергетичні параметри моношарів з 1-стеароїлфосфатидилхоліну ($M \pm m$, $n = 3-4$) ілюструє табл. 1. Слід зазначити, що використання замість води буферного розчину *трис*-HCl достовірно не впливає на значення параметрів ізотерм стиснення моношарів. Вплив ДМСО також є незначним, але відзначається зростання рівня взаємодій між молекулами ліпиду в моношарі під дією органічного розчинника.

Одним з параметрів, які характеризують ізотерму стиснення моношару, є площа, що припадає на одну молекулу ліпиду при нульовому поверхневому тиску (S_0). Цей параметр визначається шляхом екстраполяції кінцевих ділянок ізотерми, які відповідають стану моношару “тверде тіло”, до нульового значення поверхневого тиску. Значний вплив на параметр було виявлено для атропіну, димедролу та пропранололу, під дією яких значення цього параметра зростає на 12%, а для ізадрину та йохімбіну спостерігається збільшення площі на молекулу відповідно на 0,07 й 0,09 нм² (або на 16 й 20% відносно контролю). Це свідчить про зміну щільності спаккування ліпідного моношару, ймовірно, завдяки вбудовуванню молекул ФАР між молекулами фосфоліпиду (див. табл. 1).

За хімічною будовою ізадрин та йохімбін є дуже різними. Враховуючи наявність великої за розміром конденсованої системи в молекулі йохімбіну, можна припустити таке: відбувається значне екранування заряджених фосфохолінових голівок ліпиду незарядженою частиною йохімбіну, що й спричинює зменшення рівня взаємодії між молекулами води (на 49%) та посилення взаємодії між водою й ліпідом (на 51%). Відсутність конденсованої системи в молекулі ізадрину призводить до меншого вбудовування препарату в моношар та послаблення екранування заряджених залишків ліпиду. Наявність атома азоту ізопропіламінової групи, який може набувати позитивного заряду, призводить до порівнянного з йохімбіном зростання взаємодій між водою та фосфохоліновими залишками ліпиду. Істотне зростання під впливом ізадрину взаємодій між молекулами ліпідів та вільної енергії поверхні (до 118% для ізадрину та 82% для йохімбіну) відбувається внаслідок слабкішого порівняно з йохімбіном екранування фосфохолінових голівок фосфоліпиду молекулами ізадрину.

У присутності атропіну спостерігається збільшення площі, що припадає на молекулу ліпиду за рахунок можливого вбудовування ФАР у структуру моношару. Зміна параметрів взаємодії субфаза — субфаза та субфаза — ліпід дозволяє припустити проникнення препарату в структуру моношару складноефірним угрупованням, тоді як частково позитивно заряджений залишок тропової кислоти молекули атропіну взаємодіє з негативно зарядженими залишками ліпиду, що може призвести й до зростання вільної енергії.

Можна припустити, що вплив димедролу на моношар відбувається таким чином: у структуру моношарової плівки вбудовуються фенільні радикали [14], а диметиламіноетильне угруповання, яке може нести на атомі азоту частковий позитивний заряд, взаємодіє з фосфохоліновими голівками ліпиду. При цьому посилюються взаємодії між молекулами води та ліпиду, а також між молекулами ліпиду (параметри H_{12} й H_{22}). Припустімо, що в прояві відомої мембранотропної активності димедролу [14] значну роль може відігравати взаємодія димедролу з фосфоліпідним бішаром.

Таблиця 1

Сполука	S_0 , нм ² /молек	H_{11} , кал./моль	H_{12} , кал./моль	H_{22} , кал./моль	ΔG , кал./моль
Вода	0,42 ± 0,02	36 ± 4	-46 ± 5	-331 ± 12	-21 ± 4
Буфер	0,43 ± 0,01	40 ± 4	-40 ± 1	-339 ± 13	-17 ± 1
Буфер + ДМСО	0,46 ± 0,01	43 ± 3	-49 ± 2	(-393 ± 20)*	-22 ± 1
<i>Ізадрин</i>	(0,50 ± 0,03)*	32 ± 3	(-61 ± 3)*	(-407 ± 9)*	(-37 ± 3)*
<i>Теофілін</i>	0,45 ± 0,03	35 ± 4	-43 ± 6	-319 ± 12	-23 ± 4
<i>Йохімбін</i> + ДМСО	(0,55 ± 0,03)**	(22 ± 4)**	(-74 ± 4)**	-386 ± 11	(-40 ± 4)**
<i>Празозин</i> + ДМСО	0,44 ± 0,03	(24 ± 9)**	(-67 ± 9)**	-433 ± 23	(-40 ± 9)**
<i>Атропін</i>	0,48 ± 0,03	32 ± 3	(-55 ± 8)*	(-468 ± 27)*	(-28 ± 5)*
<i>Димедрол</i>	(0,48 ± 0,02)*	35 ± 2	(-65 ± 8)*	-369 ± 20	(-25 ± 4)*
<i>Ніфедипін</i> + ДМСО	(0,40 ± 0,03)**	(17 ± 5)**	(-27 ± 2)**	(-261 ± 14)**	(-12 ± 3)**
Пропранолол	0,48 ± 0,04	36 ± 2	(-62 ± 4)*	-355 ± 15	(-22 ± 2)*
Толбутамід	0,41 ± 0,04	43 ± 2	-35 ± 4	-299 ± 18	-22 ± 3
Клонідин	0,41 ± 0,02	44 ± 3	(-53 ± 6)*	(-369 ± 7)*	(-23 ± 3)*
Мезатон	0,42 ± 0,02	43 ± 4	-46 ± 7	-311 ± 12	-19 ± 5
Карбахолін	0,47 ± 0,03	(50 ± 3)*	(-48 ± 2)*	-374 ± 16	-20 ± 2
Левамізол	0,44 ± 0,03	42 ± 6	-43 ± 4	-336 ± 13	-19 ± 4

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

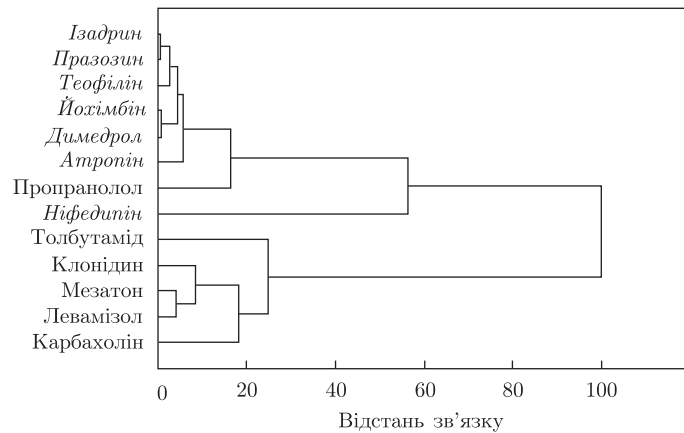


Рис. 1. Кластерний аналіз впливу ФАР на моношарові плівки з 1-стеароїлфосфатидилхоліну.
 Тут і на рис. 2: Курсивом позначено речовини біорегуляторного класу +I/–II, прямим шрифтом — класу –I/+II

Вплив пропранололу, для якого характерна мембранотропна активність [15], виявився близьким до впливу димедролу. Обидва препарати є катіонними амфифільними лікарськими засобами [10], які проявляють місцеву анестезувальну дію завдяки своїй неспецифічній мембранотропній активності. Під впливом молекули карбахоліну з позитивним зарядом збільшується взаємодія між водою та ліпідом, а також між молекулами ліпиду завдяки дії заряджених груп препарату на залишки фосфохоліну. Ймовірно, що таким чином відбувається і взаємодія клонідину з моношаровою плівкою.

Значний вплив на моношарові плівки з 1-стеароїлфосфатидилхоліну виявлено для ніфедипіну, під дією якого відбувалося істотне зменшення всіх розрахованих параметрів моношарів. Можна припустити, що молекули ніфедипіну не спроможні вбудуватися в моношарову плівку, але при цьому їх дія призводить до дегідратації моношару, внаслідок чого зменшується площа на одну молекулу ліпиду (на 13%), значно послаблюються взаємодії між молекулами води (на 60%) та зменшується кількість контактів між молекулами води та ліпиду (на 45%). Відбувається дуже різке послаблення міжліпідних взаємодій (на 34%), що також спричинює значне зменшення вільної енергії поверхні (на 45%). Одним з імовірних пояснень такого послаблення є значна роль молекул води у прояві взаємодій між ліпідними молекулами.

Отже, значний вплив на розраховані термодинамічні параметри виявлено головним чином для ФАР, які активують аденілатциклазну або інгібують фосфоінозитидну сигнальні системи клітини (найбільш сильний — для йохімбіну, ізадрину, атропіну та ніфедипіну).

У попередніх дослідженнях було отримано результати впливу ФАР на моношари з синтетичного ДСФХ [7]. Взаємодія ФАР з ліпідами моношарових плівок з ДСФХ та з продукту його ферментативного гідролізу 1-стеароїлфосфатидилхоліну відбувається значною мірою таким самим чином.

Для інтегральної оцінки спрямованості дії речовин на структурні та термодинамічні параметри ленгмюрівських плівок з 1-стеароїлфосфатидилхоліну нами використано метод кластерного аналізу за допомогою програми STATISTICA'99 Edition для Windows.

За результатами кластерного аналізу (рис. 1), ФАР можна віднести до двох груп: 1) ФАР, що активують аденілатциклазну та (або) інгібують фосфоінозитидну сигнальні системи (ізадрин, йохімбін, атропін та димедрол) — біорегуляторний клас +I/–II; 2) ФАР з проти-

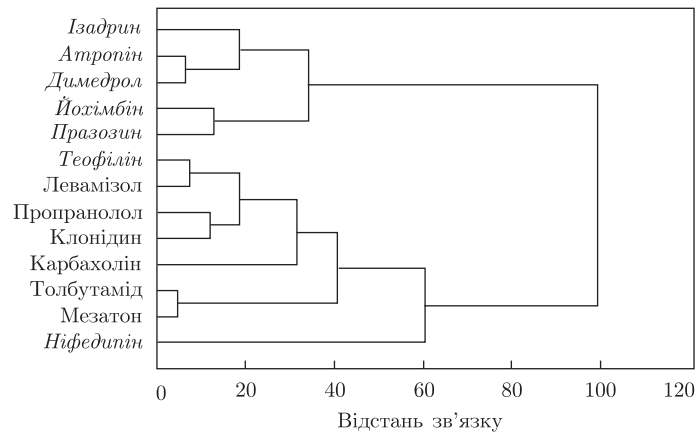


Рис. 2. Кластерний аналіз впливу ФАР на моношарові плівки з ДСФХ

лежною спрямованістю дії відносно сигнальних систем клітини: карбахолін, мезатон, левамізол та толбутамід — біорегуляторний клас –I/+II. Пропранолол класифіковано невірно.

Для порівняння нами наведено результати кластерного аналізу впливу ФАР на моношари з ДСФХ (рис. 2), що були отримані раніше [7]. Як видно з рис. 2, розділення препаратів у випадку ДСФХ та лізоформи ДСФХ значною мірою збігаються.

Таким чином, метод мономолекулярних плівок дозволяє розрізнити біорегулятори з різною загальною спрямованістю їх дії щодо сигнальних систем клітини. Використовуючи кластерний аналіз, нами встановлено, що за характером неспецифічного впливу на ліпідні моношарові плівки Ленгмюра біорегулятори можна поділити на дві групи відповідно загальної спрямованості їх дії на клітинні системи трансдукції сигналу. Результати проведених досліджень свідчать про те, що завдяки взаємодії біорегулятор — ліпід було зумовлено неспецифічні біорегуляторні ефекти речовин першої з двох розглянутих груп біорегуляторів. Крім цього, структурно-функціональна спільність біорегуляторів у межах двох груп, що встановлена нами в попередніх дослідженнях, може бути поширена не тільки на взаємодію біорегуляторів з їх безпосередніми білковими мішенями (стосовно двох універсальних сигнальних систем клітини), а й на взаємодію з ліпідним матриксом біологічних мембран (його фосфоліпідним компонентом).

1. *Кухарь В. П., Луйк А. И., Могилевич С. Е. и др.* Химия биорегуляторных процессов. – Киев: Наук. думка, 1992. – 368 с.
2. *Луйк А. И., Могилевич С. Е.* Некоторые принципы классификации лекарств // Эксперим. и клинич. фармакология. – 1992. – **55**, № 1. – С. 64–67.
3. *Луйк А. И.* Иерархическая классификация физиологически активных веществ // Теорет. и эксперим. химия. – 1998. – **34**, № 4. – С. 199–212.
4. *Ляхов О. М.* Взаємодія фізіологічно-активних речовин з ленгмюрівськими мономолекулярними плівками: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 2006. – 19 с.
5. *Прокопенко Р. А.* Взаємозв'язок між структурою та загальним профілем фізіологічної активності речовин, що діють на скорочуваність гладеньких м'язів: Автореф. дис. ... канд. біол. наук. – Київ, 1996. – 22 с.
6. *Ляхов О. М., Прокопенко В. В., Прокопенко Р. А., Могилевич С. Є.* Особливості взаємодії модуляторів аденілатциклазної та фосфоінозитидної сигнальних систем клітини з ліпідними ленгмюрівськими моношарами // Укр. біохім. журн. – 2006. – **78**, № 6. – С. 64–69.
7. *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.

8. *Ляхов О. М., Прокопенко В. В., Прокопенко Р. А., Могилевич С. Є.* Взаємодія модюляторів фосфоліпідної та аденілатциклазної сигнальних систем клітини з фосфоліпідними моношарами при різних температурах // Там само. – 2002. – № 12. – С. 113–118.
9. *Ляхов О. М., Прокопенко В. В., Могилевич С. Є.* Вплив модюляторів сигнальних систем клітини на ферментативний гідроліз фосфоліпідів лєнгмюрівських мономолекулярних плівок // Ukr. Bioorg. Acta. – 2010. – № 5. – С. 43–48.
10. *Kodavanti V. P., Mehendale H. M.* Cationic amphiphilic drugs and phospholipid storage disorder // Pharm. Rev. – 1990. – **42**, No 4. – P. 327–354.
11. *Кучеренко Н. Е., Васильев А. Н.* Липиды. – Киев: Вища шк., 1985. – 248 с.
12. *Антонов В. Ф., Смирнова Е. Ю., Шевченко Е. В.* Липидные мембраны при фазовых превращениях. – Москва: Наука, 1992. – 136 с.
13. *Feng Si-shen, Brockman L. H., Mac-Donald R. C.* On osmotic-type equations of state for liquid-expanded monolayers of lipids at the air-water interface // Langmuir. – 1994. – **10**. – P. 3188–3194.
14. *Mizuuch H., Katsura T., Hashimoto Y., Inui K.* Transepithelial transport of diphenhydramine across monolayers of the human intestinal epithelial cell line Caco-2 // Pharm. Res. – 2000. – **17**, No 5. – P. 539–545.
15. *Debabrata D.* Characterisation of the effects of propranolol on the physical state of platelets membrane // Arch. Biochem. and Biophys. – 1990. – **276**, No 2. – P. 343–347.

*Інститут біоорганічної хімії та нафтохімії
НАН України, Київ*

Надійшло до редакції 31.05.2010

A. M. Lyakhov, V. V. Prokopenko

Interaction of modulators of the adenylate cyclase and phosphoinositide signaling systems with Langmuir monolayers made of 1-stearoylphosphatidylcholine

Interactions of two groups of bioregulators, which oppositely affect the activity of the adenylate and phosphoinositide cellular signaling systems, with Langmuir monolayer films made of 1-stearoylphosphatidylcholine are studied. It is found that bioregulators, which activate the adenylate cyclase and (or) inhibit phosphoinositide signaling systems of a cell, significantly influence the structural and energy characteristics of lipid monolayers at a concentration of 10^{-4} M.