



УДК 577.152.271+616.348-002+616.34

© 2008

О. О. Кравченко, О. В. Дробінська, Л. І. Остапченко

**Активність Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ в епітеліоцитах
слизової оболонки товстої кишки щурів за умов
розвитку коліт-асоційованого канцерогенезу**

(Представлено академіком НАН України Я. Б. Блюмом)

The free cytoplasmic Ca^{2+} content and Ca^{2+} -dependent protein kinase activities are investigated in membrane and cytosolic fractions of rat colonocyte under the development of an experimental model of colitis-associated carcinogenesis. The increase of free endocellular Ca^{2+} by 2 times as compared with control during the formation and development of colon inflammation is shown. It is established that enzymes of Ser-Thr phosphorylation mediate ulcerative colitis-associated carcinogenesis. These enzyme activities increase and reach their peak values in cytosol in the second week for protein kinase C, the fourth one for Ca/calmodulin-dependent kinase, and the tenth week in the membrane fraction.

Виразковий коліт (ВК) — хронічне захворювання, яке характеризується дистрофічними й атрофічними деструктивними змінами слизової оболонки товстої кишки, супроводжується порушенням її секреторних і моторних функцій. Наслідком виразкового коліту є розвиток злоякісних новоутворень — колоректального раку [1]. Відомо, що в складний і багатоступеневий процес запалення та неопластичної трансформації клітин залучені Ca^{2+} -залежні сигнальні системи. Іони Ca^{2+} , виконуючи роль універсального внутрішньоклітинного месенджера, впливають на активність Ca^{2+} , фосфоліпідзалежної протеїнкінази (ПКК) та Ca^{2+} /кальмодулінзалежної протеїнкінази (КМПК). Підвищення проникності мембран, викликане дією цитотоксичних факторів призводить до зростання концентрації вільного кальцію в цитоплазмі, порушенню функціонування кальціезалежних протеїнкіназ і, як наслідок, до розладів таких важливих процесів, як експресія генів, диференціація, проліферація клітин, змінам секреторних й екскретоних функцій епітеліоцитів товстого кишечника [2]. На сьогодні в літературі відсутні дані щодо участі Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ у біохімічних механізмах розвитку коліт-асоційованого канцерогенезу.

Метою даної роботи було дослідити активність Ca^{2+} , фосфоліпідзалежної протеїнкінази і Ca^{2+} /кальмодулінзалежної протеїнкінази та визначити вміст іонів Ca^{2+} у епітеліоцитах слизової оболонки товстої кишки щурів за умов розвитку коліт-асоційованого канцерогенезу.

Матеріали та методи досліджень. Експерименти проводили на нелінійних білих щурах самцях з початковою масою 160–180 г. Модель коліт-асоційованого канцерогенезу відтворювали введенням декстрансульфат натрієвої солі (ДСН) і специфічного канцерогену — 1,2-диметилгідразину (ДМГ) за методичними рекомендаціями [3].

Тварин декапітували на 1, 3 і 7 добу розвитку виразкового коліту і на 2, 4, 6, 8-й і 10-й тиждень дії канцерогену. Розвиток патологій діагностували гістологічно, за специфічними симптомами та ураженнями слизової оболонки товстої кишки.

Епітеліальні клітини слизової оболонки товстої кишки виділяли за рекомендаціями W. Roediger та S. Truelove (1979).

Гомогенат клітин використовували для очищення фракцій плазматичних мембран та цитозолу методом диференційного центрифугування на градієнті 30% сахарози ($\rho = 1,127$) [4].

Активність ПКС і Ca^{2+} /кальмодулінзалежної протеїнкіназ визначали в препаратах плазматичних мембран і цитозолі колоноцитів за включенням ^{32}P з $\gamma - ^{32}\text{P}/\text{АТР}$ до специфічних субстратів фосфотрансферазної реакції [5, 6]. Питому активність ферментів виражали у пікомолях $^{32}\text{P}_\text{н}$ за 1 хв на 1 мг білка. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорд (1939).

Вміст вільного цитозольного кальцію виміряли за допомогою зонда індо-1 (Sigma, США) [7]. Отримані колоноцити ($2 \cdot 10^7/\text{мл}$) навантажували зондом (5 мкмоль) протягом 30 хв при 25 °С, відмивали (600 g, 15 хв) та ресуспендували у буфері. Спектр флуоресценції індо-1 визначали на спектрофлуориметрі СДЛ-2 (ЛОМО, Росія), $\lambda_{\text{зб}} - 350$ нм, $\lambda_{\text{випр}} - 410$ й 495 нм. Концентрацію Ca^{2+} розраховували за двохвильовим параметром R . Вміст Ca^{2+} виражали у відсотках відносно контролю.

Статистичну обробку результатів та побудову графіків проводили методами варіаційної статистики з використанням t -критерію Стьюдента.

Результати та їх обговорення. Характеризуючись високим регенераторним потенціалом, клітини слизової оболонки товстої кишки (СОТК) забезпечують фізіологічну здатність до її швидкого відновлення. Ця властивість СОТК реалізується завдяки балансу між проліферацією, диференціацією, апоптозом та десквамацією епітеліоцитів. Хоча внутрішньоклітинні механізми, що регулюють функціонування та клітинний цикл колоноцитів не є достатньо вивченими, проте є переконливі докази, які свідчать про вирішальну роль Ca^{2+} -залежних сигнальних каскадів у зазначених вище процесах [8].

У результаті проведених нами морфологічних досліджень було показано, що на 3 добу експерименту при ініціації виразкового коліту 1% розчином декстрансульфат натрієвої солі розвиваються типові гострі ерозивно-запальні ушкодження слизової оболонки, геморагії та набряки, які супроводжуються характерними симптомами коліту (діарея) і зберігаються на 7 добу експерименту. Згідно з гістологічними дослідженнями в ці строки, спостерігалися атрофічні зміни клітин слизової, інтенсифікація злущування епітеліального шару, нейтрофільна інфільтрація в слизовій оболонці товстого кишечника. На фоні розвитку коліту при щотижневому введенні специфічного канцерогену 1,2-диметилгідразину ми спостерігали локальні потовщення м'язового шару кишечника за рахунок лейкоцитарної інфільтрації, поступову дискompенсацію (хаотичне розташування) та звуження просвіту залоз за рахунок атрофії (6-й тиждень), на 8-й тиждень — дисплазію, метаплазію і трансформацію клітин, а на 10-й тиждень у 20% щурів виявлено аномальні новоутворення в проксимальному відділі товстого кишечника, які мали вигляд щільних наростів правильної округлої форми діаметром від 1 до 5 мм і характеризувались як помірно диференційована аденокарцинома з проростанням у м'язовий шар.

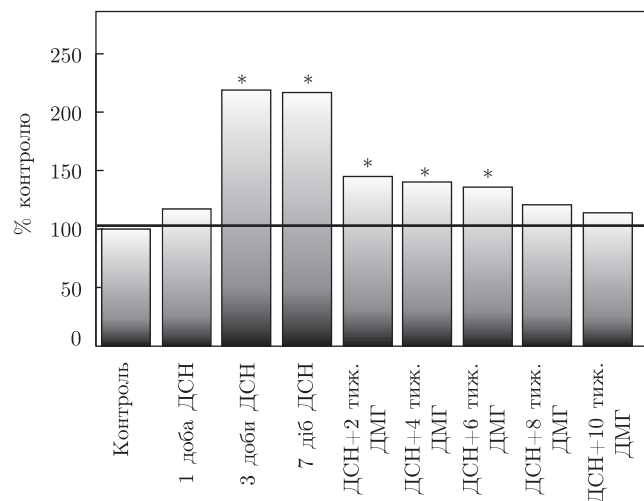


Рис. 1. Вміст цитозольного Ca^{2+} у колоноцитах щурів за умов розвитку виразкового коліту та дії канцерогену.

Тут і на рис. 2, 3: зірочка (*) — $P \leq 0,05$

З метою з'ясування участі кальцію та Ca^{2+} -залежних процесів у розвитку коліт-асоційованого канцерогенезу було досліджено вміст Ca^{2+} у цитозолі клітин слизової оболонки товстого кишечника. Встановлено, що на 3 і 7 добу введення декстрансульфат натрієвої солі, запалення слизової оболонки товстого кишечника і загострення симптомів коліту (діарея) супроводжується зростанням рівня цитоплазматичного кальцію в епітеліоцитах більш ніж в 2 рази порівняно з контрольною групою тварин (рис. 1). Встановлені зміни можуть бути пов'язані з активацією кальцієзалежних хлорних каналів, що призводить до порушення всмоктування води та електролітів [2]. На культурі клітин слизової оболонки товстої кишки людини показано, що дія Ca^{2+} -іонофорів і тапсигаргіну (інгібітора Ca^{2+} -АТФази) спричинювала активацію експресії прозапального інтерлейкіну-8, а вплив блокаторів Ca^{2+} -каналів призводив до пригнічення запалення при експериментальному коліті [9].

Подальше щотижневе введення канцерогену (1,2-диметилгідразину) призводило до поступового зниження рівня кальцію і зменшення зовнішніх проявів запалення. Протягом від 2, 4-х до 10-ти тижнів впливу диметилгідразину рівень Ca^{2+} був на 50, 40–14% відповідно, вище контрольних значень (див. рис. 1).

Іони кальцію, що є одним з універсальних вторинних месенджерів, залучені в модуляцію процесів проліферації, диференціації, експресії генів, м'язового скорочення, секреції гормонів та нейротрансмітерів тощо. Регуляція клітинного метаболізму внутрішньоклітинним кальцієм реалізуються через фосфорилування певних ефекторних білків Ca^{2+} -залежними протеїнкіназами — протеїнкіназою С і Ca^{2+} //кальмодулінзалежною протеїнкіназою. Ці ферменти каталізують фосфотрансферазні реакції — перенесення фосфатного залишку від АТФ на гідроксильні групи серину або треоніну білків, змінюючи їх функціональну активність [10].

Дослідження активності Ca^{2+} , фосфоліпідзалежної протеїнкінази у фракціях цитоплазматичних мембран та цитозолі епітеліоцитів при розвитку коліт-асоційованого канцерогенезу показало внутрішньоклітинний перерозподіл активності ферменту (рис. 2). Так, вже на 1 добу дії ДСН встановлено статистично достовірне зменшення активності ПКС у фракції плазматичних мембран клітин і зростання цього показника в 1,7 рази у цитоплазмі. Зни-

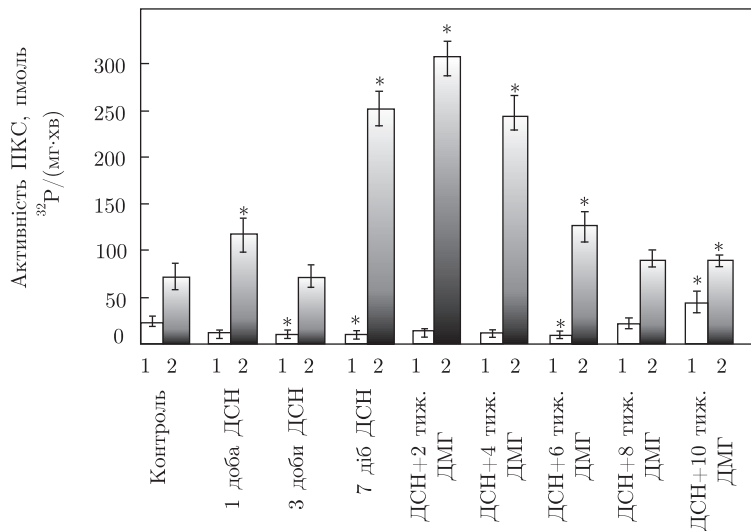


Рис. 2. Протеїнкіназна активність (ПКС) у колоноцитах щурів при розвитку виразкового коліту та дії канцерогену.

1 — Фракція цитоплазматичних мембран; 2 — цитозоль

ження активності ПКС у фракції плазматичних мембран може бути зумовлене порушенням структурно-функціонального стану мембран епітеліоцитів, яке має місце при запаленні, що показано раніше [11, 12]. Активність ПКС у цитозолі колоноцитів зростала в 3,5 раза на 7 добу експериментальних досліджень. Результати узгоджуються з даними інших авторів, які показали підвищення активності ПКС за умов розвитку експериментального коліту, індукованого оцтовою та тринітробензолсульфоною кислотами [13].

При щотижневому введенні канцерогену на 2-й тиждень спостерігався подальший ріст активності ПКС більше ніж у 4 рази в цитозольній фракції колоноцитів. В наступні терміни спостереження відмічено поступове зниження досліджуваного параметра. Так, на 4-й тиждень дії 1,2-диметилгідразину активність у цитозольній фракції ПКС становила 341% порівняно з контролем, на 6-й тиждень — 177%, а на 8-й й 10-й — 127 й 125% відповідно. При цьому на 10-й тиждень експерименту зафіксовано зростання активності ПКС у фракції плазматичних мембран.

Отримані результати дають підстави припустити, що запальні процеси, які супроводжують виразковий коліт є пусковим чинником для нагромадження іонів кальцію і активації ПКС, що в подальшому може призвести до інтенсифікації неконтрольованої проліферації, інгібування диференціації та апоптозу.

Крім ПКС, у клітинах присутня ще одна родина серин-треонінових протеїнкіназ, для активації яких необхідний комплекс кальцію з кальмодуліном. Основними білковими субстратами ферментів є еукаріотичний фактор елонгації 2 (фосфорилування якого інгібує синтез білків), легкі ланцюги міозину (які забезпечують скорочення та рух клітин і органел), транскрипційні фактори, протеїнкіназа В (РКВ/Akt) та фосфоліпаза А₂. На сьогодні практично відсутні дані щодо особливостей функціонування Ca²⁺/кальмодулінзалежних протеїнкіназ у клітинах товстого кишечника за умов розвитку коліт-асоційованого канцерогенезу. Відомо, що КМ-кіназа інгібує транспорт іонів Na⁺, стимулює секрецію хлору і кальцію через мембрани клітин слизової оболонки кишечника [14]. Тому є підстави вважати, що даний фермент може відігравати певну роль у нормальному функціонуванні епітеліоцитів

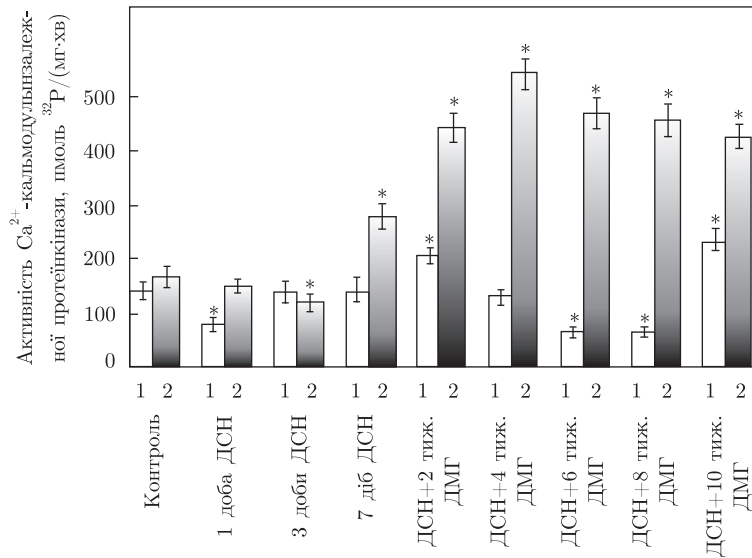


Рис. 3. Ca²⁺-кальмодулінзалежна протеїнкіназна активність у колоноцитах щурів при розвитку виразкового коліту та дії канцерогену.

1 — Фракція цитоплазматичних мембран; 2 — цитозоль

кишечника і зміни його активності можуть обумовлювати патологічні розлади у функціонуванні клітин і органу в цілому.

Дослідження активності Ca²⁺/кальмодулінзалежної протеїнкінази при розвитку експериментального виразкового коліту показали, що активність мембранозв'язаної фракції даного ферменту знижувалась майже вдвічі протягом першої доби експерименту (рис. 3). У подальші терміни розвитку запалення статистично достовірних змін активності мембранозв'язаної КМПК встановити не вдалося. Активність досліджуваної протеїнкінази в цитозолі помірно знижувалась протягом 1–3 доби експерименту, а на 7 добу розвитку виразкового коліту зростала, перевищуючи контрольні значення на 70%.

На сьогодні роль Ca²⁺/кальмодулінзалежних кіназ у запальних процесах інтестинального епітелію залишається не визначеною. Однак відомо, що при обробці цим ферментом культури клітин товстого кишечника спостерігається зростання секреції аніонів, інгібування абсорбції Na⁺ Na/H-обмінником та активація Na⁺-HCO₃-котранспортера (NBC) [14]. Враховуючи це, можна припустити, що зміни активності досліджуваного нами ферменту цілком можуть впливати на сорбційно-секреторні властивості колоноцитів при розвитку коліту і зумовлювати діарею.

Дослідження активності КМПК при коліт-асоційованому канцерогенезі показали її різнонаправлені зміни у фракції плазматичних мембран у різні терміни спостереження. Протягом перших двох тижнів введення канцерогену зафіксовано зростання зазначеного параметра на 47%, у більш пізні строки (на 4, 6 і 8-й тиждень) активність статистично достовірно знижувалась, на 10-й тиждень досягала свого максимального значення і на 65% перевищував контрольні параметри.

Активність Ca²⁺/кальмодулінзалежної кінази в цитозолі колоноцитів щурів за дії канцерогену (ДМГ) була високою протягом усього періоду спостереження. Максимальне значення даного показника, яке перевищувало контроль в 3 рази, було зафіксоване на 4-й тиждень впливу ДМГ. Такі результати вказують на участь КМПК у регуляції процесів, які

можуть впливати на трансформацію клітин слизової оболонки товстого кишечника під час розвитку онкопатології. Застосування антагоністів Ca/кальмодуліну для обробки культури клітин раку товстого кишечника людини спричинювало значну активацію апоптозу і при цьому було зафіксовано активацію ERK-сигнального каскаду [15].

Отже, в результаті проведених досліджень, встановлено збільшення вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} на 3 і 7 добу розвитку виразкового коліту, в ці самі терміни зафіксовано зростання активності досліджуваних Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ у цитозольній фракції клітин слизової оболонки товстого кишечника. Показано, що тенденція до зростання активності протеїнкінази C і КМПК у цитозолі зберігалась і в подальші терміни досліджень за умов дії канцерогену протягом 6-ти (для ПКС) та 10-ти (для КМПК) тижнів.

Інгібування активності Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ у мембранних препаратах колоноцитів під час запалення можна пояснити порушенням нормального структурно-функціонального стану мембран. Це може бути обумовлено дією протизапальних факторів, які активують циклооксигенази та фосфоліпази і спричинюють деградацію фосфоліпідів. Крім того, активні форми кисню, які утворюються під час запалення, мають цитотоксичну дію, ушкоджують мембрани епітеліальних клітин СОТК, викликають зміни в їх проникності.

Таким чином, розвиток виразкового коліту та злаякісна трансформація клітин слизової оболонки товстого кишечника супроводжуються значними коливаннями вмісту внутрішньоклітинного кальцію і, як наслідок, порушеннями функціонування систем фосфорилування, що проявляється у зміні активності Ca^{2+} -залежних протеїнкіназ.

1. Daniel K., Podolsky M. D. Inflammatory bowel disease // The new Eng. J. of Med. – 2002. – **347**, No 6. – P. 417–429.
2. Kunzelmann K., Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease // Phys. Rev. – 2002. – **82**, No 1. – P. 245–289.
3. Jian-Guo Wang, Dong-Fei Wang, Bing-Jian Lv, Jian-Min Si. A novel mouse model for colitis-associated colon carcinogenesis induced by 1, 2-dimethylhydrazine and dextran sulfate sodium // World J. Gastroenterol. – 2004. – **10**, No 20. – P. 2958–2962.
4. Рубальченко В. К., Коганов М. М. Структура и функции мембран. Практикум. – Киев: Вища шк., 1988. – 195 с.
5. Остапченко Л. И., Протас А. Ф., Васильев А. Н., Кучеренко Н. Е. Выделение и некоторые свойства Ca^{2+} , фосфолипидзависимой протеинкиназы серого вещества головного мозга крыс на раннем этапе воздействия ионизирующей радиацией // Радиобиология. – 1986. – **26**, № 6. – С. 761–765.
6. Ikebe M., Reardon S. Phosphorylation of smooth myosin light chain kinase by smooth muscle Ca^{2+} /calmodulin dependent protein kinase // J. Biol. Chem. – 1990. – **265**, No 16. – P. 8975–8978.
7. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // Ibid. – 1985. – **260**. – P. 3440–3450.
8. Bostick R., Boldt M., Darif M. et al. Calcium and colorectal epithelial cell proliferation in ulcerative colitis // Cancer Epidemiol., Biomarkers & Prevention. – 1997. – **6**. – P. 1021–1027.
9. Zeytunlu M., Korkut M., Akgün E. et al. The comparative effects of calcium channel blockers in an experimental colitis model in rats // Turkish J. Gastroenterology. – 2004. – **15**, No 4. – P. 243–249.
10. Гусев Н. Б. Внутриклеточные Ca-связывающие белки // Сорос. образоват. журн. – 1998. – № 5. – С. 2–9.
11. Morita H., Nakanishi K., Dohi T. et al. Phospholipid turnover in the inflamed intestinal mucosa: arachidonic acid-rich phosphatidyl/plasmemyl-ethanolamine in the mucosa in inflammatory bowel disease // J. Gastroenterol. – 1999. – **34**, No 1. – P. 46–53.
12. Kruidenier L., Kuiper I., Lamers C., Verspaget H. Intestinal oxidative damage in inflammatory bowel disease: semi-quantification, localization, and association with mucosal antioxidants // J. Pathol. – 2003. – **201**, No 1. – P. 28–36.
13. James F., Brown, Qing Chang, Brian D., Soper, Barry L. Tepperman protein kinase C mediates experimental colitis in the rat // Amer. J. Phys. Gastrointest Liver Phys. – 1999. – **276**. – P. 583–590.

14. *Shim J. S., Lee J., Kim K. N., Kwon H. J.* Development of a new Ca^{2+} /calmodulin antagonist and its anti-proliferative activity against colorectal cancer cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2007. – **359**, No 3. – P. 747–751.
15. *Rodriguez-Mora O. G., LaHair M. M., McCubrey J. A., Franklin R. A.* Calcium/calmodulin-dependent kinase I and calcium/calmodulin-dependent kinase kinase participate in the control of cell cycle progression in MCF – 7 human breast cancer cells // *Cancer Research.* – 2005. – **65**, No 125. – P. 408–416.

*Київський національний університет
ім. Тараса Шевченка*

Надійшло до редакції 12.05.2008