

## ИНГИБИТОРЫ ФОСФОЛИПАЗЫ $A_2$ МОДУЛИРУЮТ ВЛИЯНИЕ ГЛУТОКСИМА И МОЛИКСАНА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЙ УРОВЕНЬ $Ca^{2+}$ В МАКРОФАГАХ

© 2015 г. З. И. Крутецкая, Л. С. Миленина, А. А. Наумова,  
В. Г. Антонов, академик РАН А. Д. Ноздрачев

Поступило 01.06.2015 г.

С помощью флуоресцентного  $Ca^{2+}$ -зонда Fura-2AM исследовали возможное участие ключевого фермента каскада метаболизма арахидоновой кислоты, фосфолипазы  $A_2$ , в действии препаратов глутоксим и моликсан на внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  в макрофагах. Впервые показано, что преинкубация макрофагов с классическим ингибитором фосфолипазы  $A_2$  – 4-бромфенацил-бромидом, а также с глюкокортикостероидами преднизолоном и дексаметазоном приводит к значительному подавлению  $Ca^{2+}$ -ответов, индуцируемых глутоксимом или моликсаном в макрофагах. Полученные результаты свидетельствуют об участии фосфолипазы  $A_2$  и каскада метаболизма арахидоновой кислоты в сигнальных процессах, индуцируемых глутоксимом и моликсаном в макрофагах.

DOI: 10.7868/S0869565215320286

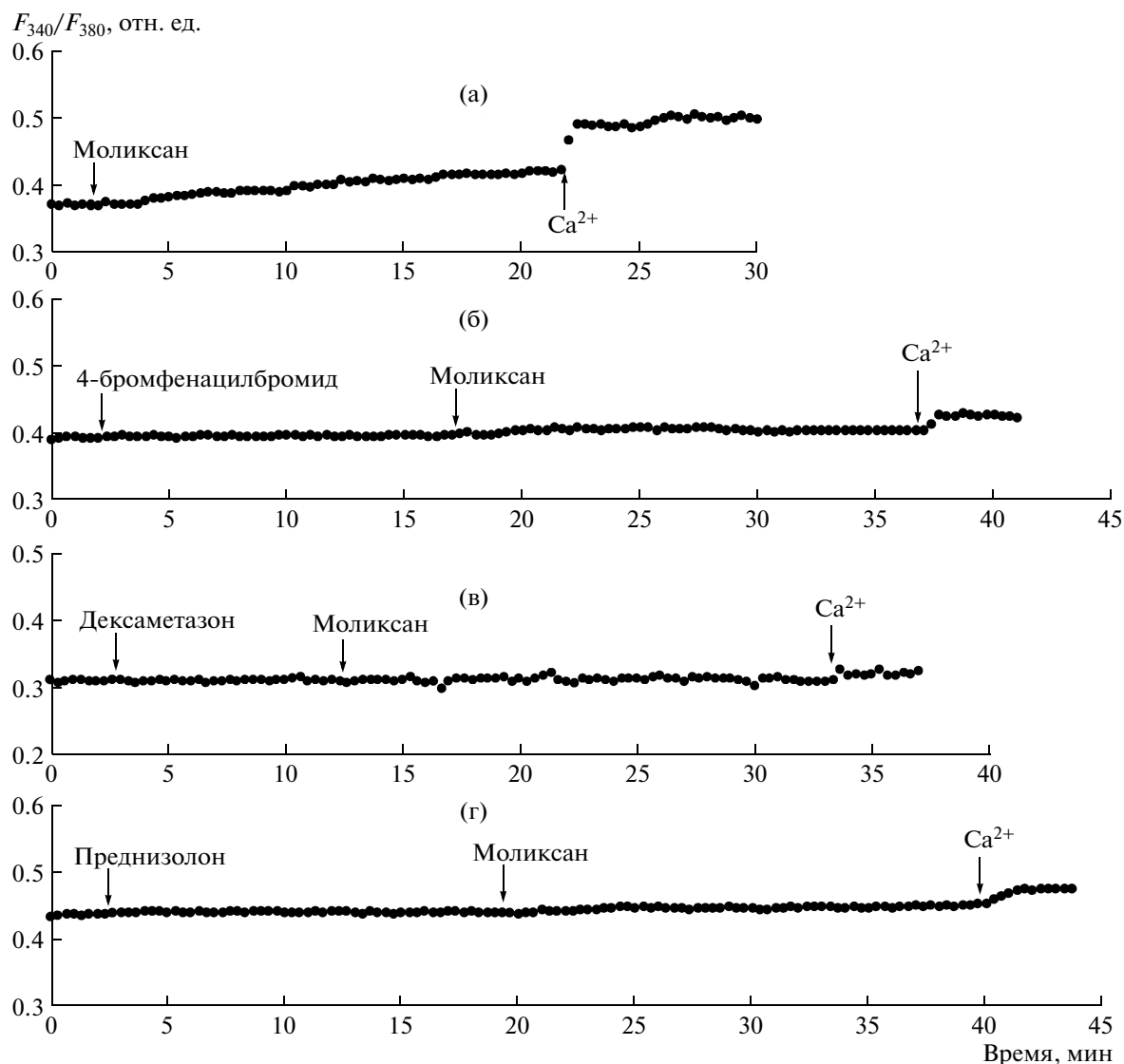
В настоящее время разработано и введено в клиническую практику значительное число дисульфидсодержащих препаратов, изменяющих окислительно-восстановительный баланс клетки и оказывающих на неё физиологически значимое влияние. Так, препарат глутоксим® (Г, комплекс динатриевой соли окисленного глутатиона (GSSG) с d-металлом в наноконцентрации, “ФАРМА-ВАМ”, Россия) используется как иммуномодулятор и гемостимулятор при комплексной терапии бактериальных и вирусных заболеваний, псориаза, лучевой и химиотерапии в онкологии [1, 2]. Другой препарат – моликсан® (М, комплекс глутоксима и нуклеозида инозина, “ФАРМА-ВАМ”) обладает противовирусной, иммуномодулирующей и гепатопротекторной активностью и применяется при терапии острого вирусного гепатита В и С, микст-гепатита и цирроза печени [1]. Однако клеточные и молекулярные механизмы действия этих препаратов до конца не выяснены.

Ранее [3, 4] нами было впервые показано, что GSSG, Г или М индуцируют двухфазный  $Ca^{2+}$ -ответ: постепенное увеличение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ), отражающее мобилизацию  $Ca^{2+}$  из тапсигаргинчувствительных депо  $Ca^{2+}$  и последующий депо-зависимый вход  $Ca^{2+}$  в перитонеальные макрофаги крысы.

Макрофаги отвечают на воздействие агонистов, быстро гидролизуют мембранные фосфолипиды, что приводит к генерации большого числа внутриклеточных и внеклеточных мессенджеров [5]. Так, активированные фагоциты продуцируют большое количество арахидоновой кислоты (АК), освобождаемой из мембранных фосфолипидов при действии фосфолипазы  $A_2$  (ФЛА<sub>2</sub>) [6]. Свободная АК легко окисляется с образованием биологически активных эйкозаноидов: простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов и оксикислот [7]. Известны три основные энзиматические пути окисления АК: с участием циклооксигеназ, липоксигеназ и CYP2J2-эпоксигеназ [7].

Ферменты метаболизма АК обладают высокой чувствительностью к действию окислителей и восстановителей [8]. С помощью ингибиторов циклооксигеназ и липоксигеназ нами ранее было впервые показано участие циклооксигеназного и липоксигеназного путей окисления АК в действии Г и М на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах [9, 10]. Поскольку запуск каскада метаболизма АК – одно из ключевых событий в активации макрофагов, представлялось целесообразным исследовать возможное участие ФЛА<sub>2</sub> в действии Г и М на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах. Это и ставило предмет настоящей работы.

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс популяции Wistar при комнатной температуре 20–22°C через 1–2 сут после начала культивирования. Подробно процедура культивирования



**Рис. 1.** Влияние ингибиторов фосфолипазы  $A_2$  на увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах крысы, вызываемое моликсаном. По оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM  $F_{340}/F_{380}$  при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.). По оси абсцисс – время. (а) – клетки инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл моликсана в номинально бескальциевой среде, затем вход  $Ca^{2+}$  индуцировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ ; (б), (в), (г) – клетки предварительно инкубировали в течение 15 мин с 20 мкМ 4-бромфенацилбромидом (б), в течение 10 мин с 8 мкг/мл дексаметазона (в), в течение 16 мин с 25 мкг/мл преднизолона (г) в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл моликсана, через 20 мин вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ . Каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант из 6–7 независимых экспериментов.

макрофагов и автоматизированная установка для измерения  $[Ca^{2+}]_i$  на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (“Leica Microsystems”, Германия) описаны ранее [11]. Для измерения  $[Ca^{2+}]_i$  использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (“Sigma-Aldrich”, США). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм, эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения  $[Ca^{2+}]_i$  рас-

считывали по уравнению Гринкевича [12]. Статистический анализ проводили с применением критерия  $t$  Стьюдента.

На рис. 1 приведены результаты типичных экспериментов. Данные представлены в виде графика зависимости от времени показателя  $F_{340}/F_{380}$  (отношение интенсивности флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм, отражающее динамику изменения  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках [13]).

Для выявления участия ФЛА<sub>2</sub> в действии Г и М на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах использовали три ингибитора ФЛА<sub>2</sub>: 4-бромфенацилбромид [14] и синтетические глюкокортикостероидные препараты дексаметазон и преднизолон [15].

В контрольных экспериментах было показано, что инкубация макрофагов в течение 20 мин с 100 мкг/мл М (рис. 1а) или 100 мкг/мл Г (данные не представлены) в бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , отражающее мобилизацию  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. В среднем (по данным 6 экспериментов для каждого из препаратов) через 20 мин после добавления агентов  $[Ca^{2+}]_i$  увеличивается от базального уровня, равного  $91 \pm 16$ , до  $153 \pm 19$  нМ для М и  $161 \pm 20$  нМ для Г. При введении в среду инкубации 2 мМ  $Ca^{2+}$  наблюдается дальнейшее повышение  $[Ca^{2+}]_i$ , отражающее вход  $Ca^{2+}$  в цитозоль (рис. 1а). В среднем (по данным 6 экспериментов для каждого из препаратов) увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  во время входа  $Ca^{2+}$  составило  $255 \pm 21$  и  $259 \pm 18$  нМ для М и Г соответственно.

В наших экспериментах впервые было обнаружено, что преинкубация клеток с 20 мкМ 4-бромфенацилбромида в течение 15 мин до введения 100 мкг/мл М приводит к подавлению как мобилизации  $Ca^{2+}$  из депо (в среднем по данным 7 экспериментов на  $71.7 \pm 4.7\%$ ), так и последующего входа  $Ca^{2+}$  в клетку (в среднем по данным 7 экспериментов на  $72.6 \pm 5.1\%$ ), вызываемых М (рис. 1б). Сходные данные были получены в опытах по влиянию 4-бромфенацилбромида на  $Ca^{2+}$ -ответы, индуцируемые 100 мкг/мл Г (данные не представлены).

Кроме того, мы впервые показали, что преинкубация клеток с 8 мкг/мл дексаметазона в течение 10 мин до введения 100 мкг/мл М практически полностью подавляет вызываемые М мобилизацию  $Ca^{2+}$  из депо (в среднем по данным 7 экспериментов на  $85.4 \pm 5.9\%$ ) и последующий вход  $Ca^{2+}$  в цитозоль (в среднем по данным 7 экспериментов на  $89.6 \pm 6.2\%$ , рис. 1в). Преинкубация макрофагов с 25 мкг/мл преднизолона в течение 16 мин до введения 100 мкг/мл М также приводит к подавлению мобилизации  $Ca^{2+}$  из депо (в среднем по данным 7 экспериментов на  $73.8 \pm 4.8\%$ ) и входа  $Ca^{2+}$  (в среднем по данным 7 экспериментов на  $71.4 \pm 5.3\%$ ), индуцированных М (рис. 1г). Сходные данные получены при использовании 100 мкг/мл Г (не представлены).

Таким образом, нами впервые показано, что ингибиторы ФЛА<sub>2</sub> вызывают значительное по-

давление обеих фаз  $Ca^{2+}$ -ответа, индуцированного Г или М в макрофагах. Полученные данные свидетельствуют об участии ФЛА<sub>2</sub> и каскада метаболизма АК в действии Г и М на  $[Ca^{2+}]_i$  в этих клетках. Результаты указывают также на нежелательность совместного применения препаратов Г или М и стероидных противовоспалительных лекарственных средств на основе дексаметазона и преднизолона.

Результаты, полученные нами ранее [3, 4, 9–11] и представленные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что Г и М, не способные проникать через плазмалемму, вызывают в макрофагах сигнальный каскад, приводящий к увеличению  $[Ca^{2+}]_i$  и активации макрофагов, одним из ключевых событий в котором является запуск метаболизма АК.

Работа выполнена при поддержке гранта СПбГУ № 1.0.127.2010.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Borisov A.E., Kozhemyakin L.A., Antushevich A.E., et al.* // *Vestn. Hirurgii im. I.I. Grekova.* 2001. V. 4. P. 32–38.
2. *Еремеев В.В., Гергерт В.Я.* // *Туберкулез и болезни лёгких.* 2013. Т. 7. С. 43–47.
3. *Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E. et al.* // *Cell and Tissue Biol.* 2008. V. 2. P. 322–332.
4. *Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. и др.* // *Цитология.* 2011. Т. 53. № 9. С. 708.
5. *Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С.* Механизмы внутриклеточной сигнализации. СПб.: Изд-во СПб. ун-та. 2003. 208 с.
6. *Dennis E.A.* // *Amer. J. Respir. Crit. Care. Med.* 2000. V. 161. P. 532–535.
7. *Needleman P., Turk J., Jacksick B.A., et al.* // *Annu. Rev. Biochem.* 1986. V. 55. P. 69–102.
8. *Hafner A.K., Cernescu M., Hofmann B., et al.* // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 392. P. 1097–1111.
9. *Крутецкая З.И., Курилова Л.С., Антонов В.Г. и др.* // *ДАН.* 2013. Т. 452. № 6. С. 690–693.
10. *Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А. и др.* // *Цитология.* 2014. Т. 56. № 5. С. 353–360.
11. *Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. и др.* // *Цитология.* 2012. Т. 54. № 2. С. 135–142.
12. *Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y.* // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. P. 3440–3450.
13. *Xie Q., Zhang Y., Zhai C., et al.* // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 16559–16566.
14. *Irvine R.F.* // *Biochem. J.* 1982. V. 204. P. 3–16.
15. *Gewert K., Sandler R.* // *Biochem. J.* 1995. V. 307. P. 499–504.