

ВЛИЯНИЕ ОКИСЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА И ЕГО ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛОГА ПРЕПАРАТА ГЛУТОКСИМ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ Ca^{2+} В МАКРОФАГАХ

© Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, В. Г. Антонов

Кафедра биофизики С.-Петербургского государственного университета;
электронный адрес: cozzy@mail.ru

С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM исследовано влияние окисленного глутатиона (GSSG) и его фармакологического аналога препарата глутоксим на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в перитонеальных макрофагах крысы. Показано, что глутоксим и GSSG увеличивают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+} -депо и последующий вход Ca^{2+} в макрофаги. Дитиотреитол, восстанавливающий S—S-связи в белках, предотвращает или полностью обращает вызываемый глутоксимом или GSSG Ca^{2+} -ответ, что свидетельствует о том, что повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , вызываемое глутоксимом или GSSG, опосредовано их взаимодействием с функционально важными SH-группами белков, участвующих в процессах Ca^{2+} -сигнализации. Два структурно различных ингибитора тирозинкиназ генестейн и метил-2,5-дигидроксициннамат предотвращают или полностью обращают вызываемое GSSG или глутоксимом увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Напротив, ингибитор тирозинфосфатаз ортованадат Na усиливает Ca^{2+} -ответ, вызываемый глутоксимом или GSSG. Полученные данные свидетельствуют об участии тирозинкиназ и тирозинфосфатаз в регуляторном влиянии GSSG и глутоксима на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в перитонеальных макрофагах крысы.

Ключевые слова: перитонеальные макрофаги, окисленный глутатион, глутоксим, тирозинкиназы, тирозинфосфатазы.

Принятые сокращения: $[Ca^{2+}]_i$ — внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , GSH — восстановленный и GSSG — окисленный глутатион соответственно.

Одним из фундаментальных регуляторных механизмов в клеточной биологии является редокс-регуляция передачи сигналов и экспрессии генов. Транспорт электронов по боковым цепям функциональных — CH_2 —SH-групп консервативных остатков цистеина белков обуславливает их редокс-чувствительность. Число известных редокс-чувствительных путей передачи сигнала постоянно возрастает; и имеющиеся данные свидетельствуют о том, что регуляция редокс-состояния клетки может быть полезной при лечении СПИДа и некоторых форм рака (Sen, 1998). Особую роль в редоксрегулируемых сигнальных путях играют эндогенные системы тиоредоксина и глутатиона.

Глутатион (γ -глутамил-цистеинил-глицин) является универсальным трипептидом, присутствующим в большинстве растений, микроорганизмов и во всех тканях млекопитающих. Глутатион существует в восстановленной (GSH) и окисленной (GSSG) формах (Meister, 1988; Lu, 1999; Sies, 1999). GSH обычно присутствует в клетках в высокой концентрации (0.1—10.0 мМ) и является самым распространенным клеточным тиолом и низкомолекулярным пептидом. GSH выступает в клетках как восстанавливающий агент и как антиоксидант. GSH предотвращает окисление SH-групп или восстанавливает S—S-связи, индуцированные окислительным стрессом,

инактивирует свободные радикалы и участвует в детоксикации токсических ксенобиотиков (лекарственных веществ и канцерогенов) (Hayes, McLellan, 1999).

GSH существует в клетке в равновесии с глутатионом дисульфидом (GSSG), и отношение концентраций GSH/GSSG служит показателем редокс-состояния клетки. В норме содержание GSSG в клетке очень низкое (<1 % от общего содержания GSH) (Meister, 1988; Lu, 1999). GSSG способен вступать в тиол-дисульфидный обмен с активными SH-группами белков с образованием смешанного дисульфидного комплекса или может окислять эндогенные SH-группы с образованием дисульфидов. При окислительном стрессе GSH окисляется до GSSG и происходит накопление GSSG в цитозоле. Чтобы избежать сдвига редокс-равновесия клетки, GSSG может активно выводиться из клетки или взаимодействовать с SH-группой белка (PSH) с образованием смешанного дисульфида (PSSG) (Lu, 1999).

Повышение содержания GSSG в клетках при различных нарушениях клеточных функций явилось поводом рассматривать его как биологически агрессивную молекулу (Кулинский, Колесниченко, 1990). Однако результаты работ, выполненных в ряде лабораторий по изучению влияния на клетки GSSG в концентрациях, близких или превышающих те, которые определяются вне клеток, по-

казали способность GSSG оказывать рецепторопосредованное влияние на клеточные процессы (Filomeni et al., 2002, 2005; Бузова и др., 2005). Кроме того, синтетический аналог GSSG — фармакологический препарат глутоксим® (ФАРМА-ВАМ, Москва) — нашел клиническое применение как иммуномодулятор и гемостимулятор в комплексной терапии бактериальных и вирусных заболеваний (Жуков и др., 2004), псориаза (Корсунская и др., 2003; Чермошенцев, 2003), лучевой и химиотерапии в онкологии (Филатова и др., 2004).

В то же время роль универсального вторичного посредника — ионов Ca^{2+} — в реализации регуляторного действия GSSG на клетки практически не исследована. В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение влияния GSSG и его фармакологического аналога препарата глутоксим на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) и Ca^{2+} -сигналы, индуцированные пуринергическим агонистом АТФ и ингибитором эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином, в перитонеальных макрофагах крысы.

Материал и методика

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крысы. Кварцевые стекла с клетками помещали в экспериментальную камеру, заполненную физиологическим раствором следующего ионного состава (в мМ): NaCl — 140, KCl — 5, CaCl_2 — 1, MgCl_2 — 1, HEPES-NaOH — 5, pH 7.3—7.4. Бескальциевая среда содержала 0 мМ CaCl_2 и 1 мМ ЭГТА. Подробно процедура культивирования макрофагов описана ранее (Крутецкая и др., 1997в).

В опытах применяли реактивы фирмы Sigma (США). Маточные растворы тапсигаргина (500 мкМ), нифедипина (20 мМ), генистейна (50 мМ) и метил-2,5-дигидроксициннамата (25 мМ) готовили в диметилсульфоксиде. Маточные растворы АТФ (100 мМ), дитиотрептола (100 мМ), ортованадата Na (10 мМ), окисленного глутатиона (50 и 5 мг/мл), глутоксима (50 и 5 мг/мл), верапамила (20 мМ), хлоридов Ni^{2+} (1 М), La^{3+} (1 М) и Gd^{3+} (50 мМ) готовили на воде. Для измерения внутриклеточной концентрации кальция ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) использовали флуоресцентный зонд Fura-2АМ. Макрофаги инкубировали в течение 45 мин в физиологическом растворе, содержащем 2 мкМ Fura-2АМ, при комнатной температуре.

Стекла с окрашенными клетками отмывали физиологическим раствором и переносили в экспериментальную камеру, расположенную на столике люминесцентного микроскопа Люмам-КФ (ЛЮМО, Санкт-Петербург). Флуоресценцию Fura-2АМ возбуждали при 337 нм с помощью азотного лазера ЛГИ-503. Лазер располагали сбоку от микроскопа под углом 30° к экспериментальной камере, что позволяло направить луч лазера непосредственно на объект. Интенсивность флуоресценции регистрировали с помощью спектрофотонасадки СФН-10 при длине волны 510 нм. Сигнал с ФЭУ-79 усиливали специально сконструированным усилителем и регистрировали на компьютере IBM PC с использованием оригинального программного обеспечения. В экспериментах использовали объектив $10\times$ с апертурой 0.4. При данном увеличении в площадь фотометрируемого участка попадало 40—50 клеток. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2.5 с. При добавлении АТФ клетки облучали непрерывно до до-

стижения максимума флуоресценции. Значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича (Gryniewicz et al., 1985). Эксперименты проводили при комнатной температуре ($22\text{—}24^\circ\text{C}$) на 2—3-и сут после культивирования клеток.

Результаты и обсуждение

Добавление к перитонеальным макрофагам 200 мкМ АТФ вызывает двухфазный Ca^{2+} -сигнал: кратковременный пик, связанный с мобилизацией Ca^{2+} из депо, и выраженное длительное «плато», отражающее вход Ca^{2+} в клетку (Alonso-Torre, Trautmann, 1993) (рис. 1, а, в). Специфический ингибитор эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргин (0.5 мкМ) (Thastrup et al., 1989) также вызывает двухфазный Ca^{2+} -сигнал: менее быстрый и не очень выраженный пик, связанный с мобилизацией Ca^{2+} из депо, и длительную фазу, отражающую депозависимый вход Ca^{2+} из наружной среды (рис. 1, б, г).

Влияние GSSG и глутоксима на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и Ca^{2+} -сигналы, индуцированные АТФ и тапсигаргином. Исследовано влияние глутоксима и GSSG в концентрациях 10, 100, 200, 300, 400, 500 и 600 мкг/мл на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и Ca^{2+} -сигналы, индуцируемые АТФ и тапсигаргином, в резидентных перитонеальных макрофагах крысы. На рис. 2 представлено влияние глутоксима (100 мкг/мл) на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в покое и Ca^{2+} -сигналы, индуцированные 200 мкМ АТФ (рис. 2, а, б) и 0.5 мкМ тапсигаргина (рис. 2, в), в макрофагах, находящихся в нормальном физиологическом растворе (рис. 2, а) или в номинально бескальциевой среде (рис. 2, б, в). На рис. 2, а видно, что преинкубация клеток с глутоксимом в среде, содержащей Ca^{2+} , в течение 15 мин до введения АТФ приводит к некоторому повышению базального уровня Ca^{2+} и уменьшению (на 20—30 %) фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызванной АТФ. Увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ после введения глутоксима может быть связано как с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо, так и с входом Ca^{2+} из наружной среды. Для выяснения механизма повышения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ были проведены эксперименты с использованием номинально бескальциевой среды (рис. 2, б, в). Обнаружено, что и в этих условиях глутоксим вызывает повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и последующее уменьшение (на 20—30 %) фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызванной АТФ (рис. 2, б) или тапсигаргином (рис. 2, в). Это свидетельствует о том, что повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при воздействии глутоксима связано с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо. Практически аналогичные данные были получены при использовании GSSG (рис. 3).

Следует специально отметить, что мы не обнаружили дозозависимости эффекта глутоксима или GSSG на $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Исследованные концентрации агентов оказывали практически одинаковое влияние на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в покое и Ca^{2+} -сигналы, индуцированные АТФ и тапсигаргином, в макрофагах. Однако более длительная (в течение 30 мин) инкубация клеток с глутоксимом вызывала более выраженное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Еще одним подтверждением того, что повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ при действии глутоксима или GSSG связано с мобилизацией Ca^{2+} из депо, являются данные, представленные на рис. 4. После предварительной инкубации клеток в течение 12 мин с глутоксимом (рис. 4, а) или в течение 16 мин с GSSG (рис. 4, б) при добавлении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдался вход Ca^{2+} , связанный, по-ви-

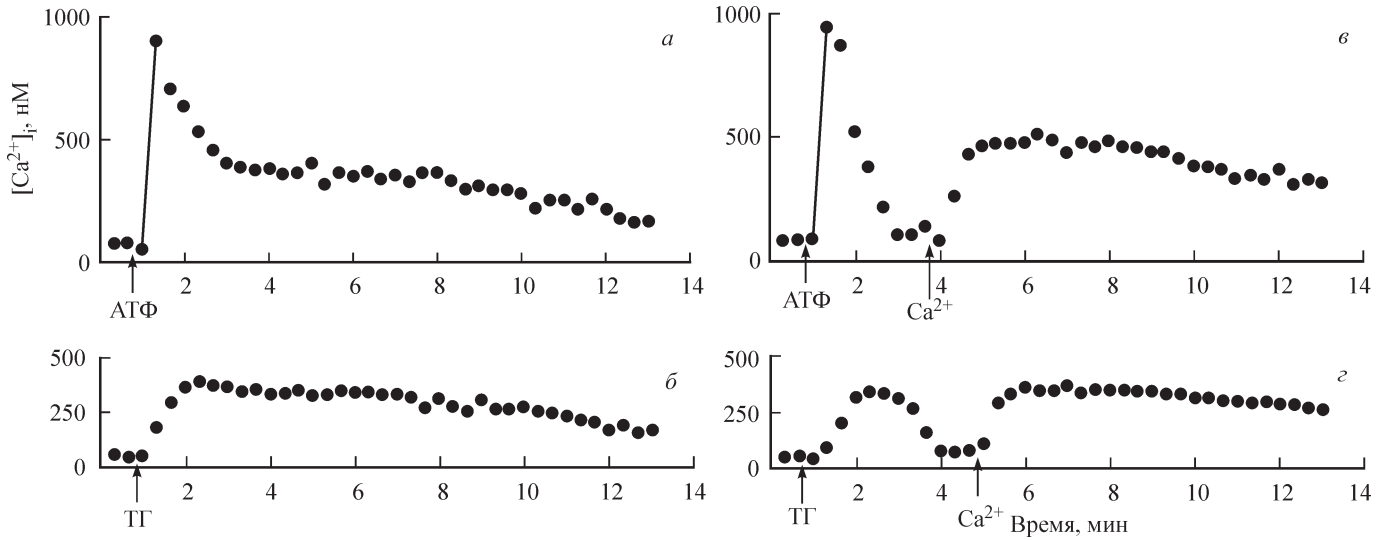


Рис. 1. Ca^{2+} -сигналы, индуцированные АТФ (а, в) и тапсигаргином (ТГ; б, з), в перитонеальных макрофагах.

а, б — клетки стимулировали 200 мкМ АТФ (а) или 0.5 мкМ ТГ (б) в нормальном физиологическом растворе; в, з — клетки стимулировали 200 мкМ АТФ (в) или 0.5 мкМ ТГ (з) в номинально бескальциевой среде, вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

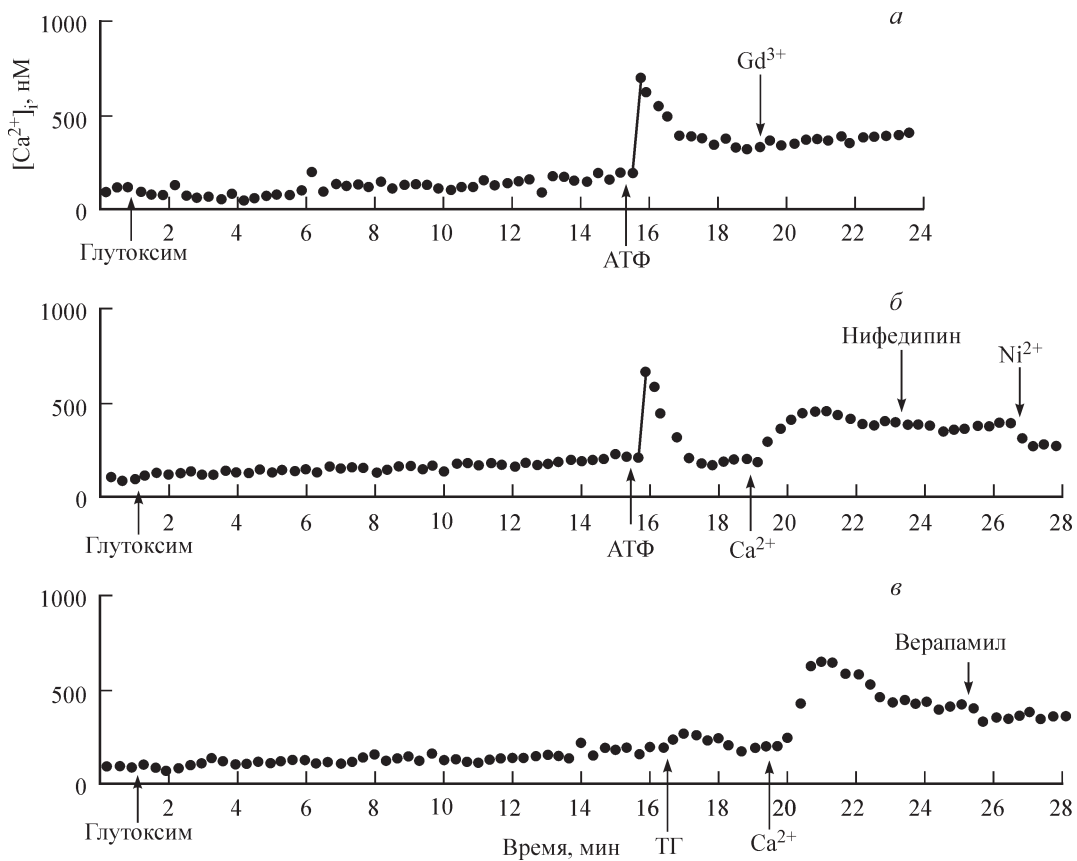


Рис. 2. Влияние глутоксима на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} и Ca^{2+} -сигналы, вызванные АТФ или тапсигаргином, в макрофагах.

а — макрофаги, находящиеся в нормальном физиологическом растворе, предварительно инкубировали в течение 15 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима, затем стимулировали 200 мкМ АТФ, во время фазы плато Ca^{2+} -сигнала добавляли 20 мкМ Gd^{3+} ; б, в — клетки инкубировали в течение 15 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима в номинально бескальциевой среде, затем стимулировали 200 мкМ АТФ (б) или 0.5 мкМ ТГ (в), после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} , во время развившегося входа Ca^{2+} добавляли 80 мкМ нифедипина (б) или 80 мкМ верапамила (в) и затем 2 мМ Ni^{2+} (б).

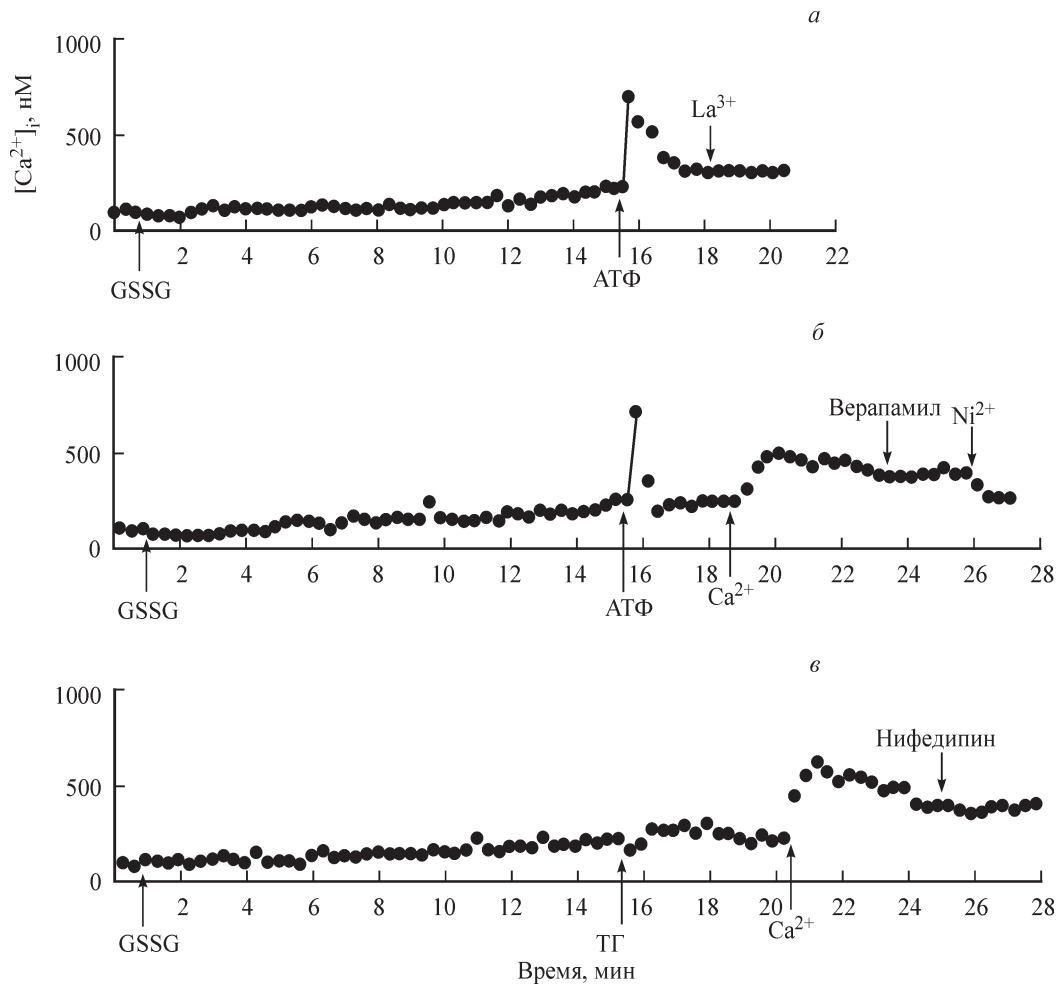


Рис. 3. Влияние окисленного глутатиона (GSSG) на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} и Ca^{2+} -сигналы, вызванные АТФ или тапсигаргином, в макрофагах.

a — макрофаги, находящиеся в нормальном физиологическом растворе, предварительно инкубировали в течение 15 мин в присутствии 100 мкг/мл GSSG, затем стимулировали 200 мкМ АТФ, во время фазы плато Ca^{2+} -сигнала добавляли 1 мМ La^{3+} ; *б, в* — клетки инкубировали в течение 15 мин в присутствии 100 мкг/мл GSSG в номинально бескальциевой среде, затем стимулировали 200 мкМ АТФ (*б*) или 0.5 мкМ ТГ (*в*), после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} , во время развившегося входа Ca^{2+} добавляли 80 мкМ верапамила (*б*) или 80 мкМ нифедипина (*в*) и затем 2 мМ Ni^{2+} (*б*).

димому, с опустошением внутриклеточных Ca^{2+} -депо. После опустошения Ca^{2+} -депо при действии 0.5 мкМ тапсигаргина глутоксим не вызывал увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 4, *в*), что свидетельствует о том, что глутоксим или GSSG вызывает мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+} -депо.

Ране нами были выявлены фармакологические характеристики депозависимого входа Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы (Крутецкая и др., 1997б, 2000). Показано, что депозависимый вход Ca^{2+} , вызванный опустошением Ca^{2+} -депо при действии 0.5 мкМ тапсигаргина или 200 мкМ УТФ, блокируется следующими фармакологическими агентами: двумя структурно различными ингибиторами потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов (20 мкМ нифедипина или 40 мкМ верапамила), ионами Ni^{2+} (1 мМ), La^{3+} (1 мМ) или Gd^{3+} (10 мкМ) и блокатором неселективных катионных каналов нифлумовой кислотой (100 мкМ).

Представляло интерес исследовать влияние классических органических (нифедипин и верапамил) и неорганических (Ni^{2+} , La^{3+} и Gd^{3+}) блокаторов Ca^{2+} -каналов на вход Ca^{2+} , индуцированный АТФ или тапсигаргином, после об-

работки клеток глутоксимом или GSSG. Полученные нами данные, представленные на рис. 2—4, позволяют предположить, что исследованные агенты изменяют фармакологические характеристики каналов входа Ca^{2+} в макрофагах. Каналы становятся менее чувствительными к блокирующему действию Ca^{2+} -антагонистов нифедипина (рис. 2, *б*; 3, *в*) и верапамила (рис. 2, *в*; 3, *б*), а также к действию неорганических блокаторов La^{3+} (рис. 3, *а*) и Gd^{3+} (рис. 2, *а*). Эффективным блокатором оказались только ионы Ni^{2+} (рис. 2, *б*; 3, *б*). Нифедипин и верапамил были неэффективными даже в концентрации 80 мкМ. При этом во многих случаях после введения нифедипина наблюдалось некоторое парадоксальное «усиление» входа Ca^{2+} .

Тот факт, что GSSG и глутоксим изменяют фармакологические характеристики каналов входа Ca^{2+} , делая их менее чувствительными к ингибирующему действию органических и неорганических блокаторов Ca^{2+} -каналов, позволяет предположить, что эти окисляющие агенты модифицируют функционально важные SH-группы, локализованные в наружном устье и(или) в области поры депозависимых Ca^{2+} -каналов.

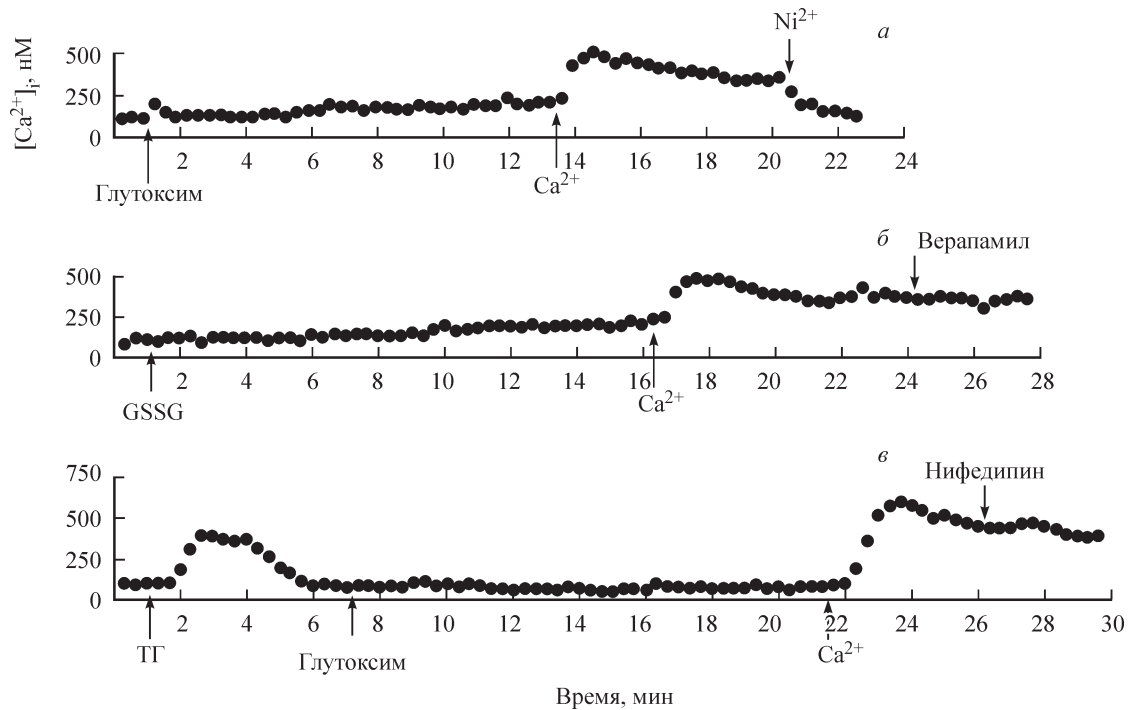


Рис. 4. Влияние глутоксима и GSSG на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах.

a, б — клетки предварительно инкубировали в течение 12 (*a*) или 16 (*б*) мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима (*a*) или GSSG (*б*) в номинально бескальциевой среде, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} , на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 2 мМ Ni^{2+} (*a*) или 80 мкМ нифедипина (*б*); *в* — макрофаги стимулировали 0.5 мкМ ТГ в номинально бескальциевой среде, после окончания фазы мобилизации Ca^{2+} из депо добавляли 100 мкг/мл глутоксима и через 15 мин вводили в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} , на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 80 мкМ нифедипина.

Влияние дитиотреитола на эффект глутоксима и GSSG на $[Ca^{2+}]_i$. Известно что GSSG способен вступать в тиол-дисульфидный обмен с активными SH-группами белков с образованием смешанного дисульфидного комплекса или может окислять эндогенные SH-группы с образованием дисульфидов (Meister, 1988; Lu, 1999). В связи с этим представлялось целесообразным исследовать влияние на эффект GSSG и глутоксима дитиотреитола (ДТТ), восстанавливающего S—S-связи в белках.

Показано, что добавление 100 мкг/мл глутоксима к макрофагам, находящимся в номинально бескальциевой среде, вызывает нарастающее и существенное увеличение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо (рис. 5, *a, в*). При добавлении 2 мМ Ca^{2+} в наружную среду наблюдается быстрое повышение $[Ca^{2+}]_i$, связанное с входом Ca^{2+} из наружной среды. Добавление во время развившегося входа Ca^{2+} 1 мМ ДТТ полностью обращает вызываемое глутоксимом увеличение $[Ca^{2+}]_i$ и вызывает возвращение $[Ca^{2+}]_i$ к базальному уровню (рис. 5, *б*). Предварительная инкубация макрофагов в течение 10 мин с 1 мМ ДТТ в бескальциевой среде практически полностью предотвращает вызываемое глутоксимом увеличение $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 5, *б*). Таким образом, восстанавливающий агент ДТТ предотвращает или полностью обращает вызываемое глутоксимом или GSSG увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы. Полученные нами результаты согласуются с данными Ренарда и соавторов (Renard et al., 1992) на пермеабилizованных гепатоцитах крысы, в соответствии с которыми эффект GSSG и цистина также обращается ДТТ. Учитывая вышеизложенное, можно предположить, что увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое глутоксимом или GSSG, опосредо-

вано их взаимодействием с функционально важными SH-группами белков, участвующих в процессах Ca^{2+} -сигнализации.

Влияние ингибиторов тирозинкиназ и тирозинфосфатаз на эффект GSSG и глутоксима на $[Ca^{2+}]_i$. Ранее нами было показано, что фениларзиноксид (ФАО), являющийся специфическим сульфидрильным реагентом, который ковалентно связывается с соседними SH-группами белков (Webb, 1966), вызывает дозозависимое увеличение $[Ca^{2+}]_i$, связанное как с мобилизацией Ca^{2+} из депо, так и с входом Ca^{2+} из наружной среды (Крутецкая и др., 1997а; Крутецкая, Лебедев, 1998). Обнаружено, что индуцируемое ФАО (10—50 мкМ) увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах эффективно блокируется ингибиторами тирозинкиназ — 100 мкМ генистейна и 25 мкМ метил-2,5-дигидроксициннамата (МДЦ). Предварительная инкубация клеток со 100 мкМ генистейна или 25 мкМ МДЦ существенно замедляет и уменьшает, но не предотвращает Ca^{2+} -ответ на действие ФАО (Крутецкая и др., 1997а; Крутецкая, Лебедев, 1998).

Кроме того, на клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 установлено, что GSSG и глутоксим вызывают трансактивацию рецептора эпидермального фактора роста и активацию его собственной тирозинкиназной активности (Бурова и др., 2005; Василенко и др., 2006). В макрофагах, в том числе перитонеальных макрофагах мышинных, также идентифицированы рецепторы с собственной тирозинкиназной активностью: рецепторы колониестимулирующего фактора (CSF-1) (Yue et al., 1993; Correll et al., 2004), рецепторы фактора роста гепатоцитов (HGF) (Camussi et al., 1997), рецепторы эпидермального фактора роста (Nolte et al., 1997) и рецепторы

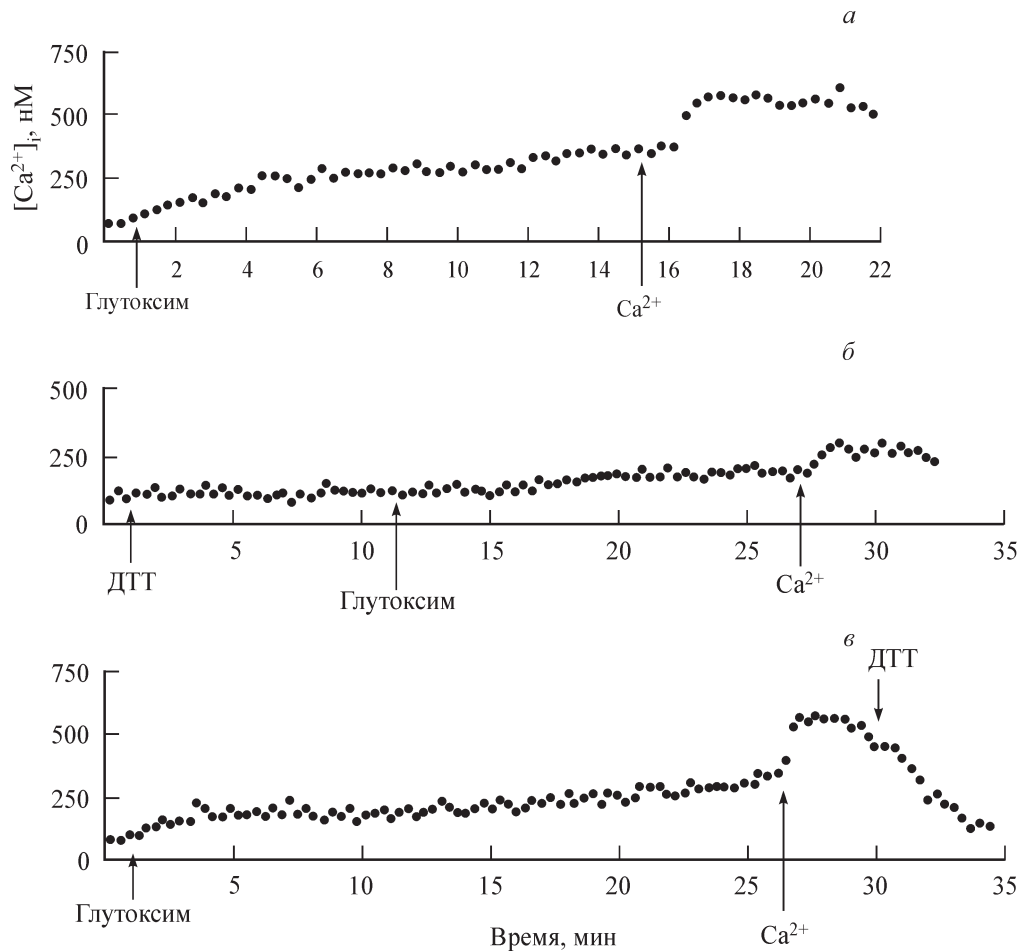


Рис. 5. Влияние дитиотреитола (ДТТ) на эффект глутоксима на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах.

a — макрофаги инкубировали в течение 15 мин со 100 мкг/мл глутоксима в номинально бескальциевой среде, вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; *б* — клетки предварительно инкубировали в течение 10 мин в присутствии 1 мМ ДТТ в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима, через 16 мин вход Ca^{2+} индуцировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; *в* — макрофаги инкубировали в течение 25 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима в бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} , 1 мМ ДТТ добавляли на фоне развившегося входа Ca^{2+} .

(RON/STK-рецепторные тирозинкиназы) белка, стимулирующего макрофаги (MSP) (Iwama et al., 1995; Wang et al., 2000; Zhou et al., 2002; Correll et al., 2004). Эти рецепторные тирозинкиназы, содержащиеся в экстраклеточных доменах участки, богатые цистеином, также могут являться мишенями для GSSG и глутоксима.

Более того, известно, что окислительный стресс и уменьшение соотношения GSH/GSSG внутри клетки вызывают изменение активности редокс-чувствительных ферментов, в первую очередь тирозинкиназ и тирозинфосфатаз (Staal et al., 1994; Rao et al., 2000; Forman, Torres, 2002), что приводит к увеличению фосфорилирования белков по тирозину.

Для выявления возможной роли фосфорилирования по тирозину во влиянии GSSG и глутоксима на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах мы исследовали влияние на Ca^{2+} -ответ, индуцируемый глутоксимом или GSSG, двух структурно различных ингибиторов тирозинкиназ генистейна (Akiyama et al., 1987; Akiyama, Ogawara, 1991; Hidaka, Kobayashi, 1992) и МДЦ (Umezawa et al., 1990; Casnellie, 1991), а также ингибитора тирозинфосфатаз ортованадата Na (Gordon, 1991).

Показано, что добавление 100 мкМ генистейна (рис. 6, *a*) или 25 мкМ МДЦ (не показано) на фоне развившегося входа Ca^{2+} , индуцированного 100 мкг/мл глуток-

сима, приводит к полному подавлению увеличения $[Ca^{2+}]_i$, вызванного глутоксимом, и возвращению $[Ca^{2+}]_i$ к базальному уровню. Кроме того, предварительная инкубация макрофагов со 100 мкМ генистейна в течение 7 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима приводит к практически полному подавлению увеличения $[Ca^{2+}]_i$, вызванного глутоксимом, и подавлению входа Ca^{2+} (рис. 6, *б*). Ингибирование входа Ca^{2+} , вызываемого глутоксимом, при действии генистейна или МДЦ согласуется с полученными нами ранее данными о том, что генистейн и МДЦ подавляют вход Ca^{2+} , индуцируемый АТФ, УТФ, тапсигаргином и циклопязониковой кислотой, в перитонеальных макрофагах крысы (Крутецкая и др., 1997в).

Общий уровень фосфорилирования белков по тирозину в клетке контролируется противоположным действием тирозинкиназ и тирозинфосфатаз (Sun, Tonks, 1994). Увеличение уровня фосфорилирования может быть вызвано повышением активности тирозинкиназ или уменьшением активности тирозинфосфатаз (Fischer et al., 1991; Hunter, 1995, 1996).

Для выявления возможной роли тирозинфосфатаз в увеличении $[Ca^{2+}]_i$ под действием глутоксима или GSSG мы использовали ингибитор тирозинфосфатаз ортованадат Na, изменяющий баланс между активностью тирозин-

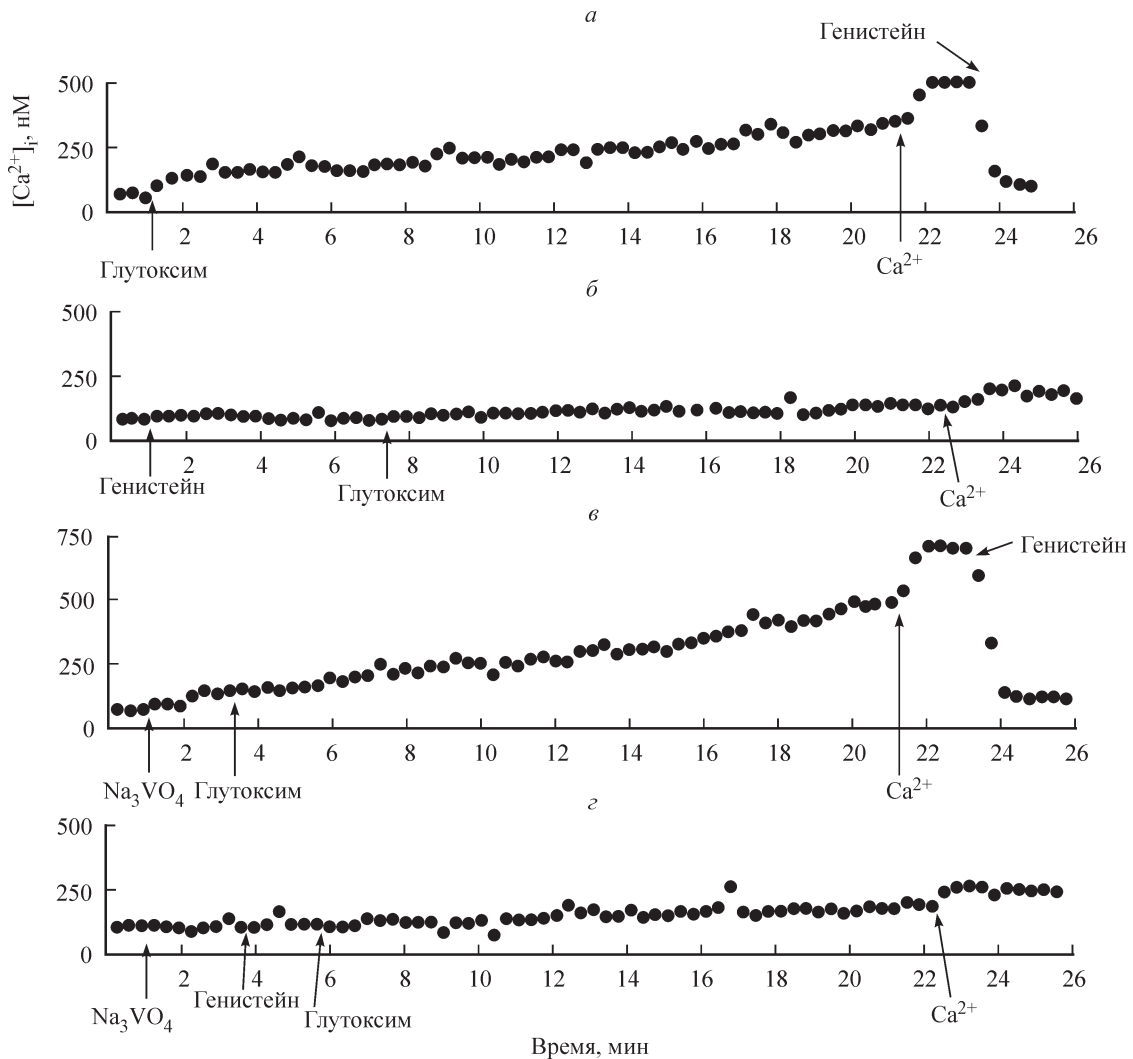


Рис. 6. Влияние генистеина и ортованадата Na (Na_3VO_4) на эффект глутоксима на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах.

a — клетки инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима в бескальциевой среде, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} , 100 мкМ генистеина добавляли на фоне развившегося входа Ca^{2+} ; *б* — клетки предварительно инкубировали в течение 6 мин со 100 мкМ генистеина в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима, через 16 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; *в* — клетки инкубировали в течение 2 мин в присутствии 50 мкМ Na_3VO_4 в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима и через 18 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} , на фоне развившегося входа Ca^{2+} вводили 100 мкМ генистеина; *г* — макрофаги предварительно инкубировали в течение 6 мин в присутствии 50 мкМ Na_3VO_4 и 100 мкМ генистеина в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима и через 16 мин вход Ca^{2+} индуцировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

киназ и тирозинфосфатаз. Показано, что добавление 50 мкМ ортованадата Na за 2 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима вызывает некоторое усиление вызванного глутоксимом Ca^{2+} -ответа, связанного с мобилизацией Ca^{2+} из депо, а также последующего входа Ca^{2+} из наружной среды (рис. 6, в). Добавление генистеина на фоне развившегося входа Ca^{2+} приводит к возвращению $[Ca^{2+}]_i$ к базальному уровню. Таким образом, предварительная обработка клеток ортованадатом Na усиливает индуцированный глутоксимом вход Ca^{2+} , но не предотвращает последующего ингибирования входа Ca^{2+} генистеином. Это согласуется с полученными нами ранее данными о том, что преинкубация клеток с ортованадатом Na усиливает АТФ-индуцированный вход Ca^{2+} , но не предотвращает последующего ингибирования входа Ca^{2+} генистеином (Крутецкая и др., 1997в).

Усиление входа Ca^{2+} ортованадатом Na подтверждает важность активации тирозинкиназ для стимуляции входа

Ca^{2+} . Это согласуется с данными о том, что степень и продолжительность фосфорилирования белков по тирозину, опосредованного рецепторными тирозинкиназами, могут быть значительно увеличены при обработке клеток ингибитором тирозинфосфатаз ортованадатом Na или его пероксипроизводными (Gordon, 1991; Posner et al., 1994; Hunter, 1995).

На рис. 6, г показано совместное влияние генистеина и ортованадата Na на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое глутоксимом. Клетки инкубировали с 50 мкМ ортованадата Na и 100 мкМ генистеина, после чего на клетки воздействовали 100 мкг/мл глутоксима и через 16 мин вводили в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . В данном случае наблюдается подавление обеих фаз Ca^{2+} -ответа, вызываемого глутоксимом. Таким образом, ортованадат Na не предотвращает ингибирования входа Ca^{2+} генистеином и в том случае, когда оба блокатора добавляются до приложения глутоксима.

Список литературы

- Можно предположить, что стимуляция входа Ca^{2+} под действием глутоксима или GSSG обусловлена активацией тирозинкиназ, повышением фосфорилирования по тирозину Ca^{2+} -канала в плазматической мембране или связанного с каналом регуляторного белка. Возможно также, что вызываемая глутоксимом или GSSG мобилизация Ca^{2+} из депо связана с фосфорилированием по тирозину и активацией канала Ca^{2+} -выброса рецептора инозитол-1,4,5-трифосфата (IP_3) в мембране эндоплазматического ретикулума (Jayaraman et al., 1996). В пользу этого свидетельствуют данные о том, что IP_3 -рецептор типа 1, идентифицированный в клетках мозжечка, гладкомышечных клетках аорты и Т-лимфоцитах человека, содержит два потенциальных участка фосфорилирования по тирозину (Туг 482 и Туг 2617). Туг 482 находится рядом с участком связывания IP_3 , а Туг 2617 расположен вблизи С-терминального домена рецептора, образующего канал Ca^{2+} -выброса (Harnick et al., 1995; Marks, 1997). Обнаружено, что при активации Т-лимфоцитов происходит тирозинное фосфорилирование IP_3 -рецептора, что приводит к увеличению вероятности открытого состояния канала Ca^{2+} -выброса (Harnick et al., 1995; Jayaraman et al., 1996).
- Мишенями для ковалентной модификации GSSG или глутоксимом могут быть сами тирозинфосфатазы. В настоящее время идентифицированы два типа тирозинкиназ и тирозинфосфатаз — рецепторные и цитоплазматические (Hunter, 1995, 1996). В каталитическом домене всех известных тирозинфосфатаз, как цитоплазматических (Barford et al., 1994; Denu et al., 1996), так и рецепторных (Fischer et al., 1991; Walton, Dixon, 1993), выявлен функционально важный остаток цистеина, который должен быть в восстановленном состоянии для осуществления фосфатазной активности. Обнаружены цитоплазматические тирозинфосфатазы PTP1C и PTP1D, содержащие два SH2-домена (src homology domains), которые связываются с фосфорилированными остатками тирозина белков. Эти SH2-домены, содержащие остатки цистеина, позволяют тирозинфосфатазе связываться с фосфорилированными белковыми субстратами и обеспечивают, по-видимому, определенную локализацию тирозинфосфатаз в клетке. Тирозинфосфатаза 1B (PTP1B) также является мишенью для редокс-регуляции в клетках (Denu, Dixon, 1998; Vargrett et al., 1999; Filomeni et al., 2002). Следовательно, возможными мишенями для ковалентной модификации GSSG или глутоксимом могут быть остатки цистеина в SH2-доменах и консервативный остаток цистеина в каталитическом домене тирозинфосфатаз.
- Таким образом, нами впервые показано, что GSSG и его фармакологический аналог препарат глутоксим увеличивают $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+} -депо и последующий вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы. С использованием ингибиторов тирозинкиназ и тирозинфосфатаз впервые выявлено участие тирозинкиназ и тирозинфосфатаз в увеличении $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызываемом GSSG или глутоксимом, в макрофагах. Учитывая, что генистейн и МДЦ блокируют широкий спектр тирозинкиназ, можно предположить, что в регуляторном влиянии глутоксима или GSSG на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ могут участвовать как рецепторные, так и цитоплазматические тирозинкиназы.
- Бурова Е. Б., Василенко К. П., Антонов В. Г., Никольский Н. Н. 2005. Трансактивация рецептора эпидермального фактора роста окисленным глутатионом и его фармакологическим аналогом Глутоксим в клетках А431. Докл. РАН. 404 (1): 122—124.
- Василенко К. П., Бурова Е. Б., Антонов В. Г., Никольский Н. Н. 2006. Окисленный глутатион вызывает активацию рецептора эпидермального фактора роста и MAP-киназ ERK1,2. Цитология. 48 (6): 500—507.
- Жуков О. Б., Зубарев А. Р., Мезенцева М. В., Андрюшкова Ю. А., Осе И. В. 2004. Современные аспекты иммуномодулирующей терапии у больных с рецидивирующими инфекциями, передаваемыми половым путем, и антибиотикорезистентным бактериальным простатитом. Врачебное сословие. 5—6: 51—56.
- Корсунская И. М., Резникова М. М., Путинцев А. Ю., Аветикян С. С. 2003. Опыт применения препарата Глутоксим в дерматологии. Лечащий врач. 4: 78—79.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 1998. Роль тирозинового фосфорилирования в регуляции активности ионных каналов клеточных мембран. СПб.: Айно. 244 с.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Крутецкая Н. И. 2000. Механизмы Ca^{2+} -сигнализации в перитонеальных макрофагах. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 86 (8): 1030—1048.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Крутецкая Н. И., Бутов С. Н., Петрова Т. В. 1997а. Ингибитор тирозинфосфатаз фениларзинноксид индуцирует увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в перитонеальных макрофагах крысы и фибробластах человека. Цитология. 39 (12): 1116—1130.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Крутецкая Н. И., Петрова Т. В. 1997б. Органические и неорганические блокаторы потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов ингибируют депозависимый вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы. Цитология. 39 (12): 1131—1141.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Тюшев В. Е., Крутецкая Н. И., Рощина Н. Г. 1997в. Влияние ингибиторов тирозинкиназ и тирозинфосфатаз на вход Ca^{2+} , индуцируемый АТФ и тапсигаргином, в перитонеальных макрофагах крысы. Цитология. 39(2/3): 164—176.
- Кулинский В. И., Колесниченко Л. С. 1990. Биологическая роль глутатиона. Успехи соврем. биол. 110 (1): 20—33.
- Филатова Е. И., Былинская Е. Н., Алаберг С. Д. 2004. Применение глутоксима в сопровождении лучевой терапии распространенного рака шейки матки. В кн.: Тезисы III съезда онкологов и радиологов СНГ. Минск. II: 354.
- Чермошенцев А. А. 2003. Эффективность глутоксима в комплексной терапии больных каплевидной формой псориаза. Рос. журн. кожных и венерических болезней. 1: 38—41.
- Akiyama T., Ishida J., Nakagawa S., Ogawara H., Watanabe S.-I., Itoh N., Shibuya M., Fukami Y. 1987. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. J. Biol. Chem. 262: 5592—5595.
- Akiyama T., Ogawara H. 1991. Use and specificity of genistein as an inhibitor of protein tyrosine kinases. Methods Enzymol. 201: 362—370.
- Alonso-Torre S. R., Trautmann A. 1993. Calcium responses elicited by nucleotides in macrophages. Interaction between two receptor subtypes. J. Biol. Chem. 268: 18 640—18 647.
- Barford D., Flint A. J., Tonks N. K. 1994. Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase 1B. Science. 263: 1397—1404.
- Barrett W. C., DeGnore J. P., Konig S., Fales H. M., Keng Y. F., Zhang Z. Y., Yi M. B., Chock P. B. 1999. Regulation of PTP1B via glutathionylation of the active site cysteine 215. Biochemistry. 38: 6699—6705.
- Camussi G., Montrucchio H., Lupia E., Soldi R., Comoglio P. M., Bussolino F. 1997. Angiogenesis induced in platelet-activating factor syntheses from macrophages. J. Immunol. 158: 1302—1309.

- Casnellie J. E. 1991. Protein kinase inhibitors: probes for the functions of protein phosphorylation. *Adv. Pharmacol.* 22 : 167—205.
- Correll P. H., Morrison A. C., Lutz M. A. 2004. Receptor tyrosine kinases and the regulation of macrophage activation. *J. Leukocyte Biol.* 75 : 731—737.
- Denu J. M., Dixon J. E. 1998. Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2 : 633—641.
- Denu J. M., Stuckey J. A., Saper M. A., Dixon J. E. 1996. Form and function in protein dephosphorylation. *Cell.* 87 : 361—364.
- Filomeni G., Aquilano K., Civitareale P., Rotilio G., Ciriolo M. R. 2005. Activation of c-jun-N-terminal kinase is required for apoptosis triggered by glutathione disulfide in neuroblastoma cells. *Free Radical. Biol. Med.* 39 : 345—354.
- Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M. R. 2002. Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochem. Pharmacol.* 64 : 1057—1064.
- Fischer E. H., Charbonneau H., Tonks N. K. 1991. Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science.* 253 : 401—406.
- Forman J. H., Torres M. 2002. Reactive oxygen species and cell signaling. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 166 : S4—S8.
- Gordon J. A. 1991. Use of vanadate as protein-phosphotyrosine phosphatase inhibitor. *Methods Enzymol.* 201 : 477—482.
- Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260 : 3440—3450.
- Harnick D. J., Jayaraman Th., Ma Y., Mulieri Ph., Go L. O., Marks A. R. 1995. The human type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from T lymphocytes. Structure, localization, and tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 270 : 2833—2840.
- Hayes J. D., McLellan L. I. 1999. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. *Free Radical Res.* 31 : 273—300.
- Hidaka H., Kobayashi R. 1992. Pharmacology of protein kinase inhibitors. *Annual Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32 : 377—397.
- Hunter T. 1995. Protein kinases and phosphatases: the Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.* 80 : 225—236.
- Hunter T. 1996. Tyrosine phosphorylation: past, present and future. *Bioch. Soc. Trans.* 24 : 307—327.
- Iwama A., Wang M.-H., Yamaguchi N., Ohno N., Okano K., Sudo T., Takeya M., Gervais F., Morissette C., Leonard E. J. 1995. Terminal differentiation of murine resident peritoneal macrophages is characterized by expression of the STK protein tyrosine kinase, a receptor for macrophage-stimulating protein. *Blood.* 86 : 3394—3403.
- Jayaraman T., Ondrias K., Ondriasova E., Marks A. R. 1996. Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. *Science.* 272 : 1492—1494.
- Lu S. C. 1999. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. *FASEB J.* 13 : 1169—1183.
- Marks A. R. 1997. Intracellular calcium-release channels: regulators of cell life and death. *Amer. J. Physiol.* 272 : H597—H605.
- Meister A. 1988. Glutathione metabolism and its selective modification. *J. Biol. Chem.* 263 : 17 205—17 208.
- Nolte C., Kirchhoff F., Kettenmann H. 1997. Epidermal growth factor is a motility factor for microglial cells *in vitro*: evidence for EGF receptor expression. *Eur. J. Neurosci.* 9 : 1690—1698.
- Posner B. I., Faure R., Burgess J. W., Bevan A. P., Lachance D., Zhang-Sun G., Fantus I. G., Ng J. B., Hall D. A., Lum B. S. 1994. Peroxovanadium compounds: a new class of potent phosphotyrosine phosphatase inhibitors which are insulin mimetics. *J. Biol. Chem.* 269 : 4596—4604.
- Rao R. K., Li L., Baker R. D., Baker S. S., Gupta A. 2000. Glutathione oxidation and PTPase inhibition by hydrogen peroxide in Caco-2 cell monolayer. *Amer. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279 : G332—G340.
- Renard D. C., Seitz M. B., Thomas A. P. 1992. Oxidized glutathione causes sensitization of calcium release to inositol 1,4,5-trisphosphate in permeabilized hepatocytes. *Biochem. J.* 284 : 507—512.
- Sen C. K. 1998. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thio. antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* 55 : 1747—1758.
- Sies H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radical Biol. Med.* 27 : 916—921.
- Staal F. J. T., Anderson M. T., Staal G. E. J., Herzenberg L. A., Güller C., Herzenberg L. 1994. Redox regulation of signal transduction: tyrosine phosphorylation and calcium influx. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 91 : 3619—3622.
- Sun H., Tonks N. K. 1994. The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling. *Trends Biochem. Sci.* 19 : 480—485.
- Thastrup O., Dawson A. P., Scharff O., Foder B., Cullen P. J., Drobak B. K., Bjerrum P. J., Christensen S. B., Hanley M. R. 1989. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions.* 27 : 17—23.
- Umezawa K., Hori T., Tajima H., Imoto M., Isshiki K., Takeuchi T. 1990. Inhibition of epidermal growth factor-induced DNA synthesis by tyrosine kinase inhibitors. *FEBS Lett.* 260 : 198—200.
- Walton K. M., Dixon J. E. 1993. Protein tyrosine phosphatases. *Annu. Rev. Biochem.* 62 : 101—120.
- Wang M.-H., Fung H.-L., Chen Y.-Q. 2000. Regulation of the RON receptor tyrosine kinase expression in macrophages: blocking the RON gene transcription by endotoxin-induced nitric oxide. *J. Immunol.* 164 : 3815—3821.
- Webb J. L. 1966. Arsenicals. In: *Enzymes and metabolic inhibitors.* New York: Acad. Press. 3 : 595—793.
- Yue X., Favot P., Dunn T. L., Cassidy A. I., Hume D. A. 1993. Expression of mRNA encoding the macrophage colony-stimulating factor receptor (c-fms) is controlled by a constitutive promoter and tissue-specific transcription elongation. *Mol. Cell. Biol.* 13 : 3191—3201.
- Zhou Y.-Q., Chen Y.-Q., Fisher J. H., Wang M. H. 2002. Activation of the RON receptor tyrosine kinase by macrophage-stimulating protein inhibits inducible cyclooxygenase-2 expression in murine macrophages. *J. Biol. Chem.* 277 : 38 104—38 110.

THE EFFECT OF OXIDIZED GLUTATHIONE AND ITS PHARMACOLOGICAL ANALOGUE, GLUTOXIM, ON INTRACELLULAR Ca^{2+} CONCENTRATION IN MACROPHAGES*L. S. Kurilova, Z. I. Krutetskaya, O. E. Lebedev, V. G. Antonov*Chair of Biophysics of St. Petersburg State University;
e-mail:cozzy@mail.ru

The effect of oxidized glutathione (GSSG) and its pharmacological analogue, glutoxim, on intracellular Ca^{2+} concentration in rat peritoneal macrophages was investigated using Fura-2AM microfluorimetry. It was shown that both GSSG and glutoxim increased intracellular Ca^{2+} concentration inducing Ca^{2+} -mobilization from thapsigargin-sensitive Ca^{2+} -stores and subsequent Ca^{2+} entry into macrophages from external medium. Dithiothreitol, which reduces S—S-bonds in proteins, completely prevented or reversed the increase in the intracellular Ca^{2+} concentration induced by GSSG or glutoxim. It suggests that the increase in the intracellular Ca^{2+} concentration induced by GSSG or glutoxim can be mediated by their interactions with functionally important SH-groups of proteins involved in Ca^{2+} -signaling. Two structurally different tyrosine kinase inhibitors, genistein and methyl-2,5-dihydroxycinnamate, prevented or completely reversed the increase in the intracellular Ca^{2+} -concentration induced by GSSG or glutoxim. On the contrary, tyrosine phosphatase inhibitor, Na orthovanadate, enhanced the increase in the intracellular Ca^{2+} concentration evoked by oxidizing agents. The data suggest that tyrosine kinases and tyrosine phosphatases are involved in regulatory effects of GSSG and glutoxim on the intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages.

Key words: peritoneal macrophages, glutoxim, oxidized glutathione, tyrosine kinases, tyrosine phosphatases.
