

## УЧАСТИЕ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА ВО ВЛИЯНИИ ПРЕПАРАТОВ ГЛУТОКСИМ И МОЛИКСАН НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ $Ca^{2+}$ В МАКРОФАГАХ

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

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

Глутоксим и моликсан являются представителями нового класса дисульфидсодержащих лекарственных средств, обладающих иммуномодулирующим, гепатопротективным и гемопозитивным действием на клетки. С использованием флуоресцентного  $Ca^{2+}$ -зонда Fura-2AM, двух структурно различных деполимеризаторов актиновых филаментов латрункулина В и цитохалазина D, а также каликулина А, вызывающего конденсацию актиновых филаментов под плазмалеммой, выявлено участие актинового цитоскелета в увеличении внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$ , вызываемом глутоксимом или моликсаном, в перитонеальных макрофагах крысы. Морфологические исследования с окраской актина роданин-фаллоидином показали, что глутоксим и моликсан вызывают реорганизацию актинового цитоскелета в перитонеальных макрофагах.

**Ключевые слова:** перитонеальные макрофаги, глутоксим, моликсан, внутриклеточная концентрация  $Ca^{2+}$ , актиновые филаменты.

В настоящее время разработано и введено в клиническую практику значительное число дисульфидсодержащих препаратов, изменяющих редокс-состояние и оказывающих физиологически значимый эффект на клетки. Так, синтетический аналог окисленного глутатиона (GSSG) — фармакологический препарат глутоксим® (динатриевая соль GSSG с нанодобавкой платины; ФАРМА-ВАМ, Москва) — используется 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). Сходное применение имеет другой дисульфидсодержащий препарат — моликсан (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина). Однако механизмы клеточного и молекулярного действия этих лекарственных средств далеки от полного понимания.

Ранее нами было обнаружено, что GSSG и глутоксим увеличивают внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  ( $[Ca^{2+}]_i$ ), вызывая мобилизацию  $Ca^{2+}$  из тапсигаргин-чувствительных  $Ca^{2+}$ -депо и последующий вход  $Ca^{2+}$  в перитонеальные макрофаги крысы (Крутецкая и др., 2007а; Курилова и др., 2008). Позднее было показано, что моликсан оказывает аналогичный эффект на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах (Крутецкая и др., 2010). Кроме того, нами установлено, что ключевыми компонентами сигнального каскада, запускаемого GSSG и глутоксимом и приводящего к увеличению  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах, являются тирозинкиназы, тирозинфосфатазы (Крутецкая и др., 2007б; Курилова и др., 2008), фосфатидилинозитолкиназы (Крутецкая и др., 2008), малые G-белки семейства Ras, а также важнейшие ферменты фосфоинозитидной системы передачи сигнала

— фосфолипаза С и протеинкиназа С (Крутецкая и др., 2009).

Известно, что действие фосфатидилинозитолкиназ, играющих важную роль в метаболизме фосфоинозитидов, приводит к динамической реорганизации актиновых филаментов (Foster et al., 2003). Кроме того, актиновые филаменты имеют высокую редокс-чувствительность и легко подвергаются S-глутатионилрованию (Dalle-Donne et al., 2003). Обнаружено также, что другой аналог GSSG — зарубежный препарат NOV-002 (GSSG в сочетании с цисплатиной) — вызывает S-глутатионилрование клеточных белков, главным образом актина. Эффект NOV-002 зависит от его концентрации и времени воздействия на клетки. S-глутатионилрование актина изменяет соотношение F- и G-актина, что приводит к существенным изменениям общей архитектуры цитоскелета и внутриклеточного транспорта (Townsend, 2007; Townsend et al., 2008). Можно предположить, что элементы актинового цитоскелета могут также служить мишенью и для глутоксима и моликсана.

В связи с этим представлялось целесообразным исследовать возможное участие актиновых филаментов в регуляторном влиянии глутоксима и моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах крысы. Кроме того, участие актинового цитоскелета в сигнальном каскаде, запускаемом глутоксимом или моликсаном в макрофагах, предполагает, по-видимому, его реорганизацию и перераспределение. Поэтому второй задачей данного исследования являлось проведение визуализации возможной реорганизации актинового цитоскелета в макрофагах при действии глутоксима или моликсана.

## Материал и методика

**Объект исследования.** Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar. Резидентные макрофаги выделяли из перитонеальной полости крыс массой 180—250 г по методу, описанному ранее (Conrad, 1981; Randriamampita, Trautmann, 1987). Сразу после выделения клетки имели сферическую форму и диаметр 10—20 мкм. Суспензию клеток помещали в бакпечатки, содержащие кварцевые стекла размером 10 × 10 мм. Клетки на стеклах культивировали в течение 1—3 сут при 37 °С в среде 199 (pH 7.2), содержащей 20 % сыворотки крови быка, глутамин (3 %), пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (100 мг/мл). Тест на  $\alpha$ -нафтил эстеразу (Monahan et al., 1981) показал, что по меньшей мере 96 % клеток в монослоях были макрофагами. Эксперименты проводили при комнатной температуре 22—24 °С через 1—2 сут после начала культивирования клеток. Кварцевые стекла с клетками помещали в экспериментальную камеру, заполненную физиологическим раствором следующего ионного состава (мМ): NaCl — 140, KCl — 5, CaCl<sub>2</sub> — 1, MgCl<sub>2</sub> — 1, HEPES-NaOH — 5, pH 7.3—7.4. Бескальциевая среда содержала 0 мМ CaCl<sub>2</sub> и 1 мМ ЭГТА. Подробно процедура культивирования макрофагов описана ранее (Крутецкая и др., 1997б).

**Реактивы.** Препараты глутоксим и моликсан предоставлялись фирмой ФАРМА-ВАМ (Москва). Маточные растворы глутоксима (50 мг/мл) и моликсана (50 мг/мл) готовили на воде.

В опытах применяли реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США). Маточные растворы цитохалазина D (2 мг/мл), латрункулина B (5 мМ) и каликулина A (50 мкМ) готовили в диметилсульфоксиде.

Для измерения  $[Ca^{2+}]_i$  использовали флуоресцентный зонд Fura-2 AM (Sigma-Aldrich, США). Макрофаги инкубировали в течение 45 мин в физиологическом растворе, содержащем 2 мкМ Fura-2AM, 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-2AM 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 применяли объектив 10× 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. Значения  $[Ca^{2+}]_i$  рассчитывали по уравнению Гринкевича (Grynkiwicz et al., 1985). На рис. 1—4 представлены результаты типичных экспериментов.

**Визуализация элементов актинового цитоскелета в макрофагах.** На 2-е сут культивирования макрофаги инкубировали в течение 20 мин со 100 мкг/мл глутоксима или моликсана. Контрольная группа клеток действию препаратов не подвергалась. Для

визуализации актинового цитоскелета клетки отмывали от среды фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), фиксировали 3.7%-ным раствором формалина в течение 15 мин, трижды промывали PBS, обрабатывали 0.1%-ным раствором Тритона X-100 в течение 10 мин и окрашивали родамин-фаллоидином (Sigma-Aldrich, США) при 37 °С в течение 10 мин. Микроскопирование полученных препаратов производили на инвертированном микроскопе AxioObserver.Z1 (Zeiss, Германия), возбуждая и регистрируя флуоресценцию светом с длинами волн 550 и 605 нм соответственно. Использовали объектив 100×. Изображения получены с применением устройства Apo-Tome. Для обработки изображений и получения графиков распределения интенсивности флуоресценции вдоль выделенной линии использована программа ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>).

## Результаты и обсуждение

Влияние деполимеризаторов актиновых филаментов цитохалазина D и латрункулина B. Для выявления участия актинового цитоскелета во влиянии глутоксима и моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах крысы использовали два структурно различных агента, вызывающих деполимеризацию микрофиламентов, — цитохалазин D и латрункулин B (Spector et al., 1983).

В контрольных экспериментах показано, что инкубация макрофагов в течение 20 мин со 100 мкг/мл глутоксима в номинально бескальциевой среде вызывает нарастающее и существенное повышение  $[Ca^{2+}]_i$ , отражающее мобилизацию Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных Ca<sup>2+</sup>-депо. Добавление в наружную среду 2 мМ Ca<sup>2+</sup> индуцирует вход Ca<sup>2+</sup> в цитозоль, обусловленный, по-видимому, опустошением Ca<sup>2+</sup>-депо (рис. 1, а; 2, а; 3, а). Предварительная инкубация клеток с 10 мкг/мл цитохалазина D в течение 5 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима приводит к усилению вызываемого глутоксимом повышения  $[Ca^{2+}]_i$ , связанного с мобилизацией Ca<sup>2+</sup> из депо, и последующего входа Ca<sup>2+</sup> (рис. 1, б). Более длительная (20 мин) преинкубация макрофагов с цитохалазином D приводит к практически полному подавлению увеличения  $[Ca^{2+}]_i$  и входа Ca<sup>2+</sup>, вызываемых глутоксимом (рис. 1, в). Сходные результаты получены с использованием другого деполимеризатора актиновых филаментов — латрункулина B в концентрации 5 мкМ (рис. 2).

Усиление повышения  $[Ca^{2+}]_i$ , индуцированного глутоксимом, при кратковременной инкубации клеток с цитохалазином D или латрункулином B по сравнению с контролем согласуется с полученными нами ранее данными о влиянии на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах другого окисляющего SH-реактанта — фениларзиноксида (ФАО) (Крутецкая и др., 1997а). Обнаружено, что кратковременная (6 мин) инкубация перитонеальных макрофагов с агентами, нарушающими структуру актиновых филаментов (20 мкг/мл цитохалазина B или 40 мкМ фаллоидина), вызывает значительное и прогрессивно нарастающее увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  при действии ФАО. Если цитохалазин B или фаллоидин добавляли на фоне Ca<sup>2+</sup>-ответа, вызванного ФАО, то с задержкой в 1—2 мин происходило дальнейшее существенное увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ . Это свидетельствует о том, что реорганизация актиновых филаментов приводит к стимуляции Ca<sup>2+</sup>-ответа, индуцированного ФАО (Крутецкая и др., 1997а).

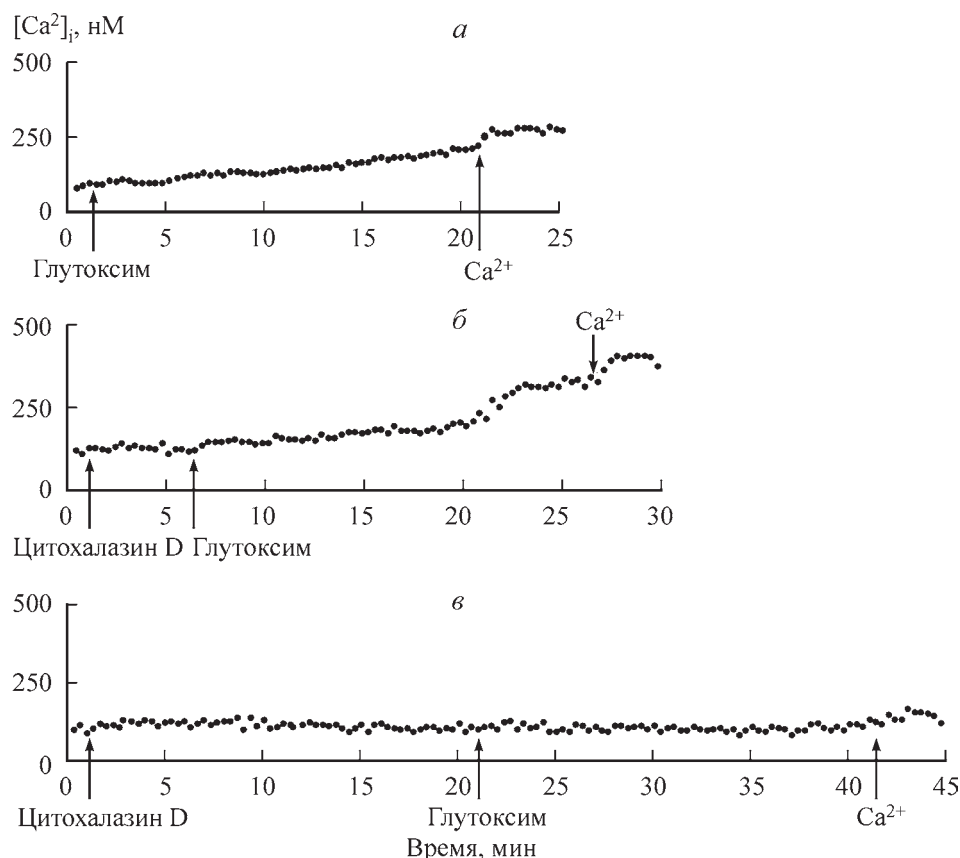


Рис. 1. Влияние цитохалазина D на увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , вызываемое глутоксимом, в макрофагах крысы.

*a* — клетки инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима в номинально бескальциевой среде, после чего вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ ; *б*, *в* — клетки предварительно инкубировали в течение 5 (*б*) или 20 (*в*) мин с 10 мкг/мл цитохалазина D в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима, через 20 мин вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ . Здесь и на рис. 2—4 каждая регистрация получена для группы из 40—50 клеток и представляет собой типичный вариант из 3—7 экспериментов.

Таким образом, нами показано, что кратковременная инкубация макрофагов с агентами, вызывающими деполимеризацию актиновых филаментов, приводит к усилению увеличения  $[Ca^{2+}]_i$ , индуцированного глутоксимом. Можно предположить, что при кратковременной инкубации клеток с деполимеризаторами микрофиламентов происходит разборка только кортикального актина, вследствие чего облегчается передача сигнала, индуцированного глутоксимом, от плазмалеммы к  $Ca^{2+}$ -депо, что приводит к усилению мобилизации  $Ca^{2+}$  из депо. При длительном воздействии латрункулина В или цитохалазина D происходят полная разборка не только подмембранных, но и цитоплазматических актиновых филаментов и подавление мобилизации  $Ca^{2+}$  из депо.

Вызываемый глутоксимом или моликсаном вход  $Ca^{2+}$  в клетку происходит, по-видимому, по депозависимому механизму (Крутецкая и др., 2007а; Курилова и др., 2008). Ранее (Курилова и др., 2006) в опытах с использованием пуринаргических агонистов АТФ и УТФ, а также ингибиторов эндоплазматических  $Ca^{2+}$ -АТФаз тапсигаргина и циклопязониковой кислоты нами показано, что депозависимый вход  $Ca^{2+}$  в перитонеальные макрофаги крысы происходит согласно модели депозависимого входа «связывание по типу секреции» (Patterson et al., 1999; Rosado, Sage, 2000), предполагающей обратимую транслокацию  $Ca^{2+}$ -депо к плазмалемме, происходящую с участием актиновых филаментов. При малом времени воздействия латрункулин В или цитохалазин D вызывают частичную

деполимеризацию подмембранных микрофиламентов, облегчая тем самым связывание  $Ca^{2+}$ -депо с плазмалеммой. При длительном воздействии латрункулина В или цитохалазина D происходит полная разборка актиновых филаментов и вспомогательная роль актинового цитоскелета в процессе взаимодействия  $Ca^{2+}$ -депо с депозависимыми  $Ca^{2+}$ -каналами в плазмалемме становится невозможной. Таким образом, полученные в настоящей работе данные о влиянии латрункулина В и цитохалазина D на вход  $Ca^{2+}$ , индуцированный глутоксимом, подтверждают модель «связывание по типу секреции» для перитонеальных макрофагов крысы.

Результаты согласуются с данными о влиянии цитохалазина D и латрункулина А на депозависимый вход  $Ca^{2+}$  в тромбоциты (Rosado, Sage, 2000) и нашими данными о влиянии латрункулина В на  $Ca^{2+}$ -сигналы в перитонеальных макрофагах крысы (Курилова и др., 2006).

Влияние каликулина А, вызывающего конденсацию микрофиламентов у плазмалеммы. Для дальнейшего подтверждения участия микрофиламентов во влиянии глутоксима или моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах мы исследовали, влияет ли образование плотного слоя кортикального актина на увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  под действием глутоксима или моликсана. Для этого использовали каликулин А. Каликулин А, выделяемый из морской губки *Discodermia calyx*, является высокоэффективным и специфическим ингибитором серин/треонин-фосфатаз PP1 и PP2A. На клетках многих типов,

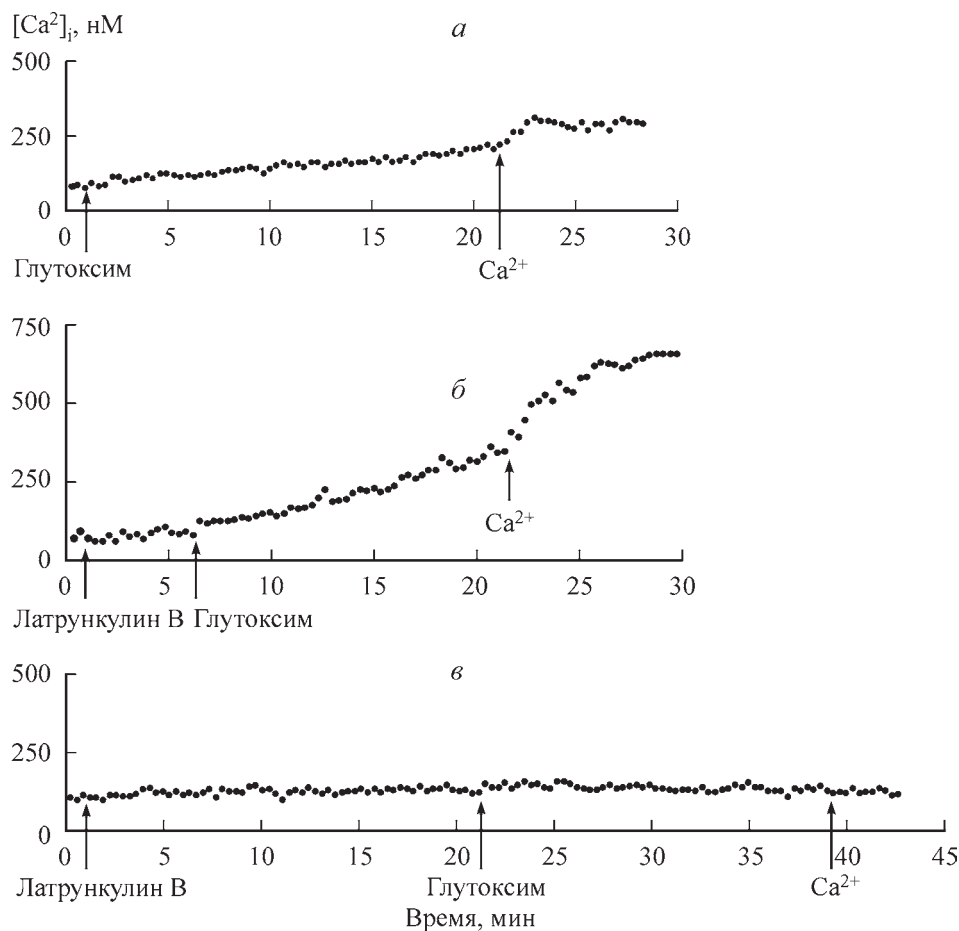
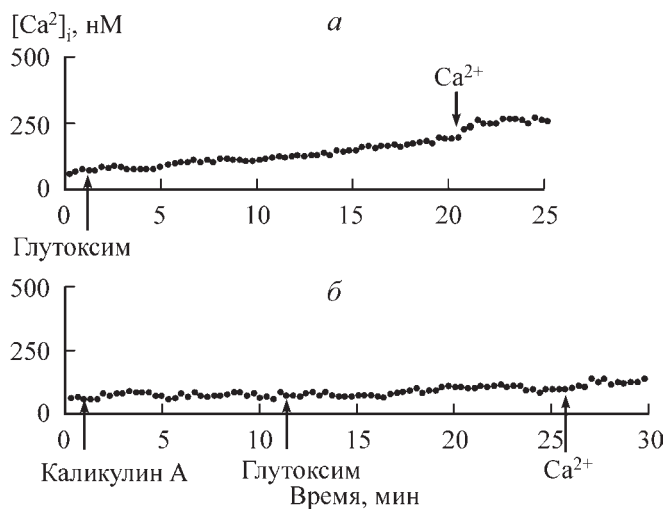


Рис. 2. Влияние латрункулина В на увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , вызываемое глутоксимом, в макрофагах крысы.

*a* — клетки инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима в номинально бескальциевой среде, после чего вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ ; *б, в* — клетки предварительно инкубировали в течение 5 (*б*) или 20 (*в*) мин с 5 мкг латрункулина В в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима, через 15 (*б*) или 17 (*в*) мин вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ .

включая тромбоциты, показано, что каликулин А в концентрации до 100 нМ вызывает реорганизацию актиновых филаментов, облегчая фосфорилирование актинсвязывающих ERM-белков (эзрина, радиксина и моззина) (Patterson et al., 1999). Фосфорилирование ERM-белков способствует взаимодействию актиновых филаментов с плазмалеммой (Kreienbuhl et al., 1992; Matsui et al., 1998).



После обработки клеток каликулином А актиновые филаменты конденсируются у плазмалеммы (Patterson et al., 1999), причем полимеризация актина не возрастает (Rosado et al., 2000).

Показано, что предварительная инкубация макрофагов со 100 нМ каликулина А в течение 10 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима вызывает практически полное подавление увеличения  $[Ca^{2+}]_i$  и последующего входа  $Ca^{2+}$ , вызываемых глутоксимом (рис. 3, *б*). Полученные данные свидетельствуют об участии актиновых филаментов в комплексном сигнальном каскаде, вызываемом глутоксимом и приводящем к увеличению  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах. Практически аналогичные данные были получены при использовании 100 мкг/мл моликсана (рис. 4, *б*).

Рис. 3. Влияние каликулина А на увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , вызываемое глутоксимом, в макрофагах крысы.

*a* — клетки инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима в номинально бескальциевой среде, затем вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ ; *б* — клетки предварительно инкубировали в течение 10 мин в присутствии 100 нМ каликулина А в номинально бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима, через 15 мин вход  $Ca^{2+}$  индуцировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ .

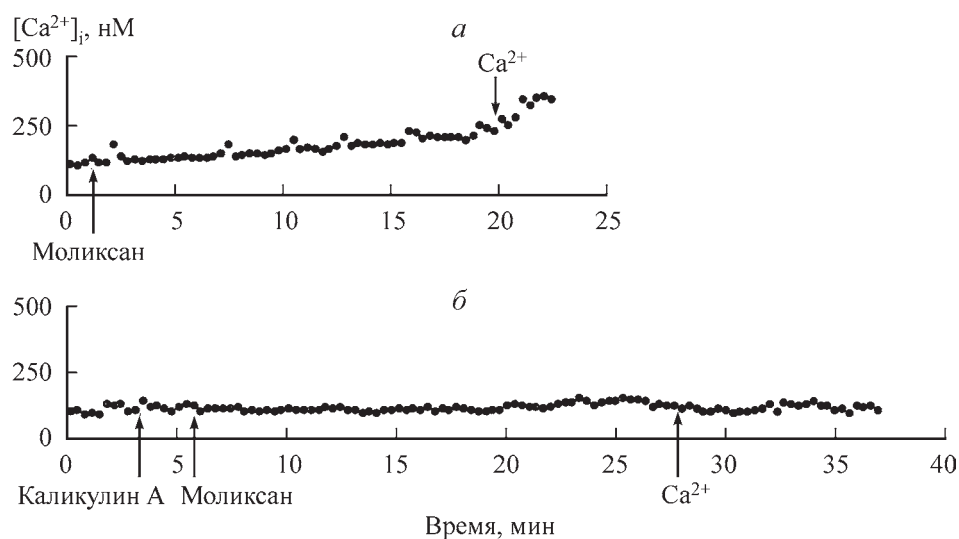


Рис. 4. Влияние каликулина А на увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , вызываемое моликсаном, в макрофагах крысы.

*а* — клетки инкубировали в течение 19 мин в присутствии 100 мкг/мл моликсана в номинально бескальциевой среде, затем вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ ; *б* — клетки предварительно инкубировали в течение 2 мин в присутствии 100 нМ каликулина А в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл моликсана, через 22 мин вход  $Ca^{2+}$  индуцировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ .

Таким образом, образование плотного слоя кортикального актина под плазмалеммой при воздействии каликулина А практически полностью предотвращает увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  при действии глутоксима или моликсана.

Полученные результаты о подавлении депозависимого входа  $Ca^{2+}$ , индуцированного глутоксимом или моликсаном, при действии каликулина А согласуются с данными об ингибировании депозависимого входа  $Ca^{2+}$  при воздействии каликулина А на тромбоциты человека (Rosado et al., 2000; Rosado, Sage, 2000) и нашими данными о влиянии каликулина А на  $Ca^{2+}$ -сигналы, индуцированные пуринергическим агонистом АТФ или ингибитором эндоплазматических  $Ca^{2+}$ -АТФаз тапсигаргином, в макрофагах крысы (Курилова и др., 2009). В модели депозависимого входа  $Ca^{2+}$  «связывание по типу секреции» кортикальный F-актин предотвращает активацию депозависимого входа  $Ca^{2+}$ , подобно тому как при экзоцитозе подмембранный актин препятствует подходу секреторных гранул к мембране (Muallem et al., 1995). В соответствии с этим каликулин А ингибирует депозависимый вход  $Ca^{2+}$ , индуцируя образование плотного слоя подмембранного актина, который вытесняет органеллы из этой области и предотвращает взаимодействие между плазмалеммой и внутриклеточными органеллами. Таким образом, результаты настоящей работы о влиянии каликулина А на депозависимый вход  $Ca^{2+}$ , индуцированный глутоксимом или моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы, подтверждают модель депозависимого входа  $Ca^{2+}$  «связывание по типу секреции» для данного типа клеток. Подавление мобилизации  $Ca^{2+}$  из депо, вызываемой глутоксимом или моликсаном, может объясняться тем, что образование плотного слоя кортикального актина препятствует передаче сигнала, индуцированного глутоксимом или моликсаном, от плазмалеммы к  $Ca^{2+}$ -депо.

Участие актинового цитоскелета во влиянии глутоксима и моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах подтверждается нашими морфологическими данными по визуализации реорганизации актинового цитоскелета в макрофагах при действии глутоксима и моликсана.

Реорганизация актинового цитоскелета при действии глутоксима или моликсана. По-

казано, что при действии глутоксима или моликсана сеть микрофиламентов в макрофагах претерпевает значительные изменения. На рис. 5 представлены флуоресцентные микрофотографии актина, окрашенного родамин-фаллоидином, в контрольных клетках (*а*) и в клетках, обработанных глутоксимом (*б*) или моликсаном (*в*). Видно, что элементы актинового цитоскелета в контрольных клетках локализованы под плазматической мембраной и образуют четко различимый кортикальный слой (рис. 5, *а*). В обработанных глутоксимом макрофагах происходит реорганизация актинового цитоскелета. Так, кортикальный слой становится более широким и «рыхлым», появляются скопления актина в цитозоле (рис. 5, *б*). На рис. 5, *в* показано сходное влияние моликсана на распределение актина в макрофагах. О реорганизации актинового цитоскелета при действии дисульфидсодержащих препаратов свидетельствует также сравнение графиков распределения интенсивности флуоресценции в контрольных клетках (рис. 5, *г*) и клетках, обработанных глутоксимом (рис. 5, *д*) или моликсаном (рис. 5, *е*).

Таким образом, нами показано, что препараты глутоксим и моликсан вызывают реорганизацию актинового цитоскелета в перитонеальных макрофагах крысы. Полученные результаты согласуются с данными о действии на актиновый цитоскелет другого синтетического аналога GSSG — препарата NOV-002 (Townsend, 2007; Townsend et al., 2008). Реорганизация актинового цитоскелета в мышечных эмбриональных фибробластах и клетках мышечной гепатомы МГ22а была обнаружена также при действии другого SH-реактанта, муколитического и антиоксидантного препарата N-ацетилцистеина (Гамалей и др., 2010).

Образование более широкого и «рыхлого» слоя кортикального актина по сравнению с контролем и появление скоплений актина в цитозоле после воздействия глутоксима или моликсана могут облегчать проведение сигнала, запускаемого этими препаратами, от плазмалеммы к внутриклеточным  $Ca^{2+}$ -депо. Латрункулин В и цитохалазин D, индуцируя разборку актиновых филаментов, по-видимому, предотвращают реорганизацию актинового цитоскелета, происходящую под действием глутоксима, и подавляют сигнальный каскад, вызываемый этим агентом

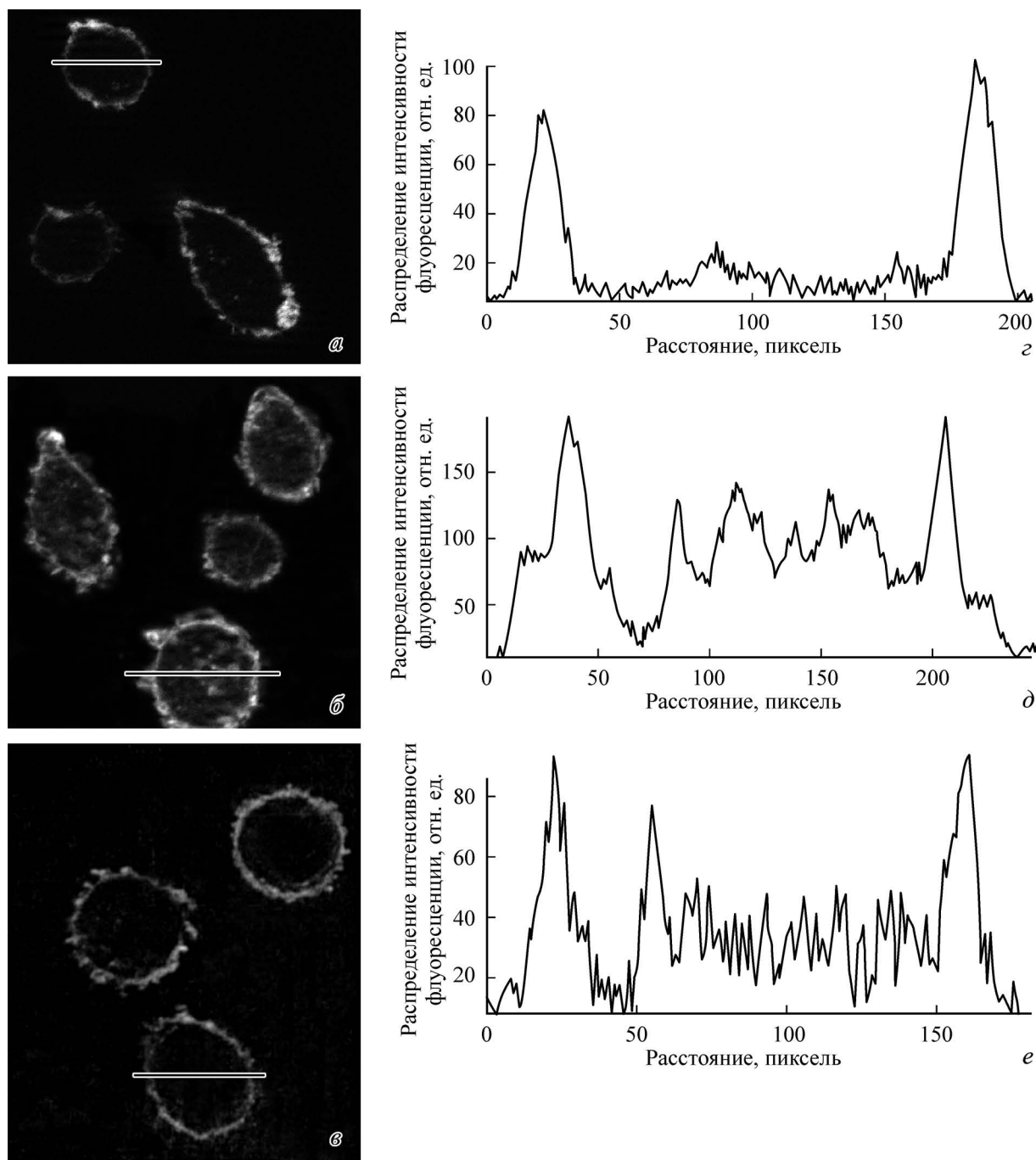


Рис. 5. Организация актинового цитоскелета в нативных макрофагах (а, з) и в макрофагах, обработанных глутоксимом (б, д) или моликусаном (в, е).

а—в — флуоресцентные микрофотографии актина, окрашенного родамин-фаллоидином, в контрольных клетках (а) и клетках, обработанных в течение 20 мин глутоксимом (100 мкг/мл, б) или моликусаном (100 мкг/мл, в). Об. 100×. з—е — распределение интенсивности флуоресценции (отн. ед.) вдоль выделенной линии (а—в) в контрольных клетках (з) и в клетках, обработанных глутоксимом (д) или моликусаном (е).

в макрофагах. Каликулин А может предотвращать эффект глутоксима или моликусана, вызывая образование плотного слоя микрофиламентов под плазмалеммой и затрудняя, таким образом, передачу сигнала в клетку. По-видимому, для проведения этого сигнала необходима изначальная интактность элементов актинового цитоскелета, поскольку как длительная предварительная деполимеризация актина, так и образование плотного слоя микрофиламентов под мембраной препятствуют увеличению  $[Ca^{2+}]_i$  при действии глутоксима или моликусана.

Таким образом, нами показано, что любые изменения в организации актиновых филаментов приводят к модуляции влияния глутоксима или моликусана на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах. Кроме того, глутоксим и моликусан сами вызывают реорганизацию актинового цитоскелета в макрофагах. Можно заключить, что актиновый цитоскелет является непосредственным участником сигнального каскада, запускаемого глутоксимом или моликусаном и приводящего к увеличению  $[Ca^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах крысы.

## Список литературы

- Гамалей И. А., Киртичникова К. М., Вахромова Е. А., Филатова Н. А. 2010. N-ацетилцистеин уменьшает чувствительность трансформированных и эмбриональных клеток к литическому действию естественных киллерных клеток. Цитология. 52 (7) : 555—561.
- Жуков О. Б., Зубарев А. Р., Мезенцева М. В., Андриюшкова 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., Курилова Л. С., Лебедев О. Е., Крутецкая Н. И., Войцехович К. О., Наумова А. А., Шамшев А. В. 2010. Влияние дисульфидсодержащего препарата Моликсан на внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  в макрофагах. В кн.: Тезисы VIII Международной конференции «Биоантиоксидант». М. 232—233.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Курилова Л. С., Антонов В. Г., Антушевич А. Е., Ноздрачев А. Д. 2007а. Возможное участие ионов кальция в регуляторном действии окисленного глутатиона на макрофаги. Докл. РАН. 412 (5) : 700—703.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Курилова Л. С., Антонов В. Г., Ноздрачев А. Д. 2007б. Роль тирозинкиназ и тирозинфосфатаз в действии окисленного глутатиона и препарата глутоксим на внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  в макрофагах. Докл. РАН. 417 (2) : 273—275.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Курилова Л. С., Антонов В. Г., Ноздрачев А. Д. 2008. Возможное участие фосфатидилинозитолкиназы в действии окисленного глутатиона и препарата глутоксим на внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  в макрофагах. Докл. РАН. 422 (4) : 562—563.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Курилова Л. С., Антонов В. Г., Ноздрачев А. Д. 2009. Роль ключевых ферментов фосфоинозитидного пути передачи сигнала в действии окисленного глутатиона и препарата глутоксим на внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  в макрофагах. Докл. РАН. 428 (2) : 272—274.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Тюшев В. Е., Крутецкая Н. И., Бутов С. Н., Петрова Т. В. 1997а. Ингибитор тирозинфосфатаз фениларзиноксид индуцирует увеличение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  в перитонеальных макрофагах крысы и фибробластах человека. Цитология. 39 (12) : 1116—1130.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Тюшев В. Е., Крутецкая Н. И., Роцина Н. Г. 1997б. Влияние ингибиторов тирозинкиназ и тирозинфосфатаз на вход  $Ca^{2+}$ , индуцируемый АТФ и тапсигаргином в перитонеальных макрофагах крысы. Цитология. 39(2/3) : 164—176.
- Курилова Л. С., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 2006. Влияние латрункулина В, джасплакинолида и брэфельдина А на депозависимый вход  $Ca^{2+}$  в макрофаги. Цитология. 48 (10) : 867—874.
- Курилова Л. С., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Антонов В. Г. 2008. Влияние окисленного глутатиона и его фармакологического аналога препарата глутоксим на внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$  в макрофагах. Цитология. 50 (5) : 452—461.
- Курилова Л. С., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Крутецкая Н. И., Иголюкова О. И., Шамшев А. В., Войцехович К. О. 2009. Влияние каликулина А на  $Ca^{2+}$ -сигналы в макрофагах. В кн.: Тезисы 13-й Международной Пушкинской школы-конференции молодых ученых «Биология — наука XXI века». Пушкино. 141—142.
- 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.
- Conrad R. E. 1981. Induction and collection of peritoneal exudate macrophages. Manual of macrophages methodology. New York: Marcell Dekker. 5—11.
- Dalle-Donne I., Giustarini D., Rossi R., Colombo R., Milzani A. 2003. Reversible S-glutathionylation of Cys 374 regulates actin filament formation by inducing structural changes in the actin molecule. Free Rad. Biol. Med. 34 : 23—32.
- Foster F. M., Traer C. J., Abraham S. M., Fry M. J. 2003. The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. J. Cell Sci. 116 : 3037—3040.
- Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. 1985. A new generation of  $Ca^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260 : 3440—3450.
- Kreienbuhl P., Keller H., Niggli V. 1992. Protein phosphatase inhibitors okadaic acid and calyculin A alter cell shape and F-actin distribution and inhibit stimulus-dependent increases in cytoskeletal actin of human neutrophils. Blood. 80 : 2911—2919.
- Matsui T., Maeda M., Doi Y., Yonemura S., Amano M., Kaibuchi K., Trukita S. 1998. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. J. Cell Biol. 140 : 647—657.
- Monahan R. A., Dvorak H. F., Dvorak A. M. 1981. Ultrastructural localization of nonspecific esterase activity in guinea pig and human monocytes, macrophages and lymphocytes. Blood. 58 : 1089—1099.
- Mualllem S., Kwiatkowska K., Xu X., Yin H. L. 1995. Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. J. Cell Biol. 128 : 589—598.
- Patterson R. L., Van Rossum D. B., Gill D. L. 1999. Store-operated  $Ca^{2+}$  entry: evidence for a secretion-like coupling model. Cell. 98 : 487—499.
- Randriamampita C., Trautmann A. 1987. Ionic channels in murine macrophages. Cell Biol. 105 : 761—769.
- Rosado J., Jenner S., Sage S. O. 2000. A role for the actin cytoskeleton in the initiation and maintenance of store-mediated calcium entry in human platelets. J. Biol. Chem. 275 : 7527—7533.
- Rosado J. A., Sage S. O. 2000. The actin cytoskeleton in store-mediated calcium entry. J. Physiol. 526 (2) : 221—229.
- Spector I., Shochet N. R., Kashman Y., Groweiss A. 1983. Latrunculins: novel marine toxins that disrupt microfilament organization in cultured cells. Science. 219 : 493—495.
- Townsend D. M. 2007. S-glutathionylation: indicator of cell stress and regulator of the unfolded protein response. Mol. Interv. 7 : 313—324.
- Townsend D. M., He L., Hutchens S., Garrett T. E., Pazoles C. J., Tew K. D. 2008. NOV-002, a glutathione disulfide mimetic, as a modulator of cellular redox balance. Cancer Res. 68 : 2870—2877.

THE INVOLVEMENT OF ACTIN CYTOSKELETON IN GLUTOXIM AND MOLIXAN EFFECT  
ON INTRACELLULAR Ca<sup>2+</sup>-CONCENTRATION IN MACROPHAGES*L. S. Kurilova, Z. I. Krutetskaya, O. E. Lebedev, N. I. Krutetskaya, V. G. Antonov*Chair of Biophysics of St. Petersburg State University;  
e-mail: cozy@mail.ru

Glutoxim and molixan belong to new generation of disulfide-containing drugs with immunomodulatory, hepatoprotective and hemopoetic effect on cells. Using Fura-2AM microfluorimetry, two structurally distinct actin filament disrupters, latrunculin B and cytochalasin D, and calyculin A, which causes actin filaments condensation under plasmalemma, we have shown the involvement of actin cytoskeleton in the intracellular Ca<sup>2+</sup>-concentration increase induced by glutoxim or molixan in rat peritoneal macrophages. Morphological data obtained with the use of rhodamine-phalloidine have demonstrated that glutoxim and molixan cause the actin cytoskeleton reorganization in rat peritoneal macrophages.

Key words: peritoneal macrophages, glutoxim, molixan, intracellular Ca<sup>2+</sup>-concentration, actin filaments.

---