

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ЦИКЛООКСИГЕНАЗ И ЛИПОКСИГЕНАЗ НА Ca^{2+} -ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ГЛУТОКСИМОМ И МОЛИКСАНОМ, В МАКРОФАГАХ

© Л. С. Курилова,* З. И. Крутецкая, А. А. Наумова, С. Н. Бутов,
Н. И. Крутецкая, В. Г. Антонов

С.-Петербургский государственный университет;

** электронный адрес: cozy@mail.ru*

Глутоксим и моликсан являются представителями нового класса дисульфидсодержащих лекарственных средств, обладающих иммуномодулирующим, гепатопротекторным и гемопоэтическим действием. С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM исследовано возможное участие циклооксигеназного и липоксигеназного путей окисления арахидоновой кислоты во влиянии глутоксима и моликсана на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в перитонеальных макрофагах крысы. Впервые показано, что преинкубация клеток с ингибиторами циклооксигеназ (индометацином или аспирином) или липоксигеназ (нордигидрогуаретиковой кислотой, каффеиковой кислотой или байкалэйном) практически полностью предотвращает увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , вызываемое глутоксимом или моликсаном. Полученные данные свидетельствуют об участии продуктов и (или) ферментов циклооксигеназного и липоксигеназного путей метаболизма арахидоновой кислоты во влиянии глутоксима и моликсана на процессы Ca^{2+} -сигнализации в макрофагах.

Ключевые слова: внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , перитонеальные макрофаги, глутоксим, моликсан, арахидоновая кислота, циклооксигеназы, липоксигеназы.

Принятые сокращения: АК — арахидоновая кислота, НДГК — нордигидрогуаретиковая кислота, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ — внутриклеточная концентрация Ca^{2+} .

Одной из основных систем поддержания окислительно-восстановительного (редокс) статуса клеток является система глутатион—окисленный глутатион (GSH/GSSG) (Sen, 1998; Sies, 1999). На основе GSSG синтезированы фармакологические препараты глутоксим® (динатриевая соль GSSG с платиной в наноконцентрации) и моликсан® (комплекс глутоксима с нуклеозидом инозином) (ФАРМА-ВАМ, Москва), влияющие на редокс-статус клеток. Глутоксим используется как иммуномодулятор и цитопротектор в комплексной терапии инфекционных и онкологических заболеваний (Борисов и др., 2001; Соколова и др., 2002; Антушевич и др., 2013). Моликсан — иммуномодулятор и гепатопротектор, применяемый при лечении цирроза печени и вирусного гепатита В и С (Борисов и др., 2001). Однако механизмы клеточного и молекулярного действия этих лекарственных средств далеки от полного понимания и являются предметом активных исследований.

Одной из основных мишеней действия глутоксима и моликсана являются такие важные иммунокомпетентные клетки, как макрофаги (Еремеев, Гергергт, 2013). Ранее нами было впервые обнаружено, что GSSG, глутоксим и моликсан увеличивают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), вызывая мобилизацию его из тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+} -депо и последующий депо-зависимый вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы

(Крутецкая и др., 2007а; Курилова и др., 2008, 2011). Кроме того, с использованием широкого спектра агентов, влияющих на компоненты сигнальных систем в клетках, нами впервые показано, что ключевыми участниками сигнального каскада, запускаемого GSSG и глутоксимом и приводящего к увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах, являются тирозинкиназы и тирозинфосфатазы (Крутецкая и др., 2007б; Курилова и др., 2008), фосфатидилинозитолкиназы (Крутецкая и др., 2008), важнейшие ферменты фосфоинозитидной системы передачи сигнала — фосфолипаза С и протеинкиназа С (Крутецкая и др., 2009). Выявлено также участие элементов актинового цитоскелета (Крутецкая и др., 2011; Курилова и др., 2012) и микротрубочек (Крутецкая и др., 2013) в действии глутоксима или моликсана на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах.

Макрофаги отвечают на воздействие разнообразных агонистов, быстро гидролизуют мембранные фосфолипиды, что приводит к генерации большого числа внутриклеточных и экстраклеточных мессенджеров (Крутецкая и др., 2003). Так, активированные фагоциты продуцируют большое количество арахидоновой кислоты (АК) — полиненасыщенной жирной кислоты (20 : 4, ω6), освобождаемой из мембранных фосфолипидов при действии фосфолипазы A_2 (Dennis, 2000).

Свободная АК легко окисляется с образованием широкого спектра биологически активных соединений —

эйкозаноидов: простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов, различных гидроксикислот (Needleman et al., 1986; Крутецкая, Лебедев, 1993). Известны три основных энзиматических пути окисления АК: с участием циклооксигеназ, липоксигеназ и эпоксигеназ (цитохром P-450-подобных ферментов) (Needleman et al., 1986; Крутецкая, Лебедев, 1993). Продукты метаболизма АК являются аутокринными и паракринными факторами, которые регулируют широкий спектр физиологических и патологических процессов: воспаление, аллергические реакции, апоптоз, транспорт ионов в почках, работу желез слизистой желудочно-кишечного тракта и др. (Dubois et al., 1998). Известно, что в иммунных клетках различных типов, включая макрофаги, АК окисляется преимущественно с участием циклооксигеназ и липоксигеназ (Крутецкая, Лебедев, 1993; Крутецкая и др., 2003).

Ферменты метаболизма АК имеют высокую редокс-чувствительность и являются мишенями для действия окисляющих и восстанавливающих агентов (Li et al., 1996; Park et al., 2009; Hafner et al., 2011). Так, установлено, что окислительный стресс в клетке приводит к активации фосфолипаз A₂, высвобождающих АК из мембранных фосфолипидов, а также активации липоксигеназ (Li et al., 1996; Park et al., 2009; Hafner et al., 2011).

В связи с этим в настоящей работе исследовали возможное участие циклооксигеназного и липоксигеназного путей метаболизма АК во влиянии глутоксида и моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы.

Материал и методика

Клетки. 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 а-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): 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂ и 5 HEPES-NaOH, pH 7.3—7.4. Бескальциевая среда отличалась тем, что содержала 0 мМ CaCl₂ и 1 мМ ЭГТА. Подробно процедура культивирования макрофагов описана ранее (Крутецкая и др., 1997б).

Использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США). Маточный раствор глутоксида (50 мг/мл) и моликсана (50 мг/мл) (ФАРМА-ВАМ, Москва) готовили на воде, индометацина (10 мМ), ацетилсалициловой кислоты (10 мМ), каффеиновой кислоты (5 мМ) и байкалейна (5 мМ) — на этиловом спирте, нордигидрогуаретиковой кислоты (10 мМ) — 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 мМ Fura-2AM, при комнатной температуре. Стекла с окрашенными клетками отмывали физиологическим раствором и переносили в экспериментальную камеру, расположенную на столике флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Для возбуждения флуоресценции Fura-2AM использовали осветитель микроскопа Leica DM 4000B, источником света в котором является ксеноновая лампа мощностью 75 Вт. Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм через объектив микроскопа. Для выделения соответствующих участков спектра использовали узкополосный оптический фильтр. Эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм при помощи фотоэлектронного умножителя (ФЭУ 85), встроенного в оптическую систему микроскопа. Сигнал с ФЭУ усиливали специально сконструированным усилителем. Для оцифровки сигнала с ФЭУ и управления функциями микроскопа использовали специализированный микроконтроллер на базе микропроцессора ATMEGA 168, подключенного к компьютеру через USB-интерфейс. Для управления экспериментом использовали оригинальное программное обеспечение. В экспериментах применяли объективы 10× с апертурой 8 мм. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения $[Ca^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича (Gryniewicz et al., 1985). На рисунках представлены результаты типичных экспериментов.

Для выявления и усиления входа Ca^{2+} в клетки использовали классическую схему эксперимента (Ca^{2+} -free/ Ca^{2+} -reintroduction protocol) (Alonso-Torre, Trautmann, 1993). Макрофаги инкубировали в номинально бескальциевой среде, затем на них действовали глутоксидом или моликсаном, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо. После добавления в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} и восстановления физиологического градиента концентрации Ca^{2+} наблюдалось быстрое повышение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее вход Ca^{2+} в клетку. Ингибиторы циклооксигеназ или липоксигеназ добавляли до введения глутоксида или моликсана или во время развивающегося входа Ca^{2+} из наружной среды.

Результаты и обсуждение

В контрольных экспериментах показано, что инкубация макрофагов в номинально бескальциевой среде в течение 20—25 мин в присутствии 200 мкг/мл моликсана (рис. 1, а; 3, а; 4, а) или 200 мкг/мл глутоксида (рис. 2, а) вызывает нарастающее и существенное повышение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо. Добавление в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} индуцирует вход Ca^{2+} в цитозоль, обусловленный, по-видимому, опустошением Ca^{2+} -депо (рис. 1, а; 2, а; 3, а; 4, а).

Влияние ингибиторов циклооксигеназ. Использовали два структурно различных неселективных ингибитора циклооксигеназ — индометацин (производное пиразолидинона) и ацетилсалициловую кислоту (аспирин) (Needleman et al., 1986; Крутецкая, Лебедев, 1993). Показано, что предварительная инкубация макрофагов в течение 5 мин в присутствии 40 мкм индометацина (рис. 1, б) или 100 мкм аспирина (рис. 1, в) вызывает практически полное подавление увеличения $[Ca^{2+}]_i$ и

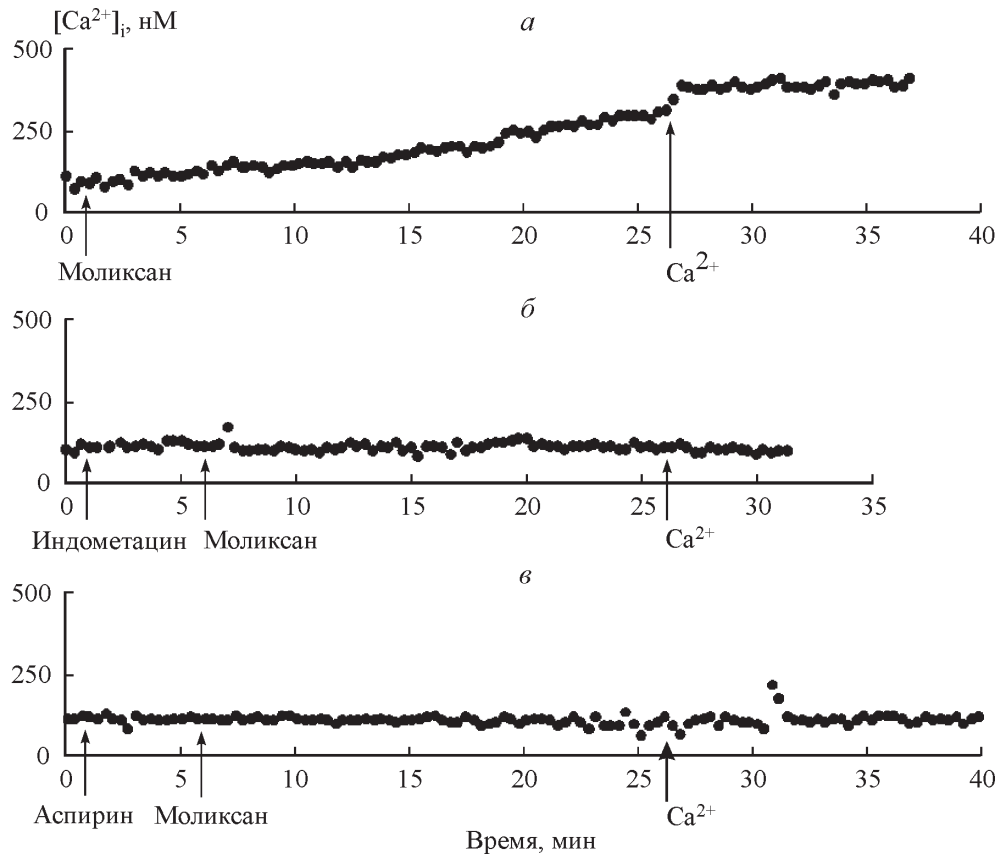


Рис. 1. Влияние ингибиторов циклооксигеназ на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое моликсаном (200 мкг/мл), в макрофагах крысы. *a* (на всех рисунках) — клетки инкубировали в номинально бескальциевой среде в присутствии указанного агента (стрелка), после чего вход Ca^{2+} (стрелка) инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . *б, в* — клетки предварительно инкубировали 5 мин с 40 мкМ индометацина (*б*) или 100 мкМ аспирина (*в*) в бескальциевой среде, затем добавляли 200 мкг/мл моликсана, 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.

входа Ca^{2+} , вызываемых моликсаном (200 мкг/мл). Сходные результаты получены при использовании 200 мкг/мл глутоксима (не показано). Полученные данные свидетельствуют о том, что циклооксигеназы и (или) продукты циклооксигеназного пути метаболизма АК участвуют в регуляции Ca^{2+} -ответов, индуцируемых глутоксिमом или моликсаном в макрофагах.

Результаты согласуются с данными исследований процессов Ca^{2+} -сигнализации в опухолевых клетках. Обнаружено, что структурно различные ингибиторы циклооксигеназ индометацин, аспирин и ибупрофен могут оказывать противоопухолевое действие, ускоряя апоптоз и ингибируя пролиферацию и миграцию раковых клеток (Kokoska et al., 2000; Guo et al., 2013). Это может быть связано с их влиянием как на циклооксигеназы, так и на процессы Ca^{2+} -сигнализации. Так, на клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431 и клетках карциномы прямой кишки человека (Caco-2) показано, что ингибиторы циклооксигеназ подавляют вход Ca^{2+} , активируемый эпидермальным фактором роста (Kokoska et al., 2000; Guo et al., 2013). Показано также, что индометацин, аспирин и ибупрофен значительно уменьшают депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый тапсигаргином, в клетках желудка человека (Kokoska et al., 1998). Полагают, что циклооксигеназный путь окисления АК участвует в регуляции входа Ca^{2+} в клетки как в норме, так и при патологии (Kokoska et al., 1998, 2000; Guo et al., 2013).

Ингибиторы циклооксигеназ индометацин и аспирин (нестероидные противовоспалительные препараты) обладают противовоспалительным, анальгетическим и жаропонижающим действием (Rao, Knaus, 2008). Полученные нами результаты свидетельствуют о нежелательности совместного клинического применения препаратов глутоксима и моликсана с лекарственными средствами на основе индометацина и аспирина.

Влияние ингибиторов липоксигеназ. Использовали селективный ингибитор липоксигеназ нордигидрогуаретиковую кислоту (НДГК) (Needleman et al., 1986), избирательный блокатор 5-липоксигеназ кофеиновую (3,4-дигидроксициннамовую) кислоту (Chung et al., 2004) и селективный ингибитор 12-липоксигеназ флавоноид байкалейн (Van Leyen et al., 2006). Предварительная инкубация макрофагов с 10 мкМ НДГК в течение 5 мин до введения 200 мкг/мл глутоксима (рис. 2, *б*) или 200 мкг/мл моликсана (не показано) приводит к практически полному подавлению увеличения $[Ca^{2+}]_i$ и входа Ca^{2+} , вызываемых глутоксिमом или моликсаном. Обнаружено также, что предварительная инкубация клеток с 5 мкМ кофеиновой кислоты в течение 5 мин до введения 200 мкг/мл глутоксима (рис. 2, *в*) или 200 мкг/мл моликсана (рис. 3, *б*) практически полностью предотвращает увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое глутоксिमом или моликсаном в макрофагах. Байкалейн оказывает аналогичное влияние на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые глутоксिमом (рис. 2, *з*) или моликсаном (рис. 4, *б*) в макрофагах.

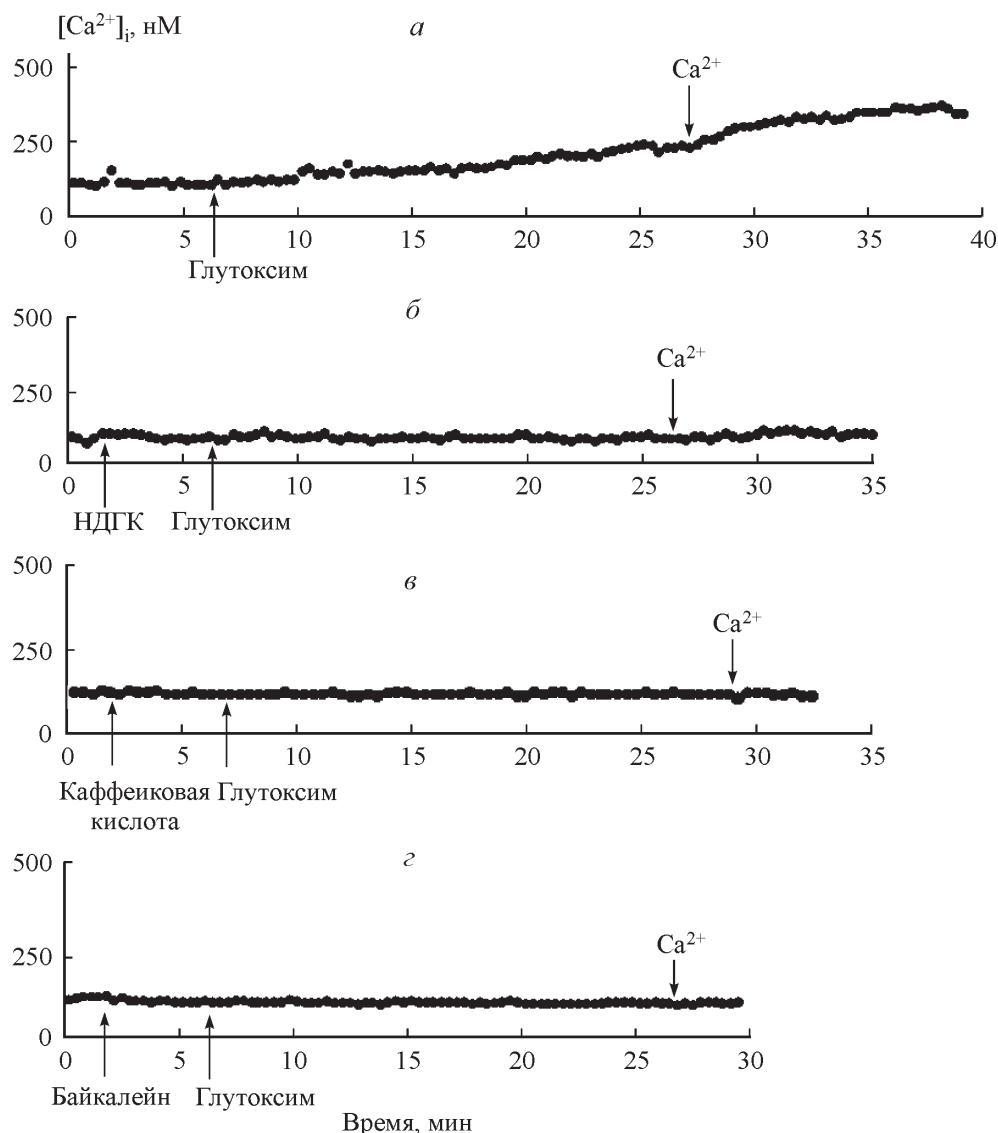


Рис. 2. Влияние ингибиторов липоксигеназ на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое глутоксимом (200 мкг/мл), в макрофагах крысы. б—г — предварительная 5-минутная инкубация в присутствии 10 мкМ НДГК (б), 5 мкМ кофеиновой кислоты (в) или 5 мкМ байкалейна (г) в бескальциевой среде, затем введение 200 мкг/мл глутоксима, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

Полученные данные свидетельствуют о том, что 5- и 12-липоксигеназы и (или) продукты окисления АК с участием этих ферментов играют важную роль в регуляции Ca^{2+} -ответов, индуцируемых глутоксимом или моликсаном, в макрофагах. Результаты согласуются с полученными нами ранее данными о том, что увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое другим дисульфидсодержащим окисляющим агентом фениларзиноксидом, также предотвращается ингибиторами липоксигеназ (Крутецкая и др., 1997а).

Обнаружено также, что добавление 10 мкМ кофеиновой кислоты (рис. 3, а) или 10 мкМ байкалейна (рис. 4, а) на фоне развившегося входа Ca^{2+} , индуцированного моликсаном, вызывает быстрое и эффективное подавление входа Ca^{2+} и возвращение $[Ca^{2+}]_i$ к базальному уровню. Можно предположить, что продукты окисления АК с участием 5- и 12-липоксигеназ участвуют не только в генерации, но и в поддержании депозависимого входа Ca^{2+} , вызванного моликсаном.

Результаты согласуются с полученными нами ранее данными о том, что ингибиторы липоксигеназ (НДГК,

кофеиновая кислота или байкалейн) подавляют депозависимый вход Ca^{2+} , активируемый сульфгидрильным агентом фениларзиноксидом (Крутецкая и др., 1997а), а также пуринергическими агонистами АТФ и УТФ и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргинном и циклопьязониковой кислотой в макрофагах (Крутецкая и др., 2003).

Ингибиторы липоксигеназ подавляют также депозависимый вход Ca^{2+} в иммунные клетки других типов. Так, кофеиновая кислота ингибирует депо-зависимый вход Ca^{2+} , индуцированный тапсигаргинном и антителами против CD3, в Т-лимфоцитах линии Jurkat (Nam et al., 2009). С использованием ингибиторов 5-липоксигеназ, новых антимикотических агентов итраконазола и позаконазола, показана важная роль липоксигеназного пути метаболизма АК в регуляции процессов Ca^{2+} -сигнализации в нейтрофилах человека (Steel et al., 2007, 2009). Установлено, что эти соединения подавляют депозависимый вход Ca^{2+} в нейтрофилы, активированные различными хемоаттрактантами (Steel et al., 2007, 2009).

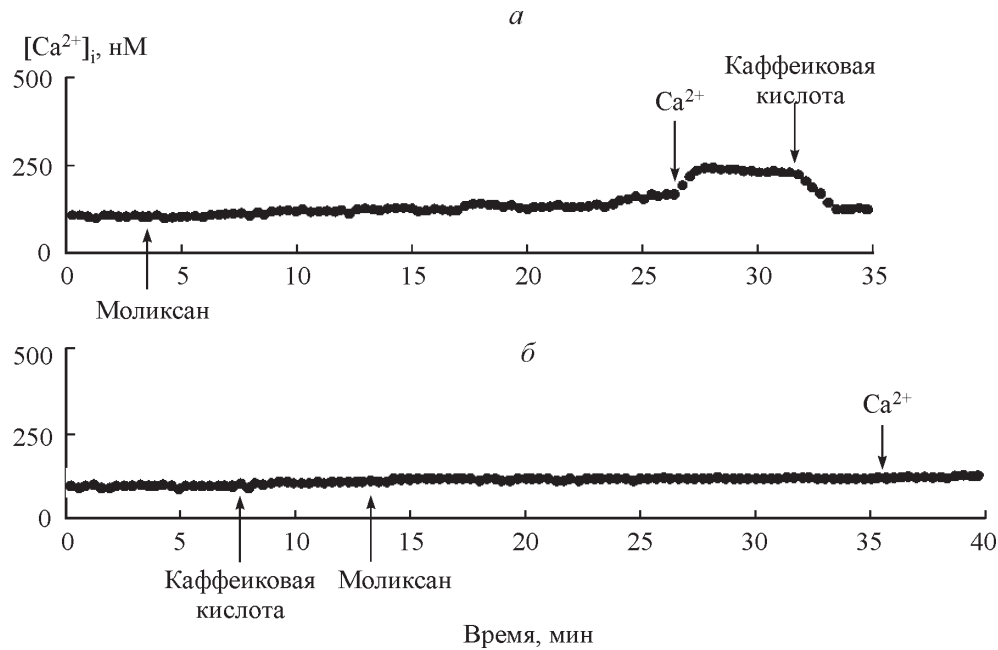


Рис. 3. Влияние каффеиковой кислоты на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое моликсаном (200 мкг/мл), в макрофагах крысы. *а* — во время развившегося входа Ca^{2+} добавляли 10 мкМ каффеиковой кислоты; *б* — клетки инкубировали 5 мин с 10 мкМ каффеиковой кислоты в бескальциевой среде, затем добавляли 200 мкг/мл моликсана, через 23 мин вход Ca^{2+} инициировали введением 2 мМ Ca^{2+} .

Ингибиторы липоксигеназ НДГК, каффеиковая кислота и байкалейн являются, по-видимому, фармакологическими агентами, перспективными для использования в медицине.

В настоящее время активно исследуются их противовоспалительный, противоопухолевый и антиоксидантный эффекты (Anjaneulu, Chopra, 2004; Chung et al., 2004; Van Leyen et al., 2006; Hsieh et al., 2007). Полученные нами данные о подавлении ингибиторами липоксигеназ увеличения $[Ca^{2+}]_i$, вызываемого глутоксимом и моликсаном, свидетельствуют о нежелательности совместного

применения в клинике каффеиковой кислоты, НДГК или байкалейна с дисульфидсодержащими иммуномодуляторами.

Результаты этой и более ранних работ свидетельствуют о том, что глутоксим и моликсан оказывают комплексное воздействие на макрофаги, которое приводит к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ и, вероятно, сопровождается активацией метаболизма АК. Продукты окисления АК в свою очередь регулируют Ca^{2+} -ответы, индуцируемые глутоксимом и моликсаном. Можно предположить следующие механизмы, опосредующие участие продуктов циклоокси-

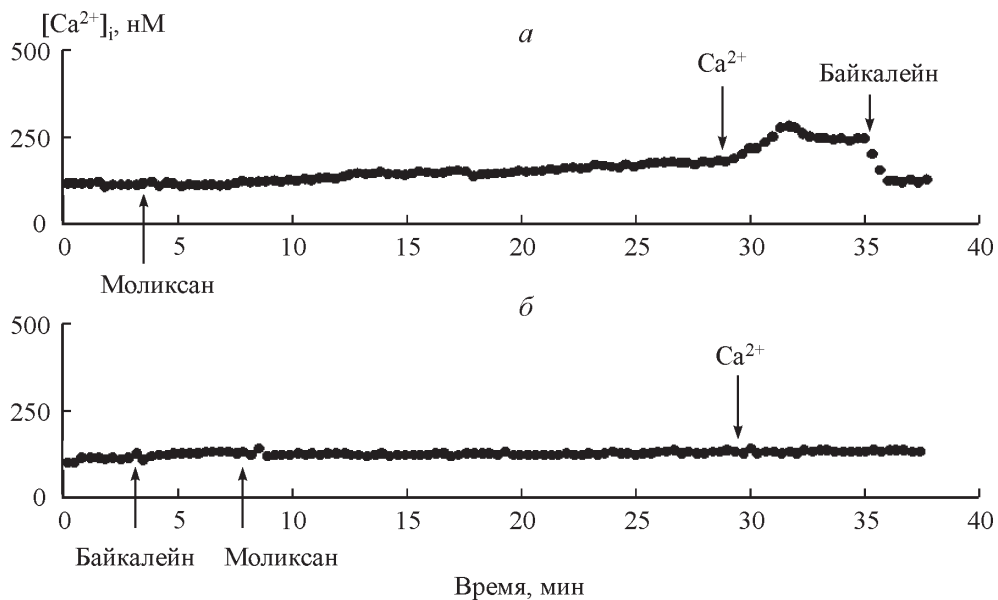


Рис. 4. Влияние байкалейна на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое моликсаном (200 мкг/мл), в макрофагах крысы. *а* — во время развившегося входа Ca^{2+} добавляли 10 мкМ байкалейна; *б* — клетки инкубировали 5 мин с 10 мкМ байкалейна в номинально бескальциевой среде, затем добавляли 200 мкг/мл моликсана, через 23 мин вход Ca^{2+} инициировали введением 2 мМ Ca^{2+} .

геназ и липоксигеназ во влиянии глутокси́ма и моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах.

Известно, что продукты метаболизма АК выступают в роли вторичных посредников, модулирующих активность ионных каналов, в том числе различных типов Ca^{2+} -каналов (Крутецкая, Лебедев, 1995; Meves, 2006, 2008). Воздействие на макрофаги глутокси́ма или моликсана, вероятно, приводит к одновременной активации фосфолипаз A_2 , циклооксигеназ и липоксигеназ и как следствие — продукции АК и соответствующих продуктов ее окисления. Можно предположить, что метаболиты АК непосредственно взаимодействуют с IP_3 -чувствительными каналами Ca^{2+} -выброса, вызывая их активацию и мобилизацию Ca^{2+} из депо. Опустошение депо активирует депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги, который может дополнительно усиливаться при воздействии продуктов метаболизма АК на депозависимые Ca^{2+} -каналы. Это согласуется с данными о том, что продукты 5-липоксигеназного пути окисления АК лейкотриен B_4 и лейкотриен D_4 вызывают мобилизацию Ca^{2+} из депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в дендритные клетки мыши (Itagaki et al., 2011).

Известно также, что продукты метаболизма АК участвуют в модуляции перестроек актинового цитоскелета. Так, обнаружено, что активация эпидермального фактором роста рецепторной тирозинкиназы в мембране клеток A431 карциномы человека, клеток HeLa и фибробластов крысы приводит к полимеризации кортикального актина и образованию стресс-фибрилл (Peppelenbosch et al., 1993). При этом продукты 5-липоксигеназ (лейкотриены) способствуют полимеризации, а продукты циклооксигеназ (простагландины), напротив, деполимеризации F-актина (Peppelenbosch et al., 1993). Показано также, что активность 12/15-липоксигеназ необходима для полимеризации актина в перитонеальных макрофагах мыши (Miller et al., 2001).

Таким образом, исходя из данных литературы (Peppelenbosch et al., 1993, 1995) и наших данных об участии актинового цитоскелета (Крутецкая и др., 2011; Курилова и др., 2012) и тирозинкиназ (Крутецкая и др., 2007б; Курилова и др., 2008) в действии глутокси́ма и моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах можно предположить, что участие продуктов метаболизма АК во влиянии глутокси́ма и моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах опосредовано перестройками актинового цитоскелета. Так, глутоксим и моликсан могут трансактивировать рецепторную тирозинкиназу в мембране макрофагов, что приводит к запуску каскада метаболизма АК с участием фосфолипаз A_2 , циклооксигеназ и липоксигеназ. Вероятно, в норме продукты окисления АК обеспечивают реорганизацию актинового цитоскелета, необходимую для развития Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксимом и моликсаном. Ингибирование циклооксигеназ может вызывать стабилизацию актиновых филаментов, а ингибирование 5- или 12-липоксигеназ — деполимеризацию актина. В результате воздействие каждого из исследованных ингибиторов каскада метаболизма АК приводит к значительному или полному подавлению как мобилизации Ca^{2+} из депо в ответ на глутоксим или моликсан, так и последующего депозависимого входа Ca^{2+} . Однако для подтверждения участия актиновых филаментов в модулирующем влиянии продуктов метаболизма АК на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые глутоксимом и моликсаном, необходимы эксперименты по визуализации актиновых филаментов при воздействии ингибиторов метаболизма АК в присутствии глутокси́ма или моликсана.

Список литературы

- Антушевич А. А., Антонов В. Г., Гребенюк А. Н., Антушевич А. Е., Ладанова Т. В., Бурова Е. Б. 2013. Патофизиологические основы эффективности глутокси́ма как средства сопроводения лучевой терапии рака ротоглотки. Вестник Рос. Военно-мед. акад. 3 (43): 32—37. (Antushevich A. A., Antonov V. G., Grebenyuk A. N., Antushevich A. E., Ladanova T. V., Burova E. B. 2013. Pathophysiological rationale of effectiveness of glutoxim supportive therapy add-on to radiotherapy management of oropharyngeal cancer. Vestnik Rossiiskoi Voenno-meditsinskoi akademii. 3: 32—37.)
- Борисов А. Е., Кожемякин Л. А., Антушевич А. Е., Кетлицкая О. С., Кащенко В. А., Ченур С. В., Кацалуха В. В., Васюкова Е. Л., Новиченков А. О., Мотушук И. Е., 2001. Клинико-экспериментальное обоснование регионарного и системного введения препаратов группы тиопоетинов при циррозе печени. Вестник хирургии им. И. И. Грекова. 4: 32—38. (Borisov A. E., Kozhemyakin L. A., Antushevich A. E., Kettliskaya O. S., Kashchenko V. A., Chepur S. V., Katsalucha V. V., Vasyukova E. L., Novichenkov A. O., Motushchuk I. E. 2001. Clinical and experimental grounds of the regional and systemic administration of the thiopoeitin group medicines for cirrhosis of the liver. First communication. Vestnik Hirurgii im. I. I. Grekova. 4: 32—38.)
- Еремеев В. В., Гергерт В. Я. 2013. Изучение способности препарата Глутоксим влиять на антимикобактериальную активность фагоцитов чувствительных и резистентных к туберкулезу мышей. Туберкулез и болезни легких. 7: 43—47. (Eremeev V. V., Gergert V. A. 2013. Investigation of the ability of glutoxim to affect the antimycobacterial activity of phagocytes in tuberculosis-susceptible and resistant mice. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 7: 43—47.)
- Крутецкая З. И., Курилова Л. С., Антонов В. Г., Ноздрачев А. Д. 2013. Участие микротрубочек в действии глутокси́ма и моликсана на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. Докл. РАН. 451 (3): 344—346. (Krutetskaya Z. I., Kurilova L. S., Antonov V. G., Nozdrachev A. D. 2013. Involvement of microtubules in the effects of glutoxim and molixan on the intracellular concentration of Ca^{2+} in macrophages. Doklady Biol. Sci. 451: 196—198.)
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 1993. Арахидоновая кислота и ее продукты: пути образования и метаболизма в клетках. Цитология. 35 (11/12): 3—35. (Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E. 1993. Arachidonic acid and its oxygenated derivatives: mechanisms for release and metabolism in cells. Tsitologiya. 35: 3—35.)
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е. 1995. Модуляция активности ионных каналов клеток арахидоновой кислотой, продуктами ее метаболизма и другими жирными кислотами. Цитология. 37 (1/2): 5—66. (Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E. 1995. Modulation of ionic channels activity by arachidonic acid, its oxygenated metabolites and other fatty acids. Tsitologiya. 37: 5—66.)
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Крутецкая Н. И., Бутов С. Н., Петрова Т. В. 1997а. Ингибитор тирозинфосфатаз фениларзин оксид индуцирует увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в перитонеальных макрофагах крысы и фибробластах человека. Цитология. 39 (12): 1116—1130. (Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Krutetskaya N. I., Butov S. N., Petrova T. V. 1997. Phenylarsine oxide, a tyrosine phosphatase inhibitor, increases an intracellular Ca^{2+} concentration in rat peritoneal macrophages and human fibroblasts. Tsitologiya. 39: 1116—1130.)
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Курилова Л. С. 2003. Механизмы внутриклеточной сигнализации. СПб.: Изд-во СПбГУ. 208 с. (Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Kurilova L. S. 2003. Mechanisms of intracellular signaling. SPb.: SPb State University. 208 p.)
- 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. (Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Kurilova L. S., Antonov V. G., Antushevich A. E., Nozdrachev A. D. 2007. The possible involvement of

calcium ions in the regulatory effect of oxidized glutathione on macrophages. *Doklady Biol. Sci.* 412 : 11—14.)

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 Ca²⁺ в макрофагах. Докл. РАН. 417 (2) : 273—275. (*Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Kurilova L. S., Antonov V. G., Nozdrachev A. D.* 2007. The role of tyrosine kinases and tyrosine phosphatases in the effect of Glutoxim and oxidized glutathione on the intracellular Ca²⁺-concentration in macrophages. *Doklady Biol. Sci.* 417 : 417—419.)

Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Курилова Л. С., Антонов В. Г., Ноздрачев А. Д. 2008. Возможное участие фосфатидилинозитолкиназ в действии окисленного глутатиона и препарата глутоксим на внутриклеточную концентрацию Ca²⁺ в макрофагах. Докл. РАН. 422 (4) : 562—563. (*Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Kurilova L. S., Antonov V. G., Nozdrachev A. D.* 2008. Possible involvement of phosphatidylinositol kinases in the effect of the oxidized glutathione and Glutoxim on the intracellular Ca²⁺ concentration in macrophages. *Doklady Biol. Sci.* 422 : 296—297.)

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 Ca²⁺ в макрофагах. Докл. РАН. 428 (2) : 272—274. (*Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Kurilova L. S., Antonov V. G., Nozdrachev A. D.* 2009. The role of the key enzymes of the phosphoinositide signaling pathway in the effect of oxidized glutathione and glutoxim on intracellular Ca²⁺ concentration in macrophages. *Doklady Biol. Sci.* 428 : 407—409.)

Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Курилова Л. С., Антонов В. Г., Ноздрачев А. Д. 2011. Участие актиновых филаментов в действии окисленного глутатиона и препарата глутоксим на внутриклеточную концентрацию Ca²⁺ в макрофагах. Докл. РАН. 346 (5) : 705—708. (*Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Kurilova L. S., Antonov V. G., Nozdrachev A. D.* 2011. Involvement of actin filaments in the effect of oxidized glutathione and drug glutoxim on the intracellular Ca²⁺ concentration in macrophages. *Doklady Biol. Sci.* 436 : 16—19.)

Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Тюшев В. Е., Крутецкая Н. И., Рощина Н. Г. 1997б. Влияние ингибиторов тирозинкиназы и тирозинфосфатаз на вход Ca²⁺, индуцируемый АТФ и тапсигаргином в перитонеальных макрофагах. Цитология. 39 (2/3) : 164—176. (*Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Tyushev V. E., Krutetskaya N. I., Roschina N. G.* 1997. The effect of tyrosine kinase and tyrosine phosphatase inhibitors on Ca²⁺-entry induced by ATP and thapsigargin in peritoneal macrophages. *Tsitologiya.* 39 : 164—176.)

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 Ca²⁺ в макрофагах. Цитология. 50 (5) : 452—461. (*Kurilova L. S., Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Antonov V. G.* 2008. The effect of oxidized glutathione and its pharmacological analogue glutoxim on intracellular Ca²⁺ concentration in macrophages. *Cell Tissue Biol. (Tsitologiya).* 2 : 322—332.)

Курилова Л. С., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Крутецкая Н. И., Антонов В. Г. 2011. Влияние препарата моликсан на процессы Ca²⁺-сигнализации в макрофагах. Цитология. 53 (9) : 708. (*Kurilova L. S., Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Krutetskaya N. I., Antonov V. G.* 2011. The effect of drug molixan on Ca²⁺-signaling processes in macrophages. *Tsitologiya.* 53 : 708.)

Курилова Л. С., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Крутецкая Н. И., Антонов В. Г. 2012. Участие актинового цитоскелета во влиянии препаратов глутоксим и моликсан на внутриклеточную концентрацию Ca²⁺ в макрофагах. Цитология. 54 (2) : 135—142. (*Kurilova L. S., Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Krutetskaya N. I., Antonov V. G.* 2012. The involvement of actin cytoskeleton in glutoxim and molixan effect on intracellular Ca²⁺-concentration in macrophages. *Cell Tissue Biol. (Tsitologiya).* 6 : 240—247.)

Соколова Г. Б., Синицын М. В., Кожемякин Л. А., Перельман М. И. 2002. Глутоксим в комплексной терапии туберкулеза. Антибиотики и химиотерапия. 2 : 20—23. (*Sokolova G. B., Sinityn M. V., Kozhemiakin L. A., Perel'man M. I.* 2002. Glutoxim in the complex treatment of tuberculosis. *Antibiot. Khimioter.* 47 : 20—23.)

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.

Anjaneyulu M., Chopra K. 2004. Nordihydroguaiaretic acid, a lignin, prevents oxidative stress and the development of diabetic nephropathy in rats. *Pharmacology.* 72 : 42—50.

Chung T.-W., Moon S.-K., Chang Y.-C., Ko J.-H., Lee Y.-C., Cho G., Kim S.-H., Kim J.-G., Kim C.-H. 2004. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. *J. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 18 : 1670—1681.

Conrad R. E. 1981. Induction and collection of peritoneal exudate macrophages. In: *Manual of macrophages methodology.* New York: Marcell Dekker. 5—11.

Dennis E. A. 2000. Phospholipase A₂ in eicosanoid generation. *Amer. J. Respir. Crit. Care Med.* 161 : 532—535.

Dubois R. N., Abramson S. B., Crofford L., Gupta R. A., Simon L. S., Van de Putte L. B. A., Lipsky P. E. 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. *J. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol.* 12 : 1063—1073.

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.

Guo Y.-C., Chang C.-M., Hsu W.-L., Chiu S.-J., Tsai Y.-T., Chou Y.-H., Hou M.-F., Wang J.-Y., Lee M.-H., Tsai K.-L., Chang W.-C. 2013. Indomethacin inhibits cancer cell migration via attenuation of cellular calcium mobilizations. *Molecules.* 18 : 6584—6596.

Hafner A. K., Cernescu M., Hofmann B., Ermisch M., Hornig M., Metzger J., Schneider G., Brutschy B., Steinhilber D. 2011. Dimerization of human lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 392 : 1097—1111.

Hsieh C.-J., Hall K., Ha T., Li C., Krishnaswamy G., Chi D. S. 2007. Baicalein inhibits IL-1 β - and TNF- α -induced inflammatory cytokine production from human mast cells via regulation of the NF- κ B pathway. *Clin. Mol. Allerg.* 5 : 1—5.

Itagaki K., Barton B. E., Murphy T. F., Taheri S., Shu P., Huang H., Jordan M. L. 2011. Eicosanoid-induced store-operated calcium entry in dendritic cells. *J. Surg. Res.* 169 : 301—310.

Kokoska E. R., Smith G. S., Miller T. A. 1998. Store-operated calcium influx in human gastric cells: role of endogenous prostaglandins. *Surgery.* 124 : 429—437.

Kokoska E. R., Smith G. S., Miller T. A. 2000. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs attenuate proliferation of colonic carcinoma cells by blocking epidermal growth factor-induced Ca⁺⁺ mobilization. *J. Gastrointest. Surg.* 4 : 150—161.

Li B., Xia L., Krantz A., Yuan Z. 1996. Site-directed mutagenesis of cys324 and cys331 in human cytosolic phospholipase A₂: locus of action of thiol modification reagents leading to inactivation of cPLA₂. *Biochemistry.* 35 : 3156—3161.

Meves H. 2006. The action of prostaglandins on ion channels. *Curr. Neuropharmacol.* 4 : 41—57.

Meves H. 2008. Arachidonic acid and ion channels: an update. *Brit. J. Pharmacol.* 155 : 4—16.

Miller Y. I., Chang M.-K., Funk C. D., Feramisco J. R., Witztum J. L. 2001. 12/15-Lipoxygenase translocation enhances site-specific actin polymerization in macrophages phagocytosing apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 276 : 19 431—19 439.

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.

Nam J. H., Shin D. H., Zheng H., Kang J. S., Kim W. K., Kim S. J. 2009. Inhibition of store-operated Ca²⁺ entry channels and K⁺ channels by caffeic acid phenylester in T lymphocytes. *Eur. J. Pharmacol.* 612 : 153—160.

Needleman P., Turk J., Jacksick B. A., Morrison A. R., Lefkowitz J. B. 1986. Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 55 : 69—102.

Park H.-A., Khanna S., Rink C., Gnyawali S., Roy S., Sen C. K. 2009. Glutathione disulfide induces neural cell death via a 12-lipoxygenase pathway. *Cell Death Differ.* 6 : 1167—1179.

Peppelenbosch J.-B., Qui R. G., de Vries-Smith A. M. M., Tertoolen L. G. J., de Laat S. W., McCormick F., Hall A., Symons M. H., Bos J. L. 1995. Rac mediates growth factor-induced arachidonic acid release. *Cell.* 81 : 849—856.

Peppelenbosch J.-B., Tertoolen L. G. J., Hage W. J., de Laat S. W. 1993. Epidermal growth factor induced actin remodeling is regulated by 5-lipoxygenase and cyclooxygenase products. *Cell.* 74 : 565—575.

Randriamampita C., Trautmann A. 1987. Ionic channels in murine macrophages. *Cell Biol.* 105 : 761—769.

Rao P. N., Knaus E. E. 2008. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) : cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 11 : 81s—110s.

Sen C. K. 1998. Redox signaling and the emerging therapeutic potential of thiol antioxidants. *Biochem. Pharmacol.* 55 : 1747—1758.

Sies H. 1999. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Rad. Biol. Med.* 27 : 916—921.

Steel H. C., Theron A. J., Tintinger G. R., Anderson R. 2009. Posaconazole attenuates leukotriene B₄ release and uptake of calcium by chemoattractant-activated human neutrophils: a potential strategy to control neutrophil-mediated inflammation. *J. Antimicrob. Chemother.* 64 : 1008—1012.

Steel H. C., Tintinger G. R., Theron A. J., Anderson R. 2007. Itraconazole-mediated inhibition of calcium entry into platelet-activating factor-stimulated human neutrophils is due to interference with production of leukotriene B₄. *Clin. Exp. Immunol.* 150 : 144—150.

Van Leyen K., Kim H. Y., Lee S.-R., Jin G., Arai K., Lo E. H. 2006. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke.* 37 : 3014—3018.

Поступила 30 I 2014

THE EFFECT OF CYCLOOXYGENASE AND LIPOXYGENASE INHIBITORS ON Ca²⁺-RESPONSES INDUCED BY GLUTOXIM AND MOLIXAN IN MACROPHAGES

L. S. Kurilova, Z. I. Krutetskaya, A. A. Naumova, S. N. Butov, N. I. Krutetskaya, V. G. Antonov

St. Petersburg State University; e-mail: cozy@mail.ru

Glutoxim and molixan belong to a new generation of disulfide-containing drugs with immunomodulatory, hepatoprotective and hemopoetic effect. Using Fura-2AM microfluorimetry, the possible involvement of the cyclooxygenase and lipoxygenase pathways of arachidonic acid oxidation in the effect of glutoxim and molixan on the intracellular Ca²⁺ concentration in rat peritoneal macrophages has been investigated. We have shown for the first time that preincubation of the cells with the cyclooxygenase inhibitors, indomethacin and aspirin, or lipoxygenase inhibitors, nordihydroguaiaretic acid, caffeic acid and baicalein, almost completely prevents the intracellular Ca²⁺ concentration increase induced by glutoxim or molixan. The obtained data indicate the involvement of products and/or enzymes of the arachidonic acid cyclooxygenase and lipoxygenase metabolism pathways in the effect of glutoxim and molixan on the processes of Ca²⁺ signaling in macrophages.

Key words: intracellular Ca²⁺ concentration, peritoneal macrophages, glutoxim, molixan, arachidonic acid, cyclooxygenases, lipoxygenases.