

## ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ЭПОКСИГЕНАЗ НА $\text{Ca}^{2+}$ -ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ГЛУТОКСИМОМ И МОЛИКСАНОМ, В МАКРОФАГАХ

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

*Кафедра биофизики, С.-Петербургский государственный университет, 199034;  
электронный адрес: cozy@mail.ru*

С использованием флуоресцентного  $\text{Ca}^{2+}$ -зонда Fura-2AM исследовали возможное участие эпоксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты во влиянии глутоксима и моликсаны на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в перитонеальных макрофагах крысы. Впервые показано, что преинкубация клеток с ингибиторами эпоксигеназ противогрибковыми агентами проадифеном и эконазолом значительно подавляет увеличение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , вызываемое глутоксимом или моликсаном. Добавление ингибиторов эпоксигеназ на фоне развившегося депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированного глутоксимом или моликсаном, вызывает существенное подавление входа  $\text{Ca}^{2+}$ . Полученные данные свидетельствуют об участии продуктов и (или) ферментов эпоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты во влиянии глутоксима и моликсанов на процессы  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации в макрофагах.

**Ключевые слова:** внутриклеточная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ , перитонеальные макрофаги, глутоксим, моликсан, арахидоновая кислота, эпоксигеназы.

**Принятые сокращения:** АК — арахидоновая кислота, 5,6-ЭЭТК — 5,6-эпоксийкозатриено-вая кислота,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  — внутриклеточная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ , GSSG — окисленный глутатион.

Синтетический аналог окисленного глутатиона (GSSG) — препарат глутоксим® (динатриевая соль GSSG с нанодобавкой d-металла, ФАРМА-ВАМ, Санкт-Петербург) — используется как иммуномодулятор и гемостимулятор в комплексной терапии бактериальных и вирусных заболеваний, псориаза, лучевой и химиотерапии в онкологии (Борисов и др., 2001; Соколова и др., 2002; Антушевич и др., 2013). Другой препарат, моликсан® (ФАРМА-ВАМ, Санкт-Петербург), комплекс глутоксина и нуклеозида инозина, имеет противовирусное, иммуномодулирующее и гепатопротекторное действие и применяется в терапии острого и вирусного гепатитов В и С, микст-гепатита и цирроза печени (Борисов и др., 2001). Глутоксим и моликсан относятся к группе лекарственных средств тиопоэтинов, влияющих на процессы редокс-регуляции в клетках. Однако понимание механизмов клеточного и молекулярного действия этих препаратов далеко от полного.

Одной из основных мишней действия глутоксина и моликсана являются такие важные иммунокомпетентные клетки, как макрофаги (Еремеев, Гергерт, 2013). Ранее нами было впервые обнаружено, что GSSG, глутоксим и моликсан увеличивают внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), вызывая мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из тапсигаргин-чувствительных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо и последующий депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в перитонеальные макрофаги крысы (Крутецкая и др., 2007а; Курилова и др., 2008, 2011; Krutetskaya et al., 2014). Кроме того, с использованием широкого спектра агентов, влияющих на компоненты сигналь-

ных 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; Krutetskaya et al., 2014), фосфатидилинозитолкиназы (Крутецкая и др., 2008; Krutetskaya et al., 2014) и важнейшие ферменты фосфоинозитидной системы передачи сигнала — фосфолипаза С и протеинкиназа С (Крутецкая и др., 2009; Krutetskaya et al., 2014). Выявлено также участие элементов актинового цитоскелета (Крутецкая и др., 2011; Курилова и др., 2012; Krutetskaya et al., 2014), актансвязывающих белков (Миленина и др., 2014а, 2014б; Krutetskaya et al., 2014) и микротрубочек (Крутецкая и др., 2013а; Krutetskaya et al., 2014), а также малых G-белков суперсемейства Ras и процессов везикулярного транспорта (Крутецкая и др., 2014; Krutetskaya et al., 2014) во влиянии глутоксина или моликсана на  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в макрофагах.

Макрофаги отвечают на воздействие разнообразных агонистов, быстро гидролизуя 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<sub>2</sub> (Dennis, 2000).

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

эйкозаноидов — простагландинов, тромбоксанов, лейкотриенов и различных гидроксикислот (Needleman et al., 1986; Крутецкая, Лебедев, 1993). Известны три основных энзиматических пути окисления АК — с участием циклооксигеназ, липоксигеназ и эпоксигеназ (цитохром Р-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 и др. (Dubois et al., 1998).

Ферменты метаболизма АК имеют высокую редокс-чувствительность и являются мишениями для действия окисляющих и восстановливающих агентов (Hafner et al., 2011). С использованием ингибиторов циклооксигеназ и липоксигеназ нами ранее было впервые показано участие циклооксигеназного и липоксигеназного путей окисления АК во влиянии глутоксика и моликсана на  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в макрофагах (Крутецкая и др., 2013б; Курилова и др., 2014; Krutetskaya et al., 2014).

Эпоксигеназный путь метаболизма АК связан с системой монооксигеназного окисления, которая локализована у млекопитающих в мембранных эндоплазматического ретикулума, а в некоторых тканях, например в клетках коры надпочечников, и в мембранных митохондрий. Система монооксигеназного окисления обладает низкой субстратной специфичностью, поэтому в ней происходит метаболизм разнообразных липофильных субстратов — стероидных гормонов, холестерина, жирорастворимых витаминов, простагландинов, жирных кислот, а также различных ксенобиотиков. Основным компонентом этой системы являются цитохромы Р-450 (57 кДа), относящиеся к особому суперсемейству ферментов-монооксигеназ (Крутецкая и др., 2003). Метаболиты эпоксигеназного пути окисления АК имеют различное биологическое действие: усиливают секрецию лютеинизирующего гормона, стимулируют выработку соматостатина, ингибируют поглощение  $\text{Na}^+$  и секрецию  $\text{K}^+$  в почках, стимулируют секрецию инсулина и глюкагона (Needleman et al., 1986). Показано также, что окисление свободной АК по эпоксигеназному пути имеет большое значение для предотвращения апоптоза в эпителиальных клетках (Chen et al., 2001).

В связи с этим представлялось целесообразным исследовать возможную роль эпоксигеназного пути окисления АК во влиянии глутоксика и моликсана на  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах крысы. Для этого использовали два эффективных блокатора эпоксигеназ — эконазол и проадифен (SKF525A). Они являются противогрибковыми агентами имидазольной природы, которые в микромолярной концентрации блокируют цитохром Р-450-подобные ферменты (Rodrigues et al., 1987; Capdevila et al., 1988).

## Материал и методика

**Клетки.** Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar. Резидентные макрофаги выделяли из перitoneальной полости крыс массой 180—250 г по методу, описанному ранее (Conrad, 1981; Randriamampita, Trautmann, 1987). Сразу после выделения клетки имели сферическую форму (диаметр 10—20 мкм). Суспензию клеток помещали в бакпрепатки, содержащие кварцевые стекла

размером 10 × 10 мм. Клетки на стеклах культивировали в течение 1—3 сут при 37 °C в среде 199 (рН 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 °C) через 1—2 сут после начала культивирования клеток. Кварцевые стекла с клетками помещали в экспериментальную камеру, заполненную физиологическим раствором следующего ионного состава (мМ): 140  $\text{NaCl}$ , 5  $\text{KCl}$ , 1  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$  и 5 HEPES-NaOH, рН 7.3—7.4. Бескальциевая среда отличалась тем, что содержала 0 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 1 М ЭГТА. Подробно процедура культивирования макрофагов описана ранее (Крутецкая и др., 1997).

Для измерения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Макрофаги инкубировали в течение 45 мин в физиологическом растворе, содержащем 2 мкМ Fura-2AM, при 22—24 °C. Стекла с окрашенными клетками отмывали физиологическим раствором и переносили в экспериментальную камеру флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм через объектив микроскопа. Для выделения соответствующих участков спектра использовали узкополосные оптические фильтры. Эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм при помощи специализированной видеокамеры Leica DFC340FX. Для выделения света с длиной волны 510 нм использовали оптический фильтр. Для управления экспериментом использовали систему обработки изображения ImageJ (плагин Micro-Manager 1.4).

Результатом измерений являлось отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при облучении светом с длиной волны 340 нм к интенсивности флуоресценции при облучении светом с длиной волны 380 нм ( $\text{Ratio}(F_{340}/F_{380})$ ), где  $F_{340}$  — интенсивность флуоресценции Fura-2AM, связанного с  $\text{Ca}^{2+}$ , а  $F_{380}$  — интенсивность флуоресценции Fura-2AM, не связанного с  $\text{Ca}^{2+}$ , отражающее изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в клетках во время измерений (Bruce, Elliott, 2000; Xie et al., 2002). Для избежания фотогорения измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. В экспериментах применяли объектив 10× с апертурой 8 мм. Статистический анализ проводили с применением *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения. На рисунках представлены результаты типичных экспериментов.

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

Использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США). Использовали маточные растворы глутоксика

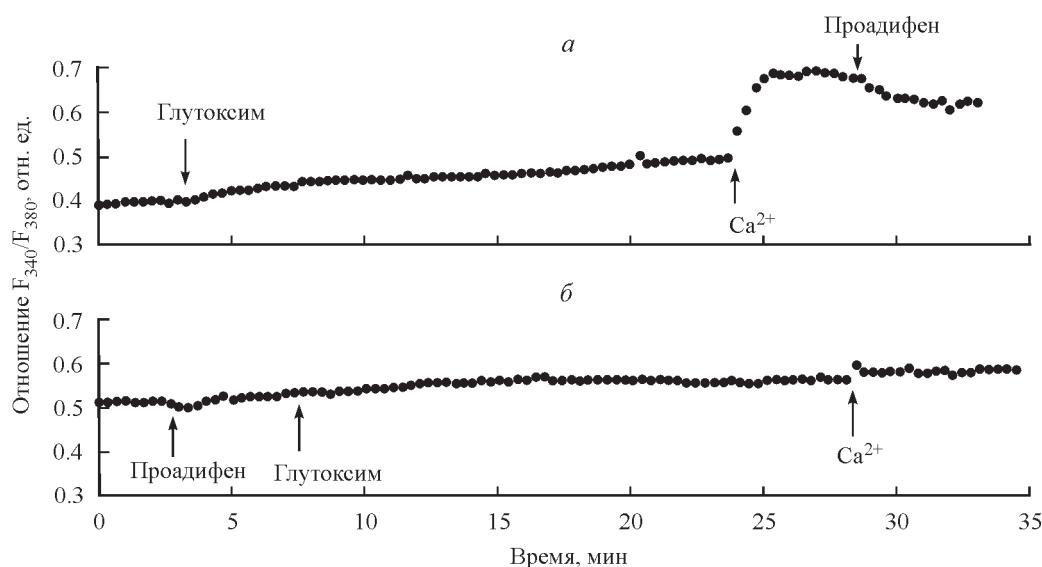


Рис. 1. Влияние проадифена на увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , вызываемое глутоксимом, в перитонеальных макрофагах крысы.

Здесь и на рис. 2, 3 по оси ординат — отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 нм и 380 нм соответственно, отн. ед. а — клетки инкубировали с 200 мкг/мл глутоксима в номинально бескальциевой среде, затем вход  $Ca^{2+}$  индуцировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ ; во время развившегося входа  $Ca^{2+}$  вводили 100 мкМ проадифена. б — макрофаги предварительно инкубировали 5 мин со 100 мкМ проадифена в бескальциевой среде, затем добавляли 200 мкг/мл глутоксима, через 20 мин вход  $Ca^{2+}$  инициировали введение 2 мМ  $Ca^{2+}$  в наружную среду. Здесь и на рис. 2, 3 каждая регистрация получена для группы из 40—50 клеток и представляет собой типичный вариант из 5—7 экспериментов.

(50 мг/мл) и моликсана (50 мг/мл) (ФАРМА-ВАМ, Санкт-Петербург) в воде, а также маточные растворы проадифена (100 мМ) и эконазола (5 мМ) в диметилсульфоксиде.

## Результаты и обсуждение

В контрольных экспериментах показали, что инкубация макрофагов в номинально бескальциевой среде в течение 20—25 мин в присутствии 200 мкг/мл глутоксима (рис. 1, а) или 200 мкг/мл моликсана (рис. 2, а) вызывает нарастающее и существенное повышение  $[Ca^{2+}]_i$ , отража-

ющее 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).

Для выявления возможного участия эпоксигеназного пути окисления АК во влиянии глутоксима и моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах использовали два структурно различных ингибитора эпоксигеназ — проадифен и эконазол. Обнаружено, что предварительная инкубация клеток со 100 мкМ проадифеном (рис. 1, б) в течение 5 мин до введения 200 мкг/мл глутоксима приводит к практически полному подавлению как фазы мобилизации  $Ca^{2+}$  из депо (на  $95.6 \pm 6.3\%$ ,  $n = 7$ ), так и фазы входа  $Ca^{2+}$  (на

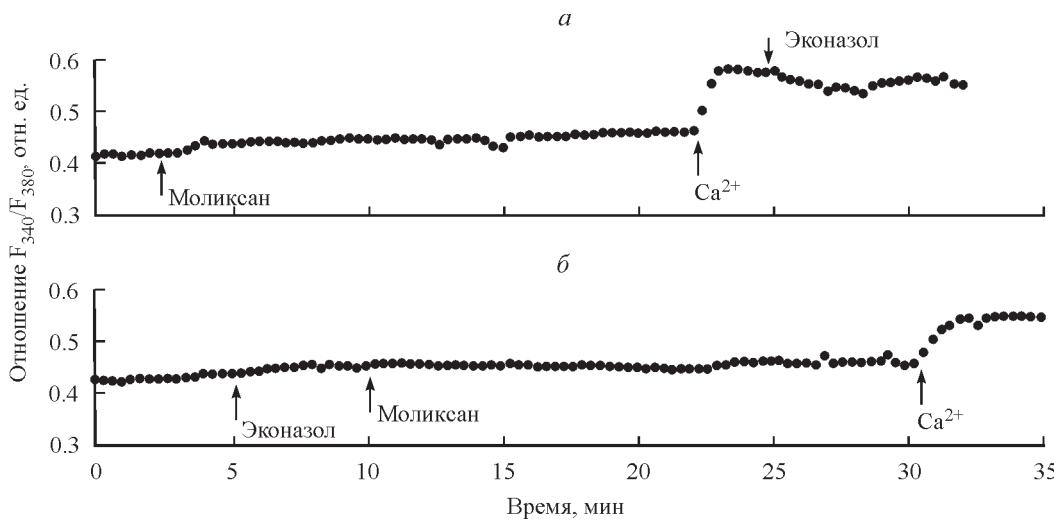


Рис. 2. Влияние эконазола на увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , вызываемое моликсаном, в перитонеальных макрофагах крысы.

а — макрофаги инкубировали с 200 мкг/мл моликсана в номинально бескальциевой среде, затем вход  $Ca^{2+}$  индуцировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ ; во время развившегося входа  $Ca^{2+}$  вводили 5 мкМ эконазола. б — клетки предварительно инкубировали 5 мин с 5 мкМ эконазола в бескальциевой среде, затем добавляли 200 мкг/мл моликсана, через 20 мин инициировали вход  $Ca^{2+}$  введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ .

$92.3 \pm 5.7\%$ ,  $n = 7$ ), вызываемых глутоксиком. Сходные результаты получены при использовании 200 мкг/мл моликсана (не показано). Предварительная инкубация макрофагов с 5 мкМ эконазола (рис. 2, б) в течение 5 мин до введения 200 мкг/мл моликсана также приводит к практически полному подавлению фазы мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо (на  $87.1 \pm 5.8\%$ ,  $n = 7$ ) и частичному подавлению входа  $\text{Ca}^{2+}$  (на  $32.3 \pm 4.9\%$ ,  $n = 7$ ), вызываемых моликсаном (рис. 2, б). Сходные данные получены при использовании 200 мкг/мл глутоксика (не показано).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что эпоксигеназы и (или) продукты эпоксигеназного пути метаболизма АК участвуют в регуляции  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов, индуцируемых глутоксиком или моликсаном, в макрофагах.

Показано также, что добавление 100 мкМ проадифена на фоне развивающегося входа  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированного глутоксиком (рис. 1, а) или моликсаном (не показано), приводит к существенному (на  $37.5 \pm 4.2\%$ ,  $n = 5$ ) подавлению входа  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофаги. Добавление 5 мкМ эконазола на фоне развивающегося входа  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированного моликсаном (рис. 2, а) или глутоксиком (не показано), также приводит к существенному (на  $35.8 \pm 5.0\%$ ,  $n = 6$ ) подавлению входа  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофаги. Это свидетельствует об участии продуктов эпоксигеназного пути окисления АК в регуляции депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированного глутоксиком или моликсаном, в макрофагах.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что эпоксигеназы наряду с другими ферментами метаболизма АК (циклооксигеназами и липоксигеназами) принимают участие в генерации и поддержании обеих фаз  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов, индуцированных глутоксиком и моликсаном, в перитонеальных макрофагах крысы. Кроме того, данные об ингибировании эконазолом и проадифеном действия глутоксика и моликсана позволяют предположить, что противогрибковые агенты, ингибирующие эпоксигеназы, нежелательно использовать в клинической практике в комбинации с иммуномодуляторами глутоксиком или моликсаном.

Подавление ингибиторами эпоксигеназ мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо, индуцированной глутоксиком или моликсаном, свидетельствует о том, что эпоксигеназы и (или) продукты эпоксигеназного пути окисления АК являются участниками комплексного сигнального каскада, вызываемого глутоксиком и моликсаном в макрофагах и приводящего к постепенному высвобождению  $\text{Ca}^{2+}$  из депо. Можно предположить, что при действии глутоксика и моликсана происходит запуск каскада метаболизма АК. Участие продуктов циклооксигеназного и липоксигеназного путей метаболизма АК во влиянии глутоксика и моликсана на  $[\text{Ca}^{2+}]$  может быть опосредовано их взаимодействием с элементами цитоскелета (Курилова и др., 2014; Krutetskaya et al., 2014). В то же время роль продуктов и (или) ферментов эпоксигеназного пути окисления АК может заключаться в дополнительной регуляции  $\text{IP}_3$ -рецепторов или  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз в мемbrane  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, необходимой для мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо.

Результаты настоящей работы согласуются с полученными ранее данными о влиянии ингибиторов эпоксигеназ на  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы в невозбудимых клетках. Одной из моделей депозависимого (емкостного) входа  $\text{Ca}^{2+}$  является модель с участием растворимого посредника — фактора входа  $\text{Ca}^{2+}$  (calcium influx factor, CIF), который высвобождается в цитозоль при опустошении внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо и активирует вход  $\text{Ca}^{2+}$  в клетки (Putney et al., 2001; Крутецкая и др., 2003). Предполагают, что

роль фактора входа  $\text{Ca}^{2+}$  может выполнять цитохром Р-450, локализованный в мембране эндоплазматического ретикулума, или продукт эпоксигеназного окисления АК — 5,6-эпоксизайкозатриеновая кислота (5,6-ЭЭТК) (Alvarez et al., 1991, 1992; Rzigalinski et al., 1999; Xie et al., 2002; Ben-Amor et al., 2006).

Так, на клетках эндотелия роговицы быка установлено, что активатор цитохрома Р-450  $\beta$ -нафтофлавон усиливает вход  $\text{Sr}^{2+}$  после опустошения внутриклеточных депо (Xie et al., 2002). Показано также, что добавляемый с наружной поверхности мембранны метаболит цитохрома Р-450 5,6-ЭЭТК активирует вход  $\text{Ca}^{2+}$  в эндотелиоциты. Оба эффекта блокируются классическим ингибитором емкостного входа  $\text{Ca}^{2+}$  2-аминоэтоксидифенилборатом (Xie et al., 2002). Кроме того, обнаружено, что внеклеточная 5,6-ЭЭТК активирует депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в тромбоциты человека (Ben-Amor et al., 2006). Эти результаты позволяют предположить, что продукты эпоксигеназного пути метаболизма АК могут играть роль факторов, активирующих депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ .

В пользу этой модели свидетельствуют данные об активном подавлении депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  ингибиторами эпоксигеназ. Так, ранее нами было установлено, что эконазол и проадифен практически полностью подавляют депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцируемый пуринергическими агонистами АТФ и УТФ и ингибиторами эндоплазматических  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз тапсигаргином и циклопьязониковой кислотой в перитонеальных макрофагах крысы (Крутецкая и др., 1998, 2000, 2003). Показано также, что эконазол и другие имидазольные ингибиторы эпоксигеназ (миконазол, клотrimазол, кетоконазол, SK&F 96365), а также проадифен являются эффективными ингибиторами депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированного широким спектром агонистов, в тимоцитах крысы (Alvarez et al., 1991, 1992), лейкемических клетках линий HL60 и U937 (Alonso-Torre et al., 1993), эндотелиоцитах быка (Graier et al., 1995; Xie et al., 2002) и ацинарных клетках поджелудочной железы крысы (Bruce, Elliott, 2000).

Кроме того, в клетках эндотелия роговицы быка выявлено сосуществование двух механизмов входа  $\text{Ca}^{2+}$  — с участием растворимого посредника и «связывания по типу секреции» (secretion-like coupling model) (Xie et al., 2002). Последний предполагает обратимую транслокацию внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ -депо к плазматической мембране и белок-белковые взаимодействия между  $\text{IP}_3$ -рецептором и депозависимым  $\text{Ca}^{2+}$ -каналом, приводящие к активации емкостного входа  $\text{Ca}^{2+}$ . При этом в регуляции депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  важную роль играют актиновые филаменты (Rosado, Sage, 2000). Известно, что фармакологические агенты, вызывающие реорганизацию актина, ингибируют депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках различного типа. Так, каликулин А, вызывающий образование толстого слоя примембранных (кортикального) актина, препятствующего передаче сигнала об опустошении депо, подавляет депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в тромбоцитах человека (Rosado, Sage, 2000) и перитонеальные макрофаги крысы (Курилова и др., 2009). В то же время на клетках эндотелия роговицы быка установлено, что каликулин А не вызывает подавления входа  $\text{Ca}^{2+}$ , активируемого  $\beta$ -нафтофлавоном или 5,6-ЭЭТК (Xie et al., 2002). Вероятно, это связано с тем, что метаболиты цитохромов Р-450, выступающие в роли факторов входа  $\text{Ca}^{2+}$ , являются малыми водорастворимыми молекулами, которые могут диффундировать к плазмалемме сквозь плотный слой

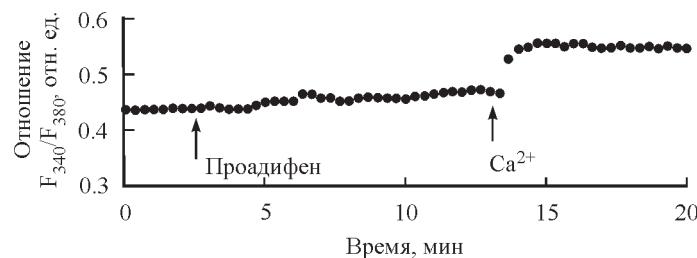


Рис. 3. Влияние проадифена на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в перитонеальных макрофагах крысы.

Клетки инкубировали 11 мин со 100 мкМ проадифена в номинально бескальциевой среде, затем инициировали вход  $\text{Ca}^{2+}$  введением в наружную среду 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ .

кортикального актина, формирующийся при действии каликулина A (Xie et al., 2002).

Однако существуют данные о том, что цитохромы P-450 не принимают участия в активации депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ , а подавление  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов связано с непосредственным действием имидазольных антимикотических агентов на  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы (Koch et al., 1994).

Известно, что производные имидазола ингибируют активность цитохромов P-450 путем взаимодействия электронов атома азота в третьем положении имидазольного кольца с гемом цитохрома P-450 (Koch et al., 1994). Введение заместителей во второе положение имидазольного кольца приводит к значительному (в 10—100 раз и более) уменьшению активности ингибиторов. Чтобы выяснить, связано ли ингибирование  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов с подавлением эпоксигеназ, авторы синтезировали производное эконазола, отличающееся присутствием метильной группы во втором положении имидазольного кольца. Как предполагали, это соединение менее эффективно (в 10 раз) подавляло активность цитохромов P-450. В то же время эконазол и его производное одинаково эффективно подавляли вход  $\text{Ca}^{2+}$ , вызванный тапсигаргином (Koch et al., 1994). Таким образом, авторами был сделан вывод о том, что в клетках HL-60 имидазольные противогрибковые агенты ингибируют депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  не за счет ингибирования цитохромов P-450, а путем прямого влияния на  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы плазматеммы (Koch et al., 1994).

Обнаружено также, что ингибиторы эпоксигеназ сами могут индуцировать  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы в клетках. Нами показано, что проадифен (100 мкМ) вызывает в бескальциевой среде постепенно нарастающее повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , связанное, по-видимому, с мобилизацией  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо в перитонеальных макрофагах крысы (рис. 3). Последующее введение в наружную среду 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  вызывает вход  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофаги (рис. 3). Кроме того, на рис. 1, б и 2, б видно, что проадифен и эконазол вызывают небольшое увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (на  $13.6 \pm 2.4\%$  относительно базального уровня,  $n = 14$ ) до введения глутоксина или моликсана.

Эти результаты согласуются с более ранними данными о влиянии ингибиторов эпоксигеназ эконазола и проадифена на  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах крысы (Крутешкая и др., 1998, 2000, 2003) и клетках адено карциномы прямой кишки линии HT29 (Carrillo et al., 2013). Так, ранее нами показано, что проадифен и эконазол вызывают двухфазное увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , связанное с мобилизацией  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо и последующим входом  $\text{Ca}^{2+}$  в перитонеальные макрофаги крысы (Крутешкая и др., 1998, 2000, 2003). Для выявления природы внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, на которые действуют эконазол и проадифен, провели эксперименты, в которых

еконазол или проадифен добавляли к макрофагам после того, как  $\text{Ca}^{2+}$ -депо были опустошены ингибитором эндоплазматических  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз тапсигаргином. В этих условиях ингибиторы эпоксигеназ не вызывали увеличения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , что свидетельствует о том, что эконазол и проадифен индуцируют мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из тапсигаргин-чувствительных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо (Крутешкая и др., 2000, 2003). Сходные данные о природе внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, на которые действует эконазол, получены на клетках адено карциномы прямой кишки линии HT29 (Carrillo et al., 2013). Кроме того, учитывая относительно медленную кинетику высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из депо при действии эконазола и проадифена (рис. 3), можно предположить, что противогрибковые агенты увеличивают  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , ингибируя  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в мембране  $\text{Ca}^{2+}$ -депо (Крутешкая и др., 1998, 2000). В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что имидазольные соединения наряду с тапсигаргином, циклопязониковой кислотой и BHQ ингибируют  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы в мембране саркоплазматического ретикулума (Mason et al., 1993; Snajdrova et al., 1998).

В связи с этим можно предположить, что подавление проадифеном и эконазолом мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо, индуцированной глутоксисом или моликсаном, может быть связано с тем, что к моменту введения глутоксина или моликсана депо уже были частично опустошены приложением проадифена или эконазола.

Таким образом, результаты, полученные в этой работе и ранее (Курилова и др., 2014; Krutetskaya et al., 2014), свидетельствуют о том, что одним из важных участников сигнального каскада, запускаемого глутоксисом и моликсаном в макрофагах, является каскад метаболизма АК, причем во влиянии глутоксина и моликсана на  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  задействованы все три пути окисления АК — циклооксигеназный, липоксигеназный и эпоксигеназный.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта СПбГУ № 1.0.127.2010.

#### Список литературы

- Антушевич А. А., Антонов В. Г., Гребенюк А. Н., Антушевич А. Е., Ладанова Т. В., Бурова Е. Б. 2013. Патофизиологические основы эффективности глутоксисма как средства сопровождения лучевой терапии рака ротовоглотки. 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. Pathophysiologic rationale of effectiveness of glutoxim supportive therapy add-on to radiotherapy management of oropharyngeal cancer. Vestnik Ross. Voenno-med. akad. 3 (43) : 32—37.)

- Борисов А. Е., Кожемякин Л. А., Антушевич А. Е., Кетлицкая О. С., Кащенко В. А., Чепур С. В., Кацалуха В. В., Васюкова Е. Л., Новиченков А. О., Мотушчук И. Е.** 2001. Клиническо-экспериментальное обоснование регионарного и системного введения препаратов группы тиопоэтинов при циррозе печени. Вестник хирургии им. И. И. Грекова. 4 : 32—38. (*Borisov A. E., Kozhemyakin L. A., Antushevich A. E., Ketliskaya 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 thiopetin 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 глутоксиком влиять на antimикобактериальную активность фагоцитов чувствительных и резистентных к туберкулезу мышей. Туберкулез и болезни легких. 7 : 43—47. (*Eremeev V. V., Gergert V. Ya.* 2013. Investigation of the ability of glutoxikom 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.** 2013а. Участие микротрубочек в действии глутоксика и моликсана на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  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 glutoxikom and molixan on the intracellular concentration of  $\text{Ca}^{2+}$  in macrophages. Doklady Biol. Sci. 451 (3) : 196—198.)
- Крутецкая З. И., Курилова Л. С., Антонов В. Г., Ноздрачев А. Д.** 2013б. Ингибиторы циклооксигеназ и липоксигеназ модулируют эффект глутоксика и моликсана на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах. Докл. РАН. 452 (6) : 690—693. (*Krutetskaya Z. I., Kurilova L. S., Antonov V. G., Nozdrachev A. D.* 2013b. Cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors modulate the glutoxikom and molixan effects on the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in macrophages. Doklady Biol. Sci. 452 (6) : 277—279.)
- Крутецкая З. И., Курилова Л. С., Наумова А. А., Антонов В. Г., Ноздрачев А. Д.** 2014. Участие малых G-белков и везикулярного транспорта в действии глутоксика и моликсана на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах. Докл. РАН. 457(2) : 244—246. (*Krutetskaya Z. I., Kurilova L. S., Naumova A. A., Antonov V. G., Nozdrachev A. D.* 2014. Involvement of small G proteins and vesicle traffic in the glutoxikom and molixan effects on the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in macrophages. Doklady Biol. Sci. 457 (2) : 252—254.)
- 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 (11/12) : 3—35.)
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Крутецкая Н. И.** 2000. Механизмы  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации в перitoneальных макрофагах. Рос. физiol. журн. им. И. М. Сеченова. 86(8) : 1030—1048. (*Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Krutetskaya N. I.* 2000. Mechanisms of  $\text{Ca}^{2+}$ -signalling in peritoneal macrophages. Ros. Physiol. J. im. I. M. Sechenova. 86 (8) : 1030—1048.)
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Крутецкая Н. И., Бутов С. Н., Булкин Н. В., Ченцов И. Г.** 1998. Роль продуктов метаболизма арахидоновой кислоты в регуляции receptor- и депозависимого входа ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в перitoneальные макрофаги крысы. В кн.: Физико-химические основы функционирования белков и их комплексов. Воронеж: Изд-во ВГУ. 116—121. (*Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Krutetskaya N. I., Butov S. N., Bulkin N. V., Chentsov I. G.* 1998. The role of arachidonic acid metabolism products in the regulation of receptor- and store-operated  $\text{Ca}^{2+}$  entry in rat peritoneal macrophages. In: Physical and chemical principles of proteins and protein complexes function. Voronezh: VGU. 116—121.)
- 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.* 2007a. The possible involvement of calcium ions in the regulatory effect of oxidized glutathione on macrophages. Doklady Biol. Sci. 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 глутоксиком на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах. Докл. РАН. 417 (2) : 273—275. (*Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Kurilova L. S., Antonov V. G., Nozdrachev A. D.* 2007b. The role of tyrosine kinases and tyrosine phosphatases in the effect of glutoxikom and oxidized glutathione on the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -concentration in macrophages. Doklady Biol. Sci. 417 (2) : 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 глутоксиком на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  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 glutoxikom on the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in macrophages. Doklady Biol. Sci. 422 (4) : 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 глутоксиком на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  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 glutoxikom on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in macrophages. Doklady Biol. Sci. 428 (2) : 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 глутоксиком на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  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 glutoxikom on the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in macrophages. Doklady Biol. Sci. 346 (5) : 705—708.)
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Тюшев В. Е., Крутецкая Н. И., Рощина Н. Г.** 1997. Влияние ингибиторов тирозинкиназ и тирозинфосфатаз на вход  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцируемый АТФ и тапсигаргином в перitoneальных макрофагах. Цитология. 39 (2/3) : 164—176. (*Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Tushayev V. E., Krutetskaya N. I., Roschina N. G.* 1997. The effect of tyrosine kinase and tyrosine phosphatase inhibitors on  $\text{Ca}^{2+}$ -entry induced by ATP and thapsigargin in peritoneal macrophages. Tsitologiya. 39 (2/3) : 164—176.)
- Курилова Л. С., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Антонов В. Г.** 2008. Влияние окисленного глутатиона и его фармакологического аналога препарата глутоксиком на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  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 glutoxikom on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in macrophages. Cell Tissue Biol. 2 : 322—332.)
- Курилова Л. С., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Крутецкая Н. И., Антонов В. Г.** 2011. Влияние препарата моликсан на процессы  $\text{Ca}^{2+}$ -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

- $\text{Ca}^{2+}$ -signaling processes in macrophages. *Tsitologiya*. 53 (9) : 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  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{Ca}^{2+}$ -concentration in macrophages. *Cell Tissue Biol.* 6 : 240—247.)
- Курилова Л. С., Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Крутецкая Н. И., Игловикова О. И., Шамшев А. В., Войтешович К. О. 2009. Влияние каликулина А на  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы в макрофагах. В кн.: Биология — наука XXI века. Пущино: Изд-во Пущино. 141—142. (Kurilova L. S., Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Krutetskaya N. I., Iglovikova O. I., Shamshev A. V., Voitsekhovich K. O. 2009. Effect of calyculin A on  $\text{Ca}^{2+}$  signals in macrophages. In: Biology — the science of the XXI century. Puschino: Puschino. 141—142.)
- Курилова Л. С., Крутецкая З. И., Наумова А. А., Бутов С. Н., Крутецкая Н. И., Антонов В. Г. 2014. Влияние ингибиторов циклооксигеназ и липоксигеназ на  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, вызываемые глутоксимом и моликсаном, в макрофагах. *Цитология*. 56 (5) : 353—360. (Kurilova L. S., Krutetskaya Z. I., Naumova A. A., Butov S. N., Krutetskaya N. I., Antonov V. G. 2014. The effect of cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors on  $\text{Ca}^{2+}$ -responses induced by glutoxim and molixan in macrophages. *Tsitologiya*. 56 (5) : 353—360.)
- Миленина Л. С., Крутецкая З. И., Наумова А. А. 2014а. Ингибиторы Arp2/3 комплекса и WASP-белков подавляют эффект глутоксима на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах. Международный научный институт «Educatio». Ежемесячный научный журнал. 4 (3) : 80—82. (Milenina L. S., Krutetskaya Z. I., Naumova A. A. 2014a. The inhibitors of Arp2/3 complex and WASP-proteins suppress glutoxim and molixan effect on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -concentration in macrophages. *Education*. 4 (3) : 80—82.)
- Миленина Л. С., Крутецкая З. И., Наумова А. А., Крутецкая Н. И., Бутов С. Н., Антонов В. Г. 2014б. Arp2/3-комплекс участвует в действии глутоксима и моликсана на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах. *Биофизика*. 59 (5) : 907—912. (Milenina L. S., Krutetskaya Z. I., Naumova A. A., Krutetskaya N. I., Butov S. N., Antonov V. G. 2014b. Arp2/3 complex is involved in the effect of glutoxim and molixan on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ -concentration in macrophages. *Biophysics*. 59 (5) : 907—912.)
- Соколова Г. Б., Синицын М. В., Кохемякин Л. А., Перельман М. И. 2002. Глутоксим в комплексной терапии туберкулеза. *Антибиот. Химиотер.* 47 (2) : 20—23. (Sokolova G. B., Sinitsyn M. V., Kozhemiakin L. A., Perel'man M. I. 2002. Glutoxim in the complex treatment of tuberculosis. *Antibiot. Khimioter.* 47 (2) : 20—23.)
- Alonso-Torre S. R., Alvarez J., Montero M., Sanchez A., Garcia-Sancho J. 1993. Control of  $\text{Ca}^{2+}$  entry into HL60 and U937 human leukaemia cells by the filling state of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *Biochem. J.* 289 : 761—766.
- 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.
- Alvarez J., Montero M., Garcia-Sancho J. 1991. Cytochrome P-450 may link intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores with plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  influx. *Biochem. J.* 274 : 193—197.
- Alvarez J., Montero M., Garcia-Sancho J. 1992. Cytochrome P-450 may regulate plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  permeability according to the filling state of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. *FASEB J.* 6 : 786—792.
- Ben-Amor N., Redondo P. C., Bartegi A., Pariente J. A., Salido G. M., Rosado J. A. 2006. A role for 5,6-epoxyeicosatrienoic acid in calcium entry by de novo conformational coupling in human platelets. *J. Physiol.* 570 : 309—323.
- Bruce J. I. E., Elliott A. C. 2000. Pharmacological evaluation of the role of cytochrome P450 in intracellular calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. *Brit. J. Physiol.* 131 : 761—771.
- Capdevila J., Gil L., Orellana M., Marnett L. J., Mason J. J., Ydagiri P., Falk J. R. 1988. Inhibitors of cytochrome P-450-dependent arachidonic acid metabolism. *Arch. Biochem. Biophys.* 261 : 257—263.
- Carrillo C., Cavia M. del M., Alonso-Torre S. R. 2013. Effect of econazole on  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in human colorectal adenocarcinoma cells. *Turk. J. Biochem.* 38 : 126—132.
- Chen J. K., Capdevila J., Harris R. C. 2001. Cytochrome P-450 epoxyenase metabolism of arachidonic acid inhibits apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 21 : 6322—6331.
- Conrad R. E. 1981. Induction and collection of peritoneal exudate macrophages. In: *Manual of macrophages methodology*. New York: Marcel Dekker. 5—11.
- Dennis E. A. 2000. Phospholipase A<sub>2</sub> 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.
- Graier W. F., Simecek S., Sturek M. 1995. Cytochrome P450 mono-oxygenase-regulated signaling of  $\text{Ca}^{2+}$  entry in human and bovine endothelial cells. *J. Physiol.* 482 : 259—274.
- Hafner A. K., Cernescu M., Hofmann B., Ermisch M., Horning M., Metzer J., Schneider G., Brutschy B., Steinhilber D. 2011. Dimerization of human lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 392 : 1097—1111.
- Koch B. D., Faurot G. F., Kopanitsa M. V., Swinney D. C. 1994. Pharmacology of  $\text{Ca}^{2+}$ -influx pathway activated by emptying the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores in HL-60 cells: evidence that a cytochrome P-450 is not involved. *Biochem. J.* 302 : 187—190.
- Krutetskaya Z. I., Milenina L. S., Melnitskaya A. V., Naumova A. A., Antonov V. G. 2014. Redox modulation of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Na}^+$  transport in nonexcitable cells. SPb.: SPb. State Polytechnical Univ. Publ. House. 171 p.
- Mason M. J., Mayer B., Hymel L. J. 1993. Inhibition of  $\text{Ca}^{2+}$  transport pathways in thymic lymphocytes by econazole, miconazole, and SKF 96365. *Amer. J. Physiol.* 264 : 654—662.
- 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.
- Needleman P., Turk J., Jacksick B. A., Morrison A. R., Lefko-with J. B. 1986. Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 55 : 69—102.
- Putney J. W., Broad L. M., Braun F. -J., Lievremont J.-P., Bird G. St. J. 2001. Mechanisms of capacitative calcium entry. *J. Cell. Sci.* 114 : 2223—2229.
- Randriamampita C., Trautmann A. 1987. Ionic channels in murine macrophages. *Cell Biol.* 105 : 761—769.
- Rodrigues A. D., Gibson G. G., Ioannides C., Parke D. V. 1987. Interaction of imidazole antifungal agents with purified cytochrome P-450 proteins. *Biochem. Pharmacol.* 36 : 4277—4281.
- Rosado J. A., Sage St. O. 2000. The actin cytoskeleton in the store-operated calcium entry. *J. Physiol.* 526 : 221—229.
- Rzigelinski B. A., Willoughby K. A., Hoffman S. W., Falck J. R., Ellis E. F. 1999. Calcium influx factor, further evidence it is 5,6-epoxyeicosatrienoic acid. *J. Biol. Chem.* 274 : 175—182.
- Snajdrova L., Xu A., Narayanan N. 1998. Clotrimazole, an antimycotic drug, inhibits the sarcoplasmic reticulum calcium pump and contractile function in heart muscle. *J. Biol. Chem.* 273 : 28 032—28 039.
- Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J. A. 2002. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277 : 16 559—16 566.

THE EFFECT OF EPOXYGENASE INHIBITORS ON  $\text{Ca}^{2+}$ -RESPONSES INDUCED  
BY GLUTOXIM AND MOLIXAN IN MACROPHAGES

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

Chair of Biophysics, St. Petersburg State University, 199034;  
e-mail: cozy@mail.ru

Using Fura-2AM microfluorimetry the possible involvement of epoxigenase pathway of arachidonic acid metabolism in the effect of glutoxim and molixan on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in rat peritoneal macrophages was investigated. It was shown for the first time that preincubation of the macrophages with epoxigenase inhibitors, proadifen and econazole, significantly decreases the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration increase induced by glutoxim and molixan. The addition of the epoxigenase inhibitors during the already developed store-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -entry induced by glutoxim or molixan partially inhibits  $\text{Ca}^{2+}$ -entry. The obtained data suggest the involvement of the products and/or enzymes of epoxigenase pathway of the arachidonic acid metabolism in the glutoxim and molixan effect on the  $\text{Ca}^{2+}$  signaling processes in macrophages.

**Key words:** intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, peritoneal macrophages, glutoxim, molixan, arachidonic acid, epoxigenases.