

УДК 576.32/.36

## УЧАСТИЕ МИКРОТРУБОЧЕК В ДЕЙСТВИИ ГЛУТОКСИМА И МОЛИКСАНА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ $Ca^{2+}$ В МАКРОФАГАХ

© 2013 г. З. И. Крутецкая, Л. С. Курилова, В. Г. Антонов, академик А. Д. Ноздрачев

Поступило 26.02.2013 г.

DOI: 10.7868/S0869565213210251

В настоящее время разработано и введено в клиническую практику значительное число дисульфидсодержащих препаратов, изменяющих редокс-состояние и оказывающих физиологически значимый эффект на клетки. Фармакологический препарат глутоксим® — динатриевая соль окисленного глутатиона (GSSG) с нанодобавкой платины (“ФАРМА-ВАМ”, Москва) используется как иммуномодулятор и гемостимулятор в комплексной терапии бактериальных и вирусных заболеваний, псориаза, лучевой и химиотерапии в онкологии [1]. 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 впервые обнаружено, что GSSG, глутоксим или моликсан 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 [2–4]. 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  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах, являются тирозинкиназы, тирозинфосфатазы [3, 5], фосфатидилинозитолкиназы [6], малые G-белки суперсемейства Ras, важнейшие ферменты фосфоинозитидной системы передачи сигнала — фосфолипаза C и протеинкиназа C [7]. Выявлено также участие элементов актинового цитоскелета в действии глутоксима или моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах [8, 9].

Известно, что белок микротрубочек тубулин имеет высокую редокс-чувствительность и легко

подвергается S-глутатионированию [10]. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать возможное участие микротрубочек в регуляторном действии глутоксима или моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах крысы.

Подробно процедура культивирования макрофагов и автоматизированная установка для регистрации  $[Ca^{2+}]_i$  с использованием флуоресцентного зонда Fura-2AM описаны ранее [11]. Эксперименты проводили при комнатной температуре 20–22°C на вторые-третьи сутки культивирования клеток. Для выявления участия микротрубочек в действии глутоксима или моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах крысы были использованы два структурно различных деполимеризатора микротрубочек — колцемид и нокодазол, а также стабилизатор микротрубочек — таксол [12].

Показано, что инкубация макрофагов в течение 20 мин со 100 мкг/мл моликсана (рис. 1а) или 100 мкг/мл глутоксима (рис. 2а) в номинально бескальциевой среде вызывает 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. 1а, 2а).

Обнаружено, что нокодазол, колцемид или таксол практически полностью предотвращают увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  при действии глутоксима или моликсана (рис. 1, 2). Так, предварительная инкубация макрофагов с 10 мкМ нокодазола (рис. 1б) в течение 25 мин до введения 100 мкг/мл моликсана вызывает практически полное подавление обеих фаз  $Ca^{2+}$ -ответа, вызываемого моликсаном. Преинкубация клеток с 50 мкМ колцемида (рис. 1в) в течение 20 мин до введения 100 мкг/мл моликсана также приводит к полному подавлению увеличения  $[Ca^{2+}]_i$ , индуцированного моликсаном. Аналогичные данные получены при использовании 100 мкг/мл глутоксима. Результаты свиде-

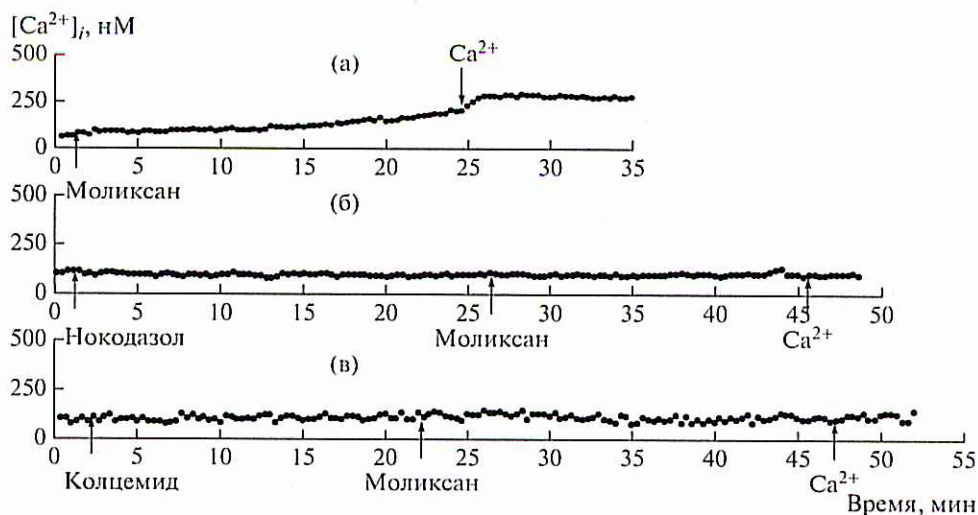


Рис. 1. Эффект моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  (а) и влияние нокодазола (б) и колцемид (в) на эффект моликсана в перитонеальных макрофагах. Каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант для 3–7 экспериментов. а–в – см. в тексте.

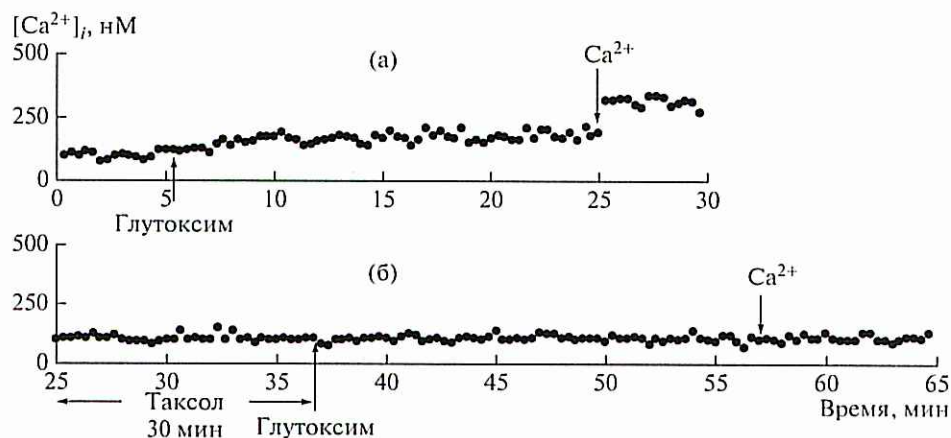


Рис. 2. Эффект глутоксима на  $[Ca^{2+}]_i$  (а) и влияние таксола на эффект глутоксима на  $[Ca^{2+}]_i$  (б) в перитонеальных макрофагах. Каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант для 3–7 экспериментов. а, б – см. в тексте.

тельствуют о том, что деполимеризация тубулинового цитоскелета предотвращает регуляторное действие глутоксима или моликсана на процессы  $Ca^{2+}$ -сигнализации в макрофагах. Кроме того, показано, что преинкубация макрофагов с 40 мкМ таксола в течение 30 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима также приводит к практически полному подавлению  $Ca^{2+}$ -ответов, вызываемых глутоксिमом (рис. 2б). Сходные результаты получены при использовании 100 мкг/мл моликсана. Это свидетельствует о том, что стабилизация микротрубочек, так же как и их разборка, может предотвращать действие глутоксима или моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах.

Обнаружено, что добавление 100 мкМ таксола на фоне развившегося депозависимого входа  $Ca^{2+}$ , индуцированного моликсаном, вызывает полное подавление входа  $Ca^{2+}$  и возвращение  $[Ca^{2+}]_i$  к базальному уровню (не показано). Это подтверждает наши ранние данные об ингибировании таксолом депозависимого входа  $Ca^{2+}$ , индуцированного пуриnergическим агонистом АТФ или ингибитором эндоплазматических  $Ca^{2+}$ -АТФаз тапсигаргином [13], и свидетельствует об участии микротрубочек не только в генерации, но и в поддержании депозависимого входа  $Ca^{2+}$  в макрофагах.

Таким образом, нами впервые показано, что любые изменения в структуре тубулинового ци-

тоскелета (деполимеризация или стабилизация) модулируют эффект глутокси́ма или моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах. Кроме того, полученные данные позволяют предположить нежелательность совместного применения глутокси́ма или моликсана с нокодазолом, колцемидом или таксоллом, которые используются в терапии онкологических заболеваний как цитостатики.

Известно также, что микротрубочки участвуют в регуляции внутриклеточного транспорта секреторных везикул, регулируя эффективность транспорта, а также подобно “дорогам или трассам” обеспечивают направление движения везикул. Агенты, вызывающие деполимеризацию микротрубочек, ингибируют секрецию в клетках различных типов [14]. Следовательно, подавление нокодазолом или колцемидом  $Ca^{2+}$ -ответов, индуцированных глутокси́мом или моликсаном, может свидетельствовать о том, что регуляция  $[Ca^{2+}]_i$  этими препаратами опосредована механизмом, сходным с процессом секреции.

Таким образом, нами впервые выявлено участие микротрубочек в регуляторном действии глутокси́ма или моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах. Можно заключить, что тубулиновый цитоскелет является непосредственным участником сигнального каскада, запускаемого глутокси́мом или моликсаном и приводящего к увеличению  $[Ca^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах крысы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Жуков О.Б., Зубарев А.Р., Мезенцева М.В. и др. // Врачебное сословие. 2004. Т. 5/6. С. 51–56.
2. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С. и др. // ДАН. 2007. Т. 412. № 5. С. 700–703.
3. Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., et al. // Cell Tissue Biol. 2008. V. 2. P. 322–332.
4. Крутецкая З.И., Курилова Л.С., Лебедев О.Е. и др. // Цитология. 2011. Т. 53. № 9. С. 708.
5. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С. и др. // ДАН. 2007. Т. 417. № 2. С. 273–275.
6. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С. и др. // ДАН. 2008. Т. 422. № 4. С. 562–563.
7. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С. и др. // ДАН. 2009. Т. 428. № 2. С. 272–274.
8. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С. и др. // ДАН. 2011. Т. 436. № 5. С. 705–708.
9. Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. и др. // Цитология. 2012. Т. 54. № 2. С. 135–142.
10. Wang J., Voja E.S., Tan W., et al. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 47763–47766.
11. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Тюшев В.Е. и др. // Цитология. 1997. Т. 39. № 2/3. С. 164–176.
12. Фултон А. Цитоскелет. Архитектура и хореография клетки. М.: Мир, 1987. 117 с.
13. Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. и др. // Бюл. сибирской медицины. 2005. Т. 4. Прил. 1. С. 114.
14. Klann M., Koeppl H., Reuss M. // PLoS ONE. 2012. V. 7. P. 1–15.

