

На правах рукописи

Наумова Александра Андреевна

**ВЛИЯНИЕ ГЛУТОКСИМА И МОЛИКСАНА
НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ Ca^{2+}
В МАКРОФАГАХ:
РОЛЬ КАСКАДА МЕТАБОЛИЗМА АРАХИДОНОВОЙ
КИСЛОТЫ И АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА**

03.01.02 - биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

**Санкт-Петербург
2017**

Работа выполнена на кафедре биофизики биологического факультета Федерального государственного бюджетного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет».

Научный руководитель: **Крутецкая Зоя Иринарховна,**
доктор биологических наук, профессор,
заведующая кафедрой биофизики
биологического факультета ФГБОУ ВО «Санкт-
Петербургский государственный университет».

Официальные оппоненты: **Шпаков Александр Олегович,**
доктор биологических наук, заведующий
лабораторией молекулярной эндокринологии и
нейрохимии ФГБУН «Институт эволюционной
физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова»
Российской Академии наук (ИЭФБ РАН).

Плахова Вера Борисовна,
кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник лаборатории физиологии возбудимых
мембран ФГБУН «Институт физиологии им.
И.П. Павлова» Российской Академии наук (ИФ
РАН).

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное
военное образовательное учреждение высшего
образования «Военно-медицинская академия им.
С.М. Кирова» Министерства обороны
Российской Федерации.

Защита состоится «25» мая 2017 года в 14 часов 00 минут на заседании
Диссертационного совета Д 212.232.10 по защите докторских и кандидатских
диссертаций на базе ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный
университет», по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д. 7/9,
ауд. № 90.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке им. А.М. Горького
ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет» по адресу:
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб. д. 7/9, а также на сайте Санкт-
Петербургского государственного университета по адресу:

<https://disserspbu.ru/files/dissers2/dissers/41cJd9x1Q6.pdf>.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2017 года.

Учёный секретарь
Диссертационного совета 212.232.10,
доктор биологических наук, профессор

Н.П. Алексеев

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Фундаментальным регуляторным механизмом в живой клетке является редокс-регуляция передачи сигналов и экспрессии генов (Filomeni et al., 2002; Biswas et al., 2006). Ведущая роль в редокс-регуляции и поддержании редокс-статуса клетки принадлежит системе глутатион/ окисленный глутатион (GSH/GSSG). GSH (γ -L-глутамил-L-цистеинил-L-глицин) является одним из ключевых внутриклеточных антиоксидантов (Biswas et al., 2006). Содержание GSSG в цитозоле повышается в условиях окислительного стресса, что послужило основанием рассматривать его как агрессивную молекулу. Однако было показано, что GSSG может оказывать рецептор-опосредованное действие на внутриклеточные процессы (Filomeni et al., 2002; Townsend et al., 2008).

В настоящее время на основе GSSG синтезирован ряд фармакологических препаратов, которые характеризуются иммуномодулирующим и системным цитопротекторным эффектами (Borisov et al., 2001; Жуков и др., 2004). К этой группе препаратов относятся глутоксим® (динатриевая соль GSSG с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) и моликсан® (комплекс глутоксима с нуклеозидом инозином, «ФАРМА-ВАМ»). Несмотря на широкое использование этих лекарственных препаратов в медицинской практике, клеточные и молекулярные механизмы их действия остаются во многом не изученными.

Одной из основных мишеней действия глутоксима и моликсана являются такие иммунокомпетентные клетки, как макрофаги (Еремеев, Гергерт, 2013). Ранее на кафедре биофизики Санкт-Петербургского государственного университета (СПбГУ) было впервые показано, что GSSG, глутоксим и моликсан вызывают увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$, связанное с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+} -депо и последующим депо-зависимым входом Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы (Крутецкая и др., 2007; Курилова и др., 2008, 2011а, б). Установлено также, что во влиянии глутоксима и моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах принимают участие такие сигнальные молекулы, как тирозинкиназы и тирозинфосфатазы (Крутецкая и др., 2007; Курилова и др., 2008), фосфатидилинозитолкиназы (Крутецкая и др., 2008), ключевые ферменты фосфоинозитидного пути передачи сигнала фосфолипаза C и протеинкиназа C (Крутецкая и др., 2009), элементы цитоскелета (Крутецкая и др., 2011; Курилова и др., 2012а, б; Крутецкая и др., 2013; Kurilova et al., 2013; Миленина и др., 2014), рецепторы, ассоциированные с гетеротримерными G-белками (Krutetskaya et al., 2014) и малые G-белки суперсемейства Ras (Крутецкая и др., 2014).

В ходе иммунного ответа активированные фагоциты продуцируют большие количества свободной арахидоновой кислоты (АК), которая высвобождается из мембранных липидов с участием фосфолипаз А₂ (ФЛА₂) и далее окисляется в клетке по трём основным ферментативным путям с участием циклооксигеназ, липоксигеназ и цитохром Р-450-подобных эпоксигеназ (Needleman et al., 1986; Lapetina, 1990; Крутецкая, Лебедев, 1993; Dennis et al., 2011). Продукты метаболизма АК (эйкозаноиды) - это вторичные посредники, которые участвуют в регуляции воспаления, аллергических реакций и целого ряда других физиологических функций клеток и тканей (Needleman et al., 1986; Lapetina, 1990).

Воздействие на макрофаги внеклеточных стимулов также приводит к динамичным перестройкам актинового цитоскелета. Актиновые филаменты участвуют в таких функциях макрофагов, как хемотаксис, фагоцитоз и презентация антигенов (Rougerie et al., 2013). Ранее на кафедре биофизики СПбГУ было впервые выявлено, что актиновые филаменты участвуют в формировании Ca²⁺-ответов, индуцируемых глутоксимом и моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы (Крутецкая и др, 2011; Курилова и др, 2012б). Морфологические исследования показали, что глутоксим и моликсан вызывают реорганизацию актинового цитоскелета в макрофагах (Курилова и др, 2012б; Kurilova et al., 2013).

Ключевым участником процессов полимеризации и ветвления микрофиламентов является комплекс белков Arp 2/3 (actin-related proteins; белки, связанные с актином), который, в свою очередь, активируется белками WASP (Wiskott – Aldrich syndrome proteins; белки синдрома Вискотта - Олдрича) (Pollard, Borisov, 2003; Rougerie et al., 2013).

Известно также, что каскад метаболизма АК и такие элементы актинового цитоскелета, как актин-связывающие белки, играют важную роль в сигнальных процессах с участием ионов Ca²⁺ в различных типах клеток (Peppelenbosch et al., 1992; Joseph et al., 2014). Однако оставалось неизвестным, задействованы ли эти внутриклеточные системы в действии глутоксима и моликсана на [Ca²⁺]_i.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось изучение роли каскада метаболизма арахидоновой кислоты и элементов актинового цитоскелета (актин-связывающих белков) во влиянии препаратов-иммуномодуляторов глутоксим и моликсан на [Ca²⁺]_i в перитонеальных макрофагах крысы.

Для достижения этой цели были поставлены и решены следующие **задачи:**

1) изучить участие ключевого фермента каскада метаболизма АК фосфолипазы A_2 во влиянии глутоксида и моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы;

2) изучить участие циклооксигеназного, липоксигеназного и эпоксигеназного путей окисления АК в регуляции Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксидом и моликсаном в макрофагах;

3) исследовать участие актин-связывающих белков WASP и Arp 2/3-комплекса в действии препаратов глутоксид и моликсан на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах.

Научная новизна работы. С использованием широкого спектра агентов, ингибирующих фосфолипазы A_2 , циклооксигеназы, липоксигеназы и эпоксигеназы, впервые выявлено участие основных путей метаболизма АК во влиянии иммуномодуляторов глутоксида и моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы. Впервые показано участие актин-связывающих белков WASP и белков Arp 2/3-комплекса в регуляции Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксидом и моликсаном в макрофагах.

Впервые предложены возможные механизмы участия каскада метаболизма АК и актиновых филаментов в сигнальном каскаде, запускаемом глутоксидом и моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты вносят вклад в один из фундаментальных разделов клеточной биологии и биофизики - изучение процессов внутриклеточной сигнализации. Результаты исследования станут дополнением к общей модели действия дисульфид-содержащих иммуномодуляторов, которая откроет широкие перспективы для разработки новых эффективных лекарственных препаратов, а также для усовершенствования существующих. Выявление клеточных механизмов влияния препаратов глутоксид и моликсан позволит повысить эффективность использования этих препаратов в терапии бактериальных и вирусных инфекций, онкологических заболеваний и т.д. Материалы диссертации используются при чтении лекционных курсов «Биофизика», «Механизмы внутриклеточной сигнализации», «Биофизика клеточных процессов», «Основы медицинской биофизики» и «Люминесцентный анализ клеток» для студентов кафедры биофизики и биологического факультета СПбГУ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Структурно различные ингибиторы фосфолипазы A_2 (4-бромфенацилбромид, дексаметазон, преднизолон) вызывают существенное подавление Ca^{2+} -ответов, индуцируемых глутоксидом и моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы, что свидетельствует об участии фосфолипазы A_2 и каскада метаболизма АК в процессах Ca^{2+} -сигнализации, запускаемых глутоксидом и моликсаном в макрофагах.

2. Ингибиторы циклооксигеназ (индометацин, аспирин), липоксигеназ (нордигидрогуаретиковая кислота, каффеиковая кислота, zileuton, байкалейн) и эпоксигеназ (эконазол, проадифен) подавляют увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое глутоксимом и моликсаном в макрофагах. Полученные результаты свидетельствуют об участии ферментов и/или продуктов метаболизма АК в регуляции Ca^{2+} -ответов, вызываемых дисульфид-содержащими иммуномодуляторами в макрофагах.

3. Ингибиторы белков WASP (вискостатин) и Agr 2/3-комплекса (соединение СК-0944666) существенно подавляют увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое глутоксимом и моликсаном в макрофагах, что свидетельствует об участии актин-связывающих белков в действии глутоксима и моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах.

Апробация работы. Материалы, представленные в диссертации, были доложены на: VIII и IX Международной конференции «Биоантиоксидант» (Москва, 2010, 2015); VIII, X и XI Международном симпозиуме «Biological Motility: Fundamental and Applied Science» (Пушино, 2012, 2014, 2016); Международном симпозиуме по проблемам боли «Translational approaches to cause-oriented treatment of pain symptoms» (Санкт-Петербург, 2012); Международной междисциплинарной научной конференции «Биологически активные вещества и материалы: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Новый Свет, Крым, 2013); Всероссийском симпозиуме и школе-конференции для молодых учёных по биологии клетки в культуре (Санкт-Петербург, 2013); XXII Съезде Физиологического общества имени И.П. Павлова (Москва – Волгоград, 2013); Международной научно-методической конференции «Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы» (Воронеж, 2013); Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (Новосибирск, 2013); V, VI, VII, VIII, IX Международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине» (Санкт-Петербург, 2013, 2014, 2015); 18 и 19 Международной Пушинской школе-конференции молодых учёных «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2014, 2015); Международной конференции молодых учёных «Экспериментальная и теоретическая биофизика 2014» (Пушино, 2014); II Всероссийской конференции «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет» (Санкт-Петербург, 2015); Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, 2015); V Съезде биофизиков России (Ростов-на-Дону, 2015); 40 Конгрессе Федерации

Европейских биохимических обществ (40th FEBS Congress) (Германия, Берлин, 2015).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 30 научных работ, в том числе 1 монография, 6 статей в рецензируемых журналах, 11 статей и 12 тезисов в материалах конференций.

Объём и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 169 страницах; включает такие разделы, как введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, общее заключение, выводы и список литературы, включающий 296 наименований. Работа иллюстрирована 55 рисунками и 2 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования служили культивируемые резидентные перитонеальные макрофаги крыс линии Wistar. Клетки выделяли из перитонеальной полости крыс (самцов массой 200 - 300 г) по методу, описанному ранее (Conrad, 1981; Randriamampita, Trautmann, 1987). Сразу после выделения клетки имели сферическую форму и диаметр около 10 - 20 мкм. Суспензию клеток помещали в бакпечатки с кварцевыми стеклами (10 x 10 мм). Клетки на стеклах культивировали в среде 199 (рН 7,2) с добавлением сыворотки крови быка (20%), раствора глутамин (3%), пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мг/мл) в течение 1 – 3 суток при 37°C. По окрашиванию α -нафтилацетатэстеразой (Monahan et al., 1981) было определено, что по меньшей мере 96% клеток в монослоях являются макрофагами. Эксперименты проводили при комнатной температуре 20 - 22°C на 2-е - 3-и сутки культивирования.

Растворы. Кварцевые стекла с клетками помещали в экспериментальную камеру, заполненную физиологическим раствором следующего ионного состава: NaCl – 140 мМ, KCl – 5 мМ, CaCl₂ – 1 мМ, MgCl₂ – 1 мМ, HEPES-NaOH - 5 мМ; рН 7,3 - 7,4 (Alonso-Torre, Trautmann, 1993). Бескальциевая среда содержала 0 мМ CaCl₂ и 1 мМ ЭГТА.

Маточные растворы глутоксима (50 мг/мл) и моликсана (50 мг/мл) («ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) готовили на воде. Маточные растворы ацетилсалициловой кислоты (10 мМ), кофеиновой кислоты (5 мМ) и байкалейна (5 мМ) («Sigma-Aldrich», США) готовили на этиловом спирте. Маточные растворы 4-бромфенацилбромида (10 мМ), индометацина (10 мМ), нордигидрогуаретиковой кислоты (10 мМ), зилеутона (1 мМ), эконазола (5 мМ), проадифена (100 мМ), вискостатина (10 мМ), соединения СК-0944666 (100 мМ) и Fura-2AM (1 мМ) («Sigma-Aldrich», США) готовили на диметилсульфоксиде.

В экспериментах также использовали коммерческие препараты дексаметазона («KRKA», Словения) и преднизолона («Takeda Austria GmbH», Австрия).

Измерение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} с помощью флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM. Для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM. Макрофаги инкубировали в течение 45 мин в физиологическом растворе, содержащем 2 мкМ Fura-2AM, при комнатной температуре (20 - 22°C). Стекла с окрашенными клетками отмывали физиологическим раствором и переносили в экспериментальную камеру, расположенную на предметном столике люминесцентного микроскопа.

Для выявления и усиления входа Ca^{2+} в клетки в ходе регистрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 глутоксимом 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее вход Ca^{2+} в клетку. Фармакологические агенты добавляли до введения глутоксима или моликсана (предварительная инкубация) или во время развившегося входа Ca^{2+} из наружной среды.

Эксперименты проводили с использованием оригинальной автоматизированной экспериментальной установки на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B («Leica Microsystems», Германия).

Экспериментальная установка на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B. Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм через объектив 10× с апертурой 8 мм флуоресцентного микроскопа. Источником возбуждающего излучения служила ксеноновая лампа (75 Вт). Эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм с помощью специализированной видеокамеры Leica DFC340FX. Для выделения соответствующих участков спектра использовали узкополосные оптические фильтры. Для управления экспериментом использовали систему обработки изображения ImageJ (плагин Micro-Manager 1.4). Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с.

Значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича (Gryniewicz et al., 1985). Статистический анализ проводили с применением критерия *t* Стьюдента. На рисунках приведены результаты типичных экспериментов. Данные представлены в виде графика изменения отношения интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (отношение F_{340}/F_{380}) во времени, отражающего динамику изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках в зависимости от времени измерения (Xie et al., 2002).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние препаратов глутоксим и моликсан на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. В контрольных экспериментах исследовано влияние препаратов глутоксим и моликсан на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в резидентных перитонеальных макрофагах крысы.

Было показано, что инкубация макрофагов в течение 20 - 23 мин с 100 мкг/мл моликсана (рис. 1а) или 100 мкг/мл глутоксима (рис. 2а) в бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В среднем (по данным 6 экспериментов для каждого из препаратов) через 20 - 23 мин после добавления агентов $[\text{Ca}^{2+}]_i$ увеличивается от базального уровня, равного 91 ± 16 нМ, до 161 ± 20 нМ для глутоксима и до 153 ± 19 нМ - для моликсана. При введении в среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдается дальнейшее повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее вход Ca^{2+} в цитозоль. В среднем (по данным 6 экспериментов для каждого из препаратов) увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 259 ± 18 нМ и 255 ± 21 нМ для глутоксима и моликсана соответственно. Таким образом, оба препарата оказывают сходное влияние на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы.

Влияние ингибиторов фосфолипазы A_2 на Ca^{2+} -ответы, вызываемые глутоксимом и моликсаном в макрофагах. Запуск каскада метаболизма АК с участием ФЛА₂ является одним из ключевых событий в активации макрофагов. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать участие ключевого («стартового») фермента каскада – ФЛА₂ – во влиянии препаратов глутоксим и моликсан на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы. Для достижения этой цели использовали три структурно-различных ингибитора ФЛА₂: **4-бромфенацилбромид (4-БФБ)**, а также глюкокортикоиды **дексаметазон** и **преднизолон** – стероидные противовоспалительные и антиаллергические агенты.

Впервые показано, что преинкубация клеток с 20 мкМ 4-БФБ в течение 15 мин до введения 100 мкг/мл моликсана приводит к подавлению как мобилизации Ca^{2+} из депо (в среднем по данным 7 экспериментов на $71,7 \pm 4,7\%$), так и последующего входа Ca^{2+} в клетку (в среднем по данным 7 экспериментов на $72,6 \pm 5,1\%$), вызываемых моликсаном (рис. 1б). Сходные данные были получены в опытах по влиянию 4-БФБ на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые 100 мкг/мл глутоксима.

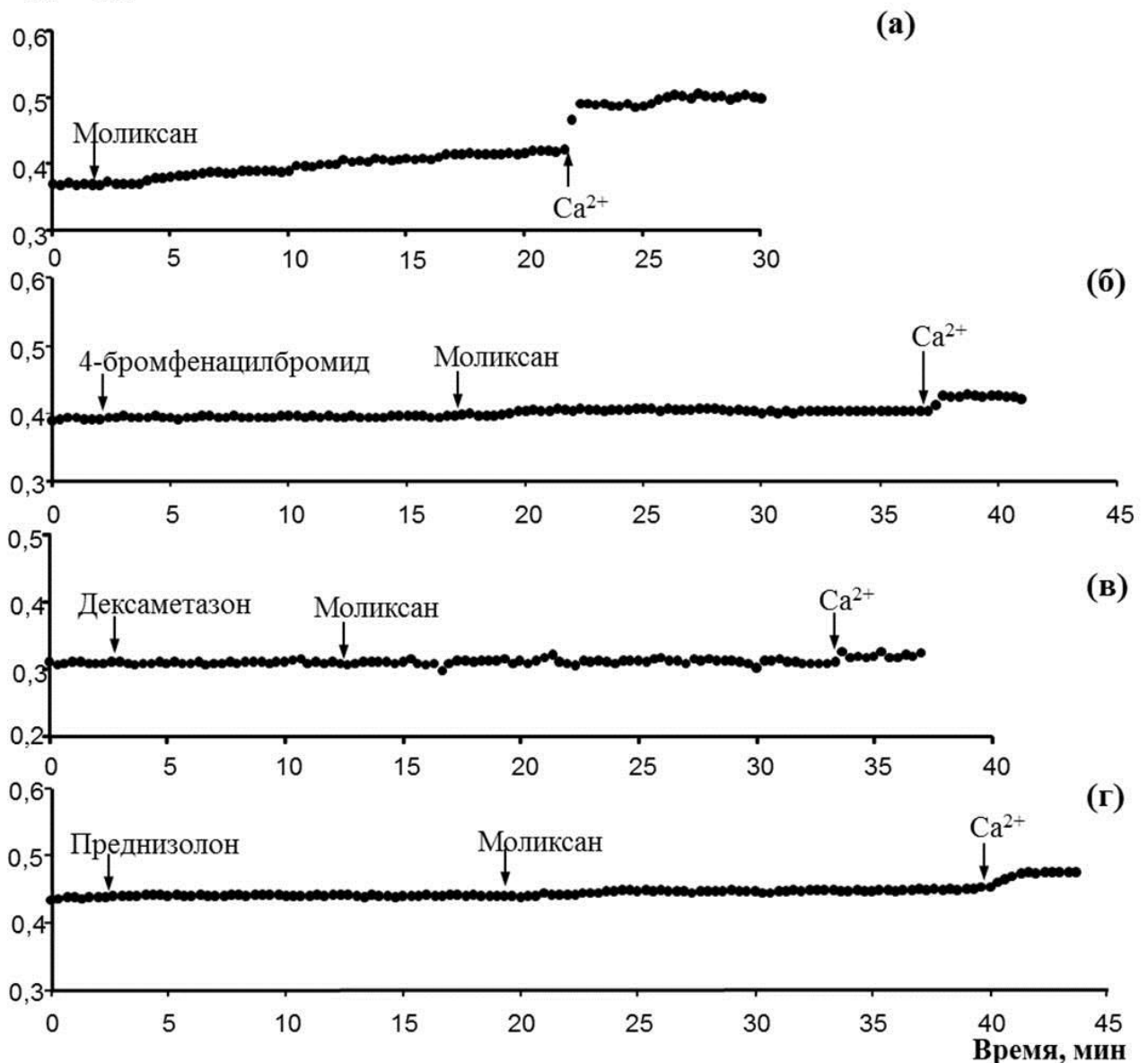
F_{340}/F_{380} , отн. ед.


Рисунок 1. Влияние ингибиторов фосфолипазы A_2 на увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы, вызываемое моликсаном

Здесь и далее на рис. 2 по оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.), по оси абсцисс – время (мин). Каждая регистрация получена для группы из 40 – 50 клеток и представляет собой типичный вариант для 6 - 7 экспериментов.

а – клетки инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл моликсана в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} индуцировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ;

б, в, г – клетки предварительно инкубировали в течение 15 мин с 20 мкМ 4-бромфенацилбромидом (б), в течение 10 мин с 8 мкг/мл дексаметазона (в), в течение 16 мин с 25 мкг/мл преднизолона (г) в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл моликсана, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

Показано также, что преинкубация клеток с 8 мкг/мл дексаметазона в течение 10 мин до введения 100 мкг/мл моликсана вызывает практически полное подавление вызываемых моликсаном мобилизации Ca^{2+} из депо (в среднем по данным 7 экспериментов на $85,4 \pm 5,9\%$) и последующего входа Ca^{2+} в цитозоль (в среднем по данным 7 экспериментов на $89,6 \pm 6,2\%$, рис. 1в).

Предварительная инкубация макрофагов с 25 мкг/мл преднизолона в течение 16 мин до введения 100 мкг/мл моликсана также приводит к подавлению мобилизации Ca^{2+} из депо (в среднем по данным 7 экспериментов на $73,8 \pm 4,8\%$) и входа Ca^{2+} (в среднем по данным 7 экспериментов на $71,4 \pm 5,3\%$), индуцированных моликсаном (рис. 1г). Сходные данные получены при использовании 100 мкг/мл глутоксима.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют об участии ФЛА₂ и каскада метаболизма АК в запуске Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксимом и моликсаном в перитонеальных макрофагах. При этом рассмотренный нами эффект глюкокортикоидов обусловлен, по-видимому, не геномными эффектами, характерными для стероидных гормонов, а их быстрым (в течение 10 – 15 мин) действием на ФЛА₂ в макрофагах

Влияние ингибиторов циклооксигеназ на увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, индуцируемое глутоксимом и моликсаном в макрофагах. Участие циклооксигеназного пути метаболизма АК в действии глутоксима и моликсана на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы исследовано с использованием структурно различных ингибиторов циклооксигеназ **индометацина** и **ацетилсалициловой кислоты (аспирина)** – нестероидных противовоспалительных агентов. Показано, что предварительная инкубация макрофагов в течение 5 мин с 20 мкМ индометацина или 100 мкМ аспирина вызывает значительное уменьшение фазы мобилизации Ca^{2+} из внутриклеточных депо и фазы входа Ca^{2+} , индуцированных 100 мкг/мл глутоксима или 100 мкг/мл моликсана.

Кроме того, показано, что добавление 40 мкМ индометацина или 100 мкМ аспирина на фоне развившегося входа Ca^{2+} , индуцируемого 100 мкг/мл глутоксима, приводит к значительному подавлению входа Ca^{2+} в макрофагах. В среднем подавление входа Ca^{2+} , вызываемого глутоксимом, составило для аспирина $26,2 \pm 3,3\%$ (по данным 8 экспериментов), для индометацина - $56,8 \pm 4,7\%$ (по данным 9 экспериментов). Аналогичные результаты получены для препарата моликсан.

На основании полученных данных можно предположить, что циклооксигеназы и/или продукты циклооксигеназного пути метаболизма АК играют важную роль в запуске мобилизации Ca^{2+} из депо, а также в генерации и

поддержании депо-зависимого входа Ca^{2+} , индуцируемых глутоксимом или моликсаном в макрофагах.

Влияние ингибиторов липоксигеназ на Ca^{2+} -ответы, вызываемые глутоксимом и моликсаном в макрофагах. Для выявления возможного участия липоксигеназного пути окисления АК во влиянии глутоксима и моликсана на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах использовали широкий спектр фармакологических агентов:

- 1) неселективный ингибитор липоксигеназ **нордигидрогуаретиковая кислота (НДГК)**;
- 2) селективный ингибитор 5-липоксигеназ **каффеиновая кислота**;
- 3) селективный ингибитор 5-липоксигеназ **зилеутон**, используемый в терапии бронхиальной астмы;
- 4) селективный ингибитор 12-липоксигеназ флавоноид **байкалейн**.

Было показано, что предварительная инкубация макрофагов с 1 мкМ зилеутона, 5 мкМ НДГК, 5 мкМ кафеиновой кислоты или 5 мкМ байкалейна в течение 5 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима вызывает значительное подавление мобилизации и депо-зависимого входа Ca^{2+} , индуцируемых глутоксимом. Так, для зилеутона подавление мобилизации Ca^{2+} составило $79,2 \pm 9,1\%$, а подавление входа Ca^{2+} - $58,7 \pm 8,4\%$ (в среднем по данным 7 экспериментов). Аналогичные результаты получены для препарата моликсан.

Исследовано также влияние ингибиторов липоксигеназ на развившийся вход Ca^{2+} , индуцируемый 100 мкг/мл глутоксима или моликсана в перитонеальных макрофагах крысы. Установлено, что введение НДГК (30 мкМ), кафеиновой кислоты (40 мкМ), зилеутона (4 мкМ) или байкалейна (40 мкМ) на фоне развившегося входа Ca^{2+} вызывает подавление входа Ca^{2+} , вызываемого глутоксимом или моликсаном, с различной эффективностью. В среднем подавление входа Ca^{2+} , вызываемого глутоксимом, составило для НДГК - $31,7 \pm 5,8\%$ (по данным 7 экспериментов), для кафеиновой кислоты - $31,2 \pm 9,1\%$ (по данным 8 экспериментов), для зилеутона $41,8 \pm 9,3\%$ (по данным 11 экспериментов), для байкалейна - $60,5 \pm 8,9\%$ (по данным 7 экспериментов). Аналогичные результаты получены для препарата моликсан.

Полученные экспериментальные данные позволяют предположить, что 5- и 12-липоксигеназы или продукты окисления АК с участием этих ферментов играют важную роль в формировании обеих фаз Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксимом или моликсаном.

Влияние ингибиторов эпоксигеназ на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые глутоксимом и моликсаном в макрофагах. Для исследования возможного участия эпоксигеназного пути окисления АК в действии глутоксима и моликсана на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах использовали два структурно различных ингибитора

эпоксигеназ: **проадифен (соединение SKF525A)** и **эконазол** – антимикотический агент имидазольной природы.

Установлено, что предварительная инкубация клеток с 100 мкМ проадифена в течение 5 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима приводит к практически полному подавлению как фазы мобилизации Ca^{2+} из депо (в среднем по данным 7 экспериментов на $95,6 \pm 6,3\%$), так и фазы входа Ca^{2+} (в среднем по данным 7 экспериментов на $92,3 \pm 5,7\%$), вызываемых глутоксимом. Аналогичные результаты получены при использовании 100 мкг/мл моликсана. При предварительной инкубации макрофагов с 5 мкМ эконазола в течение 5 мин до введения 100 мкг/мл моликсана также происходит практически полное подавление фазы мобилизации Ca^{2+} из депо (в среднем по данным 7 экспериментов на $87,1 \pm 5,8\%$) и подавление входа Ca^{2+} (в среднем по данным 7 экспериментов на $32,3 \pm 4,9\%$), вызываемых моликсаном. Сходные данные получены при использовании 100 мкг/мл глутоксима.

Показано также, что добавление 100 мкМ проадифена или 5 мкМ эконазола на фоне развившегося входа Ca^{2+} , индуцируемого глутоксимом или моликсаном, приводит к существенному подавлению входа Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы. В среднем подавление входа Ca^{2+} , вызываемого глутоксимом, составило для проадифена $37,5 \pm 4,2\%$ (по данным 5 экспериментов), а для эконазола – $35,8 \pm 5,0\%$ (по данным 6 экспериментов). Подавление входа Ca^{2+} , вызываемого моликсаном, в среднем составило для проадифена $38,1 \pm 3,9\%$ (по данным 5 экспериментов), а для эконазола – $21,8 \pm 4,3\%$ (по данным 6 экспериментов).

Полученные результаты позволяют предположить, что эпоксигеназы или продукты эпоксигеназного пути метаболизма АК участвуют в регуляции Ca^{2+} -ответов, индуцируемых глутоксимом или моликсаном в макрофагах.

В то же время установлено, что ингибиторы эпоксигеназ сами могут индуцировать Ca^{2+} -ответы в клетках. Так, проадифен (100 мкМ) вызывает в бескальциевой среде постепенно нарастающее повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, связанное, по видимому, с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных депо в перитонеальных макрофагах крысы. Последующее введение в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} активировало вход Ca^{2+} в макрофаги. Кроме того, проадифен и эконазол вызывают небольшое увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (в среднем по данным 14 экспериментов на $13,6 \pm 2,4\%$ относительно базального уровня) до введения глутоксима или моликсана.

В связи с этим можно предположить, что подавление проадифеном и эконазолом мобилизации Ca^{2+} из депо, индуцированной глутоксимом или моликсаном, может быть связано с тем, что к моменту введения глутоксима или

моликсана депо уже были частично опустошены приложением проадифена или эконазола.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что одним из важных участников сигнального каскада, запускаемого глутоксимом и моликсаном в макрофагах, является каскад метаболизма АК, причём во влиянии глутоксима и моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ задействованы все три пути окисления АК – циклооксигеназный, липоксигеназный и эпоксигеназный. Кроме того, полученные данные указывают на нежелательность совместного клинического применения глутоксима и моликсана и лекарственных препаратов на основе ингибиторов ФЛА₂, циклооксигеназ, липоксигеназ и эпоксигеназ.

Влияние ингибиторов актин-связывающих белков на Ca^{2+} -ответы, вызываемые глутоксимом и моликсаном в макрофагах. Для исследования возможного участия Arp2/3-комплекса и белков семейства WASP (Wiskott–Aldrich Syndrome proteins; белки синдрома Вискотта - Олдрича) в действии глутоксима и моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ использовали ингибитор Arp2/3-комплекса **соединение СК-0944666** и ингибитор белков WASP **вискостатин**.

Впервые обнаружено, что предварительная инкубация макрофагов с 100 мкМ СК-0944666 в течение 1 ч до введения 100 мкг/мл моликсана или 100 мкг/мл глутоксима вызывает практически полное подавление обеих фаз Ca^{2+} -ответов, индуцированных этими агентами. В среднем (по данным 7 экспериментов для каждого из препаратов) подавление мобилизации Ca^{2+} из депо составило $88,9 \pm 5,2\%$ и $86,7 \pm 5,0\%$, а входа Ca^{2+} - $91,1 \pm 6,7\%$ и $89,3 \pm 6,2\%$ для моликсана и глутоксима соответственно.

Кроме того, впервые показано, что предварительная инкубация макрофагов с 30 мкМ вискостатина в течение 15 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима приводит к существенному подавлению как фазы мобилизации Ca^{2+} из депо (в среднем на 57,6 %), так и фазы входа Ca^{2+} (в среднем на 71,2 %) (рис. 2б). Введение 40 мкМ вискостатина во время уже развившегося входа Ca^{2+} , индуцированного глутоксимом, вызывало существенное подавление (в среднем на 42,3 %) входа Ca^{2+} (рис. 2а). Аналогичные данные получены с применением 100 мкг/мл моликсана.

Таким образом, впервые выявлено участие Arp2/3 комплекса и белков WASP - ключевых регуляторов полимеризации актина – во влиянии глутоксима и моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах. Полученные данные свидетельствуют о том, что элементы актинового цитоскелета являются активными участниками процессов Ca^{2+} -сигнализации в макрофагах. Эти результаты подтверждают более ранние данные о том, что для генерации увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на глутоксим и моликсан необходимы динамичные перестройки актинового цитоскелета (Курилова и др., 2012; Kurilova et al., 2013).

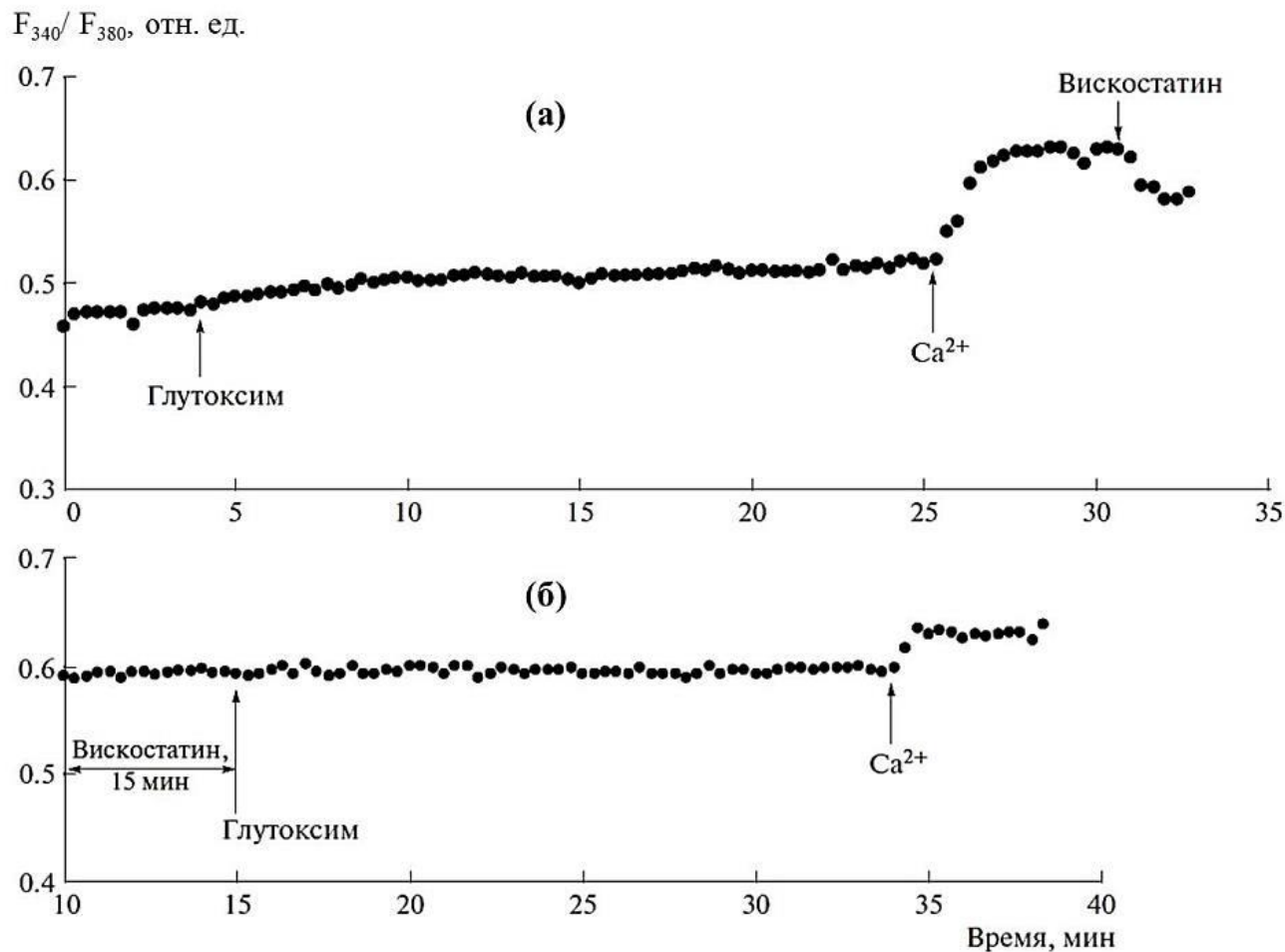


Рисунок 2. Влияние вискостатина на увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое глутоксимом в макрофагах

По вертикали и горизонтали – то же, что на рис. 1.

а – клетки инкубировали с 100 мкг/мл глутоксима в течение 20 мин в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением 2 мМ Ca^{2+} в наружную среду; на фоне развившегося входа Ca^{2+} вводили 40 мкМ вискостатина.

б – клетки предварительно инкубировали в номинально бескальциевой среде с 30 мкМ вискостатина в течение 15 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима, через 20 мин после введения глутоксима вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые показано, что ферменты и продукты каскада метаболизма АК играют важную роль в запуске и регуляции Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксимом и моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы. Так, с использованием структурно-различных ингибиторов ФЛА₂ установлено, что эти ферменты необходимы для формирования обеих фаз увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, вызываемого глутоксимом и моликсаном. В экспериментах с применением широкого спектра ингибиторов циклооксигеназ, липоксигеназ и цитохром P450-подобных эпоксигеназ впервые показано участие циклооксигеназного, липоксигеназного и эпоксигеназного путей метаболизма АК в действии глутоксима и моликсана на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы. Кроме того, полученные результаты указывают на нежелательность совместного клинического применения лекарственных средств на основе ингибиторов каскада метаболизма АК с препаратами глутоксим и моликсан.

Впервые выявлено также, что во влиянии глутоксима и моликсана на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в макрофагах важную роль играют актин-связывающие белки, запускающие рост и ветвление актиновых филаментов. Так, с использованием специфического ингибитора белков WASP вискостатина и специфического ингибитора Arp 2/3-комплекса соединения СК-0944666 показано участие этих белков в формировании Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксимом и моликсаном в макрофагах.

На основании результатов, полученных в настоящей работе и ранее, а также данных литературы можно предположить следующую модель участия каскада метаболизма АК и элементов актинового цитоскелета во влиянии иммуномодуляторов на основе GSSG на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы (рис. 3).

Вероятно, воздействие глутоксима или моликсана приводит к трансактивации рецепторов, связанных с гетеротримерными G-белками, и рецепторных тирозинкиназ в плазматической мембране макрофагов. При этом происходит запуск фосфоинозитидного пути передачи сигналов и мобилизация Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо. Сигнал об опустошении депо передаётся Ca^{2+} -каналам в плазмалемме по депо-зависимому механизму, что приводит к входу Ca^{2+} в клетки. Кроме того, при действии глутоксима и моликсана в макрофагах, вероятно, происходит запуск каскада метаболизма АК: активация фосфолипаз A₂ и продукция большого количества АК, а также активация циклооксигеназ, липоксигеназ и эпоксигеназ, которые окисляют АК с образованием широкого спектра эйкозаноидов.

Эйкозаноиды, в свою очередь, выступают в роли посредников в действии глутоксима и моликсана на $[Ca^{2+}]_i$. Так, эти соединения могут непосредственно модулировать активность ионных каналов, участвующих в процессах Ca^{2+} -сигналикации, запускаемых глутоксिमом или моликсаном. Кроме того, участие циклооксигеназного и липоксигеназного путей может быть опосредовано влиянием на элементы актинового цитоскелета (актин-связывающие белки WASP и комплексы белков Arp2/3) и на перестройки актиновых филаментов. Интактные, способные к реорганизации актиновые филаменты, в свою очередь, необходимы для генерации Ca^{2+} -ответов, индуцируемых глутоксिमом и моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы. Реорганизация кортикального слоя актина, по-видимому, необходима для передачи сигнала от рецепторов плазмалеммы к внутриклеточным Ca^{2+} -депо и развития мобилизации Ca^{2+} из депо. Кроме того, актиновые филаменты участвуют в активации депо-зависимого входа Ca^{2+} , согласно модели «связывания по типу секреции» (secretion-like coupling model) (Rosado, Sage, 2000; Курилова и др., 2006, 2007).

Ферменты и продукты эпоксигеназного пути метаболизма АК также играют важную роль в действии глутоксима и моликсана на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах. Однако механизмы участия эпоксигеназного пути окисления АК мало изучены. Существуют данные о том, что эпоксигеназы или их продукты активируют депо-зависимые Ca^{2+} -каналы, выступая в качестве факторов входа Ca^{2+} , или участвуют в активации фосфатидилинозитолкиназ и малых G-белков суперсемейства Ras, которые также играют важную роль в перестройках актиновых филаментов (Muthalif et al., 1998; Chen et al., 2001; Wang et al., 2005).

Таким образом, в настоящей работе выявлены новые участники сигнального каскада, запускаемого глутоксिमом и моликсаном и приводящего к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы: каскад метаболизма АК и элементы актинового цитоскелета - актин-связывающие белки WASP и комплекс белков Arp2/3. Однако тонкие биофизические механизмы участия этих систем в действии глутоксима и моликсана на макрофаги остаются предметом для дальнейших исследований.

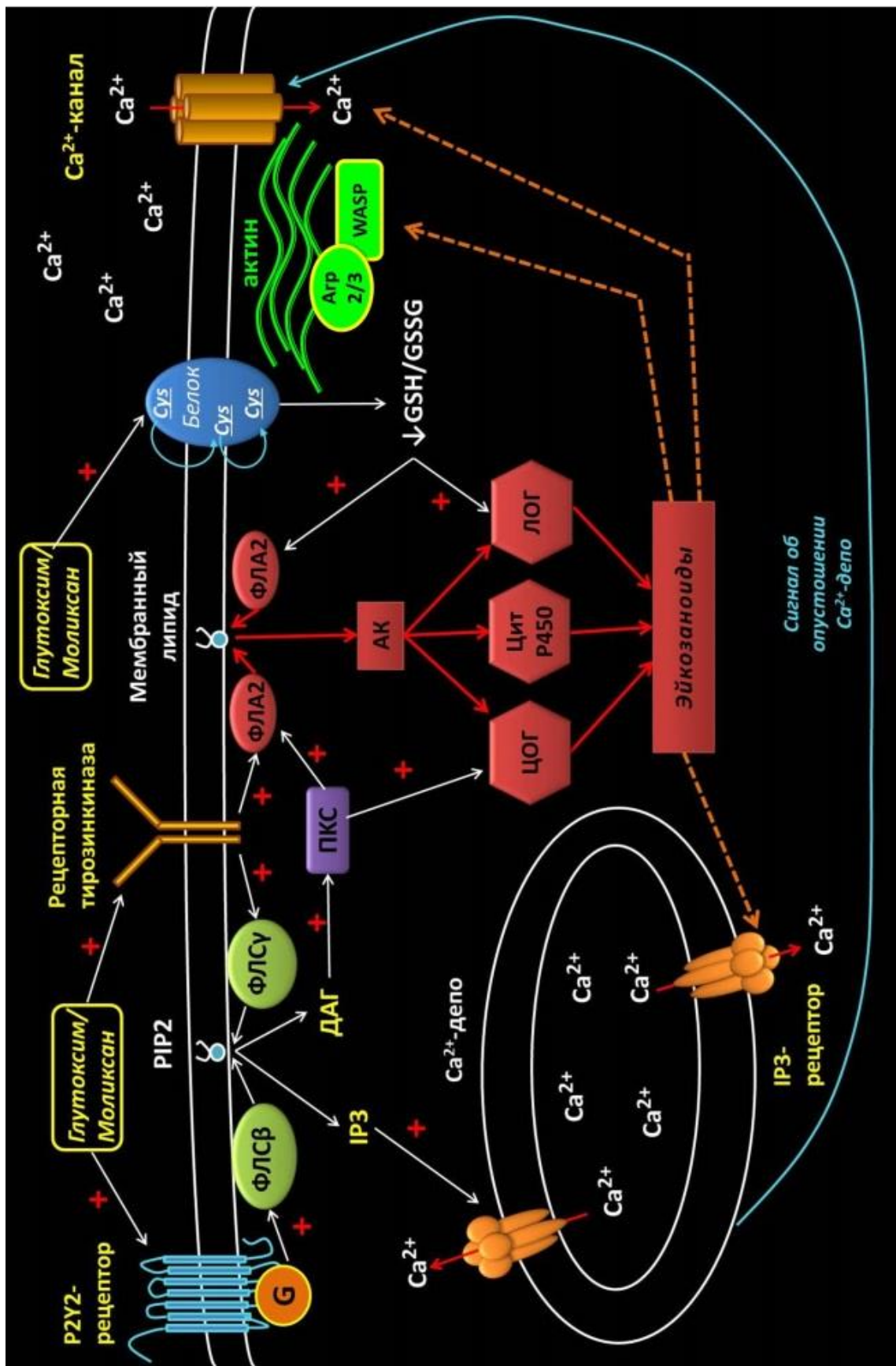


Рисунок 3 (см. на стр. 19)

Рисунок 3. Возможные механизмы влияния глутоксима и моликсана на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах: участие каскада метаболизма арахидоновой кислоты и актинового цитоскелета

Глутоксим и моликсан вызывают трансактивацию рецепторной тирозинкиназы или пуриnergического рецептора P2Y₂-типа, связанного с гетеротримерным G-белком (G), что приводит к запуску фосфоинозитидного пути передачи сигнала с участием фосфолипазы C_γ (ФЛС_γ) или β (ФЛС_β). ФЛС расщепляют фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат (PIP₂) на два вторичных посредника: инозитол-1,4,5-трифосфат (IP₃) и диацилглицерол (ДАГ). IP₃ активирует IP₃-рецепторы, в результате чего происходит выход Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо. Сигнал об опустошении Ca^{2+} депо передаётся депо-зависимым Ca^{2+} -каналам в плазмалемме, и происходит депо-зависимый вход Ca^{2+} в клетку.

ДАГ активирует протеинкиназу C (ПКС), которая, в свою очередь, вызывает активацию фосфолипаз A₂ (ФЛА₂) и циклооксигеназ (ЦОГ). Кроме того, глутоксим и моликсан могут запускать тиол-дисульфидный обмен между остатками цистеина (Cys) в трансмембранных белках, что приводит к снижению соотношения концентраций восстановленного и окисленного глутатиона (GSH/GSSG) и слабому окислительному стрессу. Изменение редокс-статуса в цитозоле также может активировать ферменты каскада метаболизма арахидоновой кислоты.

ФЛА₂ высвобождает арахидоновую кислоту (АК) из мембранных липидов. Далее АК окисляется с участием циклооксигеназ (ЦОГ), липоксигеназ (ЛОГ) и цитохром P450-подобных эпоксигеназ (Цит P450) с образованием различных эйкозаноидов. Продукты метаболизма АК регулируют как мобилизацию Ca^{2+} из депо, так и последующий депо-зависимый вход Ca^{2+} , вызываемые глутоксимом и моликсаном в макрофагах. Так, эйкозаноиды могут непосредственно влиять на активность IP₃-рецепторов и депо-зависимых Ca^{2+} -каналов или регулировать перестройки актинового цитоскелета с участием белков WASP и Arp 2/3-комплекса. Динамичная реорганизация микрофиламентов необходима для формирования обеих фаз Ca^{2+} -ответов, индуцируемых препаратами глутоксим и моликсан.

ВЫВОДЫ

1. Ингибиторы фосфолипаз A_2 (4-бромфенацилбромид, дексаметазон и преднизолон) практически полностью подавляют мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо и последующий депо-зависимый вход Ca^{2+} , индуцируемые глутоксимом или моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы.

2. Структурно различные ингибиторы циклооксигеназ (индометацин, ацетилсалициловая кислота), липоксигеназ (нордигидрогуаретиковая кислота, каффеиновая кислота, zileuton, байкалейн) и эпоксигеназ (эконазол, проадифен) подавляют обе фазы Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксимом или моликсаном. Введение этих фармакологических агентов на фоне развившегося депо-зависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого глутоксимом или моликсаном, приводит к подавлению входа Ca^{2+} в макрофаги.

3. Ингибиторы Arg 2/3-комплекса (соединение СК-0944666) и белков WASP (вискостатин) практически полностью подавляют Ca^{2+} -ответы, индуцируемые глутоксимом и моликсаном, что позволяет предположить участие процесса сборки актиновых филаментов в действии глутоксима и моликсана на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах.

4. Полученные данные свидетельствуют о том, что в сигнальном каскаде, запускаемом глутоксимом и моликсаном и приводящем к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в макрофагах, участвуют важнейшие пути окисления арахидоновой кислоты (циклооксигеназный, липоксигеназный, эпоксигеназный), а также элементы актинового цитоскелета (белки WASP и Arg 2/3-комплекс).

5. Результаты также указывают на нежелательность совместного клинического применения глутоксима и моликсана с медицинскими препаратами на основе ингибиторов каскада метаболизма арахидоновой кислоты.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИСЕРТАЦИИ

Монографии:

1. Krutetskaya Z.I., Milenina L.S., Melnitskaya A.V., **Naumova A.A.**, Antonov V.G. Redox modulation of Ca^{2+} and Na^{+} transport in nonexcitable cells// St. Petersburg State Polytechnical University Publishing House. – 2014. – 171 p.

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Курилова Л.С., Крутецкая З.И., **Наумова А.А.**, Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Влияние ингибиторов циклооксигеназ и липоксигеназ на Ca^{2+} -ответы, вызываемые глутоксимом и моликсаном в макрофагах// Цитология. - 2014. - Т. 56. - № 5. - С. 353 – 360.

2. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., **Наумова А.А.**, Крутецкая Н.И., Бутов С.Н., Антонов В.Г. Arp2/3 комплекс участвует в действии глутоксима и моликсана на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах// Биофизика. - 2014. - Т.59. - Вып. 5. - С. 907 – 912 (Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., **Naumova A.A.**, Krutetskaya N.I., Butov S.N., Antonov V.G. Arp2/3 complex is involved in the effect of glutoxim and molixan on intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages// Biophysics. - 2014. - V. 59. - № 5. - P. 736 - 740).

3. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., **Наумова А.А.**, Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Влияние ингибиторов эпоксигеназ на Ca^{2+} -ответы, вызываемые глутоксимом и моликсаном, в макрофагах// Цитология. - 2015. - Т. 57. - № 7. - С. 518 – 525.

4. Крутецкая З.И., Миленина Л.С., **Наумова А.А.**, Бутов С.Н., Ноздрачёв А.Д. Участие комплекса Arp2/3 и белков WASP в действии глутоксима и моликсана на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах// Доклады Академии наук. - 2015. - Т. 464. - № 2. - С. 227 – 230 (Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., **Naumova A.A.**, Krutetskaya N.I., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Involvement of the Arp2/3 complex and WASP proteins in the effect of glutoxim and molixan on intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages// Doklady Biochemistry and Biophysics. - 2015. - V. 464. - P. 279 - 282).

5. Крутецкая З.И., Миленина Л.С., **Наумова А.А.**, Антонов В.Г., Ноздрачёв А.Д. Ингибиторы фосфолипазы A_2 модулируют влияние глутоксима и моликсана на внутриклеточный уровень Ca^{2+} в макрофагах// Доклады Академии наук. - 2015. -Т. 465. - № 2. - С. 249 – 251 (Krutetskaya Z.I., Milenina L.S., **Naumova A.A.**, Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Phospholipase A_2 inhibitors modulate the effects of glutoxim and molixan on the intracellular Ca^{2+} level in macrophages// Doklady Biochemistry and Biophysics. - 2015. - V. 465. - P. 374 - 376).

6. Крутецкая З.И., Миленина Л.С., **Наумова А.А.**, Антонов В.Г., Ноздрачёв А.Д. Ингибитор 5-липоксигеназ зилеутон подавляет Ca^{2+} -ответы, индуцируемые в макрофагах глутоксимом и моликсаном// Доклады Академии наук. - 2016. - Т. 469. - № 5. - С. 635 – 637 (Krutetskaya Z.I., Milenina L.S., **Naumova A.A.**, Antonov V.G., Nozdrachev A.D. 5-Lipoxygenase inhibitor zileuton inhibits

Ca²⁺-responses induced by glutoxim and molixan in macrophages// Doklady Biochemistry and Biophysics. - 2016. - V. 469. - P. 302 - 304).

Статьи в сборниках материалов конференций:

1. Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Krutetskaya N.I., Antonov V.G., Lastochkin V.V., Vojtcehovitch K.O., **Naumova A.A.** Arachidonic acid metabolism inhibitors modulate the effect of drug molixan on intracellular Ca²⁺ concentration in macrophages// In: «Biological Motility: Fundamental and Applied Science», Pushchino. - 2012. - P. 101 – 104.

2. Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., **Naumova A.A.**, Krutetskaya N.I., Butov S.N., Antonov V.G. The involvement of Arp 2/3 complex in glutoxim and molixan effect on intracellular Ca²⁺ concentration in macrophages// In: «Biological Motility: new facts and hypotheses», Pushchino. - 2014. - P. 149 – 152.

3. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., **Наумова А.А.**, Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Глюкокортикоиды модулируют эффект глутоксима и моликсана на внутриклеточную концентрацию Ca²⁺ в макрофагах// В сб. статей Международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация». - 2015. - Т.1. - С. 184 – 188.

4. Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., **Naumova A.A.**, Krutetskaya N.I., Butov S.N., Antonov V.G. Antiasthmatic agent zileuton modulates glutoxim and molixan effect on intracellular Ca²⁺ concentration in macrophages// In: «Biological Motility», Pushchino. - 2016. - P. 158 – 161.

Тезисы в сборниках материалов конференций:

1. Курилова Л.С., Крутецкая З.И., **Наумова А.А.**, Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Ингибитор 12-липоксигеназы модулирует влияние моликсана на внутриклеточную концентрацию Ca²⁺ в макрофагах// Цитология (сб. научных трудов Всероссийского симпозиума и школы-конференции для молодых учёных по биологии клетки в культуре). - 2013. - Т. 55. - № 9. - С. 642 – 643.

2. **Naumova A.A.**, Krutetskaya Z.I., Milenina L.S., Krutetskaya N.I., Butov S.N., Antonov V.G. The involvement of actin-binding proteins in glutoxim and molixan effect on intracellular Ca²⁺ concentration in macrophages// FEBS J. – 2015. - V. 282 (suppl. 1). - P. 116 – 117.

3. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., **Наумова А.А.**, Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Участие фосфолипазы А₂ во влиянии глутоксима на внутриклеточную концентрацию Ca²⁺ в макрофагах// Цитология (сб. научных трудов II Всероссийской конференции «Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет», Санкт-Петербург). - 2015. - Т. 57. - № 9. - С. 643.

В заключение хочу выразить глубокую благодарность своему научному руководителю, профессору **Зое Иринарховне Крутецкой** за руководство и неоценимую помощь на всех этапах выполнения диссертации, а также всестороннюю поддержку моей научной деятельности.

Хочу выразить особую благодарность доценту кафедры биофизики **Лидии Сергеевне Милениной** за помощь в проведении экспериментов, поддержку и ценные советы при написании диссертации.

Хотелось бы также поблагодарить сотрудников кафедры биофизики инженера **Нину Иринарховну Крутецкую** и старшего преподавателя **Сергея Николаевича Бутова** за помощь в техническом обеспечении научной работы, а также весь коллектив кафедры биофизики - за приятное и плодотворное сотрудничество.