ДОКЛАДЫ АКАДЕМИИ НАУК, 2009, том 428, № 2, с. 272–274

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 576.32/.36

РОЛЬ КЛЮЧЕВЫХ ФЕРМЕНТОВ ФОСФОИНОЗИТИДНОГО ПУТИ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА В ДЕЙСТВИИ ОКИСЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА И ПРЕПАРАТА ГЛУТОКСИМ НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ Ca^{2+} В МАКРОФАГАХ

© 2009 г. З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, Л. С. Курилова, В. Г. Антонов, академик А. Д. Ноздрачёв

Поступило 08.12.2008 г.

В настоящее время значительно повысился интерес к функционированию окислительно-восстановительных систем клеток и влиянию окислителей и восстановителей на различные клеточные процессы в норме и при патологии. Так, фармакологический аналог окисленного глутатиона (GSSG) препарат глутоксим® ("ФАРМА-ВАМ", Москва) рассматривается как иммуномодулятор широкого спектра действия, который стимулирует процессы кроветворения, активирует системы фагоцитоза, в том числе в условиях иммунодефицитных состояний, способствует функциональной дееспособности тканевых макрофагов [1]. В то же время механизмы, опосредующие действие GSSG и глутоксима на клетки, до сих пор практически не изучены.

Ранее нами было показано, что GSSG и глутоксим увеличивают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+}, $[Ca^{2+}]_i$, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргинчувствительных Ca^{2+}-депо и последующий вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы [2–4]. Кроме того, с использованием двух структурно различных ингибиторов тирозинкиназ (генистейн, метил-2,5-дигидроксициннамат) и ингибитора тирозинфосфатаз ортованадата Na нами впервые выявлено участие тирозинкиназ и тирозинфосфатаз в действии GSSG и глутоксима на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах [3–5]. Полученные данные позволяют предположить участие как рецепторных, так и цитоплазматических тирозинкиназ в сигнальном каскаде, запускаемом GSSG и глутоксимом. Кроме того, с использованием двух структурно различных ингибиторов фосфатидилинозитолкиназ вертманнина и соединения LY294002 нами впервые показано участие фосфатидилинозитол-3- и фосфатидилинозитол-4-киназ в действии GSSG и глутоксима на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах крысы [6].

Санкт-Петербургский государственный университет

В перитонеальных макрофагах идентифицированы рецепторы с собственной тирозинкиназной активностью, содержащие в экстраклеточных доменах участки богатые цистеином [7], которые могут являться мишенями для GSSG и глутоксима. Активация этих рецепторных тирозинкиназ может приводить в действие белки, содержащие SH2-домены, такие как фосфолипаза Cγ, цитоплазматические тирозинкиназы семейства src и фосфатидилинозитол-3-киназа, и запускать сигнальные каскады, например фосфоинозитидный путь передачи сигнала [7, 8]. Известно, что важнейшие компоненты фосфоинозитидной системы фосфолипаза С и протеинкиназа С имеют высокую редокс-чувствительность и их активность модулируется окисляющими и восстанавливающими агентами [9, 10]. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать также возможную роль ключевых ферментов фосфоинозитидного пути передачи сигнала фосфолипазы С и протеинкиназы С в регуляторном действии GSSG и глутоксима на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах.

Для выявления участия фосфолипазы С в действии GSSG и глутоксима на $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы мы исследовали влияние ингибитора фосфолипазы С неомицина [11] на Ca^{2+}-ответ, вызываемый GSSG или глутоксимом. Для исследования роли протеинкиназы С в действии GSSG и глутоксима использованы специфические ингибиторы протеинкиназы С – соединение H-7 [12] и кальфостин С [13]. Подробно процедура культивирования макрофагов и автоматизированная установка для регистрации $[Ca^{2+}]_i$ с использованием флуоресцентного зонда Fura-2AM описаны ранее [14]. Эксперименты проводили при комнатной температуре 20–22°С на 2–3 сут культивирования клеток. На рисунках представлены результаты, полученные для глутоксима (100 мкг/мл). Аналогичные данные были получены при использовании GSSG (100 мкг/мл).

Показано, что инкубация макрофагов в течение 20 мин с 100 мкг/мл глутоксима вызывает су-

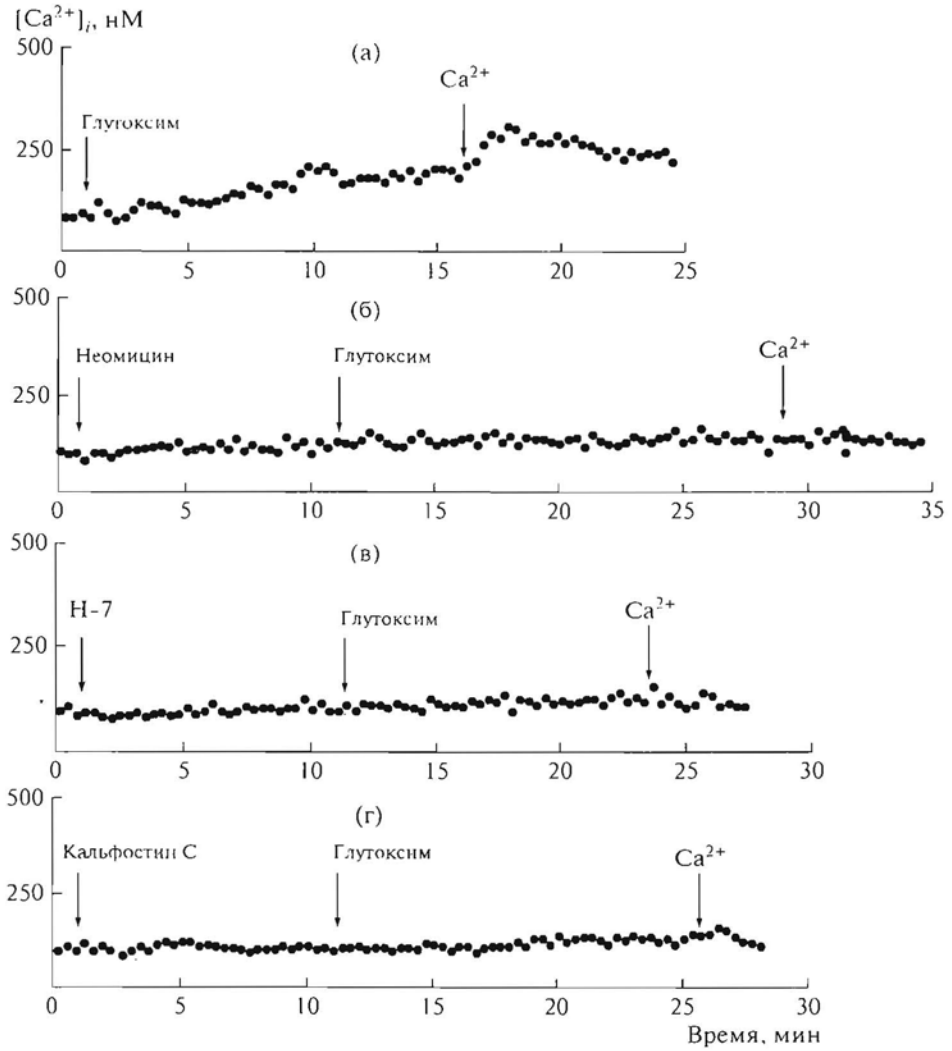

Рис. 1. Влияние неомицина, соединения H-7 и кальфостина С на эффект глутоксима на $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах. Каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант для 3–7 экспериментов. а–г – см. в тексте.

щественное 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+}, обусловленный, по-видимому, опустошением Ca^{2+}-депо (рис. 1а). Предварительная инкубация клеток с 50 мкМ неомицина в течение 10 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима практически полностью предотвращает повышение $[Ca^{2+}]_i$ и вход Ca^{2+}, вызываемые глутоксимом (рис. 1б). Предварительная инкубация макрофагов с 100 мкМ соединения H-7 в течение 10 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима также приводит к практически полному подавлению увеличения $[Ca^{2+}]_i$, вызываемого глутоксимом, и предотвращает вход Ca^{2+} из наружной среды (рис. 1в). Сходные результаты получены с использованием другого ингибитора протеинкиназы С кальфостина С в концентрации 1 мкМ (рис. 1г).

Таким образом, нами впервые показано участие ключевых ферментов фосфоинозитидного пути передачи сигнала фосфолипазы С и протеинкиназы С в регуляторном действии GSSG и глутоксима на $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крысы.

На основании результатов, полученных в настоящей работе и ранее [2–6], можно предположить, что GSSG и глутоксим трансактивируют рецепторы с собственной тирозинкиназной активностью и запускают комплексный сигнальный каскад, включающий тирозинкиназы, тирозинфосфатазы, фосфатидилинозитолкиназы, а также важнейшие ферменты фосфоинозитидной

системы фосфолипазу С и протеинкиназу С, что приводит к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах.

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. *Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е. и др.* // Цитология. 2008. Т. 50. № 5. С. 452–461.
4. *Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E. et al.* // Cell and Tissue Biol. 2008. V. 2. P. 322–332.
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. *Correll P.H., Morrison A.C., Lutz M.A.* // J. Leukoc. Biol. 2004. V. 75. P. 731–737.
8. *Lutz M.A., Correll P.H.* // J. Leukoc. Biol. 2003. V. 73. P. 802–814.
9. *Gopalakrishna R., Jaken S.* // Free Rad. Biol. Med. 2000. V. 28. P. 1349–1361.
10. *Mangat R., Singal T., Dhalla N.S. et al.* // Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2006. V. 291. P. 854–860.
11. *Lipsky J.J., Lietman P.S.* // J. Pharmacol. and Exp. Ther. 1982. V. 220. P. 287–292.
12. *Kawamoto S., Hidaka H.* // Biochem. and Biophys. Res. Communs. 1984. V. 125. P. 258–264.
13. *Kobayashi E., Nakano H., Morimoto M. et al.* // Biochem. and Biophys. Res. Communs. 1989. V. 159. P. 548–553.
14. *Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Тюшев В.Е. и др.* // Цитология. 1997. Т. 39. № 2/3. С. 164–176.