

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 576.32/36

ВОЗМОЖНОЕ УЧАСТИЕ ИОНОВ КАЛЬЦИЯ В РЕГУЛЯТОРНОМ ДЕЙСТВИИ ОКИСЛЕННОГО ГЛУТАТИОНА НА МАКРОФАГИ

© 2007 г. З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, Л. С. Курилова,
В. Г. Антонов, А. Е. Антушевич, академик А. Д. Ноздрачев

Поступило 21.04.2006 г.

Окисленный глутатион (GSSG) – низкомолекулярный тиол, выявляемый во всех типах клеток и внеклеточном пространстве. Содержание GSSG в клетках и вне их невелико и жестко регулируется относительно сопряженного с ним соединения – восстановленного глутатиона (GSH), составляя 10^{-4} – 10^{-5} М против 10^{-2} – 10^{-1} М GSH [1]. Роль GSSG в физиологических процессах рассматривается преимущественно в аспекте клеточных реакций GSH. Повышение содержания GSSG в клетках при различных нарушениях клеточных функций явилось поводом рассматривать его как биологически агрессивную молекулу [2]. Однако работы, выполненные в ряде лабораторий по изучению влияния на клетки GSSG в концентрациях, близких или превышающих те, которые определяются вне клеток, показали способность GSSG оказывать рецепторопосредованное воздействие на клеточные процессы [3–5]. Кроме того, синтетический аналог GSSG – фармакологический препарат глутоксим® – нашел клиническое применение как иммуномодулятор и гемостимулятор в комплексной терапии бактериальных и вирусных заболеваний [6], псориаза [7, 8], лучевой и химиотерапии в онкологии [9].

В то же время роль универсального вторичного посредника, ионов Ca^{2+} , в реализации регуляторного действия GSSG на клетки практически не исследована. В связи с этим целью настоящей работы являлось изучение влияния окисленного глутатиона и его синтетического аналога препарата глутоксим® на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) и Ca^{2+} -сигналы, индуцированные пуринергическим агонистом АТФ и ингибитором эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином, в нативных резидентных перитонеальных макрофагах крысы. Подробно процедура культивирования макрофагов, а также авто-

матизированная установка для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ с использованием флуоресцентного зонда Fura-2AM описаны ранее [10]. Эксперименты проводили при комнатной температуре 20–22°C на 2–3-и сутки культивирования клеток.

В исследованиях использовали два экспериментальных подхода. В первом исследовали действие фармакологических агентов на Ca^{2+} -ответ, вызываемый АТФ или тапсигаргином в макрофагах, находящихся в нормальном физиологическом растворе. Агенты вводили либо до действия агонистов, либо после, во время фазы плато Ca^{2+} -сигнала, отражающей вход Ca^{2+} из наружной среды. Во втором варианте опытов для выявления и усиления входа Ca^{2+} в клетки использовали следующую схему эксперимента. Макрофаги инкубировали в номинально бескальциевой среде (0 mM Ca^{2+} , 1 mM ЭГТА), затем на них действовали одним из агонистов, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо. После добавления в наружную среду 2 mM Ca^{2+} и восстановления физиологического градиента концентрации Ca^{2+} наблюдали быстрое повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее вход Ca^{2+} в клетку. Изучали влияние фармакологических агентов, добавленных до введения агонистов, до введения Ca^{2+} или во время развивающегося входа Ca^{2+} из наружной среды. Глутоксим® и GSSG вводили в среду инкубации макрофагов в концентрациях 10, 100, 200, 300, 400, 500, 600 мкг/мл.

Добавление к перитонеальным макрофагам АТФ или тапсигаргина в нормальном физиологическом растворе вызывает двухфазный Ca^{2+} -сигнал: достаточно быстрый пик, связанный с мобилизацией Ca^{2+} из депо, и длительную фазу, отражающую вход Ca^{2+} из наружной среды [10, 11]. В ответ на введение 200 мкМ АТФ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ увеличивается от базального уровня 75 ± 18 нМ до пика 910 ± 105 нМ. Далее следует медленно убывающая фаза плато, во время которой $[\text{Ca}^{2+}]_i$ составляет в среднем 460 ± 115 нМ через 4 мин после до-

Санкт-Петербургский государственный
университет

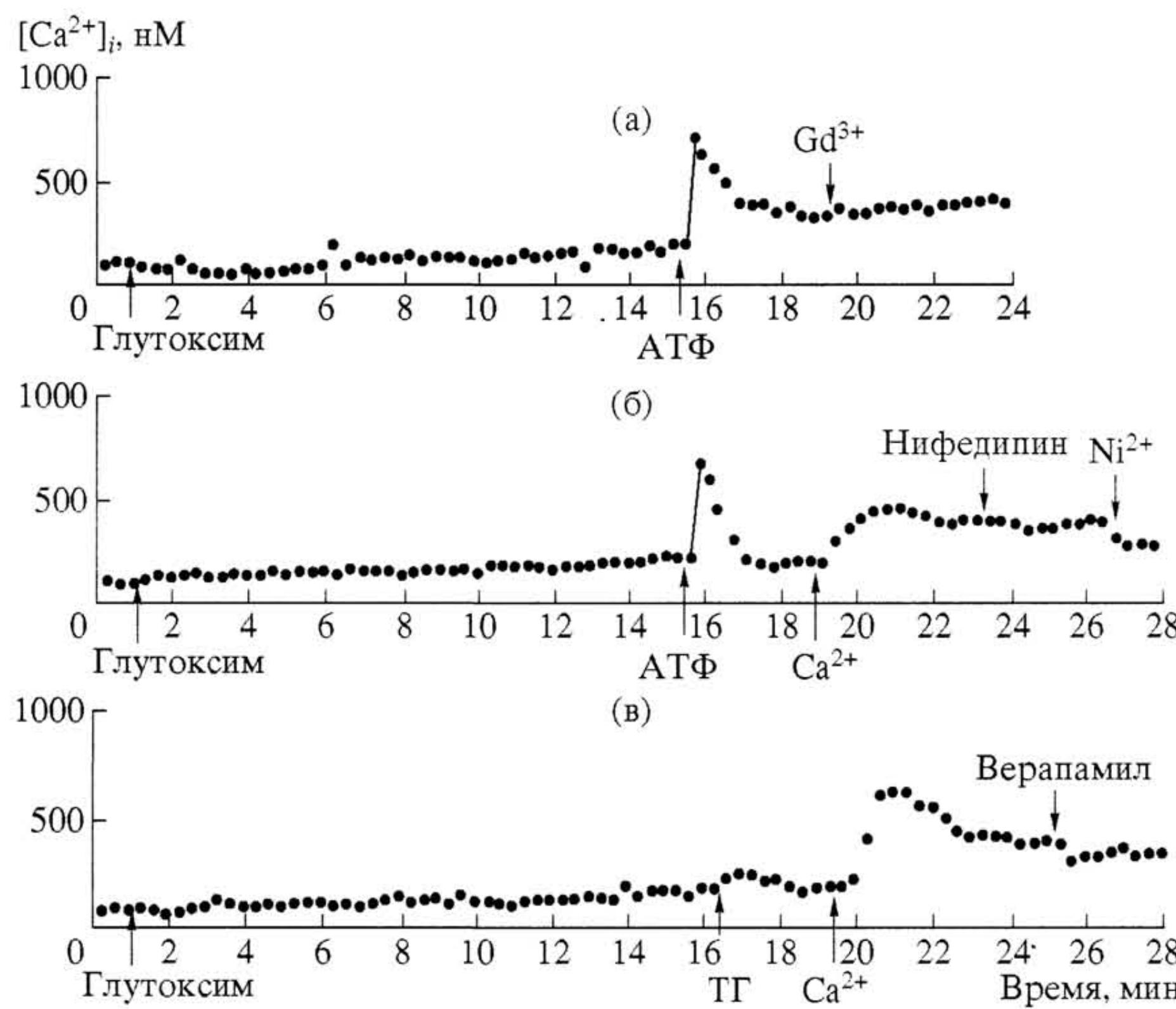


Рис. 1. Влияние глутоксима на $[Ca^{2+}]_i$ в покое и Ca^{2+} -сигналы, вызванные АТФ (а, б) и тапсигаргином (ТГ) (в), в макрофагах. Здесь и далее каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант для 3–7 экспериментов. а–в – см. в тексте.

бавления АТФ. При приложении 0.5 мкМ тапсигаргина $[Ca^{2+}]_i$ увеличивается до 450 ± 90 нМ.

На рис. 1 представлено влияние глутоксима (100 мкг/мл) на $[Ca^{2+}]_i$ в покое и Ca^{2+} -сигналы, индуцированные 200 мкМ АТФ (а, б) и 0.5 мкМ тапсигаргина (в) в макрофагах, находящихся в нормальном физиологическом растворе (а) или в номинально бескальциевой среде (б, в). Из рис. 1а видно, что предынкубация клеток с глутоксимом в среде, содержащей Ca^{2+} , в течение 15 мин до введения АТФ приводит к некоторому повышению базального уровня Ca^{2+} и уменьшению (на 20–30 %) фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызванной АТФ. Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ после введения глутоксима может быть связано как с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо, так и с входом Ca^{2+} из наружной среды. Для выяснения механизма повышения $[Ca^{2+}]_i$ были проведены эксперименты с использованием номинально бескальциевой среды (рис. 1б, в). Обнаружено, что и в этих условиях глутоксим вызывает повышение $[Ca^{2+}]_i$ и последующее уменьшение (на 20–30%) фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызванной АТФ (рис. 1б) или тапсигаргином (рис. 1в). Это свидетельствует о том, что повышение $[Ca^{2+}]_i$ при воздействии глутоксима связано с мобилизацией Ca^{2+} из внутри-

клеточных Ca^{2+} -депо. Аналогичные данные были получены при использовании GSSG (рис. 2).

Следует специально отметить, что мы не обнаружили дозо-зависимости эффекта глутоксима или GSSG на $[Ca^{2+}]_i$. Исследованные концентрации агентов оказывали практически одинаковое влияние на $[Ca^{2+}]_i$ в покое и Ca^{2+} -сигналы, индуцированные АТФ и тапсигаргином, в макрофагах. Однако, более длительная (в течение 30 мин) инкубация клеток с глутоксимом или GSSG вызывала более выраженное увеличение $[Ca^{2+}]_i$.

Еще одним подтверждением того, что повышение $[Ca^{2+}]_i$ при действии глутоксима или GSSG связано с мобилизацией Ca^{2+} из депо, являются данные, представленные на рис. 3. После предынкубации клеток в течение 15 мин с Глутоксимом (рис. 3а) или с GSSG (рис. 3б) при добавлении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдался вход Ca^{2+} , связанный, по-видимому, с опустошением внутриклеточных Ca^{2+} депо. После опустошения Ca^{2+} -депо при действии 0.5 мкМ тапсигаргина глутоксим не вызывал увеличения $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 3в), что свидетельствует о том, что глутоксим или GSSG вызывают мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргинчувствительных Ca^{2+} -депо.

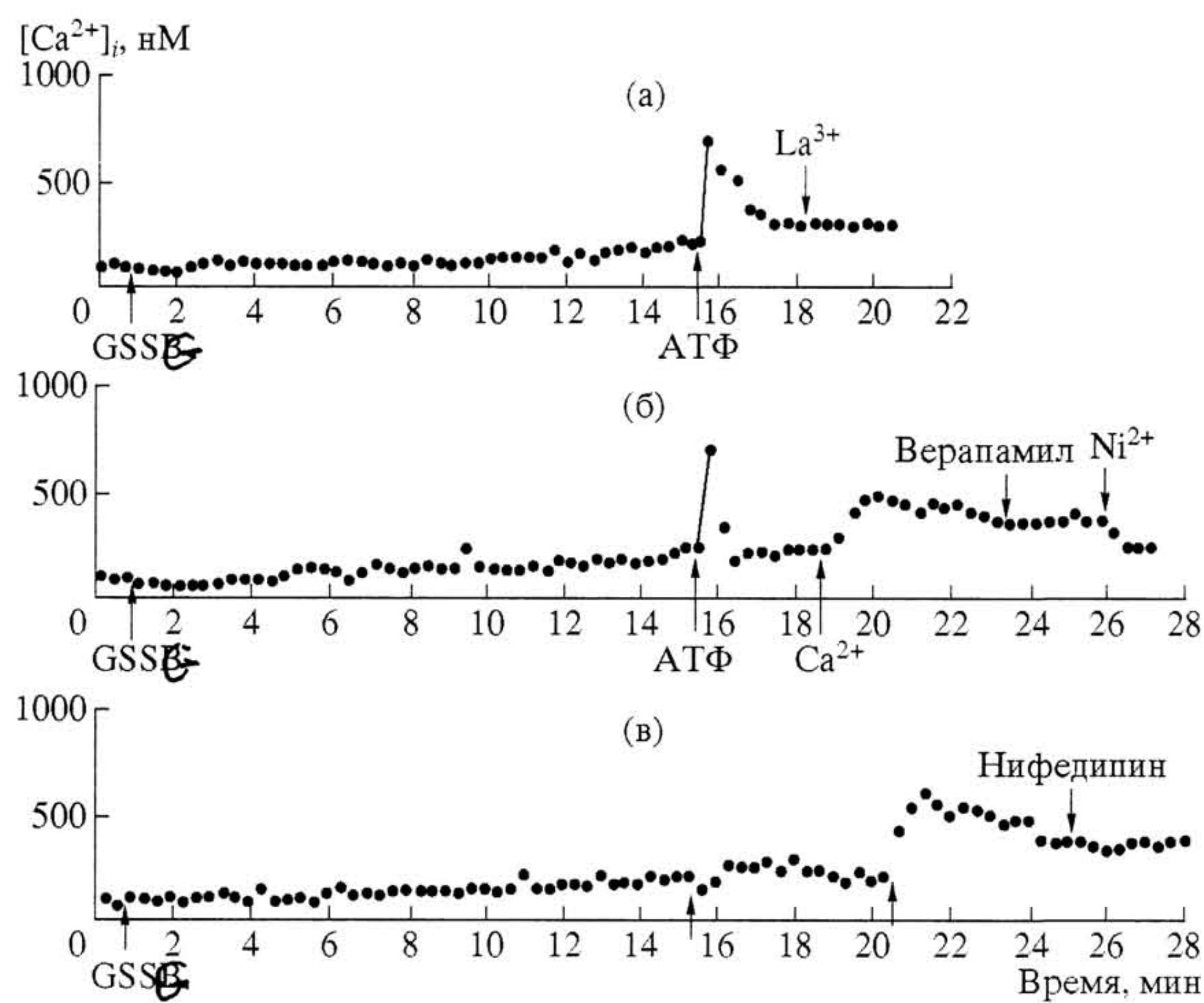


Рис. 2. Влияние окисленного глутатиона (GSSG) на $[Ca^{2+}]_i$ в покое и Ca^{2+} -сигналы, вызванные АТФ (а, б) и тапсигаргином (в), в перитонеальных макрофагах.

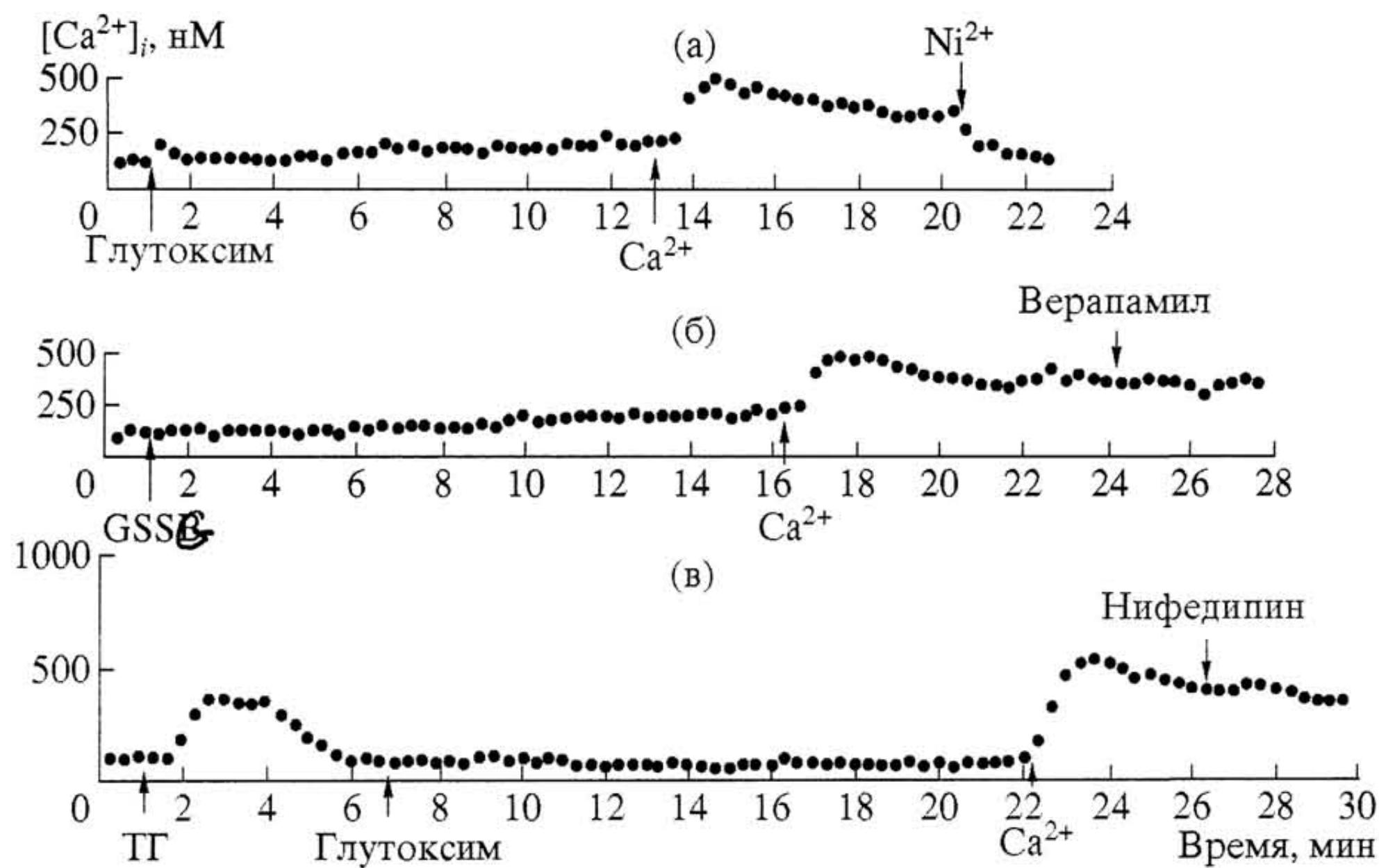


Рис. 3. Влияние глутоксина и GSSG на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах а–в – см. в тексте.

Ранее нами были выявлены фармакологические характеристики депозависимого входа Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы [12, 13]. Показано, что депозависимый вход Ca^{2+} , вызванный опустошением Ca^{2+} -депо при действии 0.5 мкМ

тапсигаргина или 200 мкМ УТФ, блокируется следующими фармакологическими агентами: двумя структурно различными ингибиторами потенциалзависимых Ca^{2+} -каналов – 20 мкМ нифедипина или 40 мкМ верапамила; ионами Ni^{2+} (1 мМ),

La^{3+} (1 мМ), Gd^{3+} (10 мкМ); блокатором неселективных катионных каналов нифлумовой кислотой (100 мкМ).

Представляло интерес исследовать влияние классических органических (нифедипин, верапамил) и неорганических (Ni^{2+} , La^{3+} , Gd^{3+}) блокаторов Ca^{2+} -каналов на вход Ca^{2+} , индуцированный АТФ или тапсигаргином, после обработки клеток глутоксимом или GSSG. Полученные нами данные позволяют предположить, что исследованные агенты изменяют фармакологические характеристики каналов входа Ca^{2+} в макрофагах. Каналы становятся менее чувствительными к блокирующему действию Ca^{2+} -антагонистов нифедипина и верапамила, а также к действию неорганических блокаторов La^{3+} и Gd^{3+} . Эффективным блокатором оказались только ионы Ni^{2+} . Нифедипин и верапамил были неэффективны даже в концентрации 80 мкМ. При этом во многих случаях после введения нифедипина наблюдалось некоторое парадоксальное усиление входа Ca^{2+} .

Полученные результаты демонстрируют влияние экстраклеточного окисленного глутатиона и препарата глутоксим® на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в перитонеальных макрофагах. Однако механизм подобного действия, а также физиологическая значимость выявленного эффекта при действии GSSG требуют дальнейшего изучения. Кроме того, представляется перспективным всестороннее исследование роли Ca^{2+} для объяснения фармакологической эффективности препарата глутоксим®.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meister A. // J. Biol. Chem. 1988. V. 263. P. 17205–17208.
2. Кулинский В.И., Колесниченко Л.С. // Успехи соврем. биологии. 1990. Т. 110. С. 20–33.
3. Бурова Е.Б., Василенко К.П., Антонов В.Г., Никольский Н.Н. // ДАН. 2005. Т. 404. № 1. С. 122–124.
4. Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M. R. et al. // Biochem. Pharmacol. 2002. V. 64. P. 1057–1064.
5. Filomeni G., Aquilano K., Civitareale P. et al. // Free Rad. Biol. Med. 2005. V. 39. P. 345–354.
6. Жуков О.Б., Зубарев А.Р., Мезенцева М.В. и др. // Врачеб. сословие. 2004. № 5/6. С. 51–56.
7. Корсунская И.М., Резникова М.М., Путинцев А.Ю. и др. // Лечащий врач. 2003. № 4. С. 78–79.
8. Чермошенцев А.А. // Рос. журн. кож. и венер. болезней. 2003. № 1. С. 38–41.
9. Филатова Е.И., Былинская Е.Н., Алаберг С.Д. и др. В кн.: Материалы III Съезда онкологов и радиологов СНГ. Минск, 2004. С. 354.
10. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Тюшев В.Е. и др. // Цитология. 1997. Т. 39. С. 164–176.
11. Alonso-Torre S.R., Trautmann A. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 18640–18647.
12. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И. и др. // Цитология. 1997. Т. 39. С. 1131–1141.
13. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И. // Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 2000. Т. 86. С. 1030–1048.