

Известно, что ключевые Na^+ -транспортирующие белки (ENaC, Na^+ - K^+ -АТФазы и Na^+ / H^+ -обменники) содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенями для внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей. Однако добавление блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, вызывало полное подавление транспорта Na^+ . Это указывает на то, что эффект глутоксима на транспорт Na^+ обусловлен, в основном, модуляцией активности ENaC.

Таким образом, впервые показано, что блокатор липоксигеназ нордигидрогуаретиковая кислота подавляет стимулирующее действие глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. Полученные данные свидетельствуют об участии липоксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты в регуляции глутоксимумом транспорта Na^+ в коже лягушки.

Список литературы / References:

1. Наточин Ю.В. *Основы физиологии почки*. Л.: Наука, 1982, 184 с. [Natochin Yu.V. *Osnovy fiziologii pochki*. Leningrad: Nauka, 1982, 184 p. (In Russ.)]
2. Boldyrev A.A., Bulygina E.R. Na/K-ATPase and oxidative stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1997, vol. 834, pp. 666–668.
3. Firsov D., Robert-Nicoud M., Gruender S., Schild L., Rossier B.C. Mutational analysis of cysteine-rich domain of the epithelium sodium channel (ENaC): Identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, pp. 2743-2749.
4. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Мельницкая А.В., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д. Влияние дисульфид-содержащих соединений на транспорт Na^+ в коже лягушки. *ДАН*, 2008, т. 421, № 5, с. 709-712. [Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Effect of disulfide containing compounds on Na^+ transport in frog skin. *Dokl. Akad. Nauk*, 2008, vol. 421, no. 5, pp. 709-712. (In Russ.)]
5. Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Курилова Л.С. *Механизмы внутриклеточной сигнализации*. СПб.: Изд. СПбГУ, 2003, 208 с. [Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Kurilova L.S. *Mechanisms of intracellular signaling*. SPb.: SPbU., 2003, 208 p. (In Russ.)]
6. Ordway R.W., Singer J.J., Walsh J.V.Jr. Direct regulation of ion channels by fatty acids. *Trends Neurosci.*, 1991, vol. 14, pp. 96-100.
7. Крутецкая З.И., Мельницкая А.В., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д. Ингибиторы циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты подавляют стимулирующее действие глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. *ДАН*, 2013, т. 451, № 2, с. 236-238. [Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Inhibitors of the cyclooxygenase oxidation pathway of arachidonic acid suppress the stimulating effect of glutoxim on Na^+ transport in frog skin. *Dokl. Biol. Sci.*, 2013, vol. 451, no. 1, pp. 193-195. (In Russ.)]
8. Czapski G.A., Czubowicz K., Strosznajder R.P. Evaluation of the antioxidative properties of lipoxygenase inhibitors. *Pharmacol. Rep.*, 2012, vol. 64, pp. 1179-1188.
9. Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Антонов В.Г., Бутов С.Н. Участие тирозинкиназ и фосфатидилинозитолкиназ в действии окисленного глутатиона и глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. *Цитология*, 2010, т. 52, № 4, с. 342-348. [Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Antonov V.G., Butov S.N. Involvement of tyrosine and phosphatidylinositol kinases in oxidized glutathione and glutoxim regulation of Na^+ transport in frog skin. *Cell Tissue Biol.*, 2010, vol. 4, no. 3, pp. 273-279. (In Russ.)]
10. Василенко К.П., Бурова Е.Б., Антонов В.Г., Никольский Н.Н. 2006. Окисленный глутатион вызывает активацию рецептора эпидермального фактора роста и MAP-киназ ERK 1,2. *Цитология*, т. 48, № 6, с. 500-507. [Vasilenko K.P., Burova E.B., Antonov V.G., Nikoliskii, N.N. Oxidized glutathione induces activation of the epidermal growth factor receptor and MAP kinases ERK 1,2. *Tsitologiya*, 2006, vol. 48, no. 6, pp. 500-507. (In Russ.)]

ВЛИЯНИЕ МЕТИЛ- β -ЦИКЛОДЕКСТРИНА НА Ca^{2+} -ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ГЛУТОКСИМОМ В МАКРОФАГАХ

Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г.
Санкт-Петербургский государственный университет
Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ
e-mail: z.krutetskaya@spbu, cozzu@mail.ru

Аннотация. С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM изучено участие липидных микродоменов рафтов в действии иммуномодулятора глутоксима на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в перитонеальных макрофагах крысы. Глутоксим вызывает двухфазный Ca^{2+} -ответ, связанный с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо и последующим депо-зависимым входом Ca^{2+} в макрофаги. Впервые показано, что преинкубация клеток с метил- β -циклодекстрином, вызывающим экстракцию мембранного холестерина и разрушение рафтов, приводит к подавлению обеих фаз Ca^{2+} -ответов, индуцируемых глутоксимумом в перитонеальных макрофагах. Полученные результаты свидетельствуют о том, что интактность рафтов необходима для развития комплексного сигнального каскада, вызываемого глутоксимумом и проводящего к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в макрофагах.

Ключевые слова: перитонеальные макрофаги, глутоксим, липидные рафты.

THE EFFECT OF METHYL- β -CYCLODEXTRIN ON GLUTOXIM-INDUCED Ca^{2+} -RESPONSES IN MACROPHAGES

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

Saint-Petersburg State University

University emb., 7/9, Saint-Petersburg, 199034, Russia

e-mail: z.krutetskaya@spbu.ru, cozzy@mail.ru

Abstract. Using Fura-2AM microfluorimetry the involvement of lipid rafts in the effect of immunomodulator glutoxim on intracellular Ca^{2+} concentration in rat peritoneal macrophages was investigated. Glutoxim induces biphasic Ca^{2+} -response associated with Ca^{2+} release from intracellular Ca^{2+} stores and subsequent store-dependent Ca^{2+} entry in macrophages. We have shown for the first time that cell preincubation with methyl- β -cyclodextrin, inducing cholesterol extraction from membranes and raft disruption, significantly decreases both phases of Ca^{2+} -responses induced by glutoxim in peritoneal macrophages. The results suggest that intact rafts are necessary for signaling cascade triggered by glutoxim and leading to intracellular Ca^{2+} -concentration increase in macrophages.

Key words: peritoneal macrophages, glutoxim, lipid rafts.

Препарат глутоксим® (динатриевая соль окисленного глутатиона с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) относится к группе лекарственных средств тиопозтинов, влияющих на процессы редокс-регуляции в клетках, используется как иммуномодулятор и гемостимулятор в комплексной терапии бактериальных и вирусных заболеваний, псориаза, лучевой и химиотерапии в онкологии [1, 2].

Ранее нами было впервые обнаружено, что глутоксим увеличивает внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргин-чувствительных Ca^{2+} -депо и последующий депо-зависимый вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы [3]. Кроме того, с использованием широкого спектра фармакологических агентов, влияющих на компоненты сигнальных систем в клетке, нами было обнаружено, что глутоксим вызывает в макрофагах комплексный сигнальный каскад, ключевыми участниками которого являются тирозинкиназы и тирозинфосфатазы, фосфатидилинозитолкиназы, ферменты фосфоинозитидного пути передачи сигнала фосфолипаза C и протеинкиназа C, гетеротримерные и малые G-белки, ферменты и/или продукты каскада метаболизма арахидоновой кислоты, а также элементы актинового цитоскелета и микротрубочки и механизм везикулярного транспорта [4].

Известно, что ключевые белки, участвующие в процессах внутриклеточной сигнализации, в том числе Ca^{2+} -сигнализации, локализованы в специализированных липидных микродоменах рафтах. Рафты представляют собой упорядоченные жидкие домены в мембране, обогащенные холестерином и сфинголипидами [5]. В связи с этим целью настоящей работы являлось исследование возможного участия липидных микродоменов рафтов в действии глутоксима на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах.

Одним из основных подходов для выявления роли рафтов в процессах внутриклеточной сигнализации является снижение уровня мембранного холестерина, то есть эксперименты в условиях деструкции рафтов или нарушения их целостности. Обнаружено, что частичная экстракция холестерина приводит к диссоциации большинства мембранных белков, связанных с рафтами [6]. Для экстракции холестерина чаще всего используются циклодекстрины – циклические олигосахариды, состоящие из остатков глюкозы, связанных между собой гликозидными связями. Гидроксильные группы циклодекстринов расположены на наружной поверхности молекулы, в то время как внутренняя полость гидрофобна. Наиболее эффективным и часто используемым акцептором холестерина является метил- β -циклодекстрин. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что инкубация клеток с метил- β -циклодекстрином приводит к экстракции холестерина из модельных и клеточных мембран. Инкубация клеток с высокой концентрацией метил- β -циклодекстрина (5-10 мМ) в течение 1 ч может снижать содержание холестерина на 80-90 %. Так, инкубация ТНР-1 макрофагов с 10 мМ метил- β -циклодекстрина в течение 60 мин приводит к экстракции до 85 % холестерина из рафтов [6, 7].

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс популяции Wistar при комнатной температуре 20-22°C через 1-2 сут после начала культивирования клеток. Подробно процедура культивирования макрофагов и автоматизированная установка для измерения $[Ca^{2+}]_i$ на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B («Leica Microsystems», Германия) описаны ранее [8]. Для измерения $[Ca^{2+}]_i$ использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM («Sigma-Aldrich», США). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм, эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения $[Ca^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича [9]. 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 $[Ca^{2+}]_i$ в клетках в зависимости от времени измерения [10].

В контрольных экспериментах показано, что глутоксим (200 мкг/мл) вызывает двухфазный Ca^{2+} -ответ, связанный с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных депо и последующим депо-зависимым входом Ca^{2+} в макрофаги (см. рис. 1а).

Впервые показано, что преинкубация макрофагов с 10 мМ метил- β -циклодекстрина в течение 1 ч до введения 200 мкг/мл глутоксима вызывает значительное подавление фазы мобилизации Ca^{2+} из депо (в среднем

по данным 7 экспериментов на $89,8 \pm 8,7\%$) и последующего депо-зависимого входа Ca^{2+} (в среднем по данным 7 экспериментов на $67,4 \pm 10,6\%$), индуцируемых глутоксимом (см. рис. 1б).

Таким образом, нами впервые показано, что метил- β -циклодекстрин подавляет обе фазы Ca^{2+} -ответа, индуцируемого глутоксимом в макрофагах. Полученные результаты свидетельствуют о том, что интактность рафтов необходима для развития комплексного сигнального каскада, вызываемого глутоксимом в макрофагах и приводящего к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} .

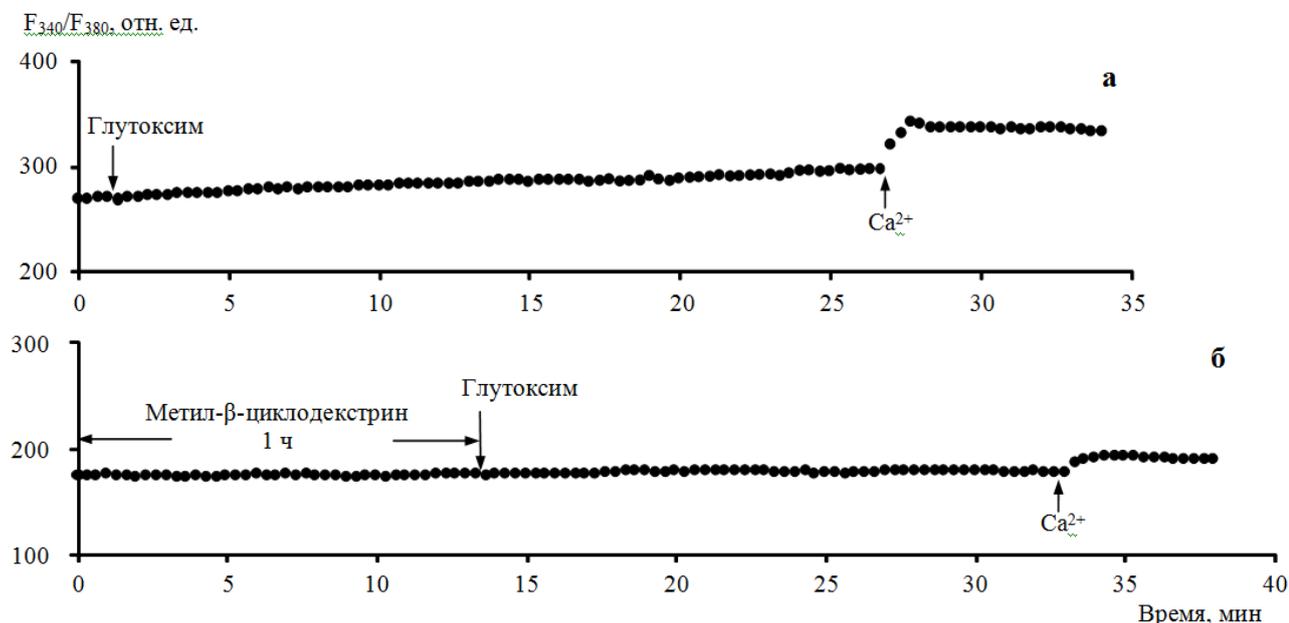


Рисунок 1 – Влияние метил- β -циклодекстрина на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые глутоксимом в макрофагах.

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. а – клетки инкубировали в течение 25 мин в присутствии 200 мкг/мл глутоксима в бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; б – макрофаги преинкубировали в течение 1 ч с 10 мМ метил- β -циклодекстрина в бескальциевой среде, затем добавляли 200 мкг/мл глутоксима, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

Данные о подавлении метил- β -циклодекстрином депо-зависимого входа Ca^{2+} , индуцированного глутоксимом, свидетельствуют об участии рафтов в активации депо-зависимого входа Ca^{2+} в макрофаги. Это согласуется с данными о том, что преинкубация с метил- β -циклодекстрином модулирует активацию депо-зависимого входа Ca^{2+} , индуцированного тапсигаргином в тромбоцитах человека [11], клетках эмбриональной почки человека (линия НЕК293) [12, 13] и клетках слюнной железы человека (линия HSG) [12].

Список литературы / References:

1. 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. Clinical and experimental grounds of the regional and systemic administration of the thiopoein group medicines for cirrhosis of the liver. *First communication. Vestnik hirurgii im. I.I. Grekova*, 2001, pp. 32-38.
2. Еремеев В.В., Гергерт В.Я. Изучение способности препарата Глутоксим влиять на антимикробактериальную активность фагоцитов чувствительных и резистентных к туберкулезу мышей. *Туберкулёз и болезни лёгких*, 2013, т. 7, с. 43-47. [Eremeev V.V., Gergert Y.A. Investigation of the ability of glutoxim to affect the antimycobacterial activity of phagocytes in tuberculosis-susceptible and resistant mice. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2013, vol. 7, pp. 43-47. (In Russ.)]
3. Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Antonov V.G. The effect of oxidized glutathione and its pharmacological analogue glutoxim on intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages. *Cell Tissue Biol.*, 2008, vol. 2, pp. 322-332.
4. 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*. Saint-Petersburg State Polytechnical University Publishing House, 2014, 171 p.
5. Pani B., Singh B.B. Lipid rafts/caveolae as microdomains of calcium signaling. *Cell Calcium*, 2009, vol. 45, pp. 625-633.
6. Zidovetzki R., Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, vol. 1768, pp. 1311-1324.

7. Gaus K., Rodriguez M., Ruberu K.R., Gelissen I., Sloane T.M., Kritharides L., Jessup W. Domain-specific lipid distribution in macrophage plasma membranes. *J. Lipid Res.*, 2005, vol. 46, pp. 1526-1538.
8. 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. [Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. The influence of epoxygenase inhibitors on Ca^{2+} -responses induced by glutoxim and molixan in macrophages. *Tsitologiya*, 2015, vol. 57, pp. 518-525. (In Russ.)]
9. Grynkiwicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, pp. 3440-3450.
10. Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J.A. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, pp. 16559-16566.
11. Dionisio N., Galan C., Jardin I., Salido G.M., Rosado J.A. Lipid rafts are essential for the regulation of SOCE by plasma membrane resident STIM1 in human platelets. *Biochim. Biophys. Acta*, 2011, vol. 1813, pp. 431-437.
12. Pani B., Ong H.L., Liu X., Rauser K., Ambudkar I.S., Singh B.B. Lipid rafts determine clustering of STIM1 in endoplasmic reticulum-plasma membrane junctions and regulation of store-operated Ca^{2+} entry (SOCE). *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283, pp. 17333-17340.
13. Galan C., Woodard G.E., Dionisio N., Salido G.M., Rosado J.A. Lipid rafts modulate the activation but not the maintenance of store-operated Ca^{2+} entry. *Biochim. Biophys. Acta*, 2010, vol. 1803, pp. 1083-1093.

ВЛИЯНИЕ СОСТАВА И СВОЙСТВ ЛИПИДОВ МЕМБРАН НА ИХ ПРОНИЦАЕМОСТЬ ДЛЯ КИСЛОРОДА

Гуськова Р.А., Васильев Н.С., Иванов К.И., Белевич Н.П., Федоров Г.Е., Иванов И.И.
Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова
Ленинские горы, 1, стр. 12, г. Москва, 119234, РФ
e-mail: ivanov36@mail.ru

Аннотация. Кислород – важнейший компонент респираторных газов, занимающий центральное место в аэробной жизни. Однако, механизмы его трансмембранного переноса все ещё изучены недостаточно. Кислород плохо растворяется и в воде, и в липидах мембран (коэффициент распределения $\gamma \sim 1$). Отсюда вытекает, что трансмембранный градиент концентрации кислорода локализуется с двух сторон углеводородной зоны мембран, и этот слой в мембранах является основным барьером, фактически определяющим барьерные свойства мембран для кислорода в целом. Исследование скорости оксигенации эритроцитов методом остановленного потока с двухволновой регистрацией степени окси/дезоксии – перехода с миллисекундным разрешением показало, что коэффициент проницаемости мембран более, чем на два порядка ниже, чем у слоя воды той же толщины. Этот метод сильно осложняют неперемешиваемые слои, появление которых обусловлено необходимостью использования разбавленных суспензий клеток. Другой метод – сканирующий электрохимический микроскоп (СЭХМ) – разработанный и собранный в нашей лаборатории, позволил установить, что сопротивление липидной зоны мембран для диффузии кислорода зависит от состава липидов, плотности их упаковки, количества разветвленных цепей, заряда и объема полярных головок фосфолипидов, а также от присутствия мультивалентных катионов, способных при участии молекул липидов образовывать их димерные и тримерные комплексы в мембранах. Полученные результаты позволяют глубже понять роль липидного компонента мембран в норме, при их адаптации к меняющимся условиям и повреждении токсическими факторами.

Ключевые слова: Трансмембранная диффузия кислорода, мембрана эритроцита, липидные монослои, коэффициент проницаемости для кислорода, СЭХМ.

EFFECT OF LIPID PROPERTIES AND COMPOSITION ON MEMBRANE PERMEABILITY TO DIOXYGEN

Gus'kova R.A., Vasil'ev N.S., Ivanov K.I., Belevich N.P., Fedorov G.E., Ivanov I.I.
Moscow State University, Faculty of Biology
Leninskie gori, 1, building 12, Moscow, 119234, Russia
e-mail: ivanov36@mail.ru

Abstract. Oxygen is the most important respiratory gas playing a central role in aerobic life. However, the mechanisms of its transmembrane flow are not fully understood. Oxygen is poorly dissolved in water and membrane lipids, with partition coefficient $\gamma \sim 1$. Consequently, oxygen transmembrane gradient determines the barrier properties of biological membranes are localized on both sides of the membrane a hydrocarbon zone. Analysis of erythrocyte oxygenation using stop-flow method with dual wavelength detection of oxy-deoxy transition at millisecond resolution showed that membrane permeability to O_2 is more than two orders of magnitude lower than that of water layer of the same thickness. This method of measurement is complicated by the presence of unstirred layers in diluted cell suspensions. Therefore, we developed another method in our laboratory based on scanning electrochemical microscopy