

## Агр2/3-КОМПЛЕКС УЧАСТВУЕТ В ДЕЙСТВИИ ГЛУТОКСИМА И МОЛИКСАНА НА ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ КОНЦЕНТРАЦИЮ $\text{Ca}^{2+}$ В МАКРОФАГАХ

© 2014 г. Л.С. Миленина, З.И. Крутецкая, А.А. Наумова, Н.И. Крутецкая, С.Н. Бутов, В.Г. Антонов

Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

E-mail: coozzy@mail.ru

Поступила в редакцию 09.06.14 г.

Исследовано участие Агр2/3-комплекса, вызывающего ветвление актиновых филаментов, в действии препаратов глутоксим и моликсан на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах. С использованием флуоресцентного  $\text{Ca}^{2+}$ -зонда Fura-2AM впервые показано, что ингибитор Агр2/3-комплекса – соединение СК-0944666 – практически полностью предотвращает увеличение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцируемое глутоксигом или моликсаном в макрофагах. Полученные данные свидетельствуют об участии Агр2/3-комплекса в действии глутоксига и моликсана на процессы  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации в макрофагах.

**Ключевые слова:**  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализация, глутоксим, моликсан, Агр2/3-комплекс, актиновые филаменты.

В настоящее время разработано и введено в клиническую практику значительное число дисульфидсодержащих препаратов, изменяющих редокс-состояние и оказывающих физиологически значимый эффект на клетки. Так, синтетический аналог окисленного глутатиона (GSSG) фармакологический препарат глутоксим® (динатриевая соль 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]. Другой препарат – моликсан («ФАРМА ВАМ», Москва), комплекс глутоксига и нуклеозида инозина, имеет противовирусный, иммуномодулирующий и гепатопротекторный эффекты; применяется в терапии острого и вирусного гепатита В и С, микст-гепатита и цирроза печени [1]. Глутоксим и моликсан относятся к группе лекарственных средств тиопоэтинов, влияющих на процессы редокс-регуляции в клетках. Однако механизмы клеточного и молекулярного действия этих препаратов далеки от полного понимания.

Ранее нами было впервые обнаружено, что глутоксим и моликсан увеличивают внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ), вызывая мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из тапсигаргин-чувствитель-

ных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо и последующий вход  $\text{Ca}^{2+}$  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 глутоксигом и приводящего к увеличению  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в макрофагах, являются тирозинкиназы и тирозинфосфатазы [3,5], фосфатидилинозитолкиназы [6], важнейшие ферменты фосфоинозитидной системы передачи сигнала – фосфолипаза С и протеинкиназа С [7]. Выявлено также участие элементов актинового цитоскелета [8] и микротрубочек [9] в действии глутоксига или моликсана на  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в макрофагах.

Кроме того, обнаружено, что глутоксим или моликсан сами вызывают реорганизацию актинового цитоскелета в макрофагах: кортикальный слой становится более широким и «рыхлым» и появляются скопления актина в цитозоле [8]. Показано также участие G-белков малой молекулярной массы суперсемейства Ras и процессов везикулярного транспорта в действии глутоксига и моликсана на  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в макрофагах [10,11].

Одним из ключевых участников процесса формирования устойчивых филаментов из мономеров G-актина является комплекс Агр2/3 (Actin-Related Proteins), состоящий из семи эволюционно-консервативных белков. Агр2/3 стабилизирует интермедиаты, состоящие из двух

Сокращения: GSSG – окисленный глутатион,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  – внутриклеточная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ , ФЭУ – фотозелектронный умножитель.

мономеров актина, стимулируя ветвление фильтров Агр2/3-комплекса представляет собой фактор, усиливающий нуклеацию нитей актина. Комплекс Агр2/3 состоит из двух субъединиц – Агр2 и Агр3, имеющих близкое структурное сходство с мономерами актина, а также пяти дополнительных субъединиц [12]. После сборки комплекс направляется к точкам полимеризации новых актиновых филаментов, связывается с существующим филаментом и выстраивается так же, как актин располагается в димере. Таким образом, комплекс Агр2/3 служит ключевым элементом для формирования новых филаментов, которые вытягиваются под углом 70° к уже существующим филаментам и образуют плотную сеть F-актина [12].

Агр2/3-комплекс участвует в различных клеточных процессах, требующих реорганизации актиновых филаментов, таких как перестройка кортикального актина, формирование филлоподий, регуляция формы и транспорта эндосом, процессы эндо- и экзоцитоза [13]. Комплекс Агр2/3 активируется при активации рецепторов с собственной тирозинкиназной активностью, рецепторов, связанных с G-белками, а также рецепторов интегринов. В макрофагах Агр2/3-комплекс участвует в процессах миграции и хемотаксиса [14].

В связи с этим, для дальнейшего исследования участия актиновых филаментов и актингвязывающих белков, а также процессов везикулярного транспорта и экзоцитоза в сигнальном каскаде, запускаемом глутоксигом и моликсаном, представлялось целесообразным исследовать возможное участие Агр2/3-комплекса в действии глутоксига и моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах.

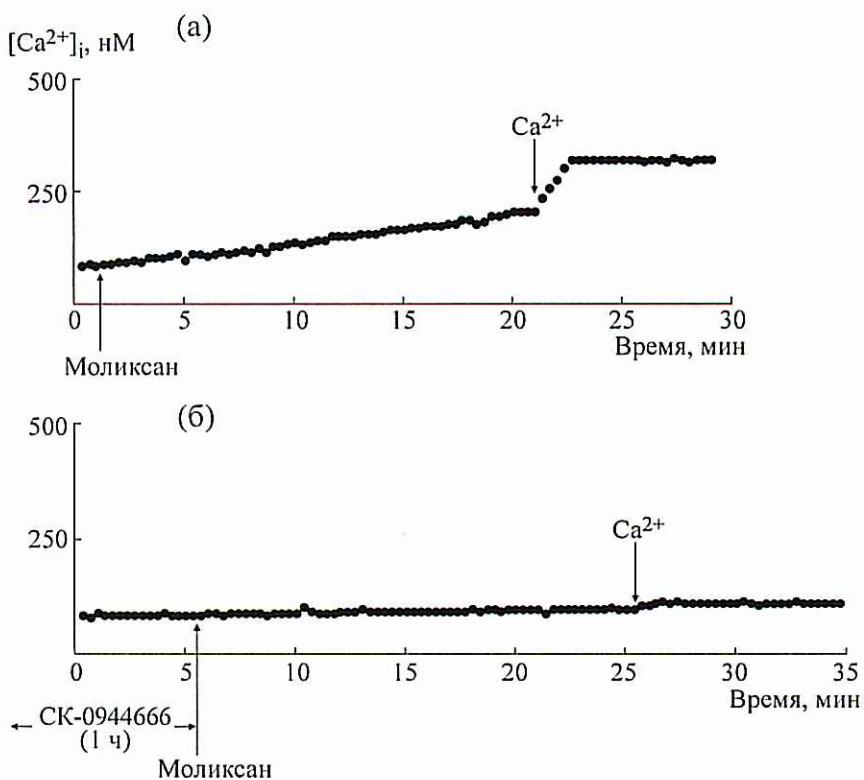
## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Клетки.** Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar. Резидентные макрофаги выделяли из перитонеальной полости крыс массой 180–250 г. Сразу после выделения клетки имели сферическую форму и диаметр 10–20 мкм. Суспензию клеток помещали в бак-печатки, содержащие кварцевые стекла размером 10 × 10 мм. Клетки на стеклах культивировали в течение 1–3 сут при 37°C в среде 199 (рН 7,2), содержащей 20% сыворотки крови быка, глутамин (3%), пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (100 мг/мл). Тест на  $\alpha$ -нафтил-эстеразу показал, что по меньшей мере 96% клеток в монослоях были макрофагами. Эксперименты проводили при комнатной темпера-

туре 22–24°C через 1–2 сут после начала культивирования клеток. Кварцевые стекла с клетками помещали в экспериментальную камеру, заполненную физиологическим раствором следующего ионного состава (мМ): 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 5 HEPES-NaOH, pH 7,3–7,4. Бескальциевая среда отличалась тем, что содержала 1 мМ ЭГТА и не содержала CaCl<sub>2</sub>. Подробно процедура культивирования макрофагов описана ранее [8].

**Использованные реагенты.** Для выявления участия Агр2/3-комплекса в действии глутоксига и моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах использовали новый эффективный низкомолекулярный ингибитор комплекса Агр2/3 – соединение СК-0944666 [15,16]. Маточный раствор глутоксига (50 мг/мл) и моликсана (50 мг/мл) (ФАРМА-ВАМ, Москва) готовили на воде, маточный раствор соединения СК-0944666 (100 мМ) (Sigma-Aldrich, США) – в диметилсульфоксиде.

Для измерения  $[Ca^{2+}]_i$  использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Макрофаги инкубировали в течение 45 мин в физиологическом растворе, содержащем 2 мкМ Fura-2AM, при комнатной температуре. Стекла с окрашенными клетками отмывали физиологическим раствором и переносили в экспериментальную камеру, расположенную на столике флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Для возбуждения флуоресценции Fura-2AM использовали осветитель микроскопа Leica DM 4000B, источником света в котором является ксеноновая лампа мощностью 75 Вт. Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм через объектив микроскопа. Для выделения соответствующих участков спектра использовали узкополосный оптический фильтр. Эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм при помощи фотоэлектронного умножителя (ФЭУ 85), встроенного в оптическую систему микроскопа. Сигнал с ФЭУ усиливали специально сконструированным усилителем. Для оцифровки сигнала с ФЭУ и управления функциями микроскопа использовали специализированный микроконтроллер на базе микропроцессора ATMEGA 168, подключенного к компьютеру через USB-интерфейс. Для управления экспериментом использовали оригинальное программное обеспечение. В экспериментах применяли объектив 10× с апертурой 8 мм. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения  $[Ca^{2+}]_i$  рассчитывали по уравнению Гринкевича [17]. Статистический анализ проводили с примене-



**Рис. 1.** Влияние соединения СК-0944666 на эффект моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах. (а) – Клетки инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл моликсана в номинально бескальциевой среде, после чего вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ ; (б) – клетки предварительно инкубировали в течение 1 ч с 100 мкМ СК-0944666 в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл моликсана, через 20 мин вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ . Здесь и на рис. 2 каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант из шести–семи независимых экспериментов.

нием  $t$ -критерия Стьюдента. Данные представлены в виде  $x \pm s_x$ . На рисунках приведены результаты типичных экспериментов.

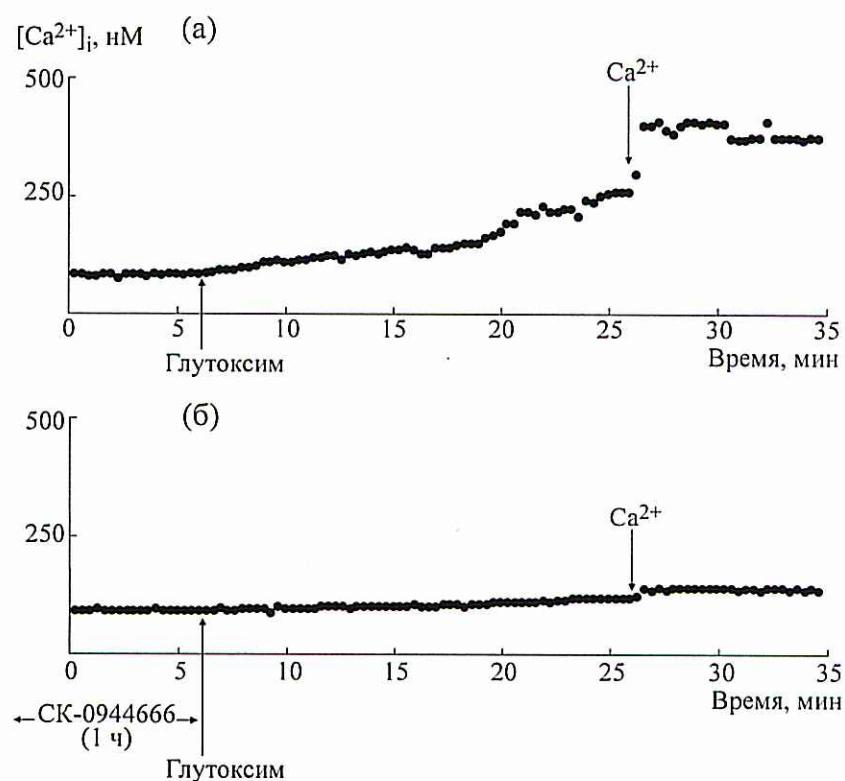
Для выявления и усиления входа  $Ca^{2+}$  в клетки использовали классическую схему эксперимента ( $Ca^{2+}$ -free/ $Ca^{2+}$ -reintroduction protocol). Макрофаги инкубировали в номинально бескальциевой среде, затем на них действовали глутоксимом или моликсаном, вызывая мобилизацию  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. После добавления в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$  и восстановления физиологического градиента концентрации  $Ca^{2+}$  наблюдали быстрое повышение  $[Ca^{2+}]_i$ , отражающее вход  $Ca^{2+}$  в клетку. Ингибитор Агр2/3-комплекса добавляли за 1 ч до введения глутоксима или моликсана.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольных экспериментах показано, что инкубация макрофагов в течение 20 мин с 100 мкг/мл моликсана (рис. 1а) или 100 мкг/мл глутоксима (рис. 2а) в номинально бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее уве-

личение  $[Ca^{2+}]_i$ , отражающее мобилизацию  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных  $Ca^{2+}$ -депо. В среднем (по данным шести экспериментов для каждого из препаратов) через 20 мин после добавления агентов  $[Ca^{2+}]_i$  увеличивается от базального уровня  $82 \pm 17$  нМ до  $205 \pm 18$  нМ для моликсана и  $249 \pm 20$  нМ для глутоксима. При введении в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$  наблюдается дальнейшее повышение  $[Ca^{2+}]_i$ , отражающее вход  $Ca^{2+}$  в цитозоль (рис. 1а, 2а). В среднем (по данным шести экспериментов для каждого из агентов) увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  во время фазы входа  $Ca^{2+}$  составляет  $315 \pm 20$  нМ и  $393 \pm 18$  нМ для моликсана и глутоксима соответственно.

Впервые обнаружено, что предварительная инкубация макрофагов со 100 мкМ СК-0944666 в течение 1 ч до введения 100 мкг/мл моликсана (рис. 1б) или 100 мкг/мл глутоксима (рис. 2б) вызывает практически полное подавление обеих фаз  $Ca^{2+}$ -ответов, индуцированных этими агентами. В среднем (по данным семи экспериментов для каждого из препаратов) подавление



**Рис. 2.** Влияние соединения СК-0944666 на эффект глутоксина на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах. (а) – Клетки инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксина в номинально бескальциевой среде, после чего вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ ; (б) – клетки предварительно инкубировали в течение 1 ч с 100 мкМ СК-0944666 в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксина, через 20 мин вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ .

мобилизации  $Ca^{2+}$  из депо составляет  $88,9 \pm 5,2\%$  и  $86,7 \pm 5,0\%$ , а входа  $Ca^{2+}$  –  $91,1 \pm 6,7\%$  и  $89,3 \pm 6,2\%$  для моликсана и глутоксина соответственно.

Таким образом, нами впервые выявлено участие Arp2/3-комплекса, одного из ключевых регуляторов полимеризации актина, в действии глутоксина и моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах. Это свидетельствует о том, что Arp2/3-комплекс и актиновый цитоскелет являются активными участниками процессов  $Ca^{2+}$ -сигнализации в макрофагах. Результаты согласуются с данными, полученными на других иммунных клетках. Так, обнаружено, что в Т-лимфоцитах при активации Т-клеточного рецептора запускается сигнальный каскад, приводящий к увеличению  $[Ca^{2+}]_i$ . В этом каскаде задействованы Arp2/3-комплекс и актиновый цитоскелет [18,19].

Результаты настоящей работы согласуются с нашими данными об участии актинового цитоскелета в действии глутоксина и моликсана на  $[Ca^{2+}]_i$  и данными о том, что глутоксин и моликсан сами вызывают реорганизацию акти-

нового цитоскелета в макрофагах [8]. В нативных макрофагах элементы актинового цитоскелета локализованы под плазматической мембраной и образуют четко различимый кортикальный слой, а в клетках, обработанных глутоксином или моликсаном, кортикальный слой становится более широким и «рыхлым» и появляются скопления актина в цитозоле [8]. Таким образом, реорганизация актинового цитоскелета при действии глутоксина и моликсана, по-видимому, является необходимым условием для проведения сигнала от плазмалеммы к внутриклеточным  $Ca^{2+}$ -депо и развития мобилизации  $Ca^{2+}$  из депо. Arp2/3-комплекс, как известно, играет важную роль в формировании ветвящейся сети актиновых филаментов [12]. Следовательно, можно предположить, что при действии глутоксина и моликсана Arp2/3-комплекс активно участвует в реорганизации актинового цитоскелета в макрофагах. В свою очередь, ингибирование Arp2/3-комплекса при действии соединения СК-0944666 делает невозможным ветвление микрофиламентов и предотвращает  $Ca^{2+}$ -ответы, индуцируемые глутоксином и моликсаном в макрофагах. Это свидетельствует о

том, что формирование разветвленной сети микрофиламентов необходимо для развития сигнального каскада, запускаемого глутоксигом и моликсаном в макрофагах и приводящего к увеличению внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ .

Результаты о подавлении соединением СК-094466б входа  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцируемого глутоксигом и моликсаном в макрофагах, согласуются с нашими данными об участии элементов цитоскелета в регуляции входа  $\text{Ca}^{2+}$ , вызываемого глутоксигом или моликсаном [8], а также пуринергическими агонистами АТФ и УТФ и ингибиторами эндоплазматических  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз тапсигаргином и циклопьязониковой кислотой в перитонеальных макрофагах крысы [20]. Вызванный глутоксигом или моликсаном вход  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку происходит по депо-зависимому механизму [3]. Ранее [20] в опытах с использованием АТФ, УТФ, тапсигаргина и циклопьязониковой кислоты нами было показано, что депо-зависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в перитонеальные макрофаги крысы происходит согласно модели депо-зависимого входа «связывание по типу секреции», предполагающей обратимую транслокацию  $\text{Ca}^{2+}$ -депо к плазмалемме, происходящую с участием актиновых филаментов [21]. Таким образом, полученные в настоящей работе данные об участии Агр2/3-комплекса в регуляции депо-зависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированного глутоксигом или моликсаном, подтверждают модель депо-зависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  «связывание по типу секреции» для перитонеальных макрофагов крысы.

Результаты о подавлении соединением СК-094466б депо-зависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированного глутоксигом или моликсаном, коррелируют также с данными, полученными на Т-клетках. Так, в Т-лимфоцитах с дефектным белком WAVE2, активирующим Агр2/3-комплекс, наблюдается подавление депо-зависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ , активируемого тапсигаргином [22].

Кроме того, результаты этой и более ранних работ [2–11] свидетельствуют о том, что в действии моликсана и глутоксига на  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в макрофагах участвуют те же сигнальные белки и их комплексы, что и в процессе экзоцитоза: тирозинкиназы, G-белки малой молекулярной массы, механизм везикулярного транспорта; актиновый и тубулиновый цитоскелет, а также Агр2/3-комплекс, опосредующий перестройки актинового цитоскелета. Реорганизация актинового цитоскелета, происходящая в макрофа-

гах при действии глутоксига и моликсана, может также опосредовать активацию макрофагов и облегчать процессы эндо- и экзоцитоза.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта СПбГУ № 1.0.127.2010.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. E. Borisov, L. A. Kozhemyakin, A. E. Antushevich, et al., *Vestnich hirurgii im. I.I. Grekova*. 4, 32 (2001).
2. З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, Л. С. Курилова и др., *Докл. РАН* 412 (5), 700 (2007).
3. L. S. Kurilova, Z. I. Krutetskaya, O. E. Lebedev, et al., *Cell Tissue Biol.* 2, 322 (2008).
4. З. И. Крутецкая, Л. С. Курилова, О. Е. Лебедев и др., *Цитология* 53 (9), 708 (2011).
5. З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, Л. С. Курилова и др., *Докл. РАН* 417 (2), 273 (2007).
6. З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, Л. С. Курилова и др., *Докл. РАН* 422 (4), 562 (2008).
7. З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев, Л. С. Курилова и др., *Докл. РАН* 428 (2), 272 (2009).
8. Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев и др., *Цитология* 54 (2), 135 (2012).
9. З. И. Крутецкая, Л. С. Курилова, В. Г. Антонов и др., *Докл. РАН* 451 (3), 344 (2013).
10. Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая и А. А. Наумова, в сб. *IV Международной научно-практической конференции молодых ученых* (Челябинск, 2013), сс. 141–143.
11. Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев и др., в сб. «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пущино, 2013), т. 1, сс. 213–217.
12. S. N. Duleh and M. D. Welch, *Cytoskeleton* 67, 193 (2010).
13. I. Rouiller, X. P. Xu, K. J. Amann, et al., *J. Cell Biol.* 180, 887 (2008).
14. G. E. Jones, *J. Leukocyte Biol.* 68, 593 () .
15. B. J. Nolen, N. Tomasevic, A. Russel, et al., *Nature* 460, 1031 (2009).
16. A. W. Baggett, Z. Cournia, M. S. Han, et al., *Chem. Med. Chem.* 7, 1286 (2012).
17. G. Grynkiewicz, M. Poenie, and R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* 260, 3440 (1985).
18. S. Kumari, S. Curado, V. Mayya, et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 546 (2014).
19. N. Joseph, B. Reicher, and M. Barda-Saad, *Biochim. Biophys. Acta* 1838, 557 (2014).
20. Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая и О. Е. Лебедев, *Цитология* 48 (10), 867 (2006).
21. J. A. Rosado and S. O. Sage, *J. Physiol.* 526 (2), 221 (2000).
22. J. C. Nolz, T. S. Gomez, P. Zhu, et al., *Current Biol.* 16, 24 (2006).

## Arp2/3 Complex is Involved in the Effect of Glutoxim and Molixan on Intracellular $\text{Ca}^{2+}$ Concentration in Macrophages

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

*St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia*

The involvement of Arp2/3 complex, which causes actin filament branching, in the effect of drugs glutoxim and molixan was investigated. Using Fura-2AM microfluorimetry it was shown for the first time that Arp2/3 complex inhibitor CK-0944666 almost completely prevents the increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, induced by glutoxim or molixan in macrophages. The data suggest the involvement of Arp2/3 complex in the glutoxim and molixan effect on the  $\text{Ca}^{2+}$  signalling processes in macrophages.

*Key words:*  $\text{Ca}^{2+}$  signalization, glutoxim, molixan, Arp2/3 complex, actin filaments