

ВЛИЯНИЕ 2-АМИНОЭТОКСИДИФЕНИЛ-БОРАТА НА ДЕПОЗАВИСИМЫЙ ВХОД Ca^{2+} В ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГАХ

© 2019 г. Л. С. Миленина¹, *, З. И. Крутецкая¹, **, В. Г. Антонов², Н. И. Крутецкая¹

¹Кафедра биофизики Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, 199034 Россия

²Кафедра клинической биохимии и лабораторной диагностики Военно-Медицинской академии им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, 194044 Россия

*E-mail: cozzu@mail.ru

**E-mail: z.krutetskaya@spbu.ru

Поступила в редакцию 07.06.2019 г.

После доработки 17.07.2019 г.

Принята к публикации 19.07.2019 г.

Депозависимый вход Ca^{2+} является универсальным механизмом регулируемого входа Ca^{2+} в клетки эукариот. Для выяснения фармакологических характеристик депозависимого входа Ca^{2+} , исследовали влияние 2-аминоэтоксидифенил-бората (2-АРВ) на депозависимый вход Ca^{2+} в перитонеальных макрофагах крысы, вызываемый ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопязоникой кислотой, а также дисульфидсодержащими иммуномодуляторами глутоксимом и моликсаном. С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM впервые показано, что в перитонеальных макрофагах крысы, как и в клетках других типов, 2-АРВ оказывает дозозависимое модулирующее влияние на депозависимый вход Ca^{2+} . В концентрации 25 мкМ 2-АРВ вызывает потенциацию входа Ca^{2+} , в то время как в концентрациях 50 и 100 мкМ эффективно подавляет депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги. Кроме того, полученные данные дополнительно подтверждают, что вход Ca^{2+} , индуцируемый глутоксимом или моликсаном, происходит по депозависимому механизму.

Ключевые слова: 2-аминоэтоксидифенил-борат, перитонеальные макрофаги, депозависимый вход Ca^{2+}

DOI: 10.1134/S0041377119110063

Депозависимый или “емкостной” вход Ca^{2+} , впервые описанный Джеймсом Патни более тридцати лет назад, является повсеместным механизмом регулируемого входа Ca^{2+} в клетки эукариот, активируемым при опустошении внутриклеточных Ca^{2+} -депо (Putney, 1990, 2017). Депозависимый вход Ca^{2+} участвует в регуляции широкого спектра клеточных процессов (экзоцитоз, экспрессия генов, рост и пролиферация клеток и др.) в норме и патологии (Putney, 2011; Prakriya, Lewis, 2015).

Функциональной единицей депозависимого входа Ca^{2+} является мультимолекулярный белковый комплекс (store-operated calcium influx complex, SOCIC), компоненты которого обладают высокой мобильностью, и взаимодействия между ними жестко регулируются (Vasa, 2010; Moreno, Vasa, 2012). Основными компонентами комплекса, необходимыми и достаточными для активации депозависимого входа Ca^{2+} , являются Ca^{2+} -каналы Orai1 в плазмалемме и Ca^{2+} -сенсор STIM1 в мембране Ca^{2+} -депо (Prakriya, Lewis, 2015). При опустошении Ca^{2+} -депо,

STIM1 олигомеризуется, транслоцируется в участки эндоплазматического ретикулума, расположенные у плазмалеммы, и прямо взаимодействует с белками Orai1, вызывая депозависимый вход Ca^{2+} (Nwokonko et al., 2017; Nguyen et al., 2018; Lunz et al., 2019).

После обнаружения важной роли депозависимых Ca^{2+} -каналов в патогенезе тяжелых заболеваний человека, таких как тяжелый комбинированный иммунодефицит (severe combined immunodeficiency, SCID), назальный полипоз, ревматоидный артрит, эктодермальная дисплазия, тромбоз, острый панкреатит, аутоиммунные и аллергические заболевания (Shaw, Feske, 2013; Lacruz, Feske, 2015; Feske, 2019) возрос интерес исследователей к разработке низкомолекулярных блокаторов депозависимых Ca^{2+} -каналов.

Из различных фармакологических модуляторов депозависимых Ca^{2+} -каналов лучше других исследован 2-аминоэтоксидифенил-борат (2-АРВ). 2-АРВ широко использовался в качестве инструмента исследования механизмов функционирования депозависимых Ca^{2+} -каналов (Putney, 2001; Bootman et al., 2002; Putney, 2010). Показано, что 2-АРВ модулирует депозависимый вход Ca^{2+} в клетках разных

Принятые сокращения: 2-АРВ — 2-аминоэтоксидифенил борат, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ — внутриклеточная концентрация Ca^{2+} .

типов (Putney, 2010; Jairaman, Prakriya, 2013; Bird, Putney, 2018).

Ранее (Курилова и др., 2008, 2011) нами было впервые показано, что дисульфидсодержащие иммуномодуляторы глутоксим® (динатриевая соль окисленного глутатиона с d-металлом в наноконцентрации) и моликсан® (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина) (ФАРМА-ВАМ, Санкт-Петербург) увеличивают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), вызывая мобилизацию Ca^{2+} из тапсигаргинчувствительных Ca^{2+} -депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крыс.

Учитывая важную роль депозависимых Ca^{2+} -каналов в функционировании клеток иммунной системы и для выяснения фармакологических характеристик депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах, представлялось целесообразным исследовать влияние 2-АРВ на депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином (Thastrup et al., 1989) и циклопiazониковой кислотой (ЦПК) (Goeger et al., 1988) и иммуномодуляторами глутоксимом и моликсаном, в перитонеальных макрофагах крысы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Выделение и культивирование перитонеальных макрофагов крыс. Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar. Содержание животных и все манипуляции выполняли в соответствии с нормативными документами и требованиями Приказа Минздрава России № 267 от 19.06.03 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”.

Резидентные макрофаги выделяли из перитонеальной полости крыс массой 180–250 г по традиционному методу, сразу после выделения клетки имели сферическую форму (диаметр 10–20 мкм) (Conrad, 1981; Randriamampita, Trautmann, 1987). Суспензию клеток помещали в бакпечатки с кварцевыми стеклами (10 × 10 мм) и культивировали клетки в течение 1–3 сут при 37°C в среде 199 (pH 7.2), содержащей 20% сыворотки крови быка, глутамин (3%), пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (100 мг/мл). Тестом на α -нафтилэстеразу подтверждали, что по меньшей мере 96% клеток в монослоях являлись макрофагами (Monahan et al., 1981).

Эксперименты проводили при комнатной температуре (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): NaCl – 140, KCl – 5, CaCl_2 – 1, MgCl_2 – 1, и HEPES-NaOH – 5, pH 7.3–7.4. Бескальциевая

среда отличалась тем, что содержала 0 мМ CaCl_2 и 1 мМ ЭГТА.

Измерение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ проводили с использованием флуоресцентного зонда Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Макрофаги инкубировали в течение 45 мин в физиологическом растворе, содержащем 2 мМ Fura-2AM, при 22–24°C. Стекла с окрашенными клетками отмывали физиологическим раствором и переносили в экспериментальную камеру флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм через объектив микроскопа. Для выделения соответствующих участков спектра использовали узкополосные оптические фильтры. Эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм при помощи специализированной видеокамеры Leica DFC340FX. Для управления экспериментом использовали систему обработки изображения ImageJ (плагин Micro-Manager 1.4).

Результатом измерений являлось отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при облучении светом с длиной волны 340 нм к интенсивности флуоресценции при облучении светом с длиной волны 380 нм ($\text{Ratio} (F_{340}/F_{380})$), где F_{340} – интенсивность флуоресценции Fura-2AM, связанного с Ca^{2+} , а F_{380} – интенсивность флуоресценции Fura-2AM, не связанного с Ca^{2+} , отражающее изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетках во время измерений (Bruce, Elliott, 2000; Xie et al., 2002). Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. В экспериментах применяли объектив 10× с апертурой 8 мм. Значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича (Gryniewicz et al., 1985). Статистический анализ проводили с применением *t*-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде среднего и стандартного отклонения. Каждую регистрацию получали для группы из 40–50 клеток и на рисунках представлены результаты типичных экспериментов из 6–7 независимых экспериментов. Достоверными считали различия при $P \leq 0.05$.

Использованные реактивы: все реактивы приобретали в фирме Sigma-Aldrich, США. Маточные растворы Fura-2AM (1 мМ), ЦПК (10 мМ) и тапсигаргина (0.5 мМ) готовили в диметилсульфоксиде. Маточный раствор 2-АРВ (25 мМ) готовили в этиловом спирте. Препараты глутоксим и моликсан предоставлялись фирмой ФАРМА-ВАМ (Санкт-Петербург, Россия). Маточные растворы глутоксима (50 мг/мл) и моликсана (50 мг/мл) готовили в воде.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние 2-АРВ на депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз. В контрольных экспериментах мы обнаружили, что добавление 0.5 мМ тапсигаргина к макрофагам в бескальциевой среде, вызывает увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$,

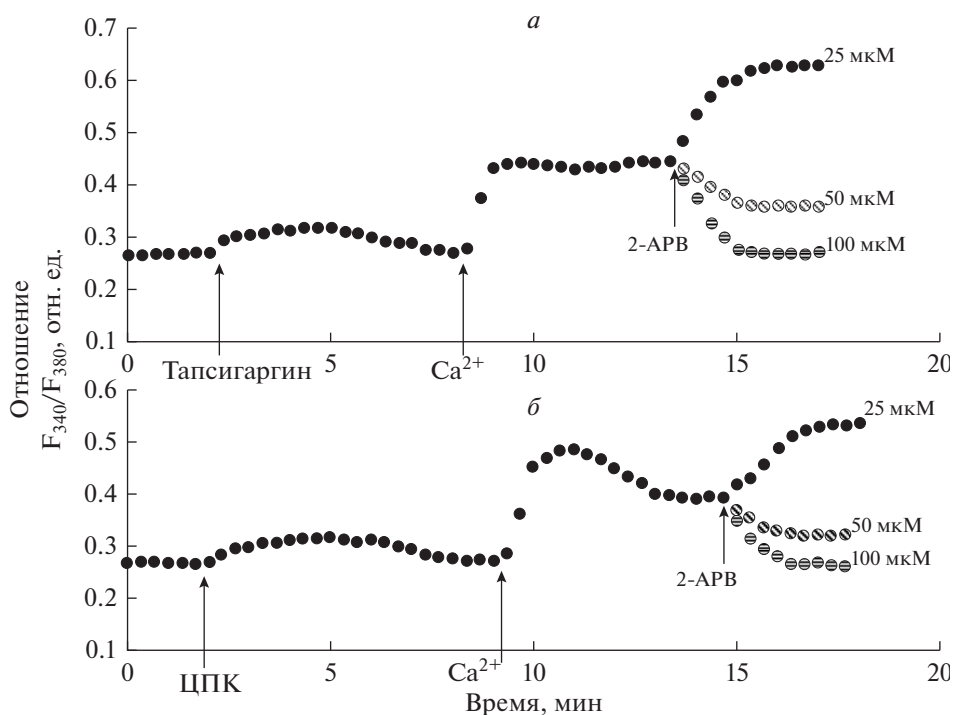


Рис. 1. Влияние 2-аминоэтоксидифенил-бората (2-АРВ) на депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый тапсигаргином (0.5 мкМ) (а) и циклопязониковой кислотой (ЦПК, 10 мкМ) (б) в перитонеальных макрофагах крысы. Объяснения к рис. 1–2: макрофаги стимулировали указанным реагентом в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; на фоне развившегося входа Ca^{2+} добавляли 25, 50 или 100 мкМ 2-аминоэтоксидифенил бората (2-АРВ); F_{340}/F_{380} — отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм, отн. ед.

отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо (рис. 1а). В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации составило 30 ± 8 нМ ($n = 7$). При последующем введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдали депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 1а). В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 112 ± 21 нМ ($n = 7$). Аналогичные результаты мы получили при использовании 10 мкМ ЦПК (рис. 1б). В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызываемой ЦПК, составило 31 ± 9 нМ ($n = 7$), а во время входа Ca^{2+} — 99 ± 21 нМ ($n = 7$) (рис. 1б).

Мы впервые обнаружили, что при добавлении 2-АРВ на фоне развившегося депозависимого входа Ca^{2+} , вызываемого тапсигаргином, действие 2-АРВ зависит от его концентрации. В концентрации 25 мкМ 2-АРВ вызывал значительную потенциацию входа Ca^{2+} (на $105.2 \pm 25.3\%$, $n = 7$) (рис. 1а). В то же время, добавление 2-АРВ в концентрации 50 или 100 мкМ приводило к подавлению депозависимого входа Ca^{2+} (рис. 1а). Подавление входа Ca^{2+} при действии 50 мкМ 2-АРВ составило $51.4 \pm 14.7\%$ ($n = 7$), а в концентрации 100 мкМ — $96.0 \pm 18.4\%$ ($n = 7$).

Сходные результаты мы получили при добавлении 2-АРВ на развившийся депозависимый вход Ca^{2+} , индуцированный ЦПК (рис. 1б). При воздействии 25 мкМ 2-АРВ мы наблюдали потенциацию входа Ca^{2+} на $116.3 \pm 23.7\%$ ($n = 7$). В случае 50 мкМ 2-АРВ происходило подавление входа Ca^{2+} на $56.5 \pm 15.3\%$ ($n = 7$), а при действии 100 мкМ 2-АРВ — на $97.1 \pm 17.5\%$ ($n = 7$).

Влияние 2-АРВ на депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый дисульфидсодержащими иммуномодуляторами. В контрольных экспериментах мы обнаружили, что инкубация макрофагов в течение 20 мин с глутоксимом (100 мкг/мл) (рис. 2а) или моликсаном (100 мкг/мл) (рис. 2б) в бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо. В среднем через 20 мин после добавления агентов $[\text{Ca}^{2+}]_i$ увеличивалась от базального уровня, равного 90 ± 17 , до 171 ± 20 нМ ($n = 6$) для глутоксима и 177 ± 21 нМ ($n = 6$) для моликсана. При введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдали дальнейшее повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 2). В среднем увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 336 ± 34 ($n = 6$) и

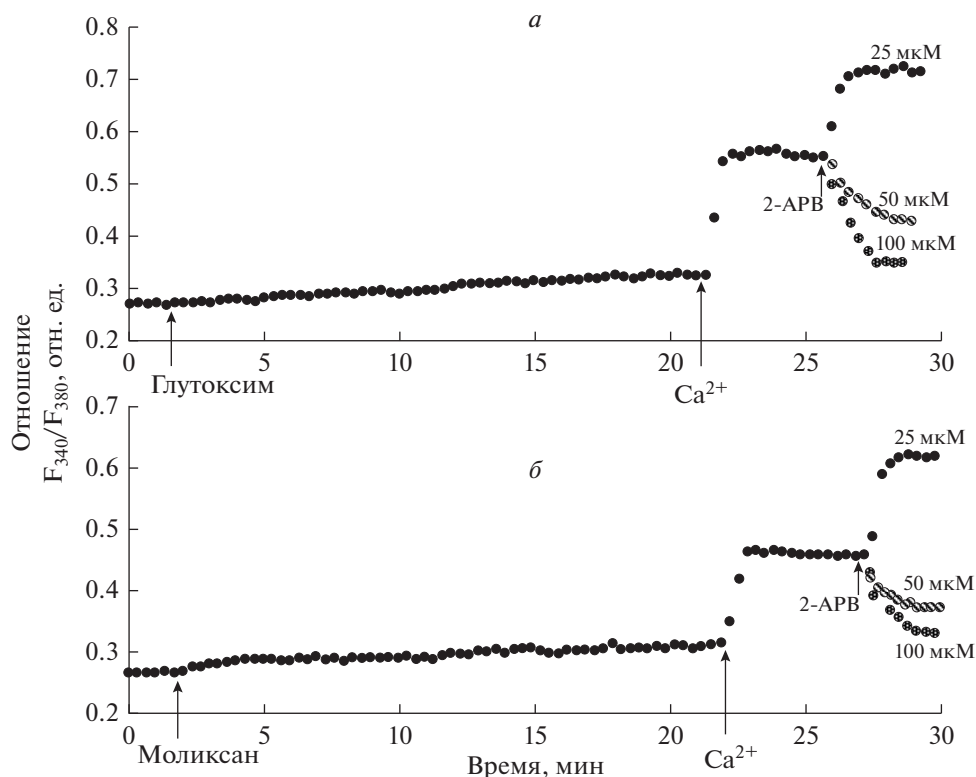


Рис. 2. Влияние 2-аминоэтоксифенил бората (2-АРВ) на депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый глутоксимом (100 мкг/мл) (а) или моликсаном (100 мкг/мл) (б) в перитонеальных макрофагах крысы.

246 ± 31 нМ ($n = 6$) для глутоксима и моликсана соответственно.

Мы впервые обнаружили, что при добавлении 2-АРВ на фоне развившегося депозависимого входа Ca^{2+} , вызываемого глутоксимом, эффект 2-АРВ зависит от его концентрации. В концентрации 25 мкМ 2-АРВ вызывал значительную потенциацию входа Ca^{2+} (на $87.4 \pm 19.2\%$, $n = 7$) (рис. 2а). В то же время, добавление 2-АРВ в концентрации 50 или 100 мкМ приводило к значительному подавлению депозависимого входа Ca^{2+} (рис. 2а). Подавление входа Ca^{2+} при действии 50 мкМ 2-АРВ составило $52.5 \pm 12.4\%$ ($n = 7$), а в концентрации 100 мкМ — $87.2 \pm 11.7\%$ ($n = 7$).

Сходные результаты мы получили в опытах с добавлением 2-АРВ на развившийся депозависимый вход Ca^{2+} , индуцированный моликсаном (рис. 2б). При воздействии 25 мкМ 2-АРВ наблюдали потенциацию входа Ca^{2+} на $95.3 \pm 21.3\%$ ($n = 7$). При приложении 50 мкМ 2-АРВ происходило подавление входа Ca^{2+} на $60.5 \pm 13.1\%$ ($n = 7$), а при воздействии 100 мкМ 2-АРВ — на $90.2 \pm 12.8\%$ ($n = 7$).

Полученные нами результаты согласуются с данными, представленными в литературе. Так, показано, что 50 мкМ 2-АРВ практически полностью по-

давляет депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый тапсигаргином в макрофагах из костного мозга мыши (Vaeth et al., 2001), амелобластах мыши (линия LS8) (Nurbueva et al., 2015) и гладкомышечных клетках легочной артерии крысы (McElroy et al., 2008). Дозозависимое модулирующее влияние 2-АРВ на депозависимый вход Ca^{2+} показано также на клетках разных типов: В-лимфоцитах цыпленка (линия DT40) (Prakriya, Lewis, 2001; Ma et al., 2002), клетках эмбриональной почки человека (линия HEK293) (De Haven et al., 2008), клетках микроглии крысы (Ohana et al., 2009), Т-клетках линии Jurkat человека и лейкоцитарных базофилах крысы (RBL-2H3) (Prakriya, Lewis, 2001). В низких концентрациях (<30 мкМ) 2-АРВ потенцирует, в то время как в более высоких концентрациях практически полностью подавляет депозависимый вход Ca^{2+} . Полагают, что в низких концентрациях 2-АРВ потенцирует депозависимый вход Ca^{2+} путем прямого расширения поры открытых Orai1 каналов (Xu et al., 2016; Ali et al., 2017). При этом диаметр поры Orai1 каналов увеличивается с 3.8 до 4.6 Å. Обнаружено также, что 2-АРВ конкурирует со STIM1 за активацию каналов Orai1 (Yamashita et al., 2011). Ингибирование депозависимого входа Ca^{2+} при действии высоких концентраций 2-АРВ может быть связано с нарушением взаи-

модействия между белками STIM1 и Orai1 (De Haven et al., 2008; Peinelt et al., 2008; Hendron et al., 2014). В дальнейшем было показано, что 2-АРВ может подавлять депозависимый вход Ca^{2+} , быстро и прямо ингибируя оба молекулярных участника “емкостного” входа Ca^{2+} , Orai1 каналы и STIM1 (Wei et al., 2016). Кроме того, 2-АРВ может опосредованно (более медленно) ингибировать функциональное связывание STIM1 и Orai1 посредством влияния на STIM1, ослабляя взаимодействие между STIM1 и N-терминальным концом канала Orai1 (Wei et al., 2016).

Таким образом, в настоящей работе мы впервые на перитонеальных макрофагах крысы показали, что 2-АРВ дозозависимо модулирует (активирует или ингибирует) депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемый ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз (тапсигаргин, ЦПК) и иммуномодуляторами глутоксिमом и моликсаном. Это комплексное действие 2-АРВ на депозависимый вход Ca^{2+} в макрофагах может быть связано с его влиянием на оба компонента мультибелкового комплекса депозависимого входа Ca^{2+} , на белки STIM1 и Orai1.

Полученные данные свидетельствуют о том, что, как и для клеток других типов, 2-АРВ является удобным фармакологическим инструментом для изучения депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах. Кроме того, результаты дополнительно подтверждают, что вход Ca^{2+} , индуцируемый глутоксिमом или моликсаном, происходит по депозависимому механизму.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках плановых тем Кафедры биофизики Санкт-Петербургского государственного университета и Кафедры клинической биохимии и лабораторной диагностики Военно-Медицинской академии им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты на животных были проведены в соответствии с общепринятыми этическими международными нормами (International guiding principles for biomedical research involving animals, 1985) и требованиями приказа Минздрава России № 267 от 19.06.2003 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. 2008. Влияние окисленного глутатиона и его фармакологического аналога препа-

рата глутоксима на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. Цитология. 50(5) : 452–461. (Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. 2008. The effect of oxidized glutathione and its pharmacological analogue glutoxim on intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages. Cell Tissue Biol. 2 : 322–332.)

Курилова Л.С., Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. 2011. Влияние препарата моликсан на процессы Ca^{2+} -сигналикации в макрофагах. Цитология. 53(9) : 708. (Kurilova L.S., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. 2011. The effect of drug molixan on Ca^{2+} -signalling processes in macrophages. Tsitologiya. 53 : 708.)

Ali Sh., Xu T., Xu X. 2017. CRAC channel gating and its modulation by STIM 1 and 2-aminoethoxydiphenyl borate. J. Physiol. 595 : 3085–3095.

Bird G.S., Putney J.W. 2018. Pharmacology of store-operated calcium entry channels. In: Calcium entry channels in non-excitable cells. CRC Press, 311–324.

Bootman M.D., Collins T.J., Mackenzie L., Roderick H.L., Berridge M.J., Peppiatt C.M. 2002. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated Ca^{2+} entry but an inconsistent inhibitor of InsP_3 -induced Ca^{2+} release. FASEB J. 16 : 1145–1150.

Bruce J.I.E., Elliott A.C. 2000. Pharmacological evaluation of the role of cytochrome P450 in intracellular calcium signaling in rat pancreatic acinar cells. Brit. J. Physiol. 131 : 761–771.

Conrad R.E. 1981. Induction and collection of peritoneal exudate macrophages. In: Manual of macrophages methodology. New York, Marcell Dekker. 5–11.

De Haven W.I., Smyth J.T., Boyles R.R., Bird G.S., Putney J.W. 2008. Complex actions of 2-aminoethoxydiphenyl borate on store-operated calcium entry. J. Biol. Chem. 283 : 19265–19273.

Feske St. 2019. CRAC channels and disease — from human CRAC channelopathies and animal models to novel drugs. Cell Calcium. 80 : 112–116.

Goeger D.E., Riley R.T., Dorner J.W., Cole R.J. 1988. Cyclopiazonic acid inhibition of the Ca^{2+} transport ATPase in rat skeletal muscle sarcoplasmic reticulum vesicles. Biochem. Pharmacol. 37 : 978–981.

Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. 1985. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. J. Biol. Chem. 260 : 3440–3450.

Hendron E., Wang X., Zhou Y., Cai X., Goto J.-I., Mikoshiba K., Baba Y., Kurosaki T., Wang Y., Gill D.L. 2014. Potent functional uncoupling between STIM1 and Orai1 by dimeric 2-aminodiphenyl borinate analogs. Cell Calcium. 56 : 482–492.

Jairaman A., Prakriya M. 2013. Molecular pharmacology of store-operated CRAC channels. Channels. 7 : 402–414.

Lacruz R.S., Feske St. 2015. Diseases caused by mutations in Orai1 and STIM1. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1356 : 45–79.

Lunz V., Romanin C., Frischauf I. 2019. STIM1 activation of Orai1. Cell Calcium. 77 : 29–38.

- Ma H.-T., Venkatachalam K., Parys J.B., Gill D.L. 2002. Modification of store-operated channel coupling and inositol trisphosphate receptor function by 2-aminoethoxydiphenyl borate in DT40 lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 277 : 6915–6922.
- McElroy S.P., Gurney A.M., Drummond R.M. 2008. Pharmacological profile of store-operated Ca^{2+} entry in intrapulmonary artery smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.* 584 : 10–20.
- Monahan R.A., Dvorak H.F., Dvorak A.M. 1981. Ultrastructural localization of nonspecific esterase activity in guinea pig and human monocytes, macrophages and lymphocytes. *Blood.* 58 : 1089–1099.
- Moreno C., Vaca L. 2012. Microdomain organization of SOCE signaling. In: Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) pathways. Wien, Springer-Verlag. 93–113.
- Nguyen N.T., Han W., Cao W.-M., Wang Y., Wen S., Huang Y., Li M., Du L., Zhou Y. 2018. Store-operated calcium entry mediated by Orai and STIM. *Comprehensive Physiol.* 8 : 981–1002.
- Nurbaeva M.K., Eckstein M., Snead M.L., Feske S., Lacruz R.S. 2015. Store-operated Ca^{2+} entry modulates the expression of enamel genes. *J. Dent. Res.* 94 : 1471–1477.
- Nwokonko R.M., Cai X., Loktionova N.A., Wang Y., Zhou Y., Gill D.L. 2017. The STIM–Orai pathway: Conformational coupling between STIM and Orai in the activation of store-operated Ca^{2+} entry. *Adv. Exp. Med. Biol.* 993 : 83–98.
- Ohana L., Newell E.W., Stanley E.F., Schlichter L.C. 2009. The Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} current (I_{CRAC}) mediates store-operated Ca^{2+} entry in rat microglia. *Channels.* 3 : 129–139.
- Peinelt C., Lis A., Beck A., Fleig A., Penner R. 2008. 2-aminoethoxydiphenyl borate directly facilitates and indirectly inhibits STIM1-dependent gating of CRAC channels. *J. Physiol.* 586 : 3061–3073.
- Prakriya M., Lewis R.S. 2001. Potentiation and inhibition of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channels by 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) occurs independently of IP_3 receptors. *J. Physiol.* 536 : 3–19.
- Prakriya M., Lewis R.S. 2015. Store-operated calcium channels. *Physiol. Rev.* 95 : 1383–1436.
- Putney J.W. 1990. Capacitative calcium entry revisited. *Cell Calcium.* 11 : 611–624.
- Putney J.W. 2001. Pharmacology of capacitative calcium entry. *Mol. Interv.* 1 : 84–94.
- Putney J.W. 2010. Pharmacology of store-operated calcium channels. *Mol. Interv.* 10 : 209–218.
- Putney J.W. 2011. The physiological function of store-operated calcium entry. *Neurochem. Res.* 36 : 1157–1165.
- Putney J.W. 2017. Store-operated calcium entry: An historical overview. *Adv. Exp. Med. Biol.* 981 : 205–214.
- Randriamampita C., Trautmann A. 1987. Ionic channels in murine macrophages. *Cell. Biol.* 105 : 761–769.
- Shaw P.J., Feske S. 2013. Physiological and pathophysiological functions of SOCE in the immune system. *Front. Biosci.* 4 : 2253–2268.
- Thastrup O., Dawson A.P., Scharff O., Foder B., Cullen P.J., Drobak B.K., Bjerrum P.J., Christensen S.B., Hanley M.R. 1989. Thapsigargin, a novel molecular probe for studying intracellular calcium release and storage. *Agents Actions.* 27 : 17–23.
- Vaca L. 2010. SOCIC: The store-operated calcium influx complex. *Cell Calcium.* 47 : 199–209.
- Vaeth M., Zee I., Concepcion A.R., Maus M., Shaw P., Portal-Celhay C., Zahra A., Kozhaya L., Weidinger C., Philips J., Unutmaz D., Feske S. 2001. Ca^{2+} -signaling but not store-operated Ca^{2+} entry is required for the function of macrophages and dendritic cells. *J. Immunol.* 195 : 1202–1217.
- Wei M., Zhou Y., Sun A., Ma G., He L., Zhou L., Zhang S., Liu J., Zhang S.L., Gill D.L., Wang Y. 2016. Molecular mechanisms underlying inhibition of STIM1–Orai1-mediated Ca^{2+} entry induced by 2-aminoethoxydiphenyl borate. *Pflugers Arch.* 468 : 2061–2074.
- Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J.A. 2002. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitative calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 277 : 16559–16566.
- Xu X., Ali Sh., Li Y., Yu H., Zhang M., Lu J., Xu T. 2016. 2-aminoethoxydiphenyl borate potentiates CRAC current by directly dilating the pore of open Orai1. *Sci. Rep.* 6 : 29304.
- Yamashita M., Somasundaram A., Prakriya M. 2011. Competitive modulation of Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} channel gating by STIM1 and 2-aminoethoxydiphenyl borate. *J. Biol. Chem.* 286 : 9429–9442.

THE EFFECT OF 2-AMINOETHOXYDIPHENYL BORATE ON STORE-DEPENDENT Ca^{2+} ENTRY IN PERITONEAL MACROPHAGES

L. S. Milenina^{a,*}, Z. I. Krutetskaya^{a,**}, V. G. Antonov^b, and N. I. Krutetskaya^a

^aChair of Biophysics, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034 Russia

^bChair of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg, 194044 Russia

*e-mail: cozzu@mail.ru

**e-mail: z.krutetskaya@spbu.ru

Store-dependent Ca^{2+} -entry is a universal mechanism of regulated Ca^{2+} entry in eucariotic cells. To elucidate the pharmacological characteristics of store-dependent Ca^{2+} entry in macrophages, the effect of 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) on store-dependent Ca^{2+} entry, induced by endoplasmic Ca^{2+} -ATPases inhibitors thapsigargin

and cyclopiazonic acid as well as disulfide-containing immunomodulators glutoxim and molixan, was investigated in rat peritoneal macrophages. Using Fura-2AM microfluorimetry we have shown that in rat peritoneal macrophages, as well as in other cell types, 2-APB modulates store-dependent Ca^{2+} entry in a dose-dependent manner. At concentration of 25 μM 2-APB potentiates Ca^{2+} entry, while at concentrations of 50 and 100 μM it effectively inhibits store-dependent Ca^{2+} entry in macrophages. The results additionally confirm that Ca^{2+} entry induced by glutoxim or molixan occurs via store-dependent mechanism.

Keywords: 2-aminoethoxydiphenyl borate, peritoneal macrophages, store-dependent Ca^{2+} entry