

## АНТАГОНИСТ РЕЦЕПТОРОВ СИГМА-1 ГАЛОПЕРИДОЛ ИНГИБИРУЕТ $Ca^{2+}$ -ОТВЕТЫ В ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГАХ КРЫСЫ

© 2023 г. Л.С. Миленина<sup>\*,#</sup>, З.И. Крутецкая<sup>\*</sup>, В.Г. Антонов<sup>\*\*</sup>, Н.И. Крутецкая<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
Университетская наб., 7/9, Санкт-Петербург, 199034, Россия

<sup>\*\*</sup>Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет,  
Литовская ул., 2, Санкт-Петербург, 194100, Россия

<sup>#</sup>E-mail: l.milenina@spbu.ru

Поступила в редакцию 16.02.2023 г.

После доработки 28.03.2023 г.

Принята к публикации 05.04.2023 г.

Рецепторы сигма-1 – повсеместные многофункциональные лигандрегулируемые молекулярные шапероны в мембране эндоплазматического ретикула, имеющие уникальную историю, структуру и фармакологический профиль. Рецепторы сигма-1 модулируют широкий спектр клеточных процессов в норме и патологии, включая процессы  $Ca^{2+}$ -сигнализации. С использованием флуоресцентного  $Ca^{2+}$ -зонда Fura-2AM мы показали, что антагонист рецепторов сигма-1 нейролептик галоперидол значительно подавляет мобилизацию  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных  $Ca^{2+}$ -депо и последующий депозависимый вход  $Ca^{2+}$  в клетки, вызываемые ингибиторами эндоплазматических  $Ca^{2+}$ -АТФаз тапсигаргином и циклопязониковой кислотой, а также иммуномодуляторами глутоксимом и моликсаном в перитонеальных макрофагах крысы. Результаты свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, вызываемом глутоксимом или моликсаном и приводящем к увеличению внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  в макрофагах, а также об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа  $Ca^{2+}$  в макрофагах.

*Ключевые слова:* галоперидол, рецепторы сигма-1, внутриклеточная концентрация  $Ca^{2+}$ , макрофаги.

DOI: 10.31857/S0006302923040075, EDN: KJXKZD

Важными участниками процессов  $Ca^{2+}$ -сигнализации в клетках являются рецепторы сигма-1, имеющие уникальную историю, структуру и фармакологию, и модулирующие широкий спектр клеточных процессов в норме и патологии [1–5]. Рецепторы сигма-1 представляют собой уникальные многофункциональные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в мембране эндоплазматического ретикула, на границе с митохондриями (МАМ – mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane) [1–5]. Они могут также транслоцироваться к плазмалемме и взаимодействовать с другими рецепторами и ионными каналами; встречаются и в ядерной оболочке, где участвуют в регуляции транскрипции [1]. Эти рецепторы экспрессированы в клетках различных типов, включая иммунные [2, 3, 5]. Рецепторы сигма-1 имеют очень широкий фармакологический профиль. Их лигандами являются различные по хи-

мической структуре и фармакологическому действию соединения: антидепрессанты (флувоксамин, сертралин, имипрамин), нейролептики (галоперидол, хлорпромазин), анальгетики (пентазоцин), анксиолитики (афобазол), противосудорожные (фенитоин), противокашлевые (декстрометорфан, карбетапентан) и антигистаминные (хлорфенамин) препараты, наркотические средства (метамфетамин и кокаин) и препараты, применяемые при лечении нейродегенеративных заболеваний (амантадин, мемантин, донепезил) [6–8]. Типичные нейролептики (галоперидол, флуфеназин, хлорпромазин, трифлуоперазин) имеют высокое сродство к рецепторам сигма-1 [9].

Выполняя функции шаперонов, рецепторы сигма-1 взаимодействуют с белками-мишенями (ионными каналами, рецепторами в плазмалемме и др.) и модулируют многие клеточные процессы, включая процессы  $Ca^{2+}$ -сигнализации [1, 3, 10]. В плазмалемме они взаимодействуют с потенциалзависимыми  $Ca^{2+}$ -,  $Na^{+}$ - и  $K^{+}$ -каналами, протон-активируемыми ионными каналами,

*Сокращения:* ЦПК – циклопязониковая кислота,  $[Ca^{2+}]_i$  – внутриклеточная концентрация  $Ca^{2+}$ .

NMDA-рецепторами, рецепторами, связанными с G-белками (мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами,  $\mu$ -опиоидными и D1- и D2-дофаминовыми рецепторами) и другими белками-мишенями [1, 3]. В мембране эндоплазматического ретикулама рецептор сигма-1 взаимодействует с рецептором инозитол-1,4,5-трифосфата 3-го типа, с другим молекулярным шапероном белком BiP (binding immunoglobulin protein) [11] и  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсором белком STIM1 [12]. Обнаружено, что, взаимодействуя с рецепторами инозитол-1,4,5-трифосфата, рецепторы сигма-1 модулируют процессы  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации в клетках – мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из депо и вход  $\text{Ca}^{2+}$  из наружной среды [10, 11]. Показано их участие в регуляции депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках [12–14].

Ранее нами было впервые показано, что лиганды рецепторов сигма-1, нейролептики фенотиазинового ряда хлорпромазин и трифлуоперазин, значительно подавляют обе фазы  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов, вызываемых дисульфидсодержащими иммуномодуляторами глутоксимом® (динатриевая соль окисленного глутатиона с *d*-металлом в наноконцентрации) и моликсаном® (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина) и ингибиторами эндоплазматических  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз тапсигаргином и циклопязоникой кислотой (ЦПК) в перитонеальных макрофагах крысы [15, 16].

Для подтверждения участия рецепторов сигма-1 в регуляции процессов  $\text{Ca}^{2+}$  сигнализации в макрофагах, представлялось целесообразным исследовать влияние других, структурно отличных, лигандов рецепторов сигма-1 на  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, индуцируемые глутоксимом и моликсаном, а также тапсигаргином и ЦПК, в перитонеальных макрофагах крысы, что и составило предмет настоящего исследования.

В экспериментах использовали антагонист рецепторов сигма-1 – нейролептик галоперидол (производное бутирофенона) [17], относящийся к первому поколению типичных нейролептиков (антипсихотических агентов), и имеющий долгую историю использования в клинике для терапии шизофрении и других психических заболеваний [18].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Выделение и культивирование перитонеальных макрофагов крыс.** Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar. Резидентные макрофаги выделяли из перитонеальной полости крыс массой 180–250 г по методу, описанному ранее [19]. Сразу после выделения клетки имели сферическую форму (диаметр 10–20 мкм). Суспензию клеток помещали в бакпечатки, содержа-

щие кварцевые стекла размером  $10 \times 10$  мм. Клетки на стеклах культивировали в течение 1–3 сут при  $37^\circ\text{C}$  в среде 199 (pH 7.2), содержащей 20% сыворотки крови быка, глутамин (3%), пенициллин (100 ед/мл) и стрептомицин (100 мг/мл). Тест на  $\alpha$ -нафтилэстеразу [20] показал, что по меньшей мере 96% клеток в монослоях были макрофагами.

Эксперименты проводили при комнатной температуре ( $22$ – $24^\circ\text{C}$ ) через одни–двое суток после начала культивирования клеток. Кварцевые стекла с клетками помещали в экспериментальную камеру, заполненную физиологическим раствором следующего ионного состава: 140 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 1 мМ  $\text{MgCl}_2$  и 5 мМ HEPES-NaOH, pH 7.3–7.4. Бескальциевая среда отличалась тем, что содержала 0 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 1 мМ ЭГТА.

**Реактивы.** В работе использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США). Маточные растворы Fura-2AM (1 мМ), циклопязоникой кислоты (10 мМ) и тапсигаргина (0.5 мМ) готовили в диметилсульфоксиде. Препараты глутоксим и моликсан были предоставлены фирмой ФАРМА-ВАМ (Санкт-Петербург). Маточные растворы галоперидола (5 мг/мл), глутоксима (50 мг/мл) и моликсана (50 мг/мл) готовили в воде.

**Измерение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ .** Для измерения внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Макрофаги инкубировали в течение 45 мин в физиологическом растворе, содержащем 2 мкМ Fura-2AM, при  $22$ – $24^\circ\text{C}$ . Стекла с окрашенными клетками отмывали физиологическим раствором и переносили в экспериментальную камеру флуоресцентного микроскопа 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 DFC340FX (Leica Microsystems, Германия). 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 ( $F_{340}/F_{380}$ ), где  $F_{340}$  – интенсивность флуоресценции Fura-2AM, связанного с  $\text{Ca}^{2+}$ , а  $F_{380}$  – интенсивность флуорес-

ценции Fuga-2AM, не связанного с  $\text{Ca}^{2+}$ . Это отношение отражает изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в клетках во время измерений [21]. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. В экспериментах применяли объектив  $10\times$  с апертурой 8 мм. Значения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  рассчитывали по уравнению Гринкевича [22].

**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. На рисунках представлены результаты однотипных экспериментов из шести-восьми независимых. Достоверными считали различия при  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Влияние галоперидола на  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, вызываемые дисульфидсодержащими иммуномодуляторами в макрофагах.** Фармакологические аналоги окисленного глутатиона (глутоксим и моликсан) используются как иммуномодуляторы и цитопротекторы в комплексной терапии бактериальных, вирусных и онкологических заболеваний [23–26]. Эти препараты оказывают комплексное влияние на процессы редокс-регуляции в клетках, однако тонкие биофизические механизмы их действия далеки от полного понимания. Клинические исследования показали, что моликсан эффективен в профилактике и лечении коронавирусной инфекции COVID-19. Он приводит к более быстрому регрессу тяжести заболевания в более легкую форму [27]. Ранее [28, 29] нами впервые было показано, что глутоксим и моликсан увеличивают  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , вызывая мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из тапсигаргинчувствительных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо и последующий депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в перитонеальные макрофаги крыс.

В настоящей работе контрольные эксперименты показали, что инкубация макрофагов в течение 20 мин со 100 мкг/мл глутоксима (рис. 1а) или 100 мкг/мл моликсана (рис. 2а) в бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , отражающее мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо. Через 20 мин после добавления агентов  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в среднем увеличивалась от базального уровня, равного  $90 \pm 18$ , до  $135 \pm 18$  нМ ( $n = 7, p < 0.05$ ) для глутоксима и  $134 \pm 20$  нМ ( $n = 6, p < 0.05$ ) для моликсана. При введении в наружную среду 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  наблюдали дальнейшее повышение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , отражающее депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль (рис. 1а и 2а).

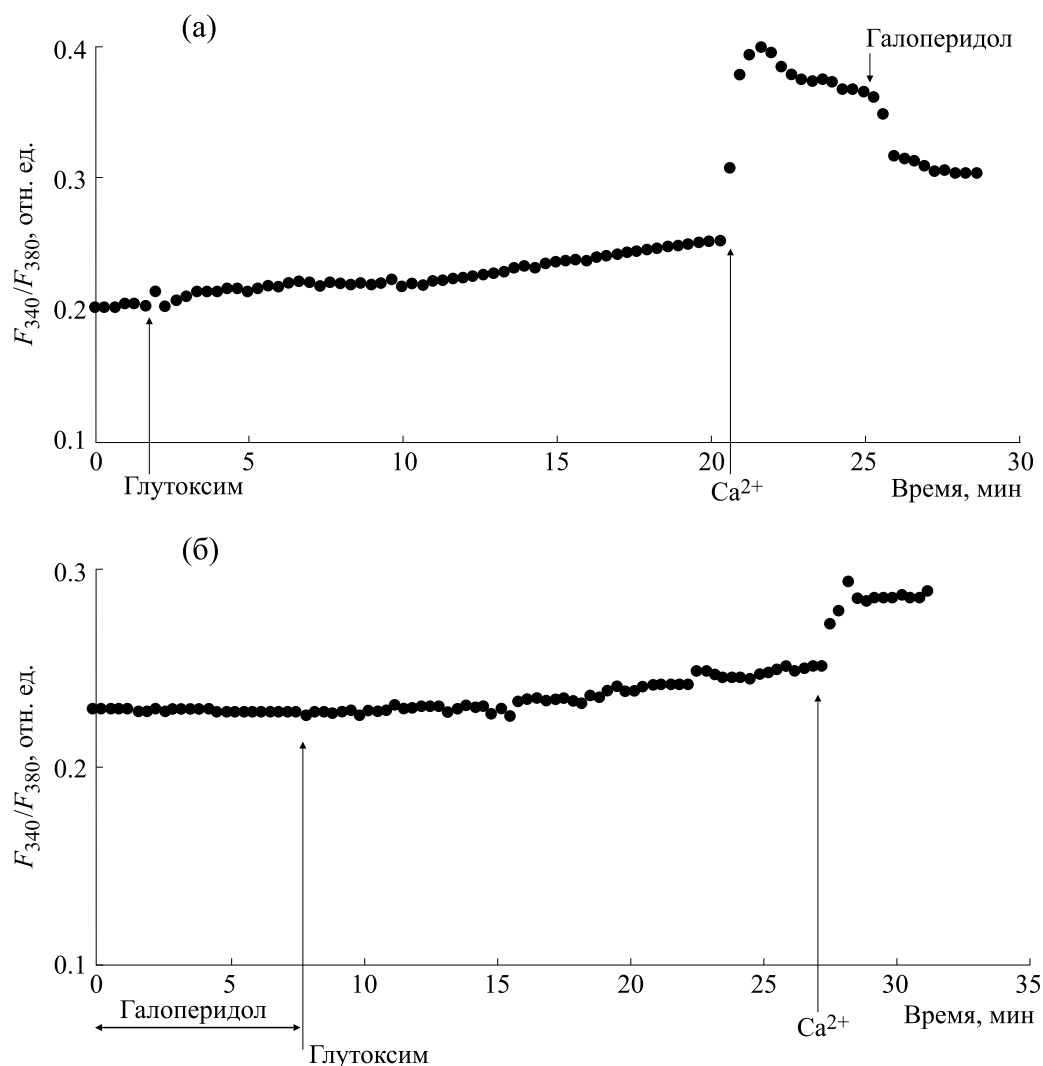
В среднем увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  во время входа  $\text{Ca}^{2+}$  составило  $223 \pm 22$  нМ ( $n = 7, p < 0.05$ ) и  $202 \pm 20$  нМ ( $n = 6, p < 0.05$ ) для глутоксима и моликсана соответственно.

Обнаружено, что преинкубация макрофагов с 30 мкг/мл галоперидола в течение 10 мин до введения 100 мкг/мл глутоксима приводила к значительному подавлению как мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо (на  $50.3 \pm 8.4\%$ ,  $n = 7, p < 0.05$ ), так и последующего депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку (на  $54.5 \pm 9.5\%$ ,  $n = 7, p < 0.05$ ), индуцируемых глутоксимом (рис. 1б). Сходные данные были получены в опытах по влиянию 30 мкг/мл галоперидола на  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, вызываемые 100 мкг/мл моликсана (рис. 2б). Так, галоперидол вызывал подавление мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо на  $49.3 \pm 8.1\%$  ( $n = 7, p < 0.05$ ) и подавление входа  $\text{Ca}^{2+}$  в клетки на  $47.6 \pm 9.7\%$  ( $n = 7, p < 0.05$ ), индуцируемых моликсаном. Это свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 в активации депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцируемого глутоксимом или моликсаном, в макрофагах.

Кроме того, выявлено, что добавление 30 мкг/мл галоперидола на фоне развившегося входа  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированного глутоксимом (рис. 1а) или моликсаном (рис. 2б), вызывает значительное (на  $51.4 \pm 9.0\%$ ,  $n = 12, p < 0.05$ ) подавление депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофаги.

**Влияние галоперидола на  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, индуцируемые ингибиторами эндоплазматических  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз.** В контрольных экспериментах было обнаружено, что добавление 0.5 мкМ тапсигаргина к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, вызывает незначительное увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , отражающее мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо (рис. 3а). В среднем увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  во время фазы мобилизации составило  $31 \pm 9$  нМ ( $n = 7, p < 0.05$ ). При последующем введении в наружную среду 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  наблюдали депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль (рис. 3а). В среднем увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  во время входа  $\text{Ca}^{2+}$  составило  $152 \pm 20$  нМ ( $n = 7, p < 0.05$ ). Сходные результаты мы получили при использовании 10 мкМ ЦПК (рис. 4а). В среднем увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  во время фазы мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо, вызываемой ЦПК, составило  $26 \pm 9$  нМ ( $n = 7, p < 0.05$ ), а во время входа  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофаги –  $141 \pm 22$  нМ ( $n = 7, p < 0.05$ ).

Показано, что преинкубация макрофагов с 30 мкг/мл галоперидола в течение 10 мин до введения 0.5 мкМ тапсигаргина вызывала подавление обеих фаз  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа, индуцируемого тап-

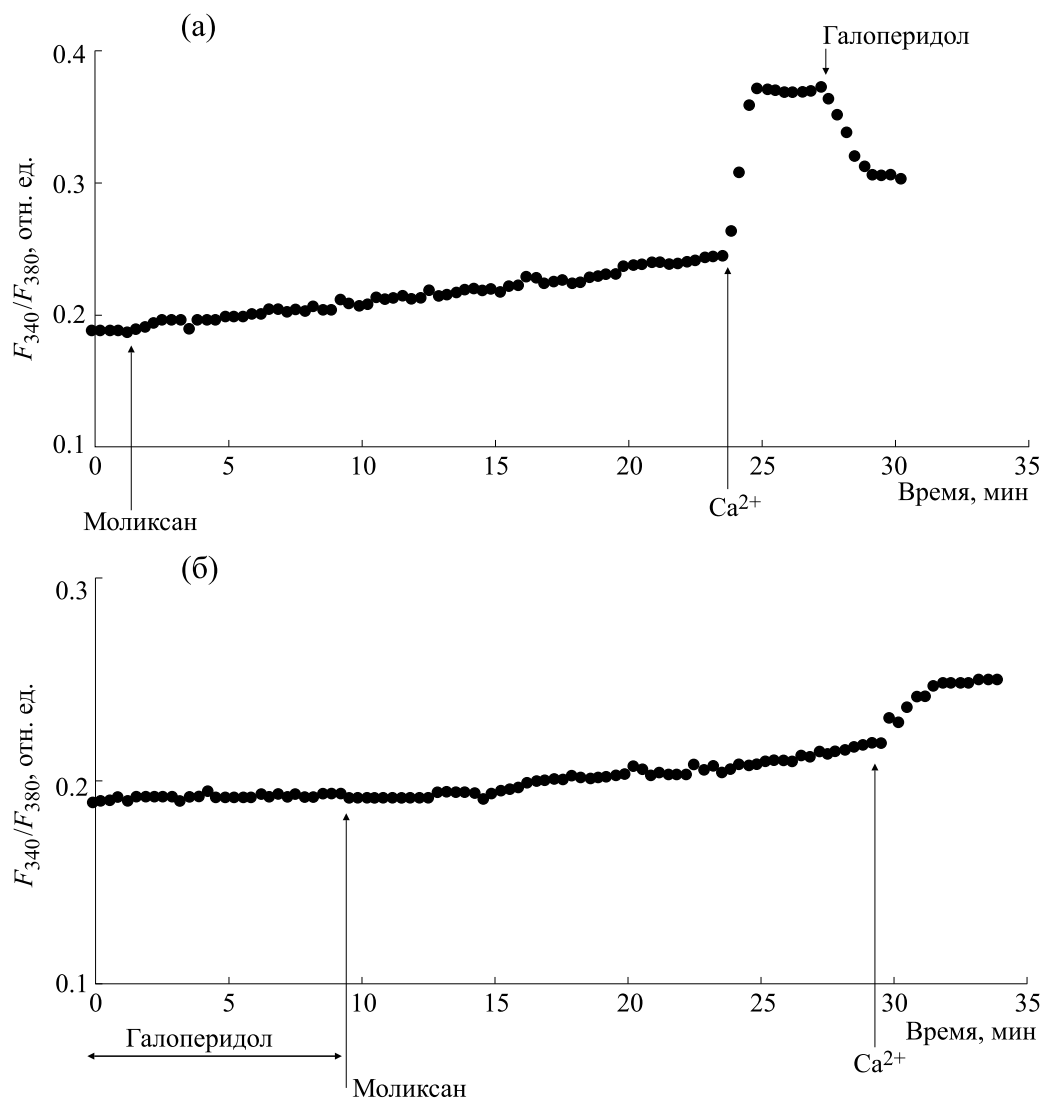


**Рис. 1.** Влияние галоперидола на увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах крыс, вызываемое глутоксимом: (а) — клетки инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима в номинально бескальциевой среде, затем вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ ; на фоне развившегося входа  $Ca^{2+}$  добавляли 30 мкг/мл галоперидола; (б) — макрофаги предварительно инкубировали в течение 10 мин с 30 мкг/мл галоперидола в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима, через 20 мин вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ . Здесь и далее на рис. 2–4: по оси ординат — отношение интенсивностей флуоресценции Фу-га-2АМ при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм ( $F_{340}/F_{380}$ , отн. ед.), по оси абсцисс — время (мин). Каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант из шести-восьми независимых экспериментов.

сигаргином (рис. 3б). В среднем галоперидол подавлял фазу мобилизации  $Ca^{2+}$  из депо на  $23.2 \pm 7.9\%$  ( $n = 7, p < 0.05$ ), а последующий депозависимый вход  $Ca^{2+}$  в макрофаги — на  $42.3 \pm 13.6\%$  ( $n = 7, p < 0.05$ ). Сходные результаты были получены в опытах с применением 10 мкМ ЦПК (рис. 4б). В среднем галоперидол вызывал подавление мобилизации  $Ca^{2+}$  из депо на  $25.9 \pm 8.0\%$  ( $n = 7, p < 0.05$ ) и подавление входа  $Ca^{2+}$  на  $43.8 \pm 12.5\%$  ( $n = 7, p < 0.05$ ), индуцируемых ЦПК. Это свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 в

активации депозависимого входа  $Ca^{2+}$ , индуцируемого тапсигаргином или ЦПК в макрофагах.

Кроме того, было обнаружено, что добавление 30 мкг/мл галоперидола на фоне развившегося входа  $Ca^{2+}$ , индуцированного тапсигаргином (рис. 3а) или ЦПК (рис. 4а), вызывает значительное подавление депозависимого входа  $Ca^{2+}$  в макрофаги. Так, подавление входа  $Ca^{2+}$  составило:  $48.5 \pm 17.1\%$  ( $n = 7, p < 0.05$ ) для тапсигаргина и  $48.1 \pm 16.9\%$  ( $n = 7, p < 0.05$ ) для ЦПК. Это свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 не

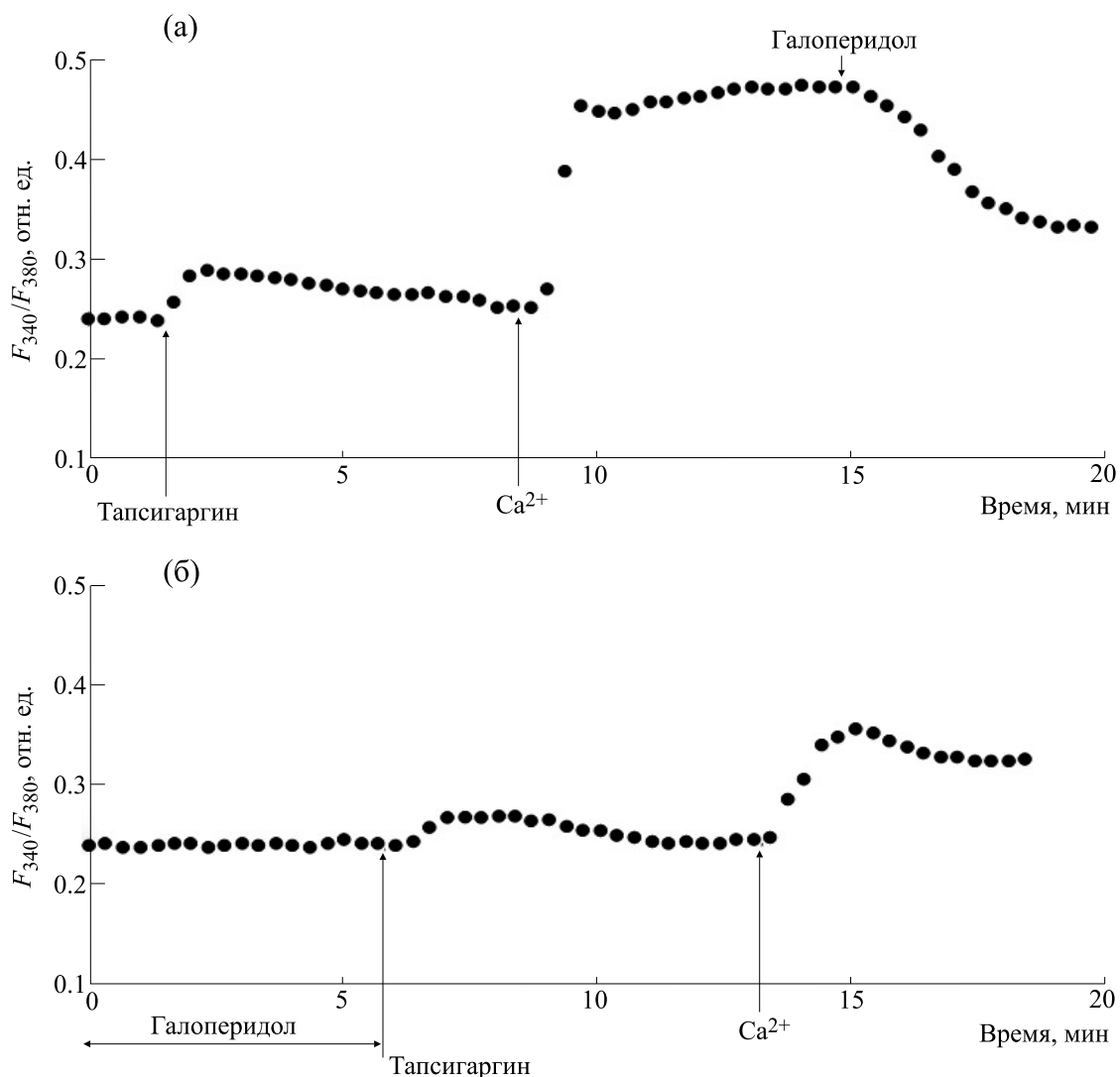


**Рис. 2.** Влияние галоперидола на увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах крысы, вызываемое моликсаном: (а) – клетки инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл моликсана в номинально бескальциевой среде, затем вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ ; на фоне развившегося входа  $Ca^{2+}$  добавляли 30 мкг/мл галоперидола; (б) – макрофаги предварительно инкубировали в течение 10 мин с 30 мкг/мл галоперидола в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл моликсана, через 20 мин вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ .

только в активации, но и в поддержании депозависимого входа  $Ca^{2+}$  в макрофаги.

Таким образом, в настоящей работе мы впервые на перитонеальных макрофагах крысы показали, что антагонист рецепторов сигма-1 нейролептик галоперидол подавляет в макрофагах обе фазы  $Ca^{2+}$ -ответов, вызываемых глутоксимом или моликсаном, а также тапсигаргином и ЦПК. Результаты согласуются с данными исследований других авторов, которые обнаружили, что лиганды рецепторов сигма-1 нейролептики фенотиазинового ряда хлорпромазин и трифлуоперазин подавляют мобилизацию  $Ca^{2+}$  из депо и последую-

ющий депозависимый вход  $Ca^{2+}$ , вызываемые АТФ или тапсигаргином, в клетках лейкоза человека (линия HL-60) [30, 31]. Показано также, что хлорпромазин ингибирует депозависимый вход  $Ca^{2+}$ , индуцируемый брадикинином или тапсигаргином в клетках феохромоцитомы крысы (линия PC12) [32], а преинкубация клеток с трифлуоперазином приводит к существенному подавлению депозависимого входа  $Ca^{2+}$ , вызываемого тапсигаргином, в клетках эмбриональной почки человека (линия НЕК-293) [33]. Обнаружено, что антагонисты сигма-1 рецепторов (вещества BD1063 и BD1047) ингибируют депозависимый



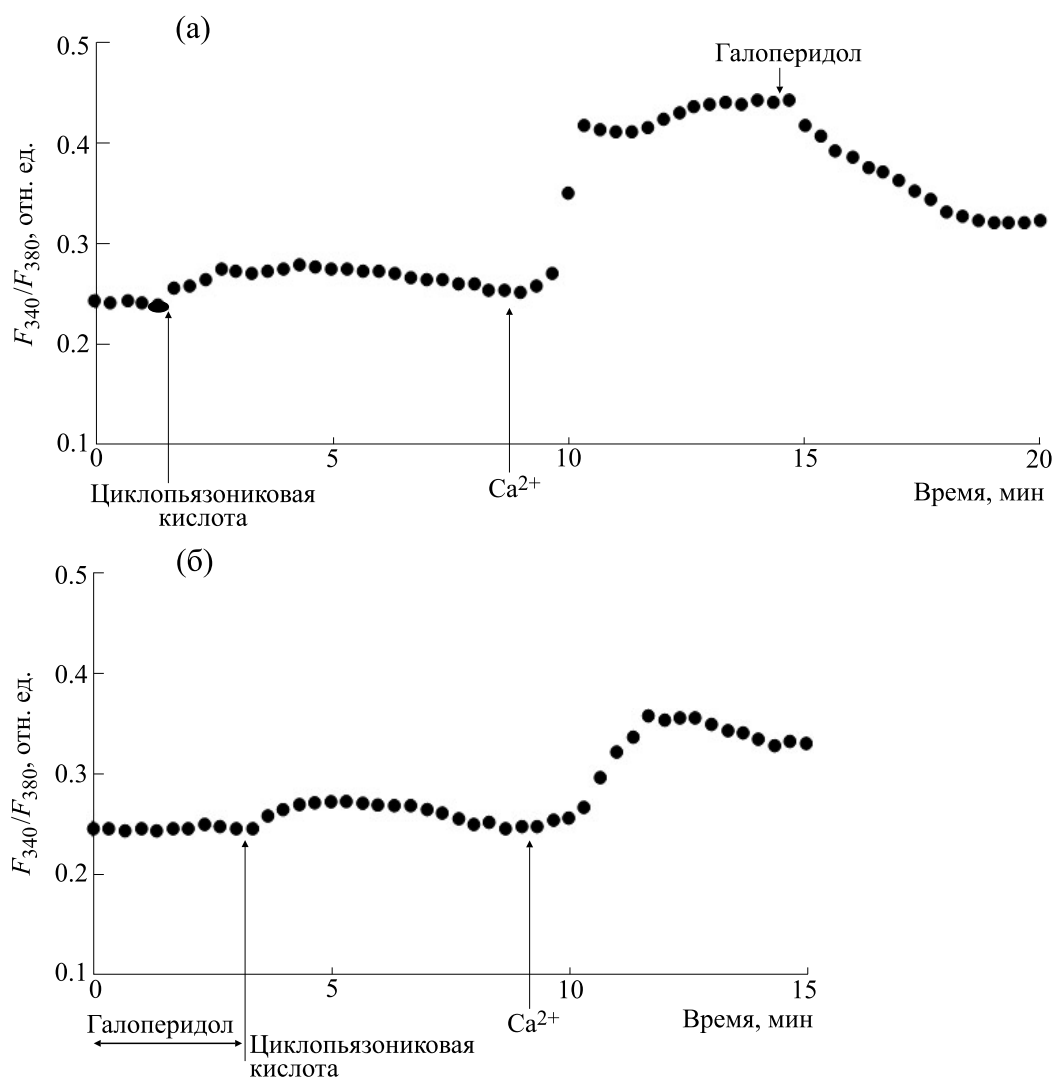
**Рис. 3.** Влияние галоперидола на  $Ca^{2+}$ -ответы, индуцируемые тапсигаргином в перитонеальных макрофагах крысы: (а) – макрофаги стимулировали 0.5 мкМ тапсигаргина в номинально бескальциевой среде, затем вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ ; на фоне развившегося депозависимого входа  $Ca^{2+}$  добавляли 30 мкг/мл галоперидола; (б) – макрофаги предварительно инкубировали в течение 10 мин с 30 мкг/мл галоперидола в бескальциевой среде, затем добавляли 0.5 мкМ тапсигаргина, после чего вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ .

вход  $Ca^{2+}$ , индуцируемый гистамином в эндотелиальных клетках подкожной вены ноги человека [34], а VD1063 значительно подавляет депозависимый вход  $Ca^{2+}$ , вызываемый тапсигаргином, в клетках аденокарциномы молочной железы человека (линия MCF7) [35].

Кроме того, известно, что галоперидол ингибирует потенциалзависимые  $Ca^{2+}$ -каналы в клетках разных типов. Так, галоперидол и хлорпромазин блокируют потенциалзависимые  $Ca^{2+}$ -каналы в гладкомышечных клетках аорты кролика [36]. Галоперидол ингибирует  $Ca^{2+}$ -каналы L-типа в нейронах гиппокампа мыши [37] и кардио-

миоцитах крысы [38],  $Ca^{2+}$ -каналы N-, L-, P/Q- и R-типов в симпатических и парасимпатических нейронах крысы [39] и  $Ca^{2+}$ -каналы T-типа в клетках эмбриональной почки человека (линия HEK293) [40].

Результаты настоящей работы о подавлении антагонистом рецепторов сигма-1 галоперидолом  $Ca^{2+}$ -ответов, вызываемых глутоксимом и моликсаном в макрофагах, свидетельствуют о возможном участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, запускаемом глутоксимом или моликсаном и приводящем к увеличению  $[Ca^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах



**Рис. 4.** Влияние галоперидола на  $Ca^{2+}$ -ответы, индуцируемые циклопязониковой кислотой в перитонеальных макрофагах крысы: (а) – макрофаги стимулировали 10 мкМ циклопязониковой кислоты в номинально бескальциевой среде, затем вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ ; на фоне развившегося депозависимого входа  $Ca^{2+}$  добавляли 30 мкг/мл галоперидола; (б) – макрофаги предварительно инкубировали в течение 10 мин с 30 мкг/мл галоперидола в бескальциевой среде, затем добавляли 10 мкМ циклопязониковой кислоты, после чего вход  $Ca^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ .

крыс. Результаты указывают также на нежелательность совместного применения в клинической практике препаратов глутоксима или моликсана и нейролептика галоперидола.

Полученные нами данные свидетельствуют также об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа  $Ca^{2+}$ , индуцируемого дисульфидсодержащими иммуномодуляторами и ингибиторами эндоплазматических  $Ca^{2+}$ -АТФаз, в перитонеальных макрофагах крыс, и позволяют рассматривать рецепторы сигма-1 в качестве нового регуляторного компонента сигнального комплекса депозависимого входа  $Ca^{2+}$  в макрофагах. Рецепторы сигма-1 могут влиять на депозависимый вход  $Ca^{2+}$ , модулируя связывание между основными компонентами белкового комплекса депозависимого входа  $Ca^{2+}$  – белками STIM1 в мембране эндоплазматического ретикулума и Orai1 в плазмалемме [12].

Результаты могут также способствовать более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия нейролептиков первого поколения. Кроме того, полученные данные могут иметь значение для терапии заболеваний, опосредованных нарушением функционирования рецепторов сигма-1. Так, известно, что изменения субклеточной локализации, экспрессии и сигнальных функций рецепторов

сигма-1 приводят к развитию широкого ряда заболеваний человека [2–5]. Выявлено участие этих рецепторов в патофизиологии нейропсихиатрических (шизофрении, тревожных расстройств, депрессивных состояний и деменции), нейродегенеративных (болезней Альцгеймера, Хантингтона и Паркинсона, бокового амиотрофического склероза), онкологических и сердечнососудистых заболеваний, болевых синдромов и ретинопатий [2–5, 10, 41, 42]. Это позволило рассматривать рецепторы сигма-1 как перспективные фармакологические мишени для терапии этих заболеваний.

В последнее время изучается также возможная роль сигма-1 рецепторов в патофизиологии коронавирусной инфекции (COVID-19). Появляются данные, что рецепторы сигма-1 могут быть перспективной терапевтической мишенью при лечении пациентов с COVID-19. Полагают, что рецепторы сигма-1 регулируют ключевые механизмы адаптивного стрессового ответа клеток-хозяев и принимают участие в ранних стадиях репликации вируса [43, 44]. Обнаружено, что белок NSP6 вируса SARS-CoV-2 взаимодействует с рецепторами сигма-1, играющими важную роль в регуляции стресса эндоплазматического ретикула [45].

Многие перепрофилированные лекарства, включенные в схемы комплексной терапии пациентов с COVID-19, часто идентифицируются как лиганды рецепторов сигма-1. К их числу относятся нейрелептики галоперидол, хлорпромазин и трифлуоперазин [43, 46]. Показано, что они эффективно ингибируют репликацию и рост вируса SARS-CoV-2 [45]. Так, галоперидол имеет значительную антивирусную активность, сильно связывается с белком NSP6 вируса SARS-CoV-2 [47] и ингибирует репликацию SARS-CoV-2 в клетках эпителия легких человека (линия Calu-3) и клетках обезьяны (линия VeroE6) [45, 48]. Лиганды рецепторов сигма-1 галоперидол [49] и хлорпромазин [50] уже прошли клинические испытания в качестве препаратов для терапии пациентов с COVID-19.

Известно также, что вирусы выработали механизмы нарушения  $Ca^{2+}$ -гомеостаза клеток-хозяев и увеличивают  $[Ca^{2+}]_i$ , поскольку  $Ca^{2+}$  необходим для проникновения вируса в клетку, для репликации, созревания и освобождения вируса [51, 52]. В связи с этим, блокирование вызванного вирусом увеличения  $[Ca^{2+}]_i$  путем ингибирования каналов кальциевого выброса в мембране эндоплазматического ретикула (рецепторов инозитол-1,4,5-трифосфата и риадиноновых рецепторов) или каналов входа  $Ca^{2+}$  в плазмалемму (потенциалзависимых и депозависимых  $Ca^{2+}$ -каналов) является одним из подходов в терапии вирусных инфекций [52]. Так, обнаружено, что бло-

каторы потенциалзависимых  $Ca^{2+}$ -каналов нифедипин и амлодипин снижают смертность и уменьшают риск необходимости искусственной вентиляции легких у пожилых пациентов с COVID-19 и гипертензией [53, 54]. Показано также, что внутривенное введение пациентам с тяжелой пневмонией при COVID-19 блокатора депозависимых  $Ca^{2+}$ -каналов соединения Аухага стабилизирует эндотелий легких и ингибирует выделение провоспалительных цитокинов, тем самым существенно облегчая и ускоряя выздоровление пациентов [55, 56].

Таким образом, полученные нами данные о подавлении антагонистом рецепторов сигма-1 галоперидолом обеих фаз  $Ca^{2+}$ -ответов, индуцируемых дисульфидсодержащими иммуномодуляторами и ингибиторами эндоплазматических  $Ca^{2+}$ -АТФаз в перитонеальных макрофагах крыс, дополнительно подтверждают многогранность эффектов нейрелептиков и свидетельствуют в пользу их терапевтического потенциала, как лигандов рецепторов сигма-1.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках договоров СПбГУ на выполнение научно-исследовательских работ № 01/18-НИОКР от 05.03.2018 и № 05/03-20 от 12.03.2020.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание животных и все манипуляции с ними выполняли в соответствии с нормативными документами и требованиями Приказа Минздрава России № 267 от 19.06.03 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. T.-P. Su, T.-C. Su, Y. Nakamura, et al., *Trends Pharmacol. Sci.*, **37**, 262 (2016).
2. C. G. Rousseaux and S. F. Greene, *J. Recept. Signal Transduct.*, **36**, 327 (2016).
3. H. R. Schmidt and A. C. Kruse, *Trends Pharmacol. Sci.*, **40**, 636 (2019).
4. R. Aishwarya, C. S. Abdullah, M. Morshed, et al., *Front. Physiol.*, **12**, 705575 (2021).
5. B. Penke, L. Fulop, M. Szucs, et al., *Curr. Neuropharmacol.*, **16**, 97 (2018).



6. E. J. Cobos, J. M. Entrena, F. R. Nieto, et al., *Curr. Neuropharmacol.*, **6**, 344 (2008).
7. T. Maurice and T.-P. Su, *Pharmacol. Ther.*, **124**, 195 (2009).
8. U. B. Chu and A. E. Ruoho, *Mol. Pharmacol.*, **89**, 142 (2016).
9. S. W. Tam and L. Cook, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5618 (1984).
10. I. Pontisso and L. Combettes, *Genes*, **12**, 139 (2021).
11. T. Hayashi and T.-P. Su, *Cell*, **131**, 596 (2007).
12. S. Srivats, D. Balasuriya, M. Pasche, et al., *J. Cell Biol.*, **213**, 65 (2016).
13. G. C. Brailoiu, E. Deliu, L. M. Console-Bram, et al., *Biochem. J.*, **473**, 1 (2016).
14. S. Berlansky, C. Humer, M. Sallinger, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 471 (2021).
15. Л. С. Миленина, З. И. Крутецкая, В. Г. Антонов и др., *Биофизика*, **66** (1), 92 (2021).
16. Л. С. Миленина, З. И. Крутецкая, В. Г. Антонов и др., *Цитология*, **64** (1), 58 (2022).
17. E. J. Cobos, E. Del Pozo, and J. M. Baeyens, *J. Neurochem.*, **102**, 812 (2007).
18. G. Ayano, *Res. Rev. J. Chem.*, **5**, 53 (2016).
19. C. Randriamampita and A. Trautmann, *Cell. Biol.*, **105**, 761 (1987).
20. R. A. Monahan, H. F. Dvorak, and A. M. Dvorak, *Blood*, **58**, 1089 (1981).
21. Q. Xie, Y. Zhang, C. Zhai, et al., *J. Biol. Chem.*, **277**, 16559 (2002).
22. G. Gryniewicz, M. Poenie, and R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.*, **260**, 3440 (1985).
23. А. Е. Борисов, Л. А. Кожемякин, А. Е. Антушевич и др., *Вестн. хирургии им. И.И. Грекова*, **4** (2), 32 (2001).
24. Г. Б. Соколова, М. В. Сеницын, Л. А. Кожемякин и др., *Антибиотики и химиотерапия*, **47** (2), 20 (2002).
25. А. А. Антушевич, В. Г. Антонов, А. Н. Гребенюк и др., *Вестн. Рос. воен.-мед. акад.*, **3** (43), 32 (2013).
26. О. А. Толстой, В. Н. Цыган, А. Г. Климов и др., *Известия Рос. воен.-мед. акад.*, **38** (1), 271 (2019).
27. M. V. Dubina, V. V. Gomonova, A. E. Taraskina, et al., <https://doi.org/10.1101/2020.09.25.20199562> (medrxiv.org 06.10.2020) (2020).
28. Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев и др., *Цитология*, **50** (5), 452 (2008).
29. Л. С. Курилова, З. И. Крутецкая, О. Е. Лебедев и др., *Цитология*, **54** (2), 135 (2012).
30. J. L. Harper, Y. Shin, and J. W. Daly, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 14912 (1997).
31. J. L. Harper and J. W. Daly, *Drug Dev. Res.*, **47**, 107 (1999).
32. S.-Y. Choi, Y.-H. Kim, Y.-K. Lee, et al., *British J. Pharmacol.*, **132**, 411 (2001).
33. L. Wang, L. Zhang, S. Li et al., *Sci. Rep.*, **5**, 1 (2015).
34. M. S. Amer, L. McKeown, S. Tumova, et al., *Brit. J. Pharmacol.*, **168**, 1445 (2013).
35. G. Gasparre, C. Abate, R. Carlucci, et al., *Pharmacol. Rep.*, **69**, 542 (2017).
36. S. F. Flaim, M. D. Brannan, S. C. Swioart et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 1237 (1985).
37. J. Church and E. J. Fletcher, *Brit. J. Pharmacol.*, **116**, 2801 (1995).
38. B. Tarabova, M. Novakova, and L. Lacinova, *Gen. Physiol. Biophys.*, **28**, 249 (2009).
39. H. Zhang and J. Cuevas, *J. Neurophysiol.*, **87**, 2867 (2002).
40. C. M. Santi, F. S. Cayabyab, K. G. Sutton, et al., *J. Neurosci.*, **22**, 396 (2002).
41. S.-Y. Tsai, T. Hayashi, T. Mori, et al., *Cent. Nerv. Syst. Agents Med. Chem.*, **9**, 184 (2009).
42. M. V. Voronin, Y. V. Vakhitova, and S. B. Seredenin, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 7088 (2020).
43. J. M. Vela, *Front. Pharmacol.*, **11**, 582310 (2020).
44. K. Hashimoto, *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.*, **271**, 249 (2021).
45. D. E. Gordon, G. M. Jang, M. Bouhaddou, et al., *Nature*, **583**, 459 (2020).
46. M. Plaze, D. Attali, A.-C. Petit, et al., *L'Encephale*, **46**, 169 (2020).
47. P. Pandey, K. Prasad, A. Prakash, et al., *J. Mol. Med.*, **98**, 1659 (2020).
48. B. L. Le, G. Andreoletti, T. Oskotsky, et al., *Sci. Rep.*, **11**, 12310 (2021).
49. N. Hoertel, M. Sanchez-Rico, R. Vernet, et al., *PLoS One*, **16**, e0247122 (2021).
50. N. Hoertel, M. Sanchez-Rico, R. Vernet, et al., *Clin. Drug Invest.*, **41**, 221 (2021).
51. Y. Zhoua, T. K. Freyby, and J. J. Yanga, *Cell Calcium*, **46**, 1 (2009).
52. X. Chen, R. Cao, and W. Zhong, *Cells*, **9**, 94 (2019).
53. I. Solaimanzadeh, *Cureus*, **12**, e8069 (2020).
54. L.-K. Zhang, Y. Sun, H. Zeng, et al., *Cell Discovery*, **6**, 96 (2020).
55. J. Miller, C. Bruen, M. Schnaus, et al., *Crit. Care*, **24**, 502 (2020).
56. S. Berlansky, M. Sallinger, H. Grabmayr, et al., *Cells*, **11**, 253 (2022).

## Haloperidol, a Sigma-1 Receptor Antagonist, Inhibits $\text{Ca}^{2+}$ Responses in Rat Peritoneal Macrophages

L.S. Milenina\*, Z.I. Krutetskaya\*, V.G. Antonov\*\*, and N.I. Krutetskaya\*

\*Saint-Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, Saint-Petersburg, 199034 Russia

\*\*Saint-Petersburg State Pediatric Medical University, Litovskaya ul. 2, Saint-Petersburg, 194100 Russia

Sigma-1 receptors are ubiquitous multifunctional ligand-operated molecular chaperones in the endoplasmic reticulum membrane and have a unique history, structure, and pharmacological profile. Sigma-1 receptors modulate a wide range of cellular processes in health and disease and  $\text{Ca}^{2+}$  signaling processes. Using the  $\text{Ca}^{2+}$  sensitive fluorescent ratiometric dye Fura-2AM, it has been shown that neuroleptic (haloperidol, an antagonist of sigma-1 receptors) significantly suppresses  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization from intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores and subsequent store-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  entry, induced by thapsigargin and cyclopiazonic acid, as inhibitors of endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases, and also by glutoxim and molixan, disulfide-containing immunomodulatory drugs, in rat peritoneal macrophages. Findings of the study revealed that sigma-1 receptors are involved in the complex signaling cascade triggered by glutoxim or molixan that leads to the increase in the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in macrophages and participate in regulation of store-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  entry in macrophages.

*Keywords: haloperidol, sigma-1 receptors, intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration, macrophages*