

## ИНГИБИТОРЫ МЕТАБОЛИЗМА АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ ПОДАВЛЯЮТ $\text{Ca}^{2+}$ -ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ТРИФЛУОПЕРАЗИНОМ, В МАКРОФАГАХ

© Л. С. Миленина,<sup>1</sup> З. И. Крутецкая, А. А. Наумова, С. Н. Бутов,  
Н. И. Крутецкая, В. Г. Антонов

Кафедра биофизики С.-Петербургского государственного университета,  
Санкт-Петербург, 199034;

<sup>1</sup> электронный адрес: [cozy@mail.ru](mailto:cozy@mail.ru), [z.krutetskaya@spbu.ru](mailto:z.krutetskaya@spbu.ru)

С использованием флуоресцентного  $\text{Ca}^{2+}$ -зонда Fura-2AM исследовано влияние нейролептика трифлуоперазина на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах крыс. Обнаружено, что трифлуоперазин вызывает дозозависимое увеличение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , связанное с мобилизацией  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо и последующим входом  $\text{Ca}^{2+}$  в перитонеальные макрофаги крыс. Показано также, что ингибиторы фосфолипазы  $\text{A}_2$  (4-бромфенацилбромид, преднизолон и дексаметазон), циклооксигеназ (аспирин и индометацин) и липоксигеназ (каффеиновая кислота, zileuton и байкалейн) подавляют  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, индуцируемые трифлуоперазином, в макрофагах. Полученные данные свидетельствуют об участии ферментов и (или) продуктов каскада метаболизма арахидоновой кислоты во влиянии трифлуоперазина на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в перитонеальных макрофагах.

Ключевые слова: внутриклеточная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ , перитонеальные макрофаги, трифлуоперазин, арахидоновая кислота, фосфолипаза  $\text{A}_2$ , циклооксигеназы, липоксигеназы.

Принятые сокращения: АК — арахидоновая кислота, 4-БФБ — 4-бромфенацилбромид,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  — внутриклеточная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$ , ФЛА<sub>2</sub> — фосфолипаза  $\text{A}_2$ , ТФП — трифлуоперазин.

Трифлуоперазин (трифтазин, стелазин) (ТФП) относится к первому поколению типичных нейролептиков (антипсихотических агентов) фенотиазинового ряда, широко применяемых в терапии шизофрении и других психических заболеваний (Dilsaver, 1993). Выявлено многогранное влияние ТФП на внутриклеточные процессы (Sudeshna, Parimal, 2010).

Множественность эффектов ТФП, как и других фенотиазинов, может быть связана с его амфифильной природой. Будучи амфифильным соединением, он хорошо проникает через мембраны. Предложен механизм встраивания амфифильных антипсихотических агентов, в том числе фенотиазиновых нейролептиков, во внутренний монослой мембраны, в котором локализованы анионные фосфолипиды, в первую очередь фосфоинозитиды (Oguch et al., 2010). Благодаря этому ТФП может модулировать внутриклеточные процессы, такие как передача сигналов и внутриклеточный транспорт.

Известно, что ТФП является антагонистом  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающего белка кальмодулина, который играет ключевую роль в регуляции процессов  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналикации. Так, при связывании ТФП с комплексом  $\text{Ca}^{2+}$ -кальмодулин происходит формирование компактной глобулярной структуры, неспособной взаимодействовать с белками-мишенями (Vandonselaar et al., 1994; Feldkamp et al., 2010). Кроме того, ТФП ингибирует сборку и последующую агрегацию белка кальсеквестрина при повыше-

нии концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в полости  $\text{Ca}^{2+}$ -депо (He et al., 1993).

Обнаружено также, что фенотиазины (ТФП, хлорпромазин) влияют на  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимую активацию макрофагов и оказывают иммуномодулирующий эффект на перитонеальные макрофаги крыс (Nadjimitova et al., 2003).

Ранее нами было показано, что другой нейролептик фенотиазинового ряда — хлорпромазин — увеличивает внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$   $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , вызывая мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из  $\text{Ca}^{2+}$ -депо и последующий вход  $\text{Ca}^{2+}$  в перитонеальные макрофаги крыс (Наумова и др., 2016; Крутецкая и др., 2017). Однако механизмы, посредством которых фенотиазины вызывают увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в макрофагах, до конца не изучены.

В активации и функционировании иммунных клеток, в том числе макрофагов, важную роль играет каскад метаболизма полиненасыщенной арахидоновой кислоты (АК) (Needleman et al., 1986). АК высвобождается из мембранных липидов под действием фосфолипазы  $\text{A}_2$  (ФЛА<sub>2</sub>) и далее окисляется в клетке по трем основным ферментативным путям с образованием биологически активных продуктов — эйкозаноидов (Needleman et al., 1986). В макрофагах АК окисляется преимущественно с участием циклооксигеназ и липоксигеназ (Brown et al., 1988).

На тромбоцитах человека было ранее установлено, что психотропные соединения, в том числе ТФП, могут модулировать активность ФЛА<sub>2</sub> и продукцию метаболи-

тов циклооксигеназного и липоксигеназного путей окисления АК (Walenga et al., 1981; Oruch et al., 2008).

В связи с этим в настоящей работе была поставлена задача изучить влияние ТФП на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах и исследовать возможное участие ключевых ферментов каскада метаболизма АК во влиянии ТФП на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах крыс.

## Материал и методика

Клетки. Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс Wistar. Резидентные макрофаги выделяли из перитонеальной полости крыс массой 180—250 г по методу, описанному ранее (Conrad, 1981; Randriamampita, Trautmann, 1987). Сразу после выделения клетки имели сферическую форму (диаметр 10—20 мкм). Суспензию клеток помещали в бакпечатки, содержащие кварцевые стекла размером 10×10 мм. Клетки на стеклах культивировали в течение 1—3 сут при 37 °С в среде 199 (рН 7.2), содержащей 20 % сыворотки крови быка, глутамин (3 %), пенициллин (100 ед./мл) и стрептомицин (100 мг/мл). Тест на  $\alpha$ -нафтилэстеразу (Mohan et al., 1981) показал, что по меньшей мере 96 % клеток в монослоях были макрофагами.

Эксперименты проводили при комнатной температуре (22—24 °С) через 1—2 сут после начала культивирования клеток. Кварцевые стекла с клетками помещали в экспериментальную камеру, заполненную физиологическим раствором следующего ионного состава (в мМ): 140 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub> и 5 HEPES-NaOH, рН 7.3—7.4. Бескальциевая среда отличалась тем, что содержала 0 мМ CaCl<sub>2</sub> и 1 мМ ЭГТА. Подробно процедура культивирования макрофагов описана ранее (Крутецкая и др., 1997).

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 22—24 °С. 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:  $F_{340}/F_{380}$ , где  $F_{340}$  и  $F_{380}$  — интенсивность флуоресценции Fura-2AM, связанного и не связанного с  $Ca^{2+}$  соответственно. Отношение отражает изменения  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках во время измерений (Bruce, Elliott, 2000; Xie et al., 2002). Для избежания фотоблещения измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. В экспериментах применяли объектив 10× с апертурой 8 мм. Значения  $[Ca^{2+}]_i$  рассчитывали по уравнению Гринкевича (Grunkiewicz et al., 1985). Статистический анализ проводили с применением *t*-критерия Стьюдента. Данные

представлены в виде среднего и стандартного отклонения. Достоверными считали различия при  $P \leq 0.05$ . На рисунках представлены результаты повторяющихся экспериментов.

Использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США). Маточные растворы тапсигаргина (0.5 мМ), зилеутона (1 мМ), 4-бромфенацилбромида (4-БФБ, 10 мМ), трифлуоперазина (2 мг/мл) и Fura-2AM (1 мМ) готовили в диметилсульфоксиде. Маточные растворы индометацина (10 мМ), ацетилсалициловой кислоты (аспирин) (50 мМ), каффеиновой кислоты (5 мМ), байкалейна (5 мМ) и дексаметазона (4 мг/мл) готовили в этиловом спирте. Маточный раствор преднизолона (25 мг/мл) готовили в воде.

## Результаты и обсуждение

Влияние трифлуоперазина на внутриклеточную концентрацию  $Ca^{2+}$ . Исследовали влияние ТФП в концентрациях 2, 4, 6 и 10 мкг/мл на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах. Показано, что в среде, содержащей ионы  $Ca^{2+}$ , ТФП вызывает дозозависимое увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  (рис. 1). При приложении ТФП происходит быстрое повышение  $[Ca^{2+}]_i$  от базального уровня, равного  $92 \pm 16$  нМ, после чего наблюдается длительная фаза плато  $Ca^{2+}$ -ответа.  $[Ca^{2+}]_i$  на фазе плато составляет  $161 \pm 17$ ,  $200 \pm 15$ ,  $241 \pm 18$  и  $265 \pm 19$  нМ после добавления 2, 4, 6 и 10 мкг/мл ТФП соответственно. По каждой исследованной концентрации проведено 8 независимых экспериментов.

Увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  после введения ТФП может быть связано как с мобилизацией  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных  $Ca^{2+}$ -депо, так и с входом  $Ca^{2+}$  из наружной среды. Для выяснения механизма повышения  $[Ca^{2+}]_i$  при действии ТФП были проведены эксперименты в номинально бескальциевой среде. Показано, что добавление ТФП (2 мкг/мл) к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, вызывает существенное (до  $205 \pm 19$  нМ,  $n = 7$ ) увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , связанное с мобилизацией  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо. При введении в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$  наблюдается дальнейшее повышение  $[Ca^{2+}]_i$  до  $274 \pm 20$  нМ (рис. 2, а). Это увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  длится все

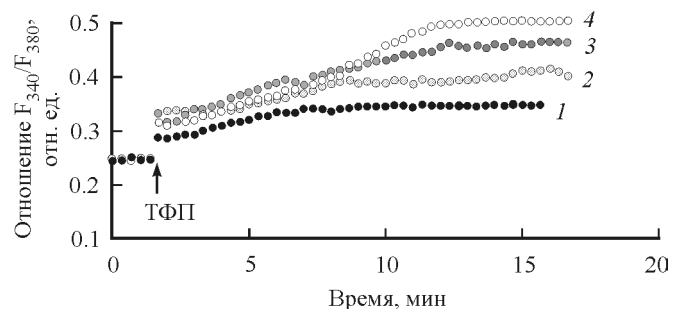


Рис. 1. Влияние трифлуоперазина (ТФП) на  $[Ca^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах крысы.

Здесь и на рис. 2—5: по оси абсцисс — время, мин; по оси ординат — отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм ( $F_{340}/F_{380}$ ), отн. ед. К макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, содержащем ионы  $Ca^{2+}$ , добавляли ТФП в концентрации 2 (кривая 1), 4 (кривая 2), 6 (кривая 3) или 10 (кривая 4) мкг/мл. Здесь и на рис. 2—5 каждая регистрация получена для группы из 40—50 клеток и представляет собой типичный повторяющийся вариант из 6—9 независимых экспериментов.

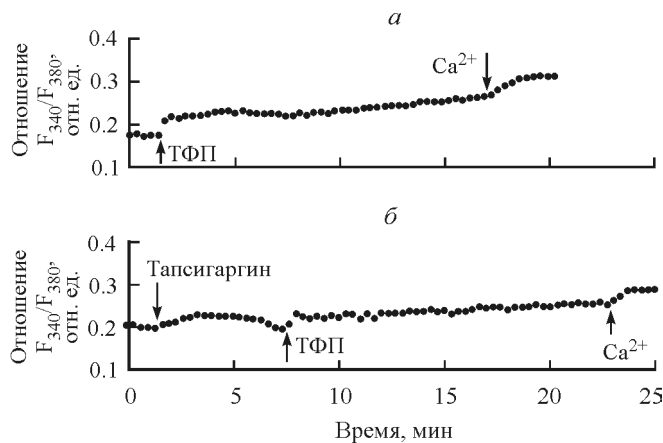


Рис. 2. Влияние ТФП на  $[Ca^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах крысы, находящихся в номинально бескальциевой среде.

*a* — макрофаги инкубировали в течение 15 мин с 2 мкг/мл ТФП в бескальциевой среде, затем вводили в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ . *б* — клетки стимулировали 0.5 мкМ тапсигаргина в бескальциевой среде, после окончания фазы мобилизации  $Ca^{2+}$  из депо, вызванной тапсигаргином, добавляли 2 мкг/мл ТФП и через 15 мин вводили в наружную среду 2 мМ  $Ca^{2+}$ .

время присутствия  $Ca^{2+}$  в среде и связано с входом  $Ca^{2+}$  из наружной среды. Вход  $Ca^{2+}$ , активируемый ТФП, обусловлен, по-видимому, опустошением  $Ca^{2+}$ -депо.

Для выяснения природы  $Ca^{2+}$ -депо, из которых происходит мобилизация  $Ca^{2+}$  при действии ТФП, были проведены эксперименты с использованием специфического ингибитора (Thastrup et al., 1989) эндоплазматических  $Ca^{2+}$ -АТФаз тапсигаргина. Макрофаги вначале стимулировали 0.5 мкМ тапсигаргина в номинально бескальциевой среде, после окончания фазы мобилизации  $Ca^{2+}$  из депо, вызванной тапсигаргином, клетки инкубировали с 2 мкг/мл ТФП в течение 15 мин до введения 2 мМ  $Ca^{2+}$  (рис. 2, *б*). В этих условиях происходит существенное уменьшение мобилизации  $Ca^{2+}$  из депо (на  $43.7 \pm 11.2\%$ ,  $n = 7$ ), индуцируемой ТФП. Это свидетельствует о том, что мобилизация  $Ca^{2+}$  из депо при действии ТФП происходит как из тапсигаргин-чувствительных  $Ca^{2+}$ -депо, таких как эндоплазматический ретикулум, так и из других внутриклеточных  $Ca^{2+}$ -депо, возможно митохондрий.

Полученные результаты согласуются с данными, представленными в литературе. Так, ТФП вызывает увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках глиобластомы, связанное с высвобождением  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных  $Ca^{2+}$ -депо, чувствительных к инозитол-1,4,5-трифосфату ( $IP_3$ ) (Kang et al., 2017). Этот эффект ТФП связан с ингибированием кальмодулина подтипа 2 (CaM2) и как следствие — с необратимой активацией  $IP_3$ -рецептора (Kang et al., 2017). Кроме того, ТФП вызывает активацию риаудиновых рецепторов и мобилизацию  $Ca^{2+}$  из депо в кардиомиоцитах кошки и кролика (Qin et al., 2009). В экспериментах *in vitro* было выявлено, что ТФП может непосредственно активировать риаудиновые рецепторы, увеличивая вероятность открытого состояния канала (Qin et al., 2009).

Таким образом, нами впервые показано, что ТФП вызывает увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , связанное с мобилизацией  $Ca^{2+}$  из  $Ca^{2+}$ -депо и последующим входом  $Ca^{2+}$  в перитонеальные макрофаги крысы. Механизм, посредством которого ТФП вызывает мобилизацию  $Ca^{2+}$  из депо, требует дальнейших исследований. Относительно быстрая кинетика высвобождения  $Ca^{2+}$  из депо под действием ТФП позво-

ляет предположить активацию  $IP_3$ -чувствительных каналов  $Ca^{2+}$ -выброса в мембране  $Ca^{2+}$ -депо. Кроме того, мобилизация  $Ca^{2+}$  из депо, вызываемая ТФП, имеет стационарную фазу (фазу плато). Это может свидетельствовать о предотвращении выведения  $Ca^{2+}$  из цитозоля. Можно предположить, что ТФП ингибирует  $Ca^{2+}$ -АТФазы в мембране  $Ca^{2+}$ -депо и в плазмалемме макрофагов. В пользу этого предположения свидетельствуют данные о том, что ТФП и другие производные фенотиазина ингибируют сарко(эндо)плазматические  $Ca^{2+}$ -АТФазы в клетках мозжечка и скелетных мышцах (Khan et al., 2000).

Влияние ТФП на процессы  $Ca^{2+}$ -сигнализации в клетках может лежать в основе побочных эффектов антипсихотических агентов, наблюдаемых в кардиологии, таких как удлинение QT-интервала, тахикардия и аритмия (Buckle, Sanders, 2000).

Для выявления участия основных путей метаболизма АК во влиянии ТФП на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах были проведены эксперименты в среде, содержащей ионы  $Ca^{2+}$ . В контрольных экспериментах показано, что инкубация

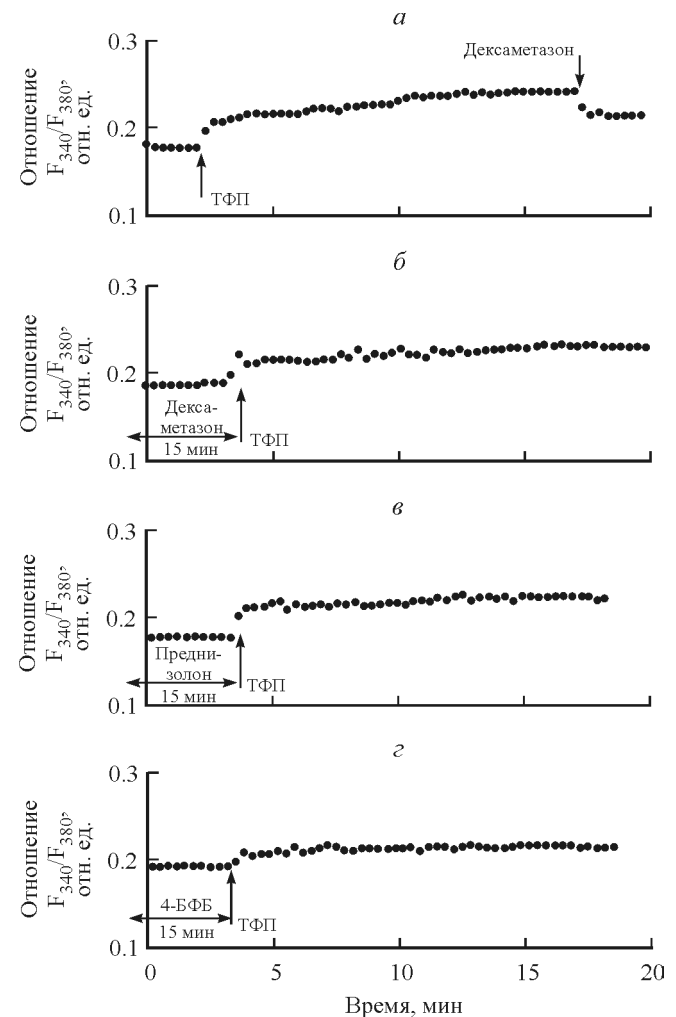


Рис. 3. Влияние ингибиторов фосфолипазы  $A_2$  на  $Ca^{2+}$ -ответы, индуцируемые ТФП в перитонеальных макрофагах крысы.

*a* — к макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, содержащем ионы  $Ca^{2+}$ , добавляли 4 мкг/мл ТФП; на фоне развившегося  $Ca^{2+}$ -ответа вводили 16 мкг/мл дексаметазона. *б–г* — макрофаги, находящиеся в нормальном физиологическом растворе, инкубировали в течение 15 мин с 8 мкг/мл дексаметазона (*б*), 25 мкг/мл преднизолона (*в*) или 20 мкМ 4-БФБ (*г*), затем вводили 4 мкг/мл ТФП.

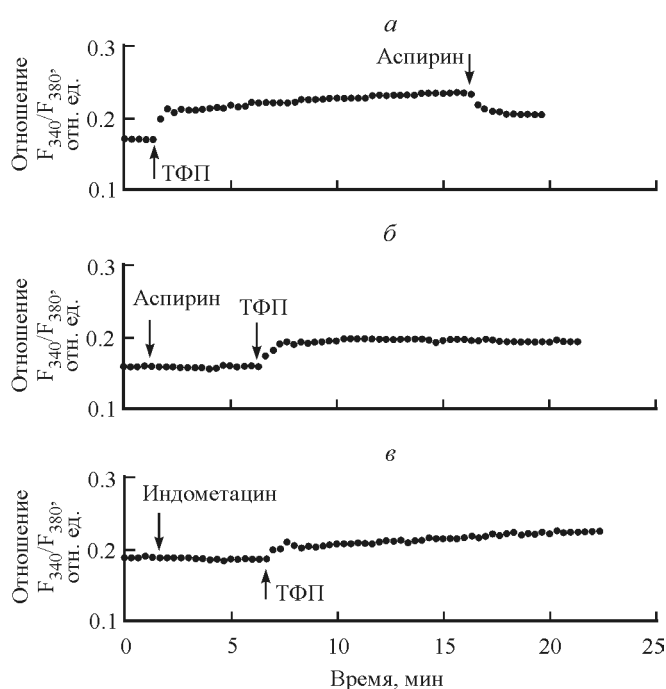


Рис. 4. Влияние ингибиторов циклооксигеназ на увеличение  $[Ca^{2+}]_i$ , вызываемое ТФП в перитонеальных макрофагах крысы.

*a* — к макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, содержащем ионы  $Ca^{2+}$ , добавляли 4 мкг/мл ТФП; на фоне развившегося  $Ca^{2+}$ -ответа вводили 100 мкМ аспирина. *b*, *v* — макрофаги, находящиеся в нормальном физиологическом растворе, инкубировали в течение 5 мин с 100 мкМ аспирина (*b*) или 10 мкМ индометацина (*v*), затем вводили 4 мкг/мл ТФП.

клеток с 4 мкг/мл ТФП вызывает увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  от базального уровня, равного  $92 \pm 17$  нМ, до  $221 \pm 25$  нМ ( $n = 14$ ) (рис. 3, *a*; 4, *a*; 5, *a*).

Влияние ингибиторов фосфолипазы  $A_2$ . Для выявления участия ФЛА<sub>2</sub> во влиянии ТФП на  $[Ca^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах крысы использовали структурно различные ингибиторы ФЛА<sub>2</sub>: 4-БФБ (Irvine, 1982) и синтетические глюкокортикоиды дексаметазон и преднизолон (Gewert, Sundler, 1995).

Обнаружено, что преинкубация макрофагов с 8 мкг/мл дексаметазона в течение 15 мин до введения 4 мкг/мл ТФП приводит к существенному подавлению  $Ca^{2+}$ -ответов (на  $37.6 \pm 9.3$  %,  $n = 7$ ), вызываемых ТФП (рис. 3, *b*). Аналогичные результаты получены при применении 25 мкг/мл преднизолона. Подавление  $Ca^{2+}$ -ответов, индуцируемых ТФП, при воздействии преднизолона составило  $54.3 \pm 13.5$  % ( $n = 7$ ) (рис. 3, *в*). Преинкубация клеток с 20 мкМ 4-БФБ в течение 15 мин до введения 4 мкг/мл ТФП также приводила к существенному подавлению  $Ca^{2+}$ -ответов (на  $37.6 \pm 8.8$  %,  $n = 7$ ), вызываемых ТФП (рис. 3, *з*).

Показано также, что введение 16 мкг/мл дексаметазона (рис. 3, *a*) или 25 мкг/мл преднизолона (не показано) на фоне развившегося плато  $Ca^{2+}$ -ответа, индуцированного ТФП, вызывает уменьшение  $[Ca^{2+}]_i$  на  $35.0 \pm 9.7$  или  $46.4 \pm 9.2$  % соответственно. При добавлении 40 мкМ 4-БФБ на фоне фазы плато  $Ca^{2+}$ -ответа, вызванного ТФП, также наблюдается существенное уменьшение  $[Ca^{2+}]_i$  (на  $33.8 \pm 11.4$  %,  $n = 7$ ) в макрофагах.

Полученные результаты свидетельствуют об участии ФЛА<sub>2</sub>, ключевого фермента каскада метаболизма

АК, во влиянии ТФП на  $[Ca^{2+}]_i$  в перитонеальных макрофагах.

Глюкокортикоиды широко используются как стероидные противовоспалительные, антиаллергические и противошоковые лекарственные средства (Becker, 2013). Полученные нами результаты позволяют предположить нежелательность совместного применения в клинической практике нейролептика ТФП и глюкокортикоидов дексаметазона или преднизолона.

Влияние ингибиторов циклооксигеназ. Для выявления участия циклооксигеназного пути окисления АК во влиянии ТФП на  $[Ca^{2+}]_i$  в макрофагах использовали структурно различные ингибиторы циклооксигеназ — ацетилсалициловую кислоту (аспирин) и индометацин (De Witt et al., 1990; Mitchell et al., 1994).

Показано, что преинкубация клеток со 100 мкМ аспирина (рис. 4, *b*) или 10 мкМ индометацина (рис. 4, *v*) в течение 5 мин до введения 4 мкг/мл ТФП приводит к подавлению увеличения  $[Ca^{2+}]_i$ , вызываемого ТФП, по сравнению с контрольными экспериментами. Подавление  $Ca^{2+}$ -ответов (индуцируемых ТФП) аспирином и индометацином составило  $44.8 \pm 10.6$  и  $44.4 \pm 10.2$  % соот-

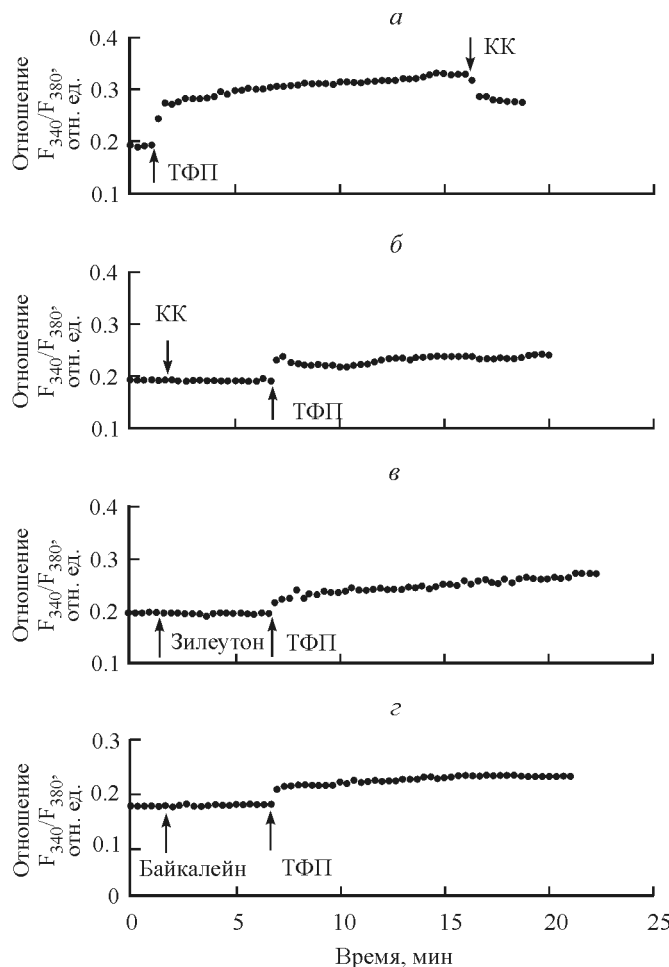


Рис. 5. Влияние ингибиторов липоксигеназ на  $Ca^{2+}$ -ответы, вызываемые ТФП в перитонеальных макрофагах крысы.

*a* — к макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, добавляли 4 мкг/мл ТФП; на фоне развившегося  $Ca^{2+}$ -ответа вводили 20 мкМ кофеиновой кислоты (КК). *б*–*в* — макрофаги, находящиеся в нормальном физиологическом растворе, инкубировали в течение 5 мин с 10 мкМ КК (*б*), 2 мкМ zileутона (*в*) или 10 мкМ байкалейна (*з*), затем добавляли 4 мкг/мл ТФП.



ветственно ( $n = 9$  для каждого из фармакологических агентов).

Обнаружено также, что при введении 100 мкМ аспирина (рис. 4, *a*) или 40 мкМ индометацина (не показано) во время развившегося плато  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа, вызываемого ТФП, происходит снижение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  на  $60.1 \pm 13.7$  ( $n = 8$ ) и  $43.0 \pm 8.5$  % ( $n = 6$ ) соответственно.

Полученные данные позволяют предположить, что циклооксигеназы и (или) их продукты принимают участие в формировании  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов, вызываемых ТФП в перитонеальных макрофагах.

Ингибиторы циклооксигеназ индометацин и аспирин — нестероидные противовоспалительные агенты, которые обладают противовоспалительным, анальгетическим и жаропонижающим эффектами (Dubois et al., 1998). Полученные нами результаты свидетельствуют о нежелательности совместного клинического применения ТФП с лекарственными средствами на основе индометацина или аспирина.

Влияние ингибиторов липоксигеназ. В экспериментах использовали селективные ингибиторы 5-липоксигеназ — каффеиковую (3,4-дигидроксицинамную) кислоту (КК) (Chung et al., 2004) и противовоспалительный агент zileuton (N-[1-(1-бензотиен-2-ил)этил]-N-гидроксимочевина, Zylflo®) (Wenzel, Kamada, 1996), а также селективный ингибитор 12/15-липоксигеназ флавоноид байкалейн (Van Leyen et al., 2006).

Показано, что преинкубация макрофагов с 10 мкМ каффеиковой кислоты в течение 5 мин до введения 4 мкг/мл ТФП приводит к существенному (на  $61.4 \pm 14.2$  %,  $n = 7$ ) подавлению  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов, вызываемых ТФП (рис. 5, *б*). Аналогичные результаты получены при использовании 2 мкМ zileutona (рис. 5, *в*) или 10 мкМ байкалейна (рис. 5, *з*). Подавление  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов, вызываемых ТФП, при воздействии zileutona составило  $34.6 \pm 10.5$  % ( $n = 7$ ), а при воздействии байкалейна —  $58.8 \pm 7.6$  % ( $n = 6$ ).

Обнаружено также, что введение 20 мкМ каффеиковой кислоты (рис. 5, *a*), 4 мкМ zileutona или 20 мкМ байкалейна (не показано) на фоне развившегося плато  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа, индуцированного ТФП, вызывает уменьшение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  на  $46.3 \pm 12.4$ ,  $33.5 \pm 8.2$  или  $52.9 \pm 3.0$  % соответственно ( $n = 7$  для каждого из агентов).

Полученные нами данные свидетельствуют об участии 5- и 12/15- липоксигеназ и (или) продуктов окисления АК с участием этих ферментов во влиянии ТФП на  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в макрофагах. Кроме того, результаты указывают на нежелательность совместного клинического применения нейролептика ТФП и противовоспалительного агента zileutona.

Таким образом, в настоящей работе впервые на перитонеальных макрофагах крысы показано, что ферменты и (или) продукты каскада метаболизма АК играют важную роль во влиянии ТФП на процессы  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации в перитонеальных макрофагах крысы.

Участие ферментов каскада метаболизма АК во влиянии ТФП на  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  может быть объяснено моделью встраивания амфифильных антипсихотических агентов, в том числе фенотиазиновых нейролептиков, во внутренний монослой мембраны, в котором локализованы анионные фосфолипиды. Трициклическое гидрофобное кольцо молекулы ТФП встраивается в гидрофобную фазу мембраны, в то время как алкильный фрагмент с терминальной аминогруппой взаимодействует с полярными головками кислых липидов (Oruch et al., 2010; Jaszczyszyn et al., 2012). Это может приводить к изменению жидкостности

мембраны и функционирования мембранно-связанных ферментов, таких как фосфолипаза  $A_2$ , запускающая каскад метаболизма АК. В свою очередь ферменты и (или) продукты метаболизма АК участвуют в формировании  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов, вызываемых ТФП.

Полученные нами результаты о влиянии ТФП на процессы  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации в макрофагах способствуют пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия ТФП.

Кроме того, полученные данные указывают на нежелательность совместного клинического применения нейролептика ТФП со стероидными и нестероидными противовоспалительными средствами или противоастматическим агентом zileутоном.

### Список литературы

Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Тюшев В. Е., Крутецкая Н. И., Рощина Н. Г. 1997. Влияние ингибиторов тирозинкиназы и тирозинфосфатазы на вход  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцируемый АТФ и тапсигаргином в перитонеальных макрофагах. Цитология. 39 (2/3) : 164—176. (Krutetskaya Z. I., Lebedev O. E., Tyushchev V. E., Krutetskaya N. I., Roschina N. G. 1997. The effect of tyrosine kinase and tyrosine phosphatase inhibitors on  $\text{Ca}^{2+}$ -entry induced by ATP and thapsigargin in peritoneal macrophages. Tsitologiya. 39 (2/3) : 164—176.)

Крутецкая З. И., Миленина Л. С., Наумова А. А., Бутов С. Н., Антонов В. Г., Ноздрачев А. Д. 2017. Влияние хлорпромазина на внутриклеточную концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах. Докл. РАН. 474 (1) : 116—118. (Krutetskaya Z. I., Milenina L. S., Naumova A. A., Butov S. N., Antonov V. G., Nozdrachev A. D. 2017. The effect of chlorpromazine on intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in macrophages. Dokl. Biochem. Biophys. 474 : 162—164.)

Наумова А. А., Крутецкая З. И., Миленина Л. С., Крутецкая Н. И., Бутов С. Н. 2016. Хлорпромазин вызывает  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы в макрофагах. Мед. акад. журн. 16 (4) : 62—63. (Naumova A. A., Krutetskaya Z. I., Milenina L. S., Krutetskaya N. I., Butov S. N. 2016. Chlorpromazine induces  $\text{Ca}^{2+}$  responses in macrophages. Med. Acad. J. (Russ.). 16 : 62—63.)

Becker D. E. 2013. Basic and clinical pharmacology of glucocorticosteroids. Anesth. Prog. 60 : 25—32.

Brown G. P., Monick M. M., Hunninghake G. W. 1988. Human alveolar macrophage arachidonic acid metabolism. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 254 : C809—C815.

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.

Buckley N. A., Sanders P. 2000. Cardiovascular adverse effects of antipsychotic drugs. Drug Saf. 23 : 215—228.

Chung T.-W., Moon S.-K., Chang Y.-C., Ko J.-H., Lee Y.-C., Cho G., Kim S.-H., Kim J.-G., Kim C.-H. 2004. Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism. J. Fed. Amer. Soc. Exp. Biol. 18 : 1670—1681.

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

De Witt D. L., El Harish E. A., Kraemer S. A., Andrews M. J., Yao E. F., Armstrong R. L., Smith W. L. 1990. The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. J. Biol. Chem. 265 : 5192—5198.

Dilsaver S. C. 1993. Antipsychotic agents: A review. Amer. Fam. Phys. 47 : 199—204.

Dubois R. N., Abramson S. B., Crofford L., Gupta R. A., Simon L. S., Van de Putte L. B. A., Lipsky P. E. 1998. Cyclooxygenase in biology and disease. FASEB J. 12 : 1063—1073.

Feldkamp M. D., O'Donnell S. E., Yu L., Shea M. A. 2010. Allosteric effects of the antipsychotic drug trifluoperazine on ener-

getics of calcium binding by calmodulin. *Proteins*. 78 : 2265—2282.

Gewert K., Sundler R. 1995. Dexametazone down-regulates the 85 kDa phospholipase A<sub>2</sub> in mouse macrophages and suppresses its activation. *Biochem. J.* 307 : 499—504.

Grynkiewicz 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.

Hadjimitova V., Bakalova R., Traykov T., Ohba H., Ribarov S. 2003. Effect of phenothiazines on protein kinase C- and calcium-dependent activation of peritoneal macrophages. *Cell Biol. Toxicol.* 19 : 3—12.

He Z., Dunker A. K., Wesson C. R., Trumble W. R. 1993.  $Ca^{2+}$ -induced folding and aggregation of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum calsequestrin. The involvement of the trifluoperazine-binding site. *J. Biol. Chem.* 268 : 24 635—24 641.

Irvine R. F. 1982. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem. J.* 204 : 3—16.

Jaszczyszyn A., Gasiorowski K., Swiatek P., Malinka W., Cieslik-Boczula K., Petrus J., Czarnik-Matusewicz B. 2012. Chemical structure of phenothiazines and their biological activity. *Pharmacol. Rep.* 64 : 16—23.

Kang S., Hong J., Lee J. M., Moon H. E., Jeon B., Choi J., Yoon N. A., Paek S. H., Roh E. J., Lee J., Kang S. S. 2017. Trifluoperazine, a well-known antipsychotic, inhibits glioblastoma invasion by binding to calmodulin, and disinhibiting calcium release channel IP3R. *Mol. Cancer Ther.* 16 : 217—227.

Khan S. Z., Longland C. L., Michelangeli F. 2000. The effects of phenothiazines and other calmodulin antagonists on the sarcoplasmic and endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  pumps. *Biochem. Pharmacol.* 60 : 1797—1806.

Mitchell J. A., Akarasereenont P., Thiemermann C., Flower R. J., Vane J. R. 1994. Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenases. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 90 : 11 693—11 697.

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.

Needleman P., Turk J., Jacksick B.A., Morrison A.R., Lefkowitz J.B. 1986. Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 55 : 69—102.

Oruch R., Lund A., Pryme I. F., Holmsen H. 2010. An intercalation mechanism as a mode of action exerted by psychotropic drugs: results of altered phospholipid substrate availabilities in membranes? *J. Chem. Biol.* 3 : 67—88.

Oruch R., Pryme I. F., Holmsen H. 2008. Effects of psychotropic drugs on the thrombin-induced liberation of arachidonate in human platelets. *Saudi Med. J.* 29 : 1397—1407.

Qin J., Zima A. V., Porta M., Blatter L. A., Fill M. 2009. Trifluoperazine: a ryanodine receptor agonist. *Pflugers Arch.* 458 : 643—651.

Randriamampita C., Trautmann A. 1987. Ionic channels in murine macrophages. *Cell. Biol.* 105 : 761—769.

Sudeshna G., Parimal K. 2010. Multiple non-psychiatric effects of phenothiazines: a review. *Europ. J. Pharmacol.* 648 : 6—14.

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.

Vandonselaar M., Hickie R. A., Quail J. W., Delbaere L. T. 1994. Trifluoperazine-induced conformational change in  $Ca^{2+}$ -calmodulin. *Nat. Struct. Biol.* 1 : 795—801.

Van Leyen K., Kim H.Y., Lee S.-R., Jin G., Arai K., Lo E.H. 2006. Baicalein and 12/15-lipoxygenase in the ischemic brain. *Stroke.* 37 : 3014—3018.

Walenga R. W., Opas E. E., Feinstein M. B. 1981. Differential effects of calmodulin antagonists on phospholipases A<sub>2</sub> and C in thrombin-stimulated platelets. *J. Biol. Chem.* 256 : 12 523—12 528.

Wenzel S. E., Kamada A. K. 1996. Zileuton — the first 5-lipoxygenase inhibitor for the treatment of asthma. *Ann. Pharmacother.* 30 : 858—864.

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 : 16 559—16 566.

Поступила 11 X 2017

#### ARACHIDONIC ACID METABOLISM INHIBITORS ATTENUATE $Ca^{2+}$ RESPONSES INDUCED BY TRIFLUOPERAZINE IN MACROPHAGES

L. S. Milenina,<sup>1</sup> Z. I. Krutetskaya, A. A. Naumova, S. N. Butov, N. I. Krutetskaya, V. G. Antonov

Chair of Biophysics, St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034;

<sup>1</sup>e-mail:cozzy@mail.ru, z.krutetskaya@spbu.ru

Using Fura-2AM microfluorimetry, the effect of neuroleptic trifluoperazine on intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in rat macrophages has been investigated. We have shown for the first time that trifluoperazine causes dose-dependent intracellular  $Ca^{2+}$  concentration increase due to  $Ca^{2+}$  mobilization from intracellular  $Ca^{2+}$  stores and subsequent  $Ca^{2+}$  entry in rat peritoneal macrophages. It has been also established that inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> (4-bromophenacyl bromide, prednisolone and dexamethasone), cyclooxygenases (aspirin and indomethacin) and lipoxygenases (caffeic acid, zileuton and baicalein) attenuate trifluoperazine-induced  $Ca^{2+}$  responses in rat macrophages. The data obtained suggest the involvement of the enzymes and (or) products of the arachidonic acid metabolism in the trifluoperazine effect on the intracellular  $Ca^{2+}$  concentration in rat peritoneal macrophages.

Key words: intracellular  $Ca^{2+}$  concentration, peritoneal macrophages, trifluoperazine, arachidonic acid, phospholipase A<sub>2</sub>, cyclooxygenases, lipoxygenases.