

УДК 576.32/.36

АНТАГОНИСТ РЕЦЕПТОРОВ СИГМА-1 ГАЛОПЕРИДОЛ ПОДАВЛЯЕТ ДЕПОЗАВИСИМЫЙ ВХОД Ca^{2+} В МАКРОФАГАХ

© 2018 г. З. И. Крутецкая*, Л. С. Миленина, А. А. Наумова, С. Н. Бутов,
В. Г. Антонов, академик РАН А. Д. Ноздрачев

Поступило 20.12.2017 г.

С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM впервые показали, что преинкубация макрофагов с антагонистом рецепторов сигма-1 – нейролептиком галоперидолом – приводит в перитонеальных макрофагах крыс к значительному подавлению депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз, тапсигаргином или циклопязониковой кислотой. Полученные результаты свидетельствуют о возможном участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

DOI: 10.7868/S0869565218050249

Рецепторы сигма-1 представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в мембране эндоплазматического ретикула на границе с митохондриями. Эти рецепторы экспрессированы в клетках разных типов, включая клетки иммунной системы [1]. Их лигандами являются эндогенные стероиды, антидепрессанты, антипсихотические, противосудорожные и анальгетические средства [2]. Рецепторы сигма-1 взаимодействуют с белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, и модулируют многие клеточные процессы [3]. Так, обнаружено, что взаимодействуя с рецепторами инозитол-1,4,5-трифосфата, рецепторы сигма-1 модулируют процессы Ca^{2+} -сигнализации в клетках: мобилизацию Ca^{2+} из депо и вход Ca^{2+} из наружной среды [3].

Универсальным механизмом регулируемого входа Ca^{2+} в клетки эукариот является депозависимый (“ёмкостный”) вход Ca^{2+} [4]. В соответствии с моделью “ёмкостного” входа Ca^{2+} этот процесс регулируется степенью заполнения Ca^{2+} -депо таким образом, что опустошение депо активирует вход Ca^{2+} [4]. Функциональной единицей депозависимого входа Ca^{2+} является мультимолекулярный белковый комплекс SOCIC (store-operated calcium influx complex), компоненты которого обладают высокой мобильностью, и взаимодействия между ними жёстко регулируются [4, 5]. 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. В состав комплекса входят также регуляторные белки: кальмодулин, аденилатциклаза и Ca^{2+} -АТФаза мембраны Ca^{2+} -депо [4, 5].

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование возможной роли рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином (ТГ) и циклопязониковой кислотой (ЦПК), в перитонеальных макрофагах крыс. В экспериментах использовали антагонист рецепторов сигма-1 – типичный нейролептик галоперидол [2, 6], широко используемый для лечения шизофрении.

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс популяции Wistar при комнатной температуре 20–22 °С через 1–2 сут после начала культивирования клеток. Подробно процедура культивирования макрофагов и описание автоматизированной установки для измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , $[\text{Ca}^{2+}]_i$, на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (“Leica Microsystems”, Германия) изложены нами ранее [7]. Для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (“Sigma-Aldrich”, США). Возбуждение флуоресценции объекта производили при длинах волн 340 и 380 нм, эмиссию регистрировали при длине волны 510 нм. Для избежания фотовыгорания измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича [8]. Статистический анализ

Санкт-Петербургский государственный университет
*E-mail: z.krutetskaya@spbu.ru

проводили с применением критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

На рис. 1 и 2 представлены результаты типичных экспериментов в виде графиков изменения отношения интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (отношение F_{340}/F_{380}) во времени, отражающего динамику изменения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках в зависимости от времени измерения [9].

В контрольных экспериментах мы обнаружили, что добавление 0,5 мкМ ТГ к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, вызывает незначительное увеличение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо (рис. 1а). В среднем (по данным 7 экспериментов) увеличение $[Ca^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации

составило 31 ± 9 нМ (здесь и далее по тексту $M \pm m, n = 7$). При последующем введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдался депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 1а). Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 152 ± 20 нМ. Аналогичные результаты мы получили при использовании 10 мкМ ЦПК (рис. 2а). Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации Ca^{2+} из депо, вызываемой ЦПК, составило 26 ± 9 нМ, а во время входа Ca^{2+} – 141 ± 22 нМ (рис. 2а).

Мы впервые обнаружили, что преинкубация макрофагов с 30 мкг/мл галоперидола в течение 20 мин до введения 0,5 мкМ ТГ вызывала подавление обеих фаз Ca^{2+} -ответа, индуцируемого ТГ (рис. 1б). Галоперидол подавлял фазу мобилизации Ca^{2+} из депо на $23,2 \pm 7,9\%$, а последующий

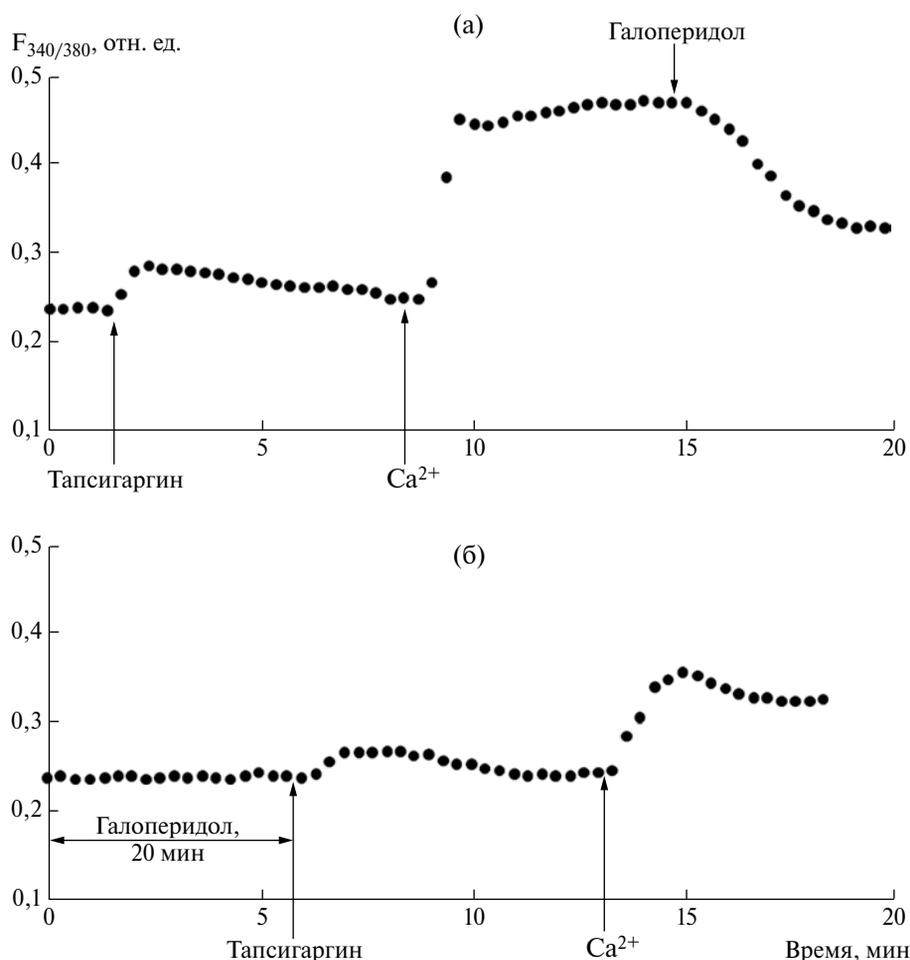


Рис. 1. Влияние галоперидола на Ca^{2+} -ответы, вызываемые тапсигаргином в перитонеальных макрофагах крыс. По оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.). По оси абсцисс – время. (а) – клетки 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 входа Ca^{2+} вводили 30 мкг/мл галоперидола; (б) – макрофаги предварительно инкубировали в течение 20 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+} . Каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант из 7 независимых экспериментов.

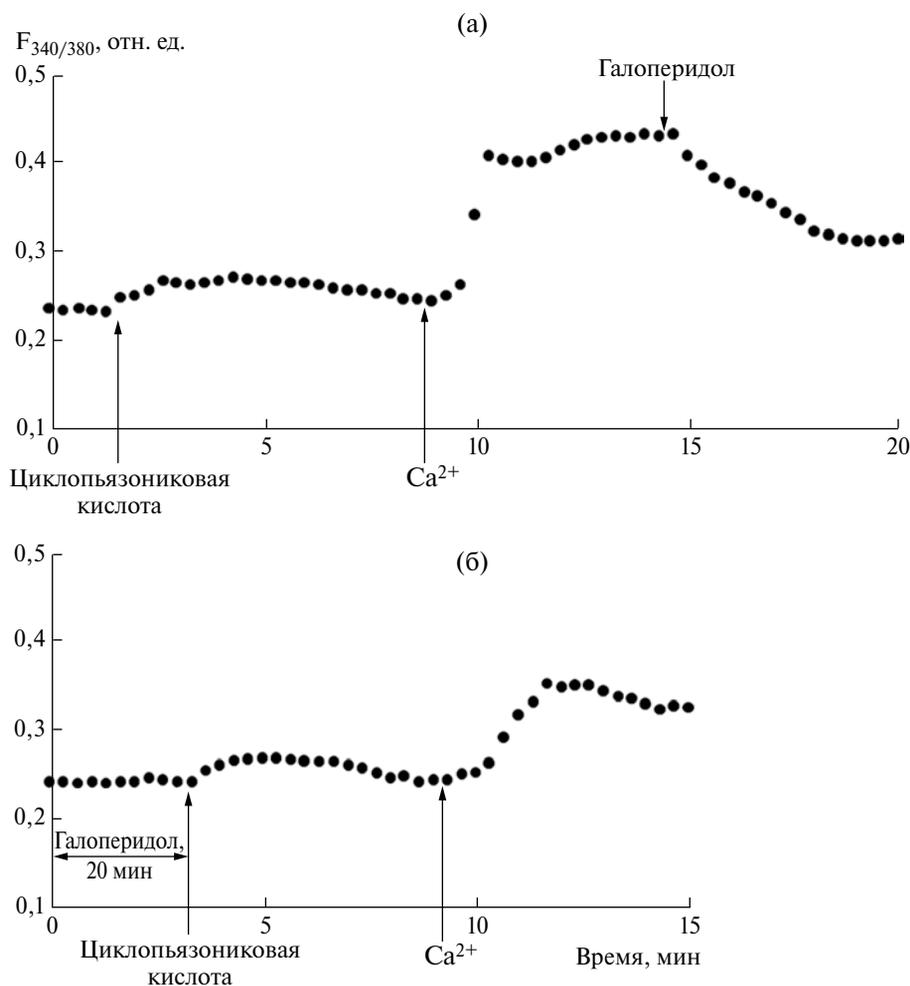


Рис. 2. Влияние галоперидола на Ca^{2+} -ответы, вызываемые циклопязониковой кислотой в перитонеальных макрофагах крыс. (а) – клетки стимулировали 10 мкМ циклопязониковой кислотой в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} , на фоне развившегося входа Ca^{2+} вводили 30 мкг/мл галоперидола; (б) – макрофаги предварительно инкубировали в течение 20 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+} .

депозависимый вход Ca^{2+} в макрофаги – на $42,3 \pm 13,6\%$. Сходные результаты были получены в опытах с применением 10 мкМ ЦПК (рис. 2б). Галоперидол вызывал подавление мобилизации Ca^{2+} из депо на $25,9 \pm 8,0\%$ и подавление депозависимого входа Ca^{2+} на $43,8 \pm 12,5\%$, индуцируемых ЦПК. Это свидетельствовало об участии рецепторов сигма-1 в активации депозависимого входа Ca^{2+} , индуцируемого ТГ или ЦПК в макрофагах.

Добавление 30 мкг/мл галоперидола на фоне развившегося депозависимого входа Ca^{2+} , индуцированного ТГ (рис. 1а) или ЦПК (рис. 2а), вызывало значительное подавление депозависимого входа Ca^{2+} в макрофаги. Для ингибиторов эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз подавление депозависимого входа Ca^{2+} составило: для ТГ $48,5 \pm 17,1\%$, для ЦПК $48,1 \pm 16,9\%$. Это свидетельствовало

о возможном участии рецепторов сигма-1 не 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 галоперидол подавляет обе фазы Ca^{2+} -ответов, индуцируемых ТГ или ЦПК в макрофагах. Полученные данные согласуются с результатами исследований других авторов, которые обнаружили, что антагонист рецепторов сигма-1 нейролептик хлорпромазин подавляет мобилизацию Ca^{2+} из депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемые АТФ или ТГ в клетках лейкоза человека линии HL-60 [10], и ингибирует депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый ТГ в клетках феохромоцитомы (линия РС12) [11]. Также обнаружено [12], что антагонист

рецепторов сигма-1 BD1063 подавляет, а агонист рецепторов сигма-1 (+)-пентазоцин потенцирует депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый ТГ в клетках аденокарциномы молочной железы (линия MCF7 σ 1) и клетках нейробластомы (линия SK-N-SH). Ранее было показано [13], что антагонисты сигма-1-рецепторов BD1063 и BD1047 ингибируют вход Ca^{2+} , индуцируемый гистамином в эндотелиальных клетках подкожной вены ноги человека. Кроме того, известно [14], что галоперидол ингибирует потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы в клетках разных типов.

Полученные нами данные о подавлении галоперидолом депозависимого входа Ca^{2+} свидетельствуют о возможном участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крысы 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 [15].

Результаты нашей работы и данные литературы указывают на то, что рецепторы сигма-1 могут являться новой фармакологической мишенью для модуляции депозависимого входа Ca^{2+} в клетках.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rousseaux C.G., Greene S.F.* // J. Recept. Signal Transduct. 2016. V. 36. P. 327–388.
2. *Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., et al.* // Curr. Neuropharmacol. 2008. V. 6. P. 344–366.
3. *Su T. – P., Hayashi T., Maurice T., et al.* // Trends Pharmacol. Sci. 2010. V. 31. P. 557–566.
4. *Prakriya M., Lewis R.S.* // Physiol. Rev. 2015. V. 95. P. 1383–1436.
5. *Moreno C., Vaca L.* In: Store-Operated Ca^{2+} Entry (SOCE) Pathways. Wien: Springer-Verlag, 2012. P. 93–113.
6. *Cobos E.J., Del Pozo E., Baeyens J.M.* // J. Neurochem. 2007. V. 102. P. 812–825.
7. *Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А. и др.* // Цитология. 2015. Т. 57. № 7. С. 518–525.
8. *Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y.* // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 3440–3450.
9. *Xie Q., Zhang Y., Zhai C., et al.* // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 16559–16566.
10. *Harper J.L., Daly J.W.* // Drug Dev. Res. 1999. V. 47. P. 107–117.
11. *Choi S.-Y., Kim Y.-H., Lee Y.-K., et al.* // Brit. J. Pharmacol. 2001. V. 132. P. 411–418.
12. *Gasparre G., Abate C., Carlucci R., et al.* // Pharmacol. Rep. 2017. V. 69. P. 542–545.
13. *Amer M.S., McKeown L., Tumova S., et al.* // Brit. J. Pharmacol. 2013. V. 168. P. 1445–1455.
14. *Tarabova B., Novadova M., Lacinova L.* // Gen. Physiol. and Biophys. 2009. V. 28. P. 249–259.
15. *Srivats S., Balasuriya D., Pasche M., et al.* // J. Cell Biol. 2016. V. 213. P. 65–79.