

УДК 576.32/.36

НЕЙРОЛЕПТИК ХЛОПРОМАЗИН МОДУЛИРУЕТ Ca^{2+} -ОТВЕТЫ В МАКРОФАГАХ

© 2020 г. З. И. Крутецкая^{1,*}, Л. С. Миленина¹, В. Г. Антонов², академик РАН А. Д. Ноздрачев^{1,3}

Поступило 20.06.2019 г.

После доработки 20.06.2019 г.

Принято к публикации 20.06.2019 г.

С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM впервые показано, что антагонист рецепторов сигма-1 — нейрорептик хлорпромазин — значительно подавляет Ca^{2+} -ответы, индуцируемые иммуномодуляторами глутоксимом и моликсаном и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопязониковой кислотой, в перитонеальных макрофагах крыс. Полученные результаты свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, вызываемом глутоксимом или моликсаном и проводящем к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , а также в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

Ключевые слова: хлорпромазин, рецепторы сигма-1, внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , макрофаги

DOI: 10.31857/S268673892001014X

Рецепторы сигма-1, экспрессируемые в клетках различных типов, представляют собой уникальные молекулярные шапероны, расположенные в мембране эндоплазматического ретикулума на границе с митохондриями [1]. Взаимодействуя с белками-мишенями, такими как ионные каналы и рецепторы, рецепторы сигма-1 регулируют многие клеточные процессы в норме и патологии [1, 2]. 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].

Рецепторы сигма-1 имеют очень широкий фармакологический профиль. Их лигандами являются различные по химической структуре и фармакологическому действию соединения: антидепрессанты, нейрорептики, анальгетики, противосудорожные и противокашлевые средства [4].

Ранее нами было впервые показано, что антагонист рецепторов сигма-1 галоперидол (производное бутирофенона) значительно подавляет обе фазы Ca^{2+} -ответов, вызываемых дисульфид-

содержащими иммуномодуляторами глутоксимом® (Г, динатриевая соль окисленного глутатиона с *d*-металлом в наноконцентрации, “ФАРМА-ВАМ”, Россия) и моликсаном® (М, комплекс глутоксида и нуклеозида инозина, “ФАРМА-ВАМ”) [5] и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином (ТГ) и циклопязониковой кислотой (ЦПК) [6] в перитонеальных макрофагах крыс.

Для подтверждения участия рецепторов сигма-1 в регуляции процессов Ca^{2+} сигнализации в макрофагах представлялось целесообразным исследовать влияние другого, структурно отличного, антагониста рецепторов сигма-1 на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые Г и М, а также ТГ и ЦПК, в перитонеальных макрофагах крыс, что и составило предмет настоящего исследования.

В экспериментах использовали антагонист рецепторов сигма-1 — нейрорептик фенотиазинового ряда хлорпромазин (ХП, аминазин, торазин) [7], широко используемый для лечения шизофрении.

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс популяции Wistar при комнатной температуре 20–22°C через 1–2 суток после начала культивирования клеток. Подробно процедура культивирования макрофагов и описание автоматизированной установки для измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$, на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (“Leica Microsystems”, Германия) изложены нами ранее [8].

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

² Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, Россия

³ Институт физиологии им. И.П. Павлова Российской Академии наук, Санкт-Петербург, Россия

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

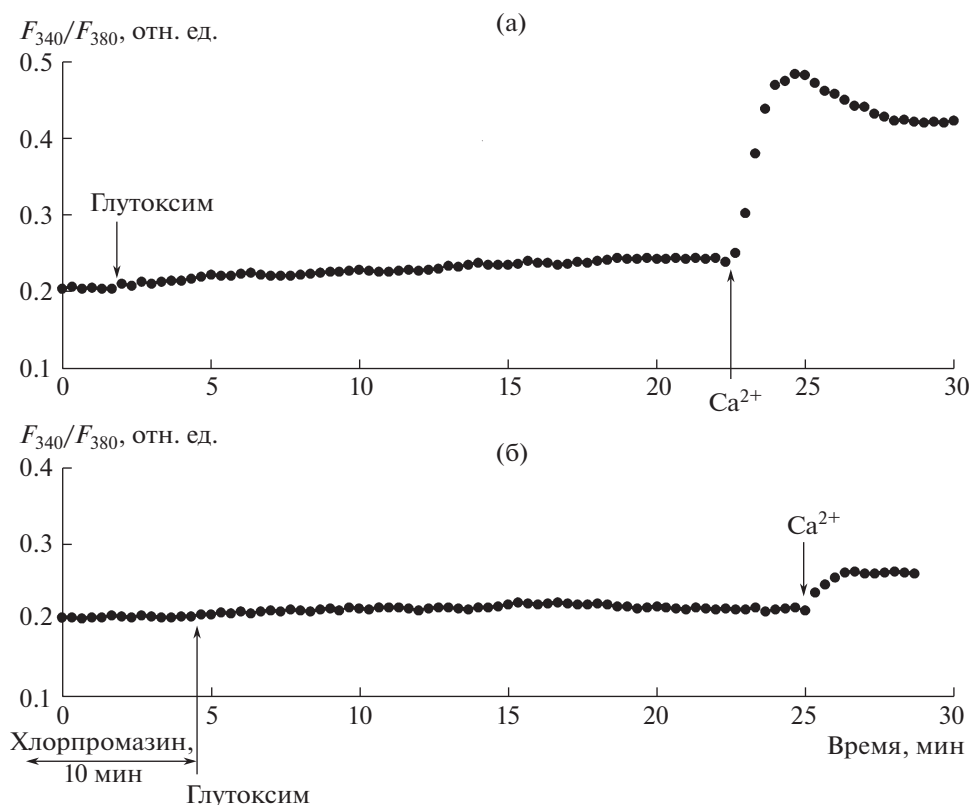


Рис. 1. Влияние хлорпромазина на увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах крыс, вызываемое глутоксимом. Здесь и на рис. 2 по оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (F_{340}/F_{380} относительные единицы, отн. ед.); по оси абсцисс – время. а – макрофаги 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+} ; б – клетки предварительно инкубировали в течение 10 мин с 25 мкг/мл хлорпромазина в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл глутоксима, через 20 мин 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 6–8 независимых экспериментов.

Для измерения $[Ca^{2+}]_i$ 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 $[Ca^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гриневича [9]. Статистический анализ проводили с применением критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0.05$. На рис. 1 и 2 приведены результаты типичных экспериментов. Данные представлены в виде графика изменения отношения интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (F_{340}/F_{380}) во времени, отражающего динамику изменения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках в зависимости от времени измерения [10].

В контрольных экспериментах было показано, что инкубация макрофагов в течение 20 мин с 100 мкг/мл Г (рис. 1а) или 100 мкг/мл М (не пред-

ставлено) в бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее увеличение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных депо. В среднем ($n = 6$ для каждого из препаратов) через 20 мин после добавления агентов $[Ca^{2+}]_i$ увеличивалась от базального уровня 90 ± 18 до 135 ± 18 нМ для Г и 134 ± 20 нМ для М. При введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдалось дальнейшее повышение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 1а). В среднем ($n = 6$) увеличение $[Ca^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 223 ± 22 и 202 ± 20 нМ для Г и М соответственно.

В наших экспериментах впервые было обнаружено, что преинкубация макрофагов с 25 мкг/мл ХП в течение 10 мин до введения 100 мкг/мл Г приводила к значительному подавлению как мобилизации Ca^{2+} из депо (на $58.5 \pm 4.6\%$, $n = 7$), так и последующего депозависимого входа Ca^{2+} в клетку (на $59.1 \pm 6.1\%$, $n = 7$), индуцируемых Г (рис. 1б). Сходные данные были получены в опытах по влиянию 25 мкг/мл ХП на Ca^{2+} -ответы, вы-

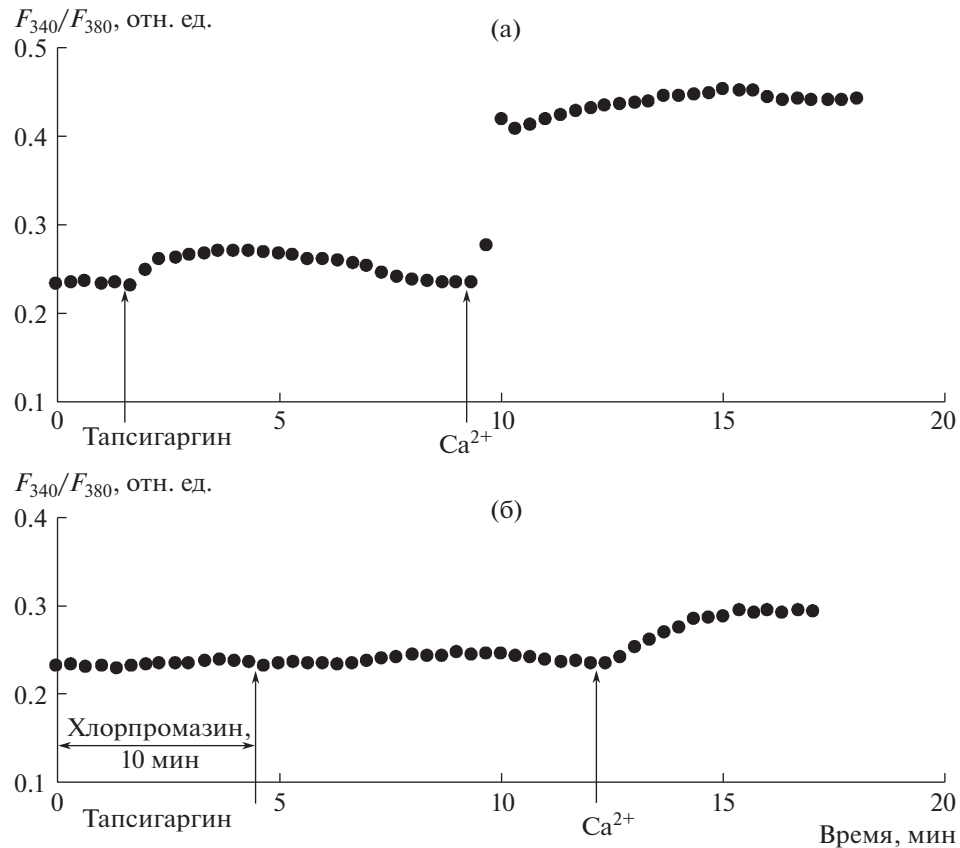


Рис. 2. Влияние хлорпромазина на Ca^{2+} -ответы, вызываемые тапсигаргином в макрофагах: а – клетки стимулировали 0.5 мкМ тапсигаргина в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; б – макрофаги предварительно инкубировали в течение 10 мин с 25 мкг/мл хлорпромазина в бескальциевой среде, затем добавляли 0.5 мкМ тапсигаргина, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} .

зываемые 100 мкг/мл М (не представлено). В среднем ($n = 8$) ХП вызывал подавление мобилизации Ca^{2+} из депо на $43.2 \pm 8.9\%$ и подавление депозависимого входа Ca^{2+} в клетку на $52.3 \pm 9.1\%$, индуцированных М.

Добавление 0.5 мкМ ТГ к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, вызывает незначительное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо (рис. 2а). В среднем ($n = 7$) увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации составило 26 ± 7 нМ (рис. 2а). При последующем введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдался депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 2а). В среднем ($n = 7$) увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 160.2 ± 20.5 нМ. Сходные результаты мы получили при использовании 10 мкМ ЦПК (не представлено). В среднем ($n = 7$) увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо, составило 37.8 ± 9.8 нМ, а увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время депозависимого входа Ca^{2+} составило 150.2 ± 23.7 нМ.

Впервые обнаружено, что преинкубация макрофагов с 25 мкг/мл ХП в номинально бескальциевой среде в течение 10 мин до введения 0.5 мкМ ТГ вызывает значительное подавление обеих фаз Ca^{2+} -ответа, индуцированного ТГ (рис. 2б). Так, подавление фазы мобилизации Ca^{2+} из депо составило $59.3 \pm 8.2\%$ ($n = 7$), а депозависимого входа Ca^{2+} – $68.2 \pm 10.4\%$ ($n = 7$). Сходные результаты были получены в опытах с применением 10 мкМ ЦПК (не представлено). Подавление ХП мобилизации Ca^{2+} из депо составило $40.2 \pm 9.1\%$ ($n = 7$), а подавление депозависимого входа Ca^{2+} – $57.6 \pm 11.3\%$ ($n = 7$).

Таким образом, в настоящей работе мы впервые на перитонеальных макрофагах крыс показали, что антагонист рецепторов сигма-1 нейролептик фенотиазинового ряда ХП подавляет обе фазы Ca^{2+} -ответов, вызываемых Г или М, а также ТГ и ЦПК, в макрофагах. Результаты согласуются с данными исследований других авторов, которые обнаружили, что ХП подавляет мобилизацию Ca^{2+} из депо и последующий депозависимый вход

Ca^{2+} , вызываемые АТФ или ТГ, в клетках лейкоза человека (линия HL-60) [11] и ингибирует депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый брадикинином или ТГ в клетках феохромоцитомы крыс (линия PC12) [12]. Обнаружено также, что антагонисты сигма-1 рецепторов (BD1063 и BD1047) ингибируют вход Ca^{2+} , индуцируемый гистамином в эндотелиальных клетках подкожной вены ноги человека [13]. Кроме того, известно [14], что ХП ингибирует потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы в клетках разных типов.

Результаты настоящей и более ранних работ [5, 15] о подавлении лигандами рецепторов сигма-1 Ca^{2+} -ответов, вызываемых Г и М в макрофагах, свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, запускаемом Г или М и приводящем к увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крыс. Результаты указывают также на нежелательность совместного применения в клинической практике препаратов Г или М и нейролептика ХП.

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.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rousseaux C.G., Greene S.F.* // J. Recept. Signal Transduct. 2016. V. 36. P. 327–388.
2. *Su T.-P., Hayashi T., Maurice T., et al.* // Trends Pharmacol. Sci. 2010. V. 31. P. 557–566.
3. *Hayashi T., Su T.-P.* // Cell. 2007. V. 131. P. 596–610.
4. *Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., et al.* // Curr. Neuropharmacol. 2008. V. 6. P. 344–366.
5. *Крутецкая З.И., Миленина Л.С., Наумова А.А., Бутов С.Н., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д.* // ДАН. 2017. Т. 472. № 6. С. 723–725.
6. *Крутецкая З.И., Миленина Л.С., Наумова А.А., Бутов С.Н., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д.* // ДАН. 2018. Т. 480. № 5. С. 613–616.
7. *Itzhak Y., Ruhland M., Krahling H.* // Neuropharmacol. 1990. V. 29. P. 181–184.
8. *Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г.* // Цитология. 2015. Т. 57. № 7. С. 518–525.
9. *Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y.* // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. P. 3440–3450.
10. *Xie Q., Zhang Y., Zhai C., et al.* // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. P. 16 559–16 566.
11. *Harper J.L., Daly J.W.* // Drug Dev. Res. 1999. V. 47. P. 107–117.
12. *Choi S.-Y., Kim Y.-H., Lee Y.-K., et al.* // British J. Pharmacol. 2001. V. 132. P. 411–418.
13. *Amer M.S., McKeown L., Tumova S., et al.* // British J. Pharmacol. 2013. V. 168. P. 1445–1455.
14. *McNaughton N.C., Green P.J., Randall A.D.* // Acta Physiol. Scand. 2001. V. 173. P. 401–408.
15. *Крутецкая З.И., Миленина Л.С., Наумова А.А., Бутов С.Н., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д.* // ДАН. 2018. Т. 481. № 5. С. 570–572.

NEUROLEPTIC CHLORPROMAZINE MODULATES Ca^{2+} RESPONSES IN MACROPHAGES

Z. I. Krutetskaya^{a, #}, L. S. Milenina^a, V. G. Antonov^b, and Academician of the RAS A. D. Nozdrachev^{a, c}

^a Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russian Federation

^b S.M. Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg, Russian Federation

^c I.P. Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation

[#] e-mail: z.krutetskaya@spbu.ru

Using Fura-2AM microfluorimetry we have shown for the first time that sigma-1 receptor antagonist neuroleptic chlorpromazine – significantly inhibits glutoxim- and molixan-induced Ca^{2+} responses and Ca^{2+} responses, induced by endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase inhibitors thapsigargin and cyclopiazonic acid, in rat peritoneal macrophages. The results suggest the involvement of sigma-1 receptors in signaling cascade induced by glutoxim or molixan and leading to intracellular Ca^{2+} concentration increase, and in the regulation of store-dependent Ca^{2+} -entry, in macrophages.

Keywords: chlorpromazine, sigma-1 receptors, intracellular Ca^{2+} concentration, macrophages