

ЛИГАНД СИГМА-1 РЕЦЕПТОРОВ ХЛОРПРОМАЗИН ПОДАВЛЯЕТ ДЕПОЗАВИСИМЫЙ ВХОД Ca^{2+} В ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГАХ

© 2021 г. Л.С. Миленина*, З.И. Крутецкая*, В.Г. Антонов**, Н.И. Крутецкая*

*Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

**Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, 194044, Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6

E-mail: cozzy@mail.ru, z.krutetskaya@spbu.ru

Поступила в редакцию 21.05.2020 г.

После доработки 08.06.2020 г.

Принята к публикации 16.06.2020 г.

С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM впервые показано, что антагонист рецепторов сигма-1 – нейрорептиг хлорпромазин – значительно подавляет в перитонеальных макрофагах крыс депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый иммуномодуляторами глутоксимом и моликсаном, а также ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопязониковой кислотой. Полученные результаты свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах.

Ключевые слова: рецепторы сигма-1, депозависимый вход Ca^{2+} , макрофаги.

DOI: 10.31857/S0006302921010XXX

Депозависимый или «емкостной» вход Ca^{2+} , впервые описанный Дж. Патни более тридцати лет назад, является повсеместным (ubiquitous) механизмом регулируемого входа Ca^{2+} в клетки эукариот, активируемым при опустошении внутриклеточных Ca^{2+} -депо [1, 2]. Депозависимый вход Ca^{2+} участвует в регуляции широкого спектра клеточных процессов (экзоцитоз, экспрессия генов, рост и пролиферация клеток и др.) в норме и патологии [3, 4].

Функциональной единицей депозависимого входа Ca^{2+} является мультимолекулярный белковый комплекс (store-operated calcium influx complex, SOCIC), компоненты которого обладают высокой мобильностью, а взаимодействия между ними жестко регулируются [5, 6]. 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 [4]. 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+} [7–9]. В состав комплекса входят также регуляторные белки:

кальмодулин, аденилатциклаза и Ca^{2+} -АТФаза в мембране Ca^{2+} -депо [5, 6].

Важными участниками процессов Ca^{2+} -сигнализации в клетках являются рецепторы сигма-1 – лигандрегулируемые молекулярные шапероны в мембране эндоплазматического ретикулума, имеющие уникальную историю, структуру и фармакологический профиль [10]. Эти рецепторы экспрессированы в клетках различных типов, включая клетки иммунной системы [10]. Взаимодействуя с белками-мишенями, такими как ионные каналы и рецепторы, рецепторы сигма-1 регулируют многие клеточные процессы в норме и патологии [10, 11]. 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 [12].

Рецепторы сигма-1 имеют очень широкий фармакологический профиль. Их лигандами являются различные по химической структуре и фармакологическому действию соединения: антидепрессанты, нейрорептигики, анальгетики, противосудорожные и противокашлевые средства [13].

Ранее нами было впервые показано, что антагонист рецепторов сигма-1 нейрорептиг галоперидол (производное бутирофенона) значительно подавляет мобилизацию Ca^{2+} из депо и депозави-

Сокращение: $[\text{Ca}^{2+}]_i$ – внутриклеточная концентрация Ca^{2+} .

симый вход Ca^{2+} , вызываемые дисульфидсодержащими иммуномодуляторами глутоксимом® (динатриевая соль окисленного глутатиона с d-металлом в наноконцентрации, «ФАРМА-ВАМ», Санкт-Петербург) и моликсаном® (комплекс глутоксима и нуклеозида инозина, «ФАРМА-ВАМ») [14] и ингибиторами эндоплазматических Ca^{2+} -АТФаз тапсигаргином и циклопьязониковой кислотой [15] в перитонеальных макрофагах крыс.

Для подтверждения участия рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа Ca^{2+} в макрофагах представлялось целесообразным исследовать влияние другого, структурно отличного антагониста рецепторов сигма-1 на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые глутоксимом и моликсаном, а также тапсигаргином и циклопьязониковой кислотой в перитонеальных макрофагах крыс, что и составило предмет настоящего исследования.

В экспериментах использовали антагонист рецепторов сигма-1 – нейрорептид фенотиазинового ряда хлорпромазин (аминазин, торазин) [16], широко используемый для лечения шизофрении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и культивирование перитонеальных макрофагов. 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 [17, 18]. 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 одних-трех суток при 37°C в среде 199 (рН 7.2), содержащей 20% сыворотки крови быка, глутамин (3%), пенициллин (100 Ед/мл) и стрептомицин (100 мг/мл). Тест на α -нафтилэстеразу [19] показал, что по меньшей мере 96% клеток в монослоях были макрофагами.

Эксперименты проводили при комнатной температуре (22–24°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 CaCl_2 , 1 мМ MgCl_2 и 5 мМ HEPES-NaOH , рН 7.3–7.4. Бескальциевая среда отличалась тем, что содержала 0 мМ CaCl_2 и 1 мМ ЭГТА.

Использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich (США). Маточные растворы Fura-2AM (1 мМ), циклопьязоникой кислоты (10 мМ) и тапсигарги-

на (0.5 мМ) готовили в диметилсульфоксиде. Маточный раствор хлорпромазина (25 мг/мл) готовили в воде. Препараты глутоксим и моликсан были предоставлены фирмой ФАРМА-ВАМ (Санкт-Петербург). Маточные растворы глутоксима (50 мг/мл) и моликсана (50 мг/мл) готовили в воде.

Измерение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . Для измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), использовали флуоресцентный зонд Fura-2AM (Sigma-Aldrich, США). Макрофаги инкубировали в течение 45 мин при 22–24°C в физиологическом растворе, содержащем 2 мкМ Fura-2AM. 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} – 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 [20, 21]. Для избежания фотоблещивания 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 [22].

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 типичных экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольных экспериментах было показано, что инкубация макрофагов в течение 20 мин с 100 мкг/мл глутоксима (рис. 1а) или 100 мкг/мл моликсана (рис. 2а) в бескальциевой среде вызывает медленно нарастающее увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$,

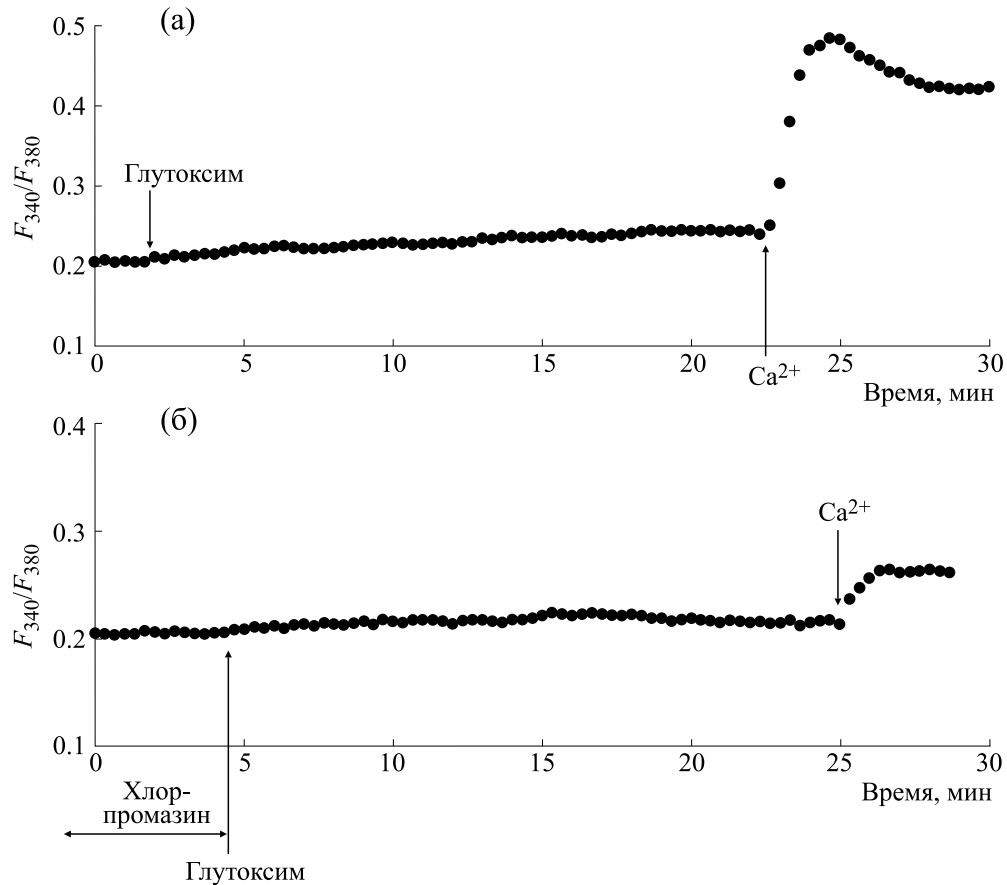


Рис. 1. Влияние хлорпромазина на увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах крыс, вызываемое глутоксимом: (а) — макрофаги инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл глутоксима в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; (б) — клетки 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+} . По оси ординат — отношение интенсивностей флуоресценции Fuga-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно, по оси абсцисс — время. Каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант из шести-восьми независимых экспериментов.

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

В наших экспериментах впервые было обнаружено, что преинкубация макрофагов с 25 мкг/мл хлорпромазина в течение 10 мин до введения 100

мкг/мл глутоксима 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 глутоксимом (рис. 1б). Сходные данные были получены в опытах по влиянию 25 мкг/мл хлорпромазина на Ca^{2+} -ответы, вызываемые 100 мкг/мл моликсана (рис. 2б). В среднем ($n = 8$) хлорпромазин вызывал подавление мобилизации Ca^{2+} из депо на $43.2 \pm 8.9\%$ и подавление депозависимого входа Ca^{2+} в клетку на $59.2 \pm 9.2\%$, индуцированных моликсаном.

Добавление 0.5 мкМ тапсигаргина к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, вызывает незначительное увеличение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных

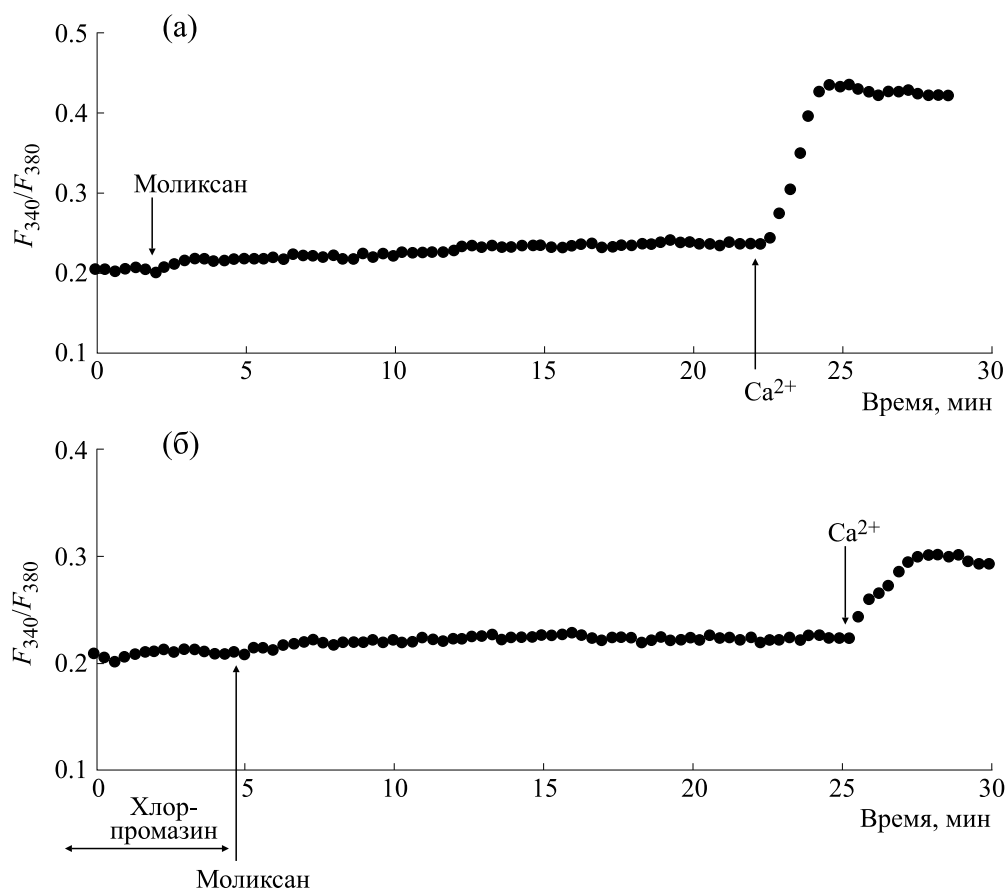


Рис. 2. Влияние хлорпромазина на увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах крыс, вызываемое моликсаном: (а) – макрофаги инкубировали в течение 20 мин в присутствии 100 мкг/мл моликсана в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; (б) – клетки предварительно инкубировали в течение 10 мин с 25 мкг/мл хлорпромазина в бескальциевой среде, затем добавляли 100 мкг/мл моликсана, через 20 мин вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . По оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно, по оси абсцисс – время.

Ca^{2+} -депо (рис. 3а). В среднем ($n = 7$) увеличение $[Ca^{2+}]_i$ во время фазы мобилизации составило 26 ± 7 нМ (рис. 3а). При последующем введении в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} наблюдался депозависимый вход Ca^{2+} в цитозоль (рис. 3а). В среднем ($n = 7$) увеличение $[Ca^{2+}]_i$ во время входа Ca^{2+} составило 160.2 ± 20.5 нМ. Сходные результаты мы получили при использовании 10 мкМ циклопязониковой кислоты (рис. 4а). В среднем ($n = 7$) увеличение $[Ca^{2+}]_i$, отражающее мобилизацию Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо, составило 37.8 ± 9.8 нМ, а увеличение $[Ca^{2+}]_i$ во время депозависимого входа Ca^{2+} составило 150.2 ± 23.7 нМ.

Мы впервые обнаружили, что преинкубация макрофагов с 25 мкг/мл хлорпромазина в номинально бескальциевой среде в течение 10 мин до

введения 0.5 мкМ тапсигаргина вызывает значительное подавление обеих фаз Ca^{2+} -ответа, индуцированного тапсигаргином (рис. 3б). 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 циклопязониковой кислоты (рис. 4б). Подавление хлорпромазином мобилизации Ca^{2+} из депо составило $40.2 \pm 9.1\%$ ($n = 7$), а подавление депозависимого входа Ca^{2+} – $63.4 \pm 11.5\%$ ($n = 7$).

Таким образом, в настоящей работе мы впервые на перитонеальных макрофагах крыс показали, что антагонист рецепторов сигма-1 – нейролептик фенотиазинового ряда хлорпромазин – подавляет мобилизацию Ca^{2+} из депо и депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемые глутоксимом или моликсаном, а также тапсигаргином и циклопяз-

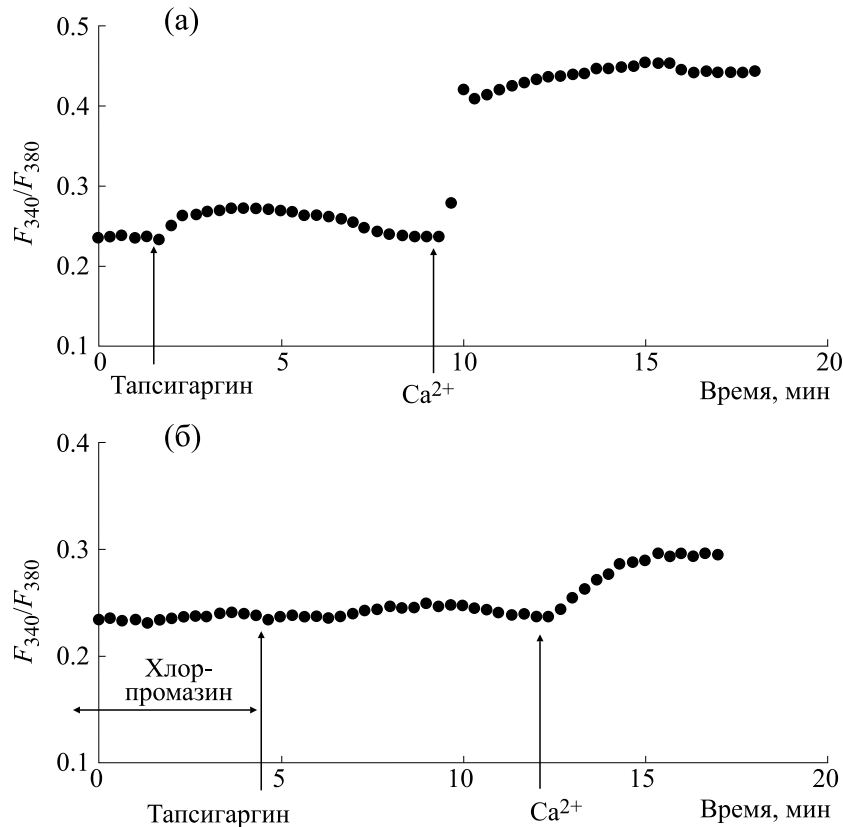


Рис. 3. Влияние хлорпромазина на Ca^{2+} -ответы, вызываемые тапсигаргином в макрофагах: (а) — клетки стимулировали 0.5 мкМ тапсигаргина в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; (б) — макрофаги предварительно инкубировали в течение 10 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+} . По оси ординат — отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно, по оси абсцисс — время.

зониковой кислотой в макрофагах. Результаты согласуются с данными других авторов, которые обнаружили, что хлорпромазин подавляет мобилизацию Ca^{2+} из депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} , вызываемые АТФ или тапсигаргином, в клетках лейкоза человека (линия HL-60) [23] и ингибирует депозависимый вход Ca^{2+} , индуцируемый брадикинином или тапсигаргином в клетках феохромоцитомы крыс (линия PC12) [24]. Обнаружено также, что антагонисты сигма-1 рецепторов (BD1063 и BD1047) ингибируют вход Ca^{2+} , индуцируемый гистамином в эндотелиальных клетках подкожной вены ноги человека [25]. Кроме того, известно [26], что хлорпромазин ингибирует потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы в клетках разных типов.

Результаты настоящей и более ранних работ [14, 27] о подавлении лигандами рецепторов сигма-1 Ca^{2+} -ответов, вызываемых глутоксимом и моликсаном в макрофагах, свидетельствуют об

участии рецепторов сигма-1 в комплексном сигнальном каскаде, запускаемом глутоксимом или моликсаном и приводящем к увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в перитонеальных макрофагах крыс. Результаты указывают также на нежелательность совместного применения в клинической практике препаратов глутоксим или моликсан и нейролептика хлорпромазина.

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+} , регулируя связывание между основными компонентами белкового ком-

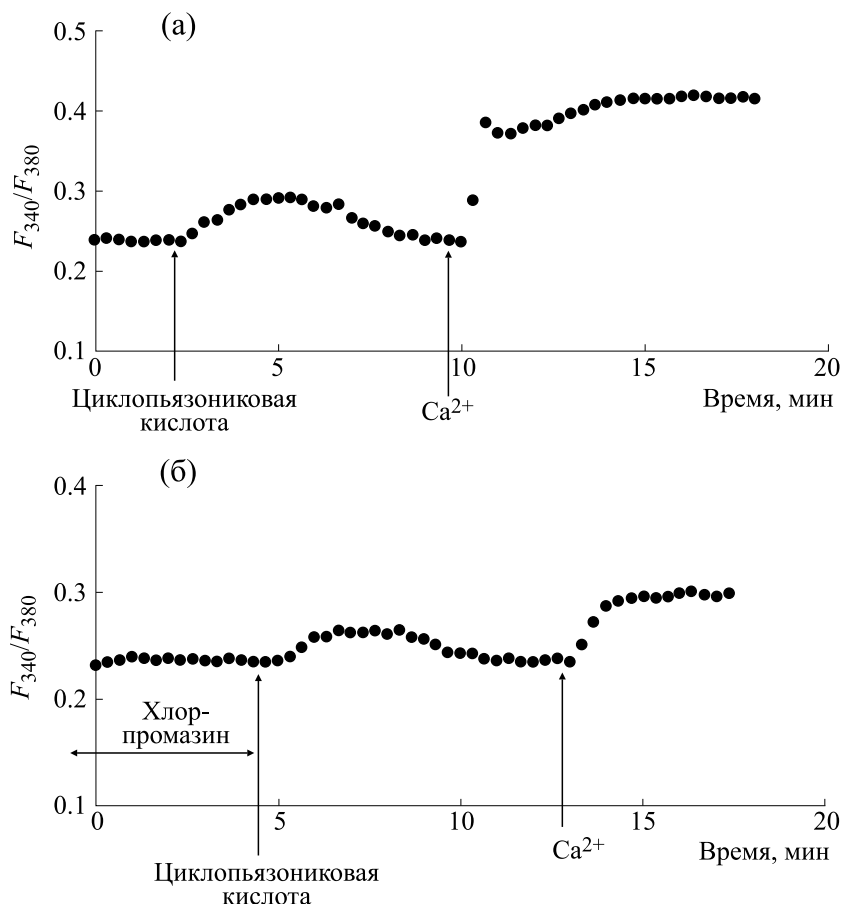


Рис. 4. Влияние хлорпромазина на Ca^{2+} -ответы, вызываемые циклопязониковой кислотой в макрофагах: (а) – клетки стимулировали 10 мкМ циклопязониковой кислоты в номинально бескальциевой среде, затем вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} ; (б) – макрофаги предварительно инкубировали в течение 10 мин с 25 мкг/мл хлорпромазина в бескальциевой среде, затем добавляли 10 мкМ циклопязониковой кислоты, после чего вход Ca^{2+} инициировали введением в наружную среду 2 мМ Ca^{2+} . По оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fuga-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно, по оси абсцисс – время.

плекса депозависимого входа Ca^{2+} – белками STIM1 в мембране эндоплазматического ретикулума и Orai1 в плазмалемме [28].

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), а также Договора на выполнение научно-исследовательских работ № 28-12-38.

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 РФ № 267 от 19.06.03 «Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. J. W. Putney, *Cell Calcium* **11**, 611 (1990).
2. J. W. Putney, *Adv. Exp. Med. Biol.* **981**, 205 (2017).
3. J. W. Putney, *Neurochem. Res.* **36**, 1157 (2011).
4. M. Prakriya and R. S. Lewis, *Physiol. Rev.* **95**, 1383 (2015).
5. L. Vaca, *Cell Calcium* **47**, 199 (2010).
6. C. Moreno and L. Vaca, in *Store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) pathways* (Springer-Verlag, Wien, 2012), pp. 93–113.

7. R. M. Nwokonko, X. Cai, N. A. Loktionova, et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* **993**, 83 (2017).
8. N. T. Nguyen, W. Han, W.-M. Cao, et al., *Comprehensive Physiol.* **8**, 981 (2018).
9. V. Lunz, C. Romanin, and I. Frischauf, *Cell Calcium* **77**, 29 (2019).
10. C. G. Rousseaux and S. F. Greene, *J. Recept. Signal Transduct.* **36**, 327 (2016).
11. T.-P. Su, T. Hayashi, T. Maurice, et al., *Trends Pharmacol. Sci.* **31**, 557 (2010).
12. T. Hayashi and T.-P. Su, *Cell* **131**, 596 (2007).
13. E. J. Cobos, J. M. Entrena, F. R. Nieto, et al., *Curr. Neuropharmacol.* **6**, 344 (2008).
14. З. И. Крутецкая, Л. С. Миленина, А. А. Наумова и др., *Докл. РАН* **472** (6), 723 (2017).
15. З. И. Крутецкая, Л. С. Миленина, А. А. Наумова и др., *Докл. РАН* **480** (5), 613 (2018).
16. Y. Itzhak, M. Ruhland, and H. Krahlhng, *Neuropharmacol.* **29**, 181 (1990).
17. R. E. Conrad, in *Manual of macrophages methodology* (Marcell Dekker, New York, 1981), pp. 5–11.
18. C. Randriamampita and A. Trautmann, *Cell. Biol.* **105**, 761 (1987).
19. R. A. Monahan, H. F. Dvorak, and A. M. Dvorak, *Blood* **58**, 1089 (1981).
20. J. I. E. Bruce and A. C. Elliott, *Brit. J. Physiol.* **131**, 761 (2000).
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. J. L. Harper and J. W. Daly, *Drug Dev. Res.* **47**, 107 (1999).
24. S.-Y. Choi, Y.-H. Kim, Y.-K. Lee, et al., *Brit. J. Pharmacol.* **132**, 411 (2001).
25. M. S. Amer, L. McKeown, S. Tumova, et al., *Brit. J. Pharmacol.* **168**, 1445 (2013).
26. N. C. McNaughton, P.J. Green, and A. D. Randall, *Acta Physiol. Scand.* **173**, 401 (2001).
27. З. И. Крутецкая, Л. С. Миленина, А. А. Наумова и др., *Докл. РАН* **481** (5), 570 (2018).
28. S. Srivats, D. Balasuriya, M. Pasche, et al., *J. Cell Biol.* **213**, 65 (2016).

Sigma-1 Receptor Ligand Chlorpromazine Attenuates Store-Dependent Ca²⁺ Entry in 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*

***S.M. Kirov Military Medical Academy, ul. Akademika Lebedeva 6, Saint-Petersburg, 194044 Russia*

Using Fura-2AM, a fluorescent Ca²⁺ indicator, we have shown for the first time that the sigma-1 receptor antagonist - neuroleptic chlorpromazine - significantly inhibits the store-dependent Ca²⁺ entry induced by immunomodulators glutoxim as well as molixan and endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase inhibitors thapsigargin and cyclopiazonic acid in rat peritoneal macrophages. The results suggest the involvement of sigma-1 receptors in the regulation of store-dependent Ca²⁺ entry in macrophages.

Keywords: sigma-1 receptors, store-dependent Ca²⁺ entry, macrophages