

ЛИГАНДЫ РЕЦЕПТОРОВ СИГМА-1 – ХЛОПРОМАЗИН И ТРИФЛУОПЕРАЗИН – ИНГИБИРУЮТ ТРАНСПОРТ Na^+ В ЭПИТЕЛИИ КОЖИ ЛЯГУШКИ

© 2020 г. А.В. Мельнищкая*, 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: z.krutetskaya@spbu.ru, avmelnitskaya@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.11.2019 г.

После доработки 30.11.2019 г.

Принята к публикации 04.06.2020 г.

С использованием метода фиксации потенциала впервые показано, что антагонисты рецепторов сигма-1 – нейрорептиды хлорпромазин и трифлуоперазин – подавляют транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. Полученные данные свидетельствуют о возможном участии рецепторов сигма-1 в регуляции трансэпителиального транспорта Na^+ в коже лягушки.

Ключевые слова: рецепторы сигма-1, транспорт Na^+ , хлорпромазин, трифлуоперазин.

DOI: 10.31857/S0006302920050105

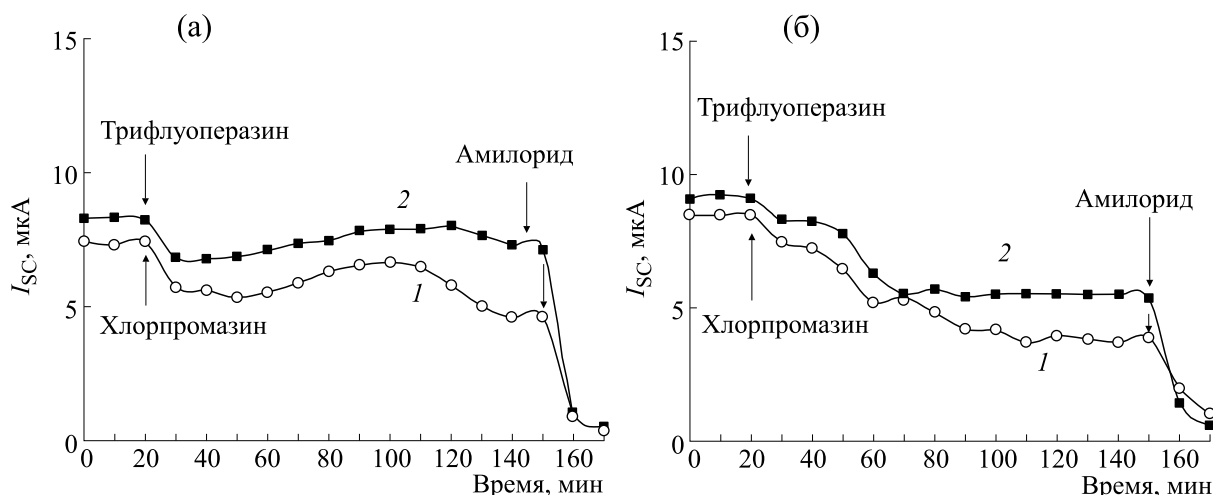
Кожа амфибий и другие изолированные эпителиальные системы являются классическими модельными объектами для исследования механизмов транспорта ионов через биологические мембраны. По способности к транспорту электролитов и реакции на некоторые гормоны кожа и мочевого пузыря амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев, что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов транспорта воды и ионов в клетках почки [1]. Транспорт Na^+ в эпителиальных тканях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие Na^+ -транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки. Белковые компоненты этой системы являются мишенью для действия широкого спектра гормонов и фармакологических агентов.

Ключевую роль в транспорте Na^+ в реабсорбирующих эпителиях играют амилорид-чувствительные эпителиальные Na^+ -каналы (ENaC). ENaC являются представителями обширного суперсемейства дегенерин/эпителиальные Na^+ -каналы (Deg/ENaC), объединяющего лигандуправ-

ляемые Na^+ -проводящие каналы, блокируемые диуретиком амилоридом. Deg/ENaC универсальны для всех многоклеточных организмов; экспрессируются в различных возбудимых и невозбудимых тканях; участвуют в процессах болевой чувствительности, механочувствительности и направленного переноса Na^+ [2]. Несмотря на то что представители суперсемейства Deg/ENaC функционально гетерогенны, они обладают сходными биофизическими свойствами и структурной организацией.

Рецепторы сигма-1 представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в плазматической мембране и в мембране эндоплазматического ретикула на границе с митохондриями. Эти рецепторы широко экспрессированы в центральной нервной системе и в периферических тканях, в том числе в клетках почки и печени [3, 4]. Их лигандами являются эндогенные стероиды, антидепрессанты, антипсихотические, противосудорожные и анальгетические средства [5, 6]. Рецепторы сигма-1 взаимодействуют с многочисленными белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвуют в модуляции многих клеточных процессов [7]. Обнаружено, что в нейронах рецепторы сигма-1 модулируют активность потенциалзависимых ионных каналов различных типов [8]. В последнее время появляются данные о том, что рецепторы данного типа участвуют в модуляции активности протон-активируемых ион-

Сокращения: ENaC – амилорид-чувствительные эпителиальные Na^+ -каналы, Deg/ENaC – суперсемейство дегенерин/эпителиальные Na^+ -каналы, ASICs – протон-активируемые ионные каналы, ХП – хлорпромазин, ТФП – трифлуоперазин.



Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{SC} через кожу лягушки в ответ на приложение антагонистов рецепторов сигма-1 – 50 мкг/мл хлорпромазина (1) и 20 мкг/мл трифлуоперазина (2), добавленных со стороны апикальной (а) и базолатеральной (б) поверхности кожи лягушки. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилоридчувствительных эпителиальных Na^+ -каналов – амилорид (20 мкМ).

ных каналов (ASICs) – одного из представителей суперсемейства Deg/ENaC [9]. В то же время роль рецепторов сигма-1 в процессах трансэпителиального транспорта Na^+ практически не изучена. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать участие рецепторов сигма-1 в регуляции транспорта Na^+ в эпителии кожи лягушки. В экспериментах были использованы антагонисты рецепторов сигма-1 – типичные антипсихотические средства – нейролептики фенотиазинового ряда хлорпромазин (аминазин, ХП) и трифлуоперазин (трифтазин, ТФП) [5, 6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на самцах лягушки *Rana temporaria* в период с ноября по март. Кожу с брюшка лягушки срезали и помещали в камеру Уссинга (World Precision Instruments Inc., Германия) с диаметром внутреннего отверстия 12 мм. Камеру заполняли раствором Рингера для холоднокровных, содержащим (в мМ): $NaCl$ – 110, KCl – 2.5, $CaCl_2$ – 3, $Tris-HCl$ – 5, pH 7.4. Опыты проводили при комнатной температуре (22–23°C).

Для измерения электрических параметров кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала и регистрации вольт-амперных характеристик [10]. Для измерения вольт-амперных характеристик на кожу подавали линейно изменяющееся напряжение со скоростью изменения 20 мВ/с. В интервалах между измерениями вольт-амперных характеристик трансэпителиальный потенциал (V_T) кожи под-

держивали при 0 мВ (режим короткого замыкания) или при потенциале открытой цепи V_{OC} ($V_{OC} = V_T$ при трансэпителиальном токе $I_T = 0$). Из вольт-амперных характеристик определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания I_{SC} ($I_{SC} = I_T$ при $V_T = 0$), V_{OC} и трансэпителиальную проводимость g_T .

Транспорт Na^+ оценивали как амилоридчувствительный ток I_{SC} . В связи с этим в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ).

Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Маточные растворы ХП (25 мг/мл), ТФП (5 мг/мл) и амилорида (10 мМ) готовили на воде. Фармакологические агенты добавляли к апикальной или базолатеральной поверхности кожи лягушки.

Статистический анализ проводили с применением t -критерия Стьюдента. Данные представлены в виде $x \pm s_x$. На рисунке приведены результаты типичных экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным десяти экспериментов) составили: $I_{SC} = 9.5 \pm 2.34$ мкА, $V_{OC} = -11.71 \pm 3.85$ мВ, $g_T = 0.79 \pm 0.27$ мСм.

Мы обнаружили, что обработка кожи лягушки ТФП или ХП снижает в ней транспорт Na^+ . В среднем, изменение электрических характеристик кожи лягушки (здесь и далее по тексту $x \pm s_x$,

n (число опытов) = 10) после добавления 20 мкг/мл ТФП было следующим: I_{SC} уменьшился на 10.34 ± 3.82 или $31.24 \pm 13.11\%$, V_{OC} уменьшился на 26.35 ± 12.24 или $34.18 \pm 16.22\%$, а g_T уменьшилась на 21.12 ± 8.74 или увеличилась на $5.21 \pm 1.14\%$ при приложении ТФП со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи соответственно. В случае обработки кожи лягушки 50 мкг/мл ХП изменение электрических характеристик в среднем было следующим: I_{SC} уменьшился на 18.34 ± 6.19 или $39.25 \pm 7.18\%$, V_{OC} уменьшился на 20.02 ± 7.35 или $40.18 \pm 12.34\%$, а g_T не изменялась или уменьшилась на $10.34 \pm 3.85\%$ при приложении ХП со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи соответственно.

Полученные данные свидетельствуют о том, что степень и кинетика ингибирующего действия нейрелептиков фенотиазинового ряда на транспорт Na^+ различаются в зависимости от приложения агентов со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи (см. рисунок). Так, приложение ХП или ТФП к апикальной поверхности кожи вызывает двухфазное изменение I_{SC} : подавление I_{SC} , наблюдаемое в течение 30–40 мин после приложения агентов, сменяющееся некоторым увеличением I_{SC} , наблюдаемым в течение второго часа после приложения ТФП или ХП. В случае добавления ТФП или ХП со стороны базолатеральной поверхности кожи наблюдается постепенное снижение I_{SC} в течение первого часа после приложения агентов. Фаза увеличения I_{SC} в этом случае не наблюдалась. Можно предположить, что влияние антагонистов рецепторов сигма-1 на транспорт Na^+ в коже лягушки осуществляется при участии различных белковых и липидных сигнальных комплексов, ассоциированных с апикальным и базолатеральным доменами поляризованных эпителиальных клеток.

Полученные нами результаты согласуются с литературными данными. Так, способность ХП ингибировать активность Na^+ - K^+ -АТФазы [11] и снижать внутриклеточную концентрацию Na^+ обнаружена в клетках печени крысы (*Rattus norvegicus*) и жабы (*Bufo marinus*) [12]. Было показано, что ХП ингибирует активность ENaC, экспрессированных в ооцитах лягушки *Xenopus* [13]. Обнаружено также, что приложение 100 мкМ ТФП со стороны базолатеральной мембраны, вызывает снижение I_{SC} и V_{OC} в мочевом пузыре жабы [14]. Двухфазное дозозависимое изменение I_{SC} при воздействии ТФП показано для изолированной кожи лягушки *Rana esculenta* [15, 16]. Однако в этом случае добавление ТФП вызывало стимуляцию транспорта Na^+ через кожу лягушки.

В цитируемых работах также высказывалось предположение о том, что молекулярные механизмы, вовлеченные в регуляцию ТФП транспорта Na^+ в коже лягушки, различаются в зависимости от приложения агента к апикальному или базолатеральному домену полярных клеток эпителия. Так, наиболее вероятно, что влияние ТФП на I_{SC} в случае приложения агента к апикальной поверхности кожи связано с модуляцией активности ENaC [16] или с изменением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} [15], тогда как влияние ТФП на I_{SC} при приложении агента к базолатеральной поверхности кожи опосредуется Ca^{2+} -зависимым синтезом и последующим выделением из базолатеральной мембраны простагландина E_2 , что в свою очередь приводит к стимуляции транспорта Na^+ через кожу лягушки [15, 16]. Известно, что ТФП является антагонистом Ca^{2+} -связывающего белка кальмодулина, играющего ключевую роль в регуляции процессов Ca^{2+} -сигнализации [17]. Однако имеются данные о сходном влиянии на I_{SC} различных производных фенотиазина (ХП и ТФП), что свидетельствует о том, что влияние ТФП на транспорт Na^+ в коже лягушки осуществляется, по-видимому, без участия комплекса « Ca^{2+} –кальмодулин» [16].

Известно, что транспорт Na^+ в эпителиях представляет собой сложную многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие многочисленные Na^+ -транспортирующие белки, локализованные в различных мембранах клетки. Введение в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) вызывало полное подавление I_{SC} (см. рисунок), что свидетельствует о том, что влияние антагонистов рецепторов сигма-1 ХП или ТФП на транспорт Na^+ связано преимущественно с модуляцией активности ENaC. Полученные результаты могут представлять интерес в связи с литературными данными о способности рецепторов сигма-1 модулировать активность ионных каналов ASICs – одного из представителей суперсемейства Deg/ENaC, к которому принадлежат и ENaC, играющие ключевую роль в транспорте Na^+ в реабсорбирующих эпителиях. Так, на клетках эмбриональной почки человека (линия HEK-293) обнаружено, что возможно как прямое взаимодействие между рецепторами сигма-1 и ASICs, с образованием комплекса со стехиометрией 1 рецептор сигма-1 : 1 субъединица ASIC [9], так и опосредованное влияние агонистов/антагонистов рецепторов сигма-1 на ASICs при участии дополнительных сигнальных молекул, таких как

гетеротримерные G-белки и комплекс кальци-нейрина с адаптерным белком AKAP150 [18].

Таким образом, как ранее [19], так и в настоящей работе нами показано, что различные антагонисты рецепторов сигма-1, в том числе нейролептики фенотиазинового ряда ХП и ТФП, модулируют транспорт Na^+ в коже лягушки, что свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 в регуляции транспорта Na^+ в эпителии кожи лягушки. Полученные нами данные о влиянии антагонистов рецепторов сигма-1 на трансэпителиальный транспорт Na^+ способствуют более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия производных фенотиазина, широко применяемых в клинической практике в качестве антипсихотических, миорелаксирующих и седативных средств, а также для лечения шизофрении и других психических заболеваний.

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

Все применимые международные, национальные и институциональные принципы ухода и использования животных при выполнении работы были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ю. В. Наточин, *Основы физиологии почки* (Наука, Л., 1982).
2. S. Kellenberger and L. Schild, *Physiol. Rev.* **82**, 735 (2002).
3. C. G. Rousseaux and S. F. Greene, *J. Recept. Signal. Trans.* **36**, 327 (2016).
4. S. B. Hellewell, A. Bruce, G. Feinstein, et al., *Eur. J. Pharmacol.* **268**, 9 (1994).
5. E. J. Cobos, J. M. Entrena, F. R. Nieto, et al., *Curr. Neuropharmacol.* **6**, 344 (2008).
6. Y. Itzhak, M. Ruhland, and H. Kraehling, *Neuropharmacol.* **29**, 181 (1990).
7. B. Penke, L. Fulop, M. Szucs, et al., *Curr. Neuropharmacol.* **16**, 97 (2018).
8. T.-P. Su, T. Hayashi, T. Maurice, et al., *Trends Pharmacol. Sci.* **31**, 557 (2010).
9. S. M. Carnally, M. Johannessen, R. M. Henderson, et al., *Biophys. J.* **98**, 1182 (2010).
10. Z. I. Krutetskaya, O. E. Lebedev, A. V. Melnitskaya, et al., *Dokl. Akad. Nauk* **421** (5), 709 (2008).
11. R. W. Van Dyke and B. F. Scharschmidt, *Am. J. Physiol.* **253**, 613 (1987).
12. P. Else and K. Mansfield, *Biochem. Pharmacol.* **54**, 275 (1997).
13. M. S. Awayda, W. Shao, F. Guo, et al., *J. Gen. Physiol.* **123**, 709 (2004).
14. S. D. Levine, W. A. Kachadorian, D. N. Levin, et al., *J. Clin. Invest.* **67** (3), 662 (1981).
15. H. F. Bjerregaard and R. Nielsen, *Acta Physiol. Scand.* **127** (1), 75 (1986).
16. H. F. Bjerregaard and R. Nielsen, *Acta Physiol. Scand.* **134** (1), 43 (1988).
17. M. D. Feldkamp, S. E. O'Donnell, L. Yu, et al., *Proteins* **78** (10), 2265 (2010).
18. Y. Herrera, C. Katnik, J. D. Rodriguez, et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **327**, 491 (2008).
19. А. В. Мельницкая, З. И. Крутецкая, С. Н. Бутов и др., в кн. *Рецепторы и внутриклеточная сигнализация*, под ред. В. П. Зинченко и А. В. Бережнова (Fix-Print, Пушкино, 2017), т. 1, сс. 55–58.

Sigma-1 Receptor Ligands Chlorpromazine and Trifluoperazine Inhibit Na^+ Transport in Frog Skin Epithelium

A.V. Melnitskaya*, Z.I. Krutetskaya*, V.G. Antonov**, and N.I. Krutetskaya*

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

**Kirov Military Medical Academy, ul. Akademika Lebedeva 6, St. Petersburg, 194044 Russia

Using voltage-clamp technique, we have shown for the first time that sigma-1 receptor antagonists – neuroleptics chlorpromazine and trifluoperazine – attenuate Na^+ transport in the frog skin epithelium. The results suggest the possible involvement of sigma-1 receptors in the regulation of transepithelial Na^+ transport in frog skin.

Keywords: sigma-1 receptors, Na^+ transport, chlorpromazine, trifluoperazine