

АНТАГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРОВ СИГМА-1 ГАЛОПЕРИДОЛ И ХЛОРПРОМАЗИН МОДУЛИРУЮТ ВЛИЯНИЕ ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ

З. И. Крутецкая*, А. В. Мельницкая, В. Г. Антонов,
академик РАН А. Д. Ноздрачев

Поступило 28.06.2018 г.

С помощью метода фиксации потенциала исследовали участие рецепторов сигма-1 в регуляции иммуномодулятором глутоксимом транспорта Na^+ в эпителии кожи лягушки. Впервые показали, что обработка кожи лягушки антагонистами рецепторов сигма-1 — галоперидолом или хлорпромазином — подавляет стимулирующее влияние глутоксима на транспорт Na^+ . Полученные результаты свидетельствуют о возможном участии рецепторов сигма-1 в регуляции глутоксимом транспорта Na^+ в коже лягушки.

Ключевые слова: сигма-1 рецепторы, галоперидол, хлорпромазин, глутоксим, транспорт Na^+ , кожа лягушки.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524845629-632>

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 мочевой пузырь амфибий сходны с дистальными отделами почечных канальцев [1], что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов транспорта воды и ионов в клетках почки.

Ключевую роль в транспорте Na^+ в реабсорбирующих эпителиях играют амилоридчувствительные эпителиальные Na^+ -каналы (ENaC). Эти каналы локализованы в апикальных мембранах эпителиальных клеток и являются представителями обширного суперсемейства дегенерины/эпителиальные Na^+ -каналы (Deg/ENaC), объединяющего лигандуправляемые Na^+ -проводящие каналы, блокируемые диуретиком амилоридом [2, 3].

Ранее [4] нами было обнаружено, что транспорт Na^+ в коже лягушки модулируется различными окисляющими и восстанавливающими агентами. В цитируемой работе впервые было показано, что окисленный глутатион (GSSG) и препарат-иммуномодулятор глутоксим® (Г — динариевая соль GSSG с нанодобавкой d-металла,

“ФАРМА–ВАМ”, Россия), приложенные к базолатеральной поверхности кожи лягушки, имитируют действие инсулина и стимулируют трансэпителиальный транспорт Na^+ .

Рецепторы сигма-1 представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в плазматической мембране и в мембране эндоплазматического ретикулума на границе с митохондриями. Эти рецепторы широко экспрессированы в центральной нервной системе и в периферических тканях, в том числе в клетках почки и печени [5, 6]. Их лигандами являются эндогенные стероиды, антидепрессанты, антипсихотические, противосудорожные и анальгетические средства [7]. Рецепторы сигма-1 взаимодействуют с многочисленными белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвуют в модуляции многих клеточных процессов [8].

Ранее нами было показано, что антагонисты рецепторов сигма-1 — нейрорептики галоперидол (ГП) и хлорпромазин (ХП) — подавляют транспорт Na^+ в коже лягушки [9]. Известно, что некоторые клинические случаи требуют совместного применения иммуномодуляторов и нейрорептиков. В связи с этим представлялось целесообразным исследовать возможное участие рецепторов сигма-1 во влиянии Г на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки, что и составило предмет настоящего сообщения. В экспериментах использовали антагонисты рецепторов

Санкт-Петербургский государственный университет

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

сигма-1 — производное фенотиазина ХП [10] и производное бутирофенона ГП [11].

Опыты 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. Опыты проводили при комнатной температуре (22–23°C). Для регистрации вольт-амперных характеристик (ВАХ) кожи лягушки использовали автоматизированную установку фиксации потенциала [4]. Из ВАХ определяли электрические параметры кожи: ток короткого замыкания I_{SC} ($I_{SC} = I_T$ при $V_T = 0$, где I_T — трансэпителиальный ток), потенциал открытой цепи V_{OC} ($V_{OC} = V_T$ при $I_T = 0$, где V_T — трансэпителиальный потенциал) и трансэпителиальную проводимость g_T . Транспорт Na^+ оценивали как амилоридчувствительный I_{SC} . В экспериментах использовали реактивы фирмы “Sigma-Aldrich” (США). Галоперидол (100 мкг/мл) и ХП (100 мкг/мл) добавляли за 30–40 мин до введения в раствор Г. Статистический анализ проводили с применением критерия *t* Стьюдента.

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле составили (здесь и далее по тексту $M \pm m$, n (число опытов) = 10): $I_{SC} = 24,46 \pm 4,08$ мкА, $V_{OC} = -80,67 \pm 12,35$ мВ, $g_T = 0,27 \pm 0,12$ мСм. Мы установили, что Г (100 мкг/мл), приложенный к базолатеральной поверхности кожи лягушки, подобно инсулину стимулирует транспорт Na^+ (рис. 1а, б, кривая 1). После приложения Г, I_{SC} возрос на $41,13 \pm 8,01\%$; V_{OC} — на $49,31 \pm 8,34\%$; величина g_T не изменилась.

Мы обнаружили, что предварительная обработка кожи лягушки ГП (100 мкг/мл) или ХП (100 мкг/мл) в течение 30 мин перед добавлением к базолатеральной поверхности кожи 100 мкг/мл Г приводила к снижению стимулирующего влияния Г на транспорт Na^+ (табл. 1, рис. 1). При сравнении влияния исследованных антагонистов рецепторов сигма-1 обнаружили, что ГП и ХП различались по степени ингибирующего действия на эффект Г, которая также зависела от приложения агентов со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи. Результаты, представленные в табл. 1 и на рис. 1, свидетельствовали о том, что ХП значительно сильнее снижал стимулирующее действие Г на транспорт Na^+ . Кроме того, ингибирующий эффект ГП и ХП был более выражен при действии агентов со стороны апикальной поверхности кожи лягушки. Так, приложение ХП к апикальной поверхности кожи вызывало

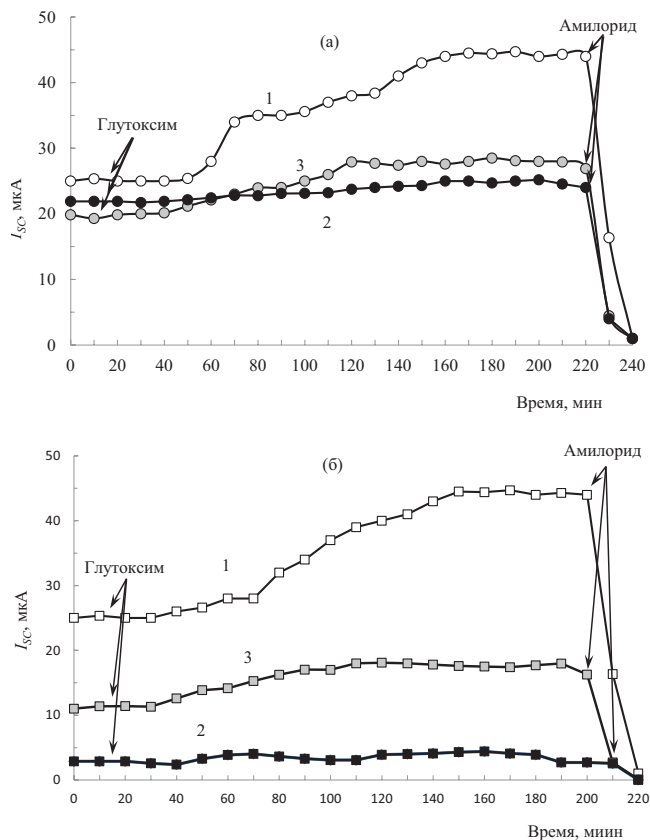


Рис. 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{SC} через кожу лягушки в ответ на действие глутокси́ма (Г) и антагонистов рецепторов сигма-1 — хлорпромазина (ХП) и галоперидола (ГП), приложенных со стороны апикальной (а) или базолатеральной (б) поверхности кожи. 1 — I_{SC} после добавления 100 мкг/мл Г к базолатеральной поверхности интактной кожи; 2 — I_{SC} после добавления Г к коже лягушки, предварительно обработанной в течение 30 мин. 100 мкг/мл ХП; 3 — I_{SC} после добавления Г к коже лягушки, предварительно обработанной в течение 30 мин 100 мкг/мл ГП. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ЕNaС амилорид (20 мкМ). На рисунке представлены результаты типичных экспериментов.

полное подавление стимулирующего действия Г на транспорт Na^+ (табл. 1 и рис. 1, кривая 2). Ингибирующий эффект ГП был также более выражен при приложении агента со стороны апикальной поверхности кожи, однако предварительная обработка кожи ГП вызывала снижение, но не подавление стимулирующего действия Г (табл. 1, рис. 1, кривая 3).

Таким образом, в настоящей работе мы впервые на эпителии кожи лягушки показали, что два структурно разных антагониста рецепторов сигма-1 модулируют влияние Г на транспорт Na^+ , что свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 в сигнальных каскадах, запускаемых Г

Таблица 1. Влияние глутоксима (Г) на электрические характеристики кожи лягушки

Блокатор, концентрация	Электрические характеристики	Изменения электрических характеристик после приложения Г к коже лягушки, предварительно обработанной антагонистами рецепторов сигма-1, %	
		со стороны апикальной поверхности	со стороны базолатеральной поверхности
Галоперидол, 100 мкг/мл	I_{SC}	↑ 25,34 ± 7,12	↑ 30,02 ± 9,34
	V_{OC}	↑ 32,19 ± 8,41	↑ 29,76 ± 7,48
	g_T	↑ 6,37 ± 2,07	↑ 9,13 ± 2,09
Хлорпромазин, 100 мкг/мл	I_{SC}	↑ 2,35 ± 0,15	↑ 19,45 ± 4,12
	V_{OC}	↑ 5,52 ± 1,09	↑ 17,37 ± 3,21
	g_T	↓ 7,27 ± 2,13	↑ 4,55 ± 1,74

Примечание. Стрелками обозначено увеличение (↑) или уменьшение (↓) значений электрических характеристик кожи после приложения Г по сравнению с контролем. $M \pm m$, n (число опытов) = 10.

в эпителии кожи лягушки и приводящих к стимуляции транспорта Na^+ .

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Так, в последнее время появляются данные о том, что рецепторы сигма-1 модулируют активность ионных каналов разных типов, в том числе протонактивируемых ионных каналов (ASICs) — одного из представителей суперсемейства Deg/ENaC, к которому принадлежат и ENaC. Обнаружено [12], что возможно как прямое взаимодействие между рецепторами сигма-1 и ASICs с образованием комплекса со стехиометрией 1 рецептор сигма-1/1-субъединица ASIC, так и опосредованное влияние агонистов/антагонистов рецепторов сигма-1 на ASICs при участии дополнительных сигнальных молекул, таких как гетеротримерные G-белки и комплекс кальцинейрина с адаптерным белком AKAP150 [13]. Полученные нами данные о том, что ингибирующий эффект ГП и ХП значительно более выражен при добавлении их со стороны апикальной поверхности кожи позволяют предположить, что основные мишени для действия антагонистов рецепторов сигма-1 локализованы именно в апикальных, а не в базолатеральных мембранах клеток эпителия кожи лягушки.

Известно, что многие Na^+ -транспортирующие белки содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенями для внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей [14, 15]. Добавление в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, блокатора ENaC амилорида (20 мкМ), вызвало полное подавление транспорта Na^+ (рис. 1). Это свидетельствует о том, что влияние Г на транспорт Na^+ обусловлено в основном модуляцией активности ENaC.

Таким образом, мы впервые обнаружили модулирующее влияние антагонистов рецепторов сигма-1 ГП и ХП на эффект Г на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. Результаты указывают также на нежелательность совместного применения в клинической практике препарата Г и нейрореплетиков ГП и ХП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Наточин Ю.В.* Основы физиологии почки. Л.: Наука, 1982. 184 с.
2. *Benos D.J., Stanton B.A.* // J. Physiol. 1999. V. 520. P. 631–644.
3. *Kellenberger S., Schild L.* // Physiol. Rev. 2002. V. 82. P. 735–767.
4. *Крутецкая З.И., Лебедев О.Е., Мельницкая А.В., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д.* // ДАН. 2008. Т. 421. № 5. С. 709–712.
5. *Rousseaux C.G., Greene S.F.* // J. Recept. Signal. Trans. 2016. V. 36. P. 327–388.
6. *Hellewell S.B., Bruce A., Feinstein G., et al.* // Eur. J. Pharmacol. 1994. V. 268. P. 9–18.
7. *Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., et al.* // Curr. Neuropharmacol. 2008. V. 6. P. 344–366.
8. *Su T.-P., Hayashi T., Maurice T., et al.* // Trends Pharmacol. Sci. 2010. V. 31. P. 557–566.
9. *Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г.* В сб. “Актуальные вопросы биологической физики и химии БФФХ-2017”. Севастополь: Севастопол. гос. ун-т, 2017. С. 272–275.
10. *Itzhak Y., Ruhland M., Krahling H.* // Neuropharmacology. 1990. V. 29. P. 181–184.
11. *Cobos E.J., Del Pozo E., Baeyens J.M.* // J. Neurochem. 2007. V. 102. P. 812–825.

12. Carnally S.M., Johannessen M., Henderson R.M., et al. // Biophys. J. 2010. V. 98. P. 1182–1191.
13. Herrera Y., Katnik C., Rodriguez J.D., et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2008. V. 327. P. 491–502.
14. Firsov D., Robert-Nicoud M., Gruender S., et al. // J. Biol. Chem. 1999. V. 274. P. 2743–2749.
15. Boldyrev A.A., Bulygina E.R. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1997. V. 834. P. 666–668.

SIGMA-1 RECEPTOR ANTAGONISTS HALOPERIDOL AND CHLORPROMAZINE MODULATE THE EFFECT OF GLUTOXIM ON Na⁺ TRANSPORT IN FROG SKIN

**Z. I. Krutetskaya, A. V. Melnitskaya, V. G. Antonov,
Academician of the RAS A. D. Nozdrachev**

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

Received June 28, 2018

Using voltage-clamp technique, the involvement of sigma-1 receptors in immunomodulatory drug glutoxim regulation of Na⁺ transport in frog skin was investigated. We have shown for the first time that preincubation of the frog skin with sigma-1 receptor antagonists – haloperidol or chlorpromazine – attenuates the stimulatory effect of glutoxim on Na⁺ transport. The results suggest the possible involvement of the sigma-1 receptors in glutoxim effect on Na⁺ transport in frog skin epithelium.

Keywords: sigma-1 receptor, haloperidol, chlorpromazine, glutoxim, Na⁺ transport, frog skin.