

УДК 576.32/.36

АГОНИСТ РЕЦЕПТОРОВ СИГМА-1 АМИТРИПТИЛИН ПОДАВЛЯЕТ  
ДЕПОЗАВИСИМЫЙ ВХОД  $\text{Ca}^{2+}$  В МАКРОФАГАХ

З. И. Крутецкая<sup>1,\*</sup>, Л. С. Миленина<sup>1</sup>, В. Г. Антонов<sup>1</sup>, академик РАН А. Д. Ноздрачев<sup>1,2,\*\*</sup>

Поступило 08.02.2019 г.

С использованием флуоресцентного  $\text{Ca}^{2+}$ -зонда Fura-2AM впервые показали, что агонист рецепторов сигма-1 – трициклический антидепрессант амитриптилин – значительно подавляет депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцируемый ингибиторами эндоплазматических  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз тапсигаргином и циклопья-зонниковой кислотой, в макрофагах. Полученные результаты свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах.

**Ключевые слова:** амитриптилин, депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , рецепторы сигма-1, макрофаги.

**DOI:** <https://doi.org/10.31857/S0869-56524882221-224>

Депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , впервые описанный Джеймсом Патни более тридцати лет назад, является повсеместным (*ubiquitous*) механизмом входа  $\text{Ca}^{2+}$  в клетки эукариот, активируемым при опустошении внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо [1]. Депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  участвует в регуляции широкого спектра клеточных процессов (эзоцитоз, экспрессия генов, рост и пролиферация клеток и др.) в норме и патологии [1, 2]. Ключевыми молекулярными участниками депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  являются  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы Orai1 в плазмалемме и  $\text{Ca}^{2+}$ -сенсор STIM1 в мембране  $\text{Ca}^{2+}$ -депо. При опустошении депо, STIM1 олигомеризуется и транслоцируется в участки эндоплазматического ретикулума, расположенные у плазмалеммы, и прямо взаимодействует с белками Orai1, вызывая депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  [1, 2].

Важными участниками процессов  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнализации в клетках являются сигма-1 рецепторы – лигандрегулируемые молекулярные шапероны в мембране эндоплазматического ретикулума, имеющие уникальную историю, структуру и фармакологический профиль [3, 4]. Лигандами этих рецепторов являются различные по химической структуре и фармакологическому действию соединения: антидепрессанты, нейролептики, анальгетики, противосудорожные и противокашлевые средства [4, 5].

В связи с этим целью настоящей работы явилось исследование возможного участия рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцируемого ингибиторами эндоплазматических  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФаз тапсигаргином (ТГ) и циклопья-zon-

ковой кислотой (ЦПК), в перитонеальных макрофагах крыс. В экспериментах использовали агонист рецепторов сигма-1 – трициклический антидепрессант амитриптилин [3, 4, 6], широко используемый для лечения тревожно-депрессивных состояний [7].

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс популяции Wistar при комнатной температуре 20–22°C через 1–2 сут после начала культивирования клеток. Подробно процедура культивирования макрофагов и описание автоматизированной установки для измерения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (“Leica Microsystems”, Германия) изложены нами ранее [8]. 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 фотогорения измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  рассчитывали по уравнению Гринкевича [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  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в клетках в зависимости от времени измерения [10].

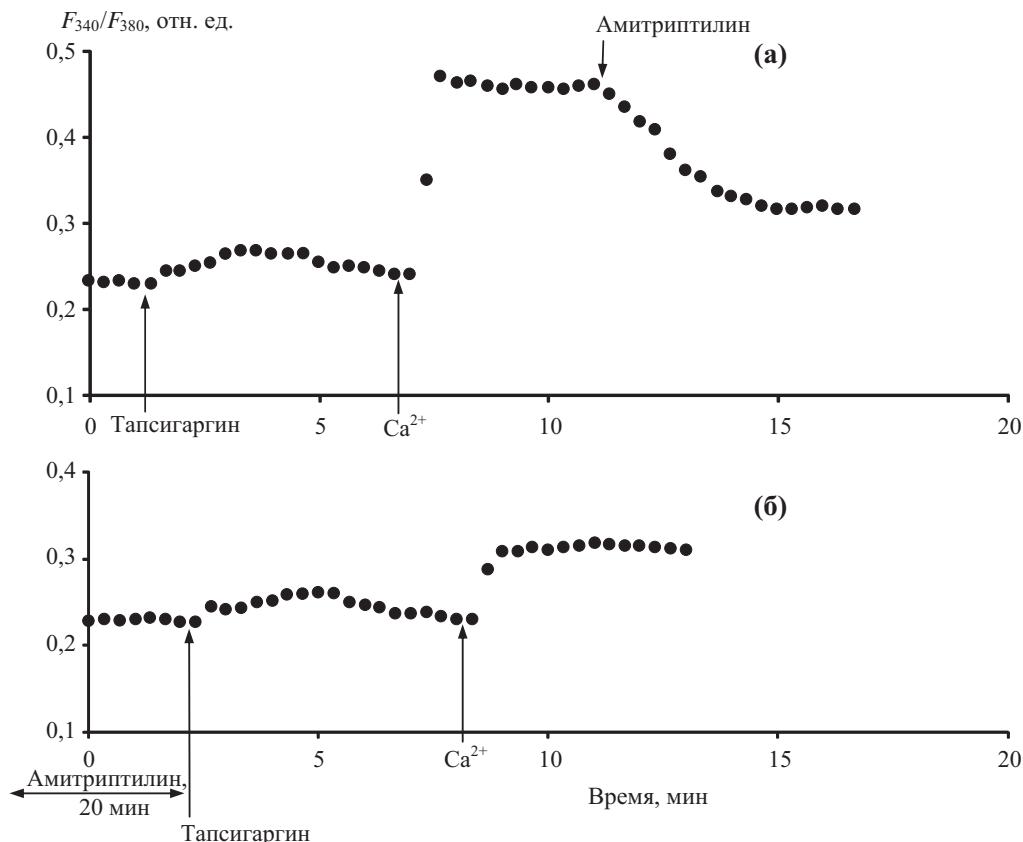
В контрольных экспериментах мы обнаружили, что добавление 0,5 мкМ ТГ к макрофагам, находящимся в бескальциевой среде, вызывает незначительное увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , отражающее мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо (рис. 1а). В среднем (по данным 10 экспериментов) увеличи-

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет

<sup>2</sup>Институт физиологии им. И. П. Павлова Российской Академии наук, Санкт-Петербург

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

\*\*E-mail: a.d.nozdrachev@mail.ru



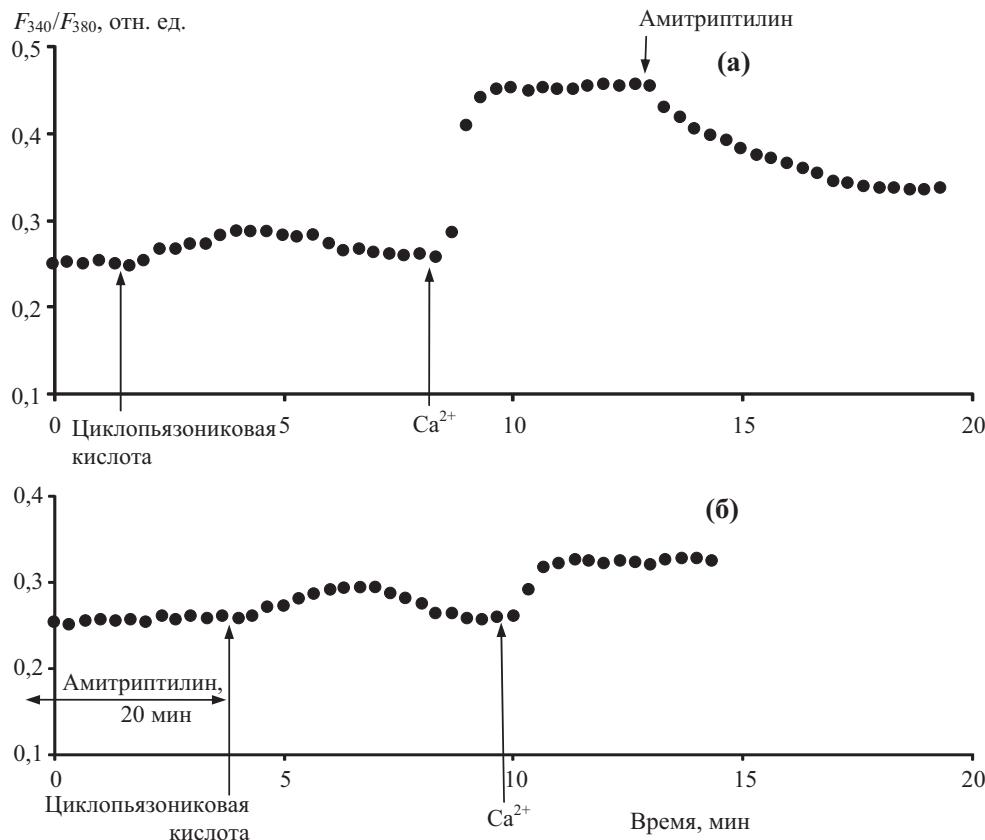
**Рис. 1.** Влияние амитриптилина на увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в макрофагах крыс, вызываемое тапсигаргином. Здесь и на рис. 2 по оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции  $F_{340}/F_{380}$  Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм. По оси абсцисс – время. а – к макрофагам, находящимся в номинально бескальциевой среде, добавляли 0,5 мкМ тапсигаргина, после окончания фазы мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо вход  $\text{Ca}^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ ; на фоне развивающегося входа  $\text{Ca}^{2+}$  добавляли 40 мкг/мл амитриптилина. б – клетки предварительно инкубировали в течение 20 мин с 20 мкг/мл амитриптилина в бескальциевой среде, затем добавляли 0,5 мкМ тапсигаргина, после окончания фазы мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо вход  $\text{Ca}^{2+}$  инициировали введением в наружную среду 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ . Каждая регистрация получена для группы из 40–50 клеток и представляет собой типичный вариант из 7–10 независимых экспериментов.

ние  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  во время фазы мобилизации составило  $35 \pm 9$  нМ (рис. 1а). При последующем введении в наружную среду 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$  наблюдался депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоль (рис. 1а). В среднем (по данным 10 экспериментов) увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  во время входа  $\text{Ca}^{2+}$  составило  $175,1 \pm 23,2$  нМ. Аналогичные результаты мы получили при использовании 10 мкМ ЦПК (рис. 2а). В среднем (по данным 7 экспериментов) увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , отражающее мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных  $\text{Ca}^{2+}$ -депо, составило  $29,8 \pm 9,2$  нМ (рис. 2а), а увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  во время входа  $\text{Ca}^{2+}$  составило  $143,3 \pm 21,4$  нМ.

Мы впервые обнаружили, что преинкубация макрофагов с 20 мкг/мл амитриптилина в течение 20 мин до введения 0,5 мкМ ТГ приводила к значительному подавлению как мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо (в среднем по данным 7 экспериментов на  $21,3 \pm$

$\pm 5,1\%$ ), так и последующего депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку (в среднем по данным 7 экспериментов на  $47,9 \pm 11,4\%$ ), индуцируемых ТГ (рис. 1б). Сходные результаты были получены в опытах по влиянию 20 мкг/мл амитриптилина на  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, вызываемые 10 мкМ ЦПК (рис. 2б). В среднем (по данным 7 экспериментов) амитриптилин вызывал подавление мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо на  $20,6 \pm 6,2\%$  и подавление депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  на  $42,9 \pm 10,4\%$ , индуцируемых ЦПК. Это свидетельствовало об участии рецепторов сигма-1 в активации депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцируемого ТГ или ЦПК, в макрофагах.

Кроме того, нами было показано, что добавление 40 мкг/мл амитриптилина на фоне развивающегося входа  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцированного ТГ (рис. 1а) или ЦПК (рис. 2а), вызывает значительное (в среднем по данным 12 экспериментов на  $50,5 \pm 14,3\%$ ) подавление



**Рис. 2.** Влияние амитриптилина на увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в макрофагах крыс, вызываемое циклопьязониковой кислотой. а – к макрофагам, находящимся в номинально бескальциевой среде, добавляли 10 мкМ циклопьязониковой кислоты, после окончания фазы мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо вход  $\text{Ca}^{2+}$  инициировали введение в наружную среду 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ ; на фоне развившегося входа  $\text{Ca}^{2+}$  добавляли 40 мкг/мл амитриптилина. б – клетки предварительно инкубировали в течение 20 мин с 20 мкг/мл амитриптилина в бескальциевой среде, затем добавляли 10 мкМ циклопьязониковой кислоты, после окончания фазы мобилизации  $\text{Ca}^{2+}$  из депо вход  $\text{Ca}^{2+}$  инициировали введение в наружную среду 2 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ .

депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофаги. Это свидетельствовало о возможном участии рецепторов сигма-1 не только в активации, но и в поддержании депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в макрофагах.

Таким образом, в настоящей работе мы впервые на перитонеальных макрофагах крысы показали, что агонист рецепторов сигма-1 трициклический антидепрессант амитриптилин подавляет обе фазы  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов, вызываемых ТГ или ЦПК в макрофагах. Полученные данные согласуются с результатами исследований других авторов, которые обнаружили, что амитриптилин подавляет мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из депо и последующий депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , индуцируемые АТФ или ТГ, в клетках лейкоза человека (линия HL-60) [11]. Установлено также, что агонист рецепторов сигма-1 кокаин ингибирует депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , вызываемый ТГ в эндотелиальных клетках сосудов мозга крыс [12], а агонист рецепторов сигма-1, (+)-SKF-10047, подавляет мобилизацию  $\text{Ca}^{2+}$  из депо и депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , вызываемые

ТГ в ооцитах китайского хомячка и клетках эмбриональной почки человека (линия HEK 293) [13]. Кроме того, известно, что амитриптилин блокирует потенциалзависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы L-типа (Cav1.2) в миоцитах желудочка сердца крыс [14, 15].

Полученные нами данные свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в регуляции депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в перитонеальных макрофагах. Рецепторы сигма-1 могут влиять на депозависимый вход  $\text{Ca}^{2+}$ , регулируя связывание между основными компонентами белкового комплекса депозависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$ : белками STIM1 в мембране эндоплазматического ретикулума и Orai1 в плазмалемме [13].

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Putney J.W. // Adv. Exp. Med. Biol. 2017. V. 981. P. 205–214.
2. Prakriya M., Lewis R.S. // Physiol. Rev. 2015. V. 95. P. 1383–1436.

3. Rousseaux C.G., Greene S.F. // J. Recept. Signal Transduct. 2016. V. 36. P. 327–388.
4. Penke B., Fulop L., Szucs M., et al. // Curr. Neuropharmacol. 2018. V. 16. P. 97–116.
5. Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., et al. // Curr. Neuropharmacol. 2008. V. 6. P. 344–366.
6. Villard V., Meunier J., Chevallier N., et al. // J. Pharmacol. Sci. 2011. V. 115. P. 279–292.
7. Gillman P.K. // British J. Pharmacol. 2007. V. 151. P. 737–748.
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. 16559–16566.
11. Harper J.L., Daly J.W. // Drug Dev. Res. 1999. V. 47. P. 107–117.
12. Brailou G.C., Deliu E., Console-Bram L.M., et al. // Biochem. J. 2016. V. 473. P. 1–5.
13. Srivats S., Balasuriya D., Pasche M., et al. // J. Cell Biol. 2016. V. 213. P. 65–79.
14. Humplova-Peichlova J., Krusek J., Paclt I., et al. // Physiol. Res. 2002. V. 51. P. 317–321.
15. Zahradnik I., Minarovic I., Zahradnikova Z. // J. Pharmacol. Exper. Therap. 2008. V. 324. P. 977–984.

## SIGMA-1 RECEPTOR AGONIST AMITRIPTYLINE INHIBITS STORE-DEPENDENT $\text{Ca}^{2+}$ ENTRY IN MACROPHAGES

Z. I. Krutetskaya<sup>1</sup>, L. S. Milenina<sup>1</sup>, V. G. Antonov<sup>1</sup>, Academician of the RAS A. D. Nozdrachev<sup>1,2</sup>

Received February 8, 2019

<sup>1</sup>Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russian Federation

<sup>2</sup>Institute of Physiology Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg, Russian Federation

Using Fura-2AM microfluorimetry we have shown for the first time that sigma-1 receptor agonist – tricyclic antidepressant amitriptyline – significantly inhibits store-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  entry, induced by endoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase inhibitors thapsigargin and cyclopiazonic acid, in rat peritoneal macrophages. The results suggest possible involvement of sigma-1 receptors in the regulation of store-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  entry in macrophages.

**Keywords:** amitriptyline, store-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  entry, sigma-1 receptor, macrophages.