

ИНГИБИТОРЫ ЦИКЛООКСИГЕНАЗ ПОДАВЛЯЮТ Ca^{2+} -ОТВЕТЫ, ВЫЗЫВАЕМЫЕ ХЛОРПРОМАЗИНОМ В МАКРОФАГАХ

Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Антонов В.Г., Крутецкая Н.И.

Санкт-Петербургский государственный университет

Университетская наб., 7/9, г. Санкт-Петербург, 199034, РФ; e-mail: cozy@mail.ru

Поступила в редакцию: 11.06.19

Аннотация. Нейролептик первого поколения хлорпромазин, широко применяемый в терапии шизофрении и других психических заболеваний, оказывает многогранное влияние на внутриклеточные процессы. Так, ранее нами было показано, что хлорпромазин вызывает увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в перитонеальных макрофагах крыс, связанное с мобилизацией Ca^{2+} из внутриклеточных Ca^{2+} -депо и последующим входом Ca^{2+} из наружной среды. Однако, механизмы, посредством которых хлорпромазин вызывает Ca^{2+} -ответы в макрофагах, до конца не изучены. В активации и функционировании иммунных клеток, в том числе макрофагов, важную роль играет каскад метаболизма полиненасыщенной арахидоновой кислоты. В макрофагах арахидоновая кислота окисляется преимущественно с участием циклооксигеназ и липоксигеназ. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать участие циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты во влиянии нейролептика фенотиазинового ряда хлорпромазина на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. С использованием флуоресцентного Ca^{2+} -зонда Fura-2AM впервые показано, что два структурно различных ингибитора циклооксигеназ ацетилсалициловая кислота (аспирин) и индометацин подавляют Ca^{2+} -ответы, вызываемые хлорпромазином в перитонеальных макрофагах крысы. Полученные данные свидетельствуют об участии циклооксигеназ и (или) продуктов циклооксигеназного пути окисления арахидоновой кислоты во влиянии хлорпромазина на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. Участие ферментов каскада метаболизма арахидоновой кислоты во влиянии хлорпромазина на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} может быть объяснено моделью встраивания амфифильных антипсихотических агентов, в том числе фенотиазинового нейролептиков, во внутренний монослой мембраны, в котором локализованы анионные фосфолипиды. Это может приводить к изменению жидкостности мембраны и функционирования мембраносвязанных ферментов, таких как фосфолипаза A_2 , запускающая каскад метаболизма арахидоновой кислоты. В свою очередь, ферменты и/или продукты метаболизма арахидоновой кислоты участвуют в формировании Ca^{2+} -ответов, вызываемых хлорпромазином.

Ключевые слова: хлорпромазин, циклооксигеназы, внутриклеточная концентрация Ca^{2+} , перитонеальные макрофаги.

ВВЕДЕНИЕ

Хлорпромазин (аминазин) (ХП) относится к первому поколению типичных нейролептиков (антипсихотических агентов) фенотиазинового ряда, широко применяемых в терапии шизофрении и других психических заболеваний [1]. Выявлено многогранное влияние ХП на внутриклеточные процессы [2].

Множественность эффектов ХП, как и других фенотиазинов, может быть связана с его амфифильной природой. Будучи амфифильным соединением, он хорошо проникает через мембраны. Предложен механизм встраивания (intercalation mechanism) амфифильных антипсихотических агентов, в том числе фенотиазиновых нейролептиков, во внутренний монослой мембраны, в котором локализованы анионные фосфолипиды, в первую очередь фосфоинозитиды [3]. Благодаря этому, ХП может модулировать внутриклеточные процессы, такие как передача сигналов и внутриклеточный транспорт.

Ранее нами было впервые показано, что ХП и другой нейролептик фенотиазинового ряда – трифлуоперазин – увеличивают внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$, вызывая мобилизацию Ca^{2+} из Ca^{2+} -депо и последующий депозависимый вход Ca^{2+} в перитонеальные макрофаги крыс [4, 5]. Однако механизмы, посредством которых фенотиазины вызывают увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах, до конца не изучены.

В активации и функционировании иммунных клеток, в том числе макрофагов, важную роль играет каскад метаболизма полиненасыщенной арахидоновой кислоты (АК) [6]. АК высвобождается из мембранных липидов под действием фосфолипазы A_2 (ФЛА₂) и далее окисляется в клетке по трём основным ферментативным путям с образованием биологически активных продуктов – эйкозаноидов [6]. В макрофагах АК окисляется преимущественно с участием циклооксигеназ и липоксигеназ [7]. На тромбоцитах человека было ранее установлено, что психотропные соединения могут модулировать активность ФЛА₂ и продукцию метаболитов циклооксигеназного и липоксигеназного путей окисления АК [8, 9].

В связи с этим, в настоящей работе была поставлена **задача** исследовать возможное участие циклооксигеназного пути окисления АК во влиянии ХП на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах.

МЕТОДИКА

Эксперименты проводили на культивируемых резидентных перитонеальных макрофагах крыс линии Wistar при комнатной температуре 20-22 °С через 1-2 сут после начала культивирования клеток. Подробно процедура культивирования макрофагов и автоматизированная установка для измерения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , $[Ca^{2+}]_i$, на базе флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия) описаны ранее [5]. 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 фотоблещения измерения проводили через каждые 20 с, облучая объект в течение 2 с. Значения $[Ca^{2+}]_i$ рассчитывали по уравнению Гринкевича [10]. Статистический анализ проводили с применением критерия t Стьюдента. Достоверными считали различия при $p \leq 0,05$.

На рисунках приведены результаты типичных экспериментов. Данные представлены в виде графика изменения отношения интенсивностей флуоресценции Fura-2AM при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм (отношение F_{340}/F_{380}) во времени, отражающего динамику изменения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках в зависимости от времени измерения [11].

Для выявления участия циклооксигеназного пути окисления АК во влиянии ХП на $[Ca^{2+}]_i$ в макрофагах использовали структурно различные ингибиторы циклооксигеназ ацетилсалициловую кислоту (аспирин) и индометацин [12, 13].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В контрольных экспериментах мы обнаружили, что добавление 25 мкг/мл ХП к макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, приводит к быстрому повышению $[Ca^{2+}]_i$ от базального уровня, равного 92 ± 16 нМ, до 241 ± 22 нМ, после чего наблюдается длительная фаза «плато» Ca^{2+} -ответа (рис. 1а, 2а).

Показано, что преинкубация клеток с 100 мкМ аспирина (рис. 1б) или 10 мкМ индометацина (рис. 2б) в течение 5 мин до введения 25 мкг/мл ХП приводит к подавлению увеличения $[Ca^{2+}]_i$, вызываемого ХП, по сравнению с контрольными экспериментами. Подавление Ca^{2+} -ответов, индуцируемых ХП, аспирином и индометацином составило $27,9 \pm 8,1$ и $38,2 \pm 9,4$ % соответственно ($n = 9$ для каждого из фармакологических агентов).

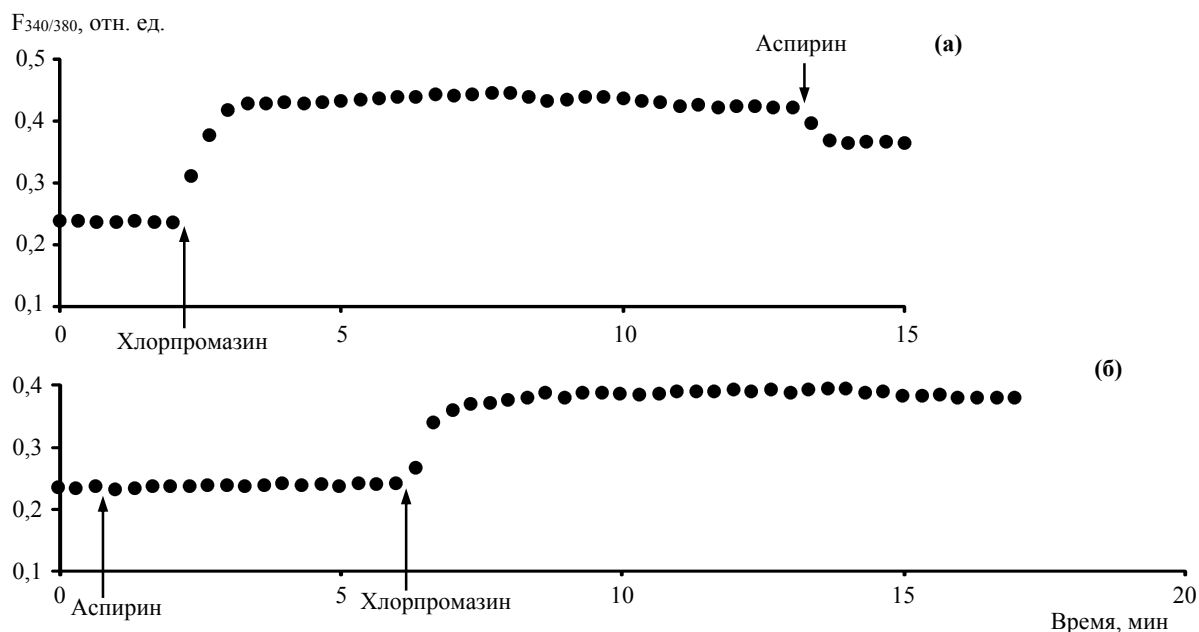


Рисунок 1. Влияние аспирина на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые хлорпромазином в макрофагах. Здесь и на рисунке 2 по оси ординат – отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2AM F_{340}/F_{380} при длинах волн возбуждающего излучения 340 и 380 нм соответственно (относительные единицы, отн. ед.). По оси абсцисс – время. а – к макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, добавляли 25 мкг/мл хлорпромазина. На фоне развившегося Ca^{2+} -ответа вводили 100 мкМ аспирина; б – клетки инкубировали с 100 мкМ аспирина в течение 5 мин до введения 25 мкг/мл хлорпромазина. Каждая регистрация получена для группы из 40-50 клеток и представляет собой типичный вариант из 7 независимых экспериментов

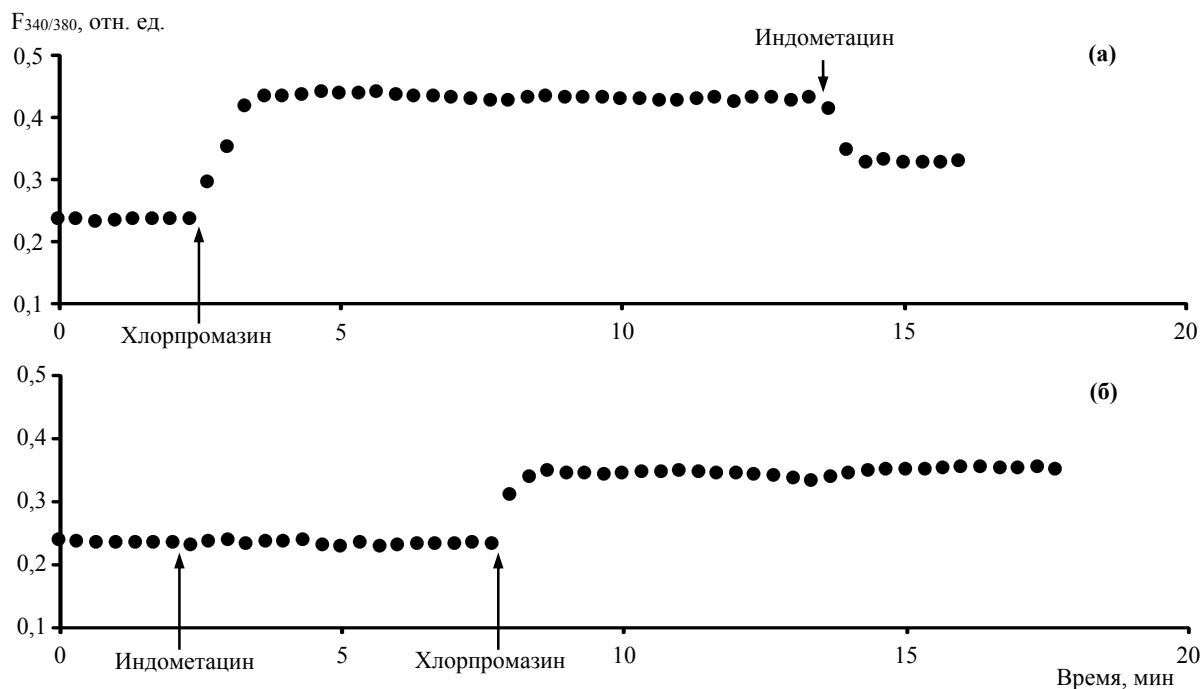


Рисунок 2. Влияние индометацина на Ca^{2+} -ответы, индуцируемые хлорпромазином в макрофагах. а – к макрофагам, находящимся в нормальном физиологическом растворе, добавляли 25 мкг/мл хлорпромазина. На фоне развившегося Ca^{2+} -ответа вводили 40 мкМ индометацина; б – клетки инкубировали с 10 мкМ индометацина в течение 5 мин до введения 25 мкг/мл хлорпромазина

Обнаружено также, что при введении 100 мкМ аспирина (рис. 1а) или 40 мкМ индометацина (рис. 2а) во время развившегося плато Ca^{2+} -ответа, вызываемого ХП, происходит снижение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на $32,5 \pm 8,4\%$ ($n = 8$) и $40,1 \pm 10,8\%$ ($n = 6$) соответственно.

Полученные данные позволяют предположить, что циклооксигеназы и/или их продукты принимают участие в формировании Ca^{2+} -ответов, вызываемых ХП в перитонеальных макрофагах.

Ингибиторы циклооксигеназ индометацин и аспирин - нестероидные противовоспалительные агенты, которые обладают противовоспалительным, анальгетическим и жаропонижающим эффектами [14]. Полученные нами результаты свидетельствуют о нежелательности совместного клинического применения ХП с лекарственными средствами на основе индометацина или аспирина.

Участие ферментов каскада метаболизма АК во влиянии ХП на $[\text{Ca}^{2+}]_i$ может быть объяснено моделью встраивания (intercalation mechanism) амфифильных антипсихотических агентов, в том числе фенотиозиновых нейролептиков, во внутренний монослой мембраны, в котором локализованы анионные фосфолипиды. Трициклическое гидрофобное кольцо молекулы ХП встраивается в гидрофобную фазу мембраны, в то время как алкильный фрагмент с терминальной аминогруппой взаимодействует с полярными головками кислых липидов [3, 15]. Это может приводить к изменению жидкости мембраны и функционирования мембраносвязанных ферментов, таких как фосфолипаза A_2 , запускающая каскад метаболизма АК. В свою очередь, ферменты и/или продукты метаболизма АК участвуют в формировании Ca^{2+} -ответов, вызываемых ХП.

Список литературы / References:

1. Dilsaver S.C. Antipsychotic agents: a review. *Am. Fam. Phys.*, 1993, vol. 47, pp. 199-204.
2. Sudeshna G., Parimal K. Multiple non-psychiatric effects of phenothiazines: a review. *Europ. J. Pharmacol.*, 2010, vol. 648, pp. 6-14.
3. Oruch R., Lund A., Pryme I.F., Holmsen H. An intercalation mechanism as a mode of action exerted by psychotropic drugs: results of altered phospholipid substrate availabilities in membranes? *J. Chem. Biol.*, 2010, vol. 3, pp. 67-88.
4. Крутецкая З.И., Миленина Л.С., Наумова А.А., Бутов С.Н., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д. Влияние хлорпромазина на внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} в макрофагах. *Докл. Акад. Наук*, 2017, т. 474, № 1, с. 116-118. [Krutetskaya Z.I., Milenina L.S., Naumova A.A., Butov S.N., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. The effect of chlorpromazine on intracellular Ca^{2+} concentration in macrophages. *Dokl. Bioch. Biophys.*, 2017, vol. 474, pp. 162-164.]
5. Миленина Л.С., Крутецкая З.И., Наумова А.А., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Ингибиторы метаболизма арахидоновой кислоты подавляют Ca^{2+} -ответы, вызываемые трифлуоперазином, в макрофагах. *Цитология*, 2018, т. 60, № 2, с. 116-121. [Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Naumova A.A., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. Arachidonic acid metabolism inhibitors attenuate Ca^{2+} responses induced by trifluoperazine in macrophages. *Cell Tissue Biol.*, 2018, vol. 12, № 4, pp. 315-322.]

6. Needleman P., Turk J., Jacksick B.A., Morrison A.R., Lefkowitz J.B. Arachidonic acid metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, 1986, vol. 55, pp. 69-102.
7. Brown G.P., Monick M. M., Hunninghake G.W. Human alveolar macrophage arachidonic acid metabolism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 1988, vol. 254, pp. C809-C815.
8. Walenga R.W., Opas E. E., Feinstein M.B. Differential effects of calmodulin antagonists on phospholipases A₂ and C in thrombin-stimulated platelets. *J. Biol. Chem.*, 1981, vol. 256, pp. 12523-12528.
9. Oruch R., Pryme I. F., Holmsen H. Effects of psychotropic drugs on the thrombin-induced liberation of arachidonate in human platelets. *Saudi Med. J.*, 2008, vol. 29, pp. 1397-1407.
10. Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, pp. 3440-3450.
11. Xie Q., Zhang Y., Zhai C., Bonanno J. A. Calcium influx factor from cytochrome P-450 metabolism and secretion-like coupling mechanisms for capacitance calcium entry in corneal endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 2002, vol. 277, pp. 16559-16566.
12. De Witt D.L., El Harish E.A., Kraemer S.A., Andrews M.J., Yao E.F., Armstrong R.L., Smith W.L. The aspirin and heme-binding sites of ovine and murine prostaglandin endoperoxide synthases. *J. Biol. Chem.*, 1990, vol. 265, pp. 5192-5198.
13. Mitchell J.A., Akarasereenont P., Thiemermann C., Flower R.J., Vane J.R. Selectivity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1994, vol. 90, pp. 11693-11697.
14. Dubois R. N., Abramson S.B., Crofford L., Gupta R.A., Simon L.S., Van de Putte L.B.A., Lipsky P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.*, 1998, vol. 12, pp. 1063-1073.
15. Jaszczyszyn A., Gasiorowski K., Swiatek P., Malinka W., Cieslik-Boczula K., Petrus J., Czarnik-Matusiewicz B. Chemical structure of phenothiazines and their biological activity. *Pharmacol. Rep.*, 2012, vol. 64, pp. 16-23.

CYCLOOXYGENASE INHIBITORS ATTENUATE Ca²⁺ RESPONSES INDUCED BY CHLORPROMAZINE IN MACROPHAGES

Milenina L.S., Krutetskaya Z.I., Antonov V.G., Krutetskaya N.I.

Saint-Petersburg State University

Universitetskaya emb., 7/9, Saint-Petersburg, 199034, Russia; e-mail: cozyy@mail.ru

Abstract. Chlorpromazine belongs to the first antipsychotics generation widely used in treatment of mental diseases. A multifaceted influence of chlorpromazine on intracellular processes has been revealed. Earlier we have shown that chlorpromazine increases intracellular Ca²⁺ concentration, causing Ca²⁺ mobilization from intracellular Ca²⁺-stores and subsequent Ca²⁺-entry from external medium, in rat peritoneal macrophages. However, the mechanisms by which chlorpromazine causes Ca²⁺-responses are not fully understood. In activation and functioning of immune cells, including macrophages, the arachidonic acid metabolism cascade plays an important role. In macrophages arachidonic acid is oxidized predominantly by cyclooxygenases and lipoxygenases. Therefore, it was useful to investigate the involvement of cyclooxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in the effect of phenothiazine neuroleptic chlorpromazine on intracellular Ca²⁺-concentration in macrophages. Using Fura-2AM microfluorimetry it was shown for the first time that two structurally distinct cyclooxygenase inhibitors acetylsalicylic acid (aspirin) and indomethacin attenuate Ca²⁺-responses, induced by chlorpromazine in rat peritoneal macrophages. The data obtained suggest the involvement of cyclooxygenases and (or) cyclooxygenase pathway products in the chlorpromazine effect on intracellular Ca²⁺-concentration in macrophages. The participation of arachidonic acid cascade enzymes in the influence of chlorpromazine on intracellular Ca²⁺ concentration can be explained by the model of embedding of amphiphilic antipsychotic agents, including phenothiazine neuroleptics, in the membrane inner monolayer. This can lead to a change in membrane fluidity and functioning of membrane-bound enzymes, such as phospholipase A₂, which triggers arachidonic acid cascade. In turn, the enzymes and/or products of arachidonic acid metabolism are involved in the formation of chlorpromazine-induced Ca²⁺ responses.

Key words: chlorpromazine, cyclooxygenases, intracellular Ca²⁺-concentration, peritoneal macrophages.