

АМИНАЗИН МОДУЛИРУЕТ ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРА ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ

Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г.

Санкт-Петербургский государственный университет

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

Поступила в редакцию: 26.06.2018

Аннотация. С использованием метода фиксации потенциала исследовали участие сигма-1 рецепторов в регуляции глютоксिमом транспорта Na^+ в коже лягушки. Показано, что обработка кожи лягушки антагонистом рецепторов сигма-1 аминазином подавляет стимулирующее влияние глютоксима на транспорт Na^+ . Полученные результаты свидетельствуют о возможном участии рецепторов сигма-1 в регуляции глютоксिमом транспорта Na^+ в коже лягушки.

Ключевые слова: кожа лягушки, трансэпителиальный транспорт Na^+ , глютоксим, аминазин.

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, что позволяет использовать данные, получаемые на этих объектах, для выяснения механизмов транспорта воды и ионов в клетках почки [1]. Трансэпителиальный транспорт Na^+ 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 могут являться мишенью для окислительного стресса [2, 3].

Ранее нами было показано, что транспорт Na^+ в коже лягушки чувствителен к окислительному стрессу и модулируется различными окисляющими агентами, такими как цистамин, цистин, окисленный глутатион (GSSG) и препарат глютоксим® (динатриевая соль GSSG с нанодобавкой d-металла; «ФАРМА – ВАРМ», Санкт-Петербург), приложенными к апикальной или базолатеральной поверхности кожи [4]. Обнаружено, что добавление этих окислителей со стороны апикальной поверхности кожи ингибирует транспорт Na^+ . В то же время, при добавлении агентов со стороны базолатеральной поверхности кожи, только цистин и цистамин сохраняли своё ингибирующее действие, тогда как GSSG и глютоксим имитировали действие инсулина и стимулировали трансэпителиальный транспорт Na^+ . В дальнейшем, с использованием широкого спектра фармакологических агентов, нами было впервые показано, что в регуляции глютоксिमом транспорта Na^+ в коже лягушки принимают участие различные структурные элементы клетки и компоненты многих сигнальных систем [5-10]. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляторного действия глютоксима на транспорт Na^+ , во многом еще не ясны.

Ключевую роль в транспорте Na^+ в реабсорбирующих эпителиях играют амилорид-чувствительные эпителиальные Na^+ -каналы (ENaC). ENaC являются представителями обширного суперсемейства дегенерины/эпителиальные Na^+ -каналы (Deg/ENaC), объединяющего лиганд-управляемые Na^+ -проводящие каналы, блокируемые диуретиком амилоридом. Deg/ENaC универсальны для всех многоклеточных организмов; экспрессируются в различных возбудимых и невозбудимых тканях и участвуют в таких разнообразных процессах, как болевая чувствительность, механочувствительность и направленный перенос Na^+ [11, 12]. Несмотря на то, что представители суперсемейства Deg/ENaC функционально гетерогенны, они обладают сходными биофизическими свойствами и структурной организацией.

Сигма-1 рецепторы представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные как в плазматической мембране, так 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 [13, 14]. Сигма-1 рецепторы взаимодействуют с многочисленными белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвуют в модуляции многих клеточных процессов [15]. Их лигандами являются эндогенные стероиды, антидепрессанты, антипсихотические, противосудорожные и анальгетические средства [16]. Ранее нами было показано, что антагонисты рецепторов сигма-1 – нейрорептикти галоперидол и хлорпромазин (аминазин) подавляют транспорт Na^+ в коже лягушки [17]. В то же время известно, что некоторые клинические случаи требуют совместного применения иммуномодуляторов и нейрорептиктиков. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможное участие рецепторов сигма-1 во влиянии глютоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. В экспериментах использовали антагонист рецепторов сигма-1 – нейрорептиктик фенотиазинового ряда аминазин [18].

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 mM): 110 NaCl, 2,5 KCl, 3 CaCl₂, 5 Tris HCl, 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. Для измерения вольт-амперных

характеристик на кожу подавали линейно изменяющееся напряжение (ramp) со скоростью 20 мВ/с. В интервалах между измерениями вольт-амперных характеристик трансэпителиальный потенциал (V_T) кожи поддерживали 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 амилорид-чувствительный I_{SC} . В связи с этим, в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных Na^+ - каналов (ENaC) амилорид (20 мкМ). Использовали реактивы фирмы Sigma (США). Фармакологические агенты добавляли к апикальной или базолатеральной поверхности кожи. Статистический анализ проводили с применением t-критерия Стьюдента. Данные представлены в виде $x \pm s_x$. На рисунках приведены результаты типичных экспериментов.

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляют: $I_{SC} = 23,18 \pm 3,95$ мкА, $V_{OC} = -83,42 \pm 12,05$ мВ, $g_T = 0,30 \pm 0,13$ мСм. Показано, что глутоксим (100 мкг/мл), приложенный к базолатеральной поверхности кожи лягушки, подобно инсулину, стимулирует транспорт Na^+ (рис.1, кривая 1). В среднем (по результатам 10 экспериментов) после приложения глутоксима, I_{SC} возрос на $38,44 \pm 6,35$ %; V_{OC} – на $47,12 \pm 6,38$ %; величина g_T не изменилась.

Показано, что предварительная обработка кожи лягушки аминазином (100 мкг/мл) в течение 30 мин перед добавлением к базолатеральной поверхности кожи 100 мкг/мл глутоксима, приводила к снижению стимулирующего влияния глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. Обнаружено также, что степень ингибирующего действия аминазина на транспорт Na^+ различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи (рис. 1). Так, изменение электрических характеристик кожи лягушки после добавления 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности кожи, предварительно обработанной в течение 30 мин 100 мкг/мл аминазина (по данным 10 экспериментов), было следующим: I_{SC} увеличился на $3,31 \pm 1,5$ или на $20,14 \pm 5,03$ %, V_{OC} увеличился на $5,31 \pm 1,23$ или на $18,34 \pm 3,13$ %, а g_T уменьшилась на $7,13 \pm 2,04$ или увеличилась на $4,85 \pm 1,76$ %, при преинкубации с аминазином с апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно.

(1) – I_{SC} после добавления 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности интактной кожи; (2) – I_{SC} после добавления глутоксима к коже лягушки, предварительно обработанной в течение 30 мин 100 мкг/мл аминазина со стороны апикальной поверхности кожи; (3) – I_{SC} после добавления глутоксима к коже лягушки, предварительно обработанной в течение 30 мин 100 мкг/мл аминазина со стороны базолатеральной поверхности кожи. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ). На рисунке представлены результаты типичных экспериментов.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы. Так, в последнее время появляются данные о том, что рецепторы сигма-1 модулируют активность ионных каналов различных типов, в том числе протон-активируемых ионных каналов (ASICs) - одного из представителей суперсемейства Deg/ENaC, к которому принадлежат и ENaC. Обнаружено, что возможно как прямое взаимодействие между рецепторами сигма-1 и ASICs, с образованием комплекса со стехиометрией 1 сигма-1 рецептор/1 субъединица ASIC [19], так и опосредованное влияние агонистов/антагонистов сигма-1 рецепторов на ASICs, при участии дополнительных сигнальных молекул, таких как гетеротримерные G- белки и комплекс кальцинейрина с адаптерным белком AKAP150 [20]. Полученные нами данные о том, что ингибирующий эффект аминазина значительно более выражен при добавлении его 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.

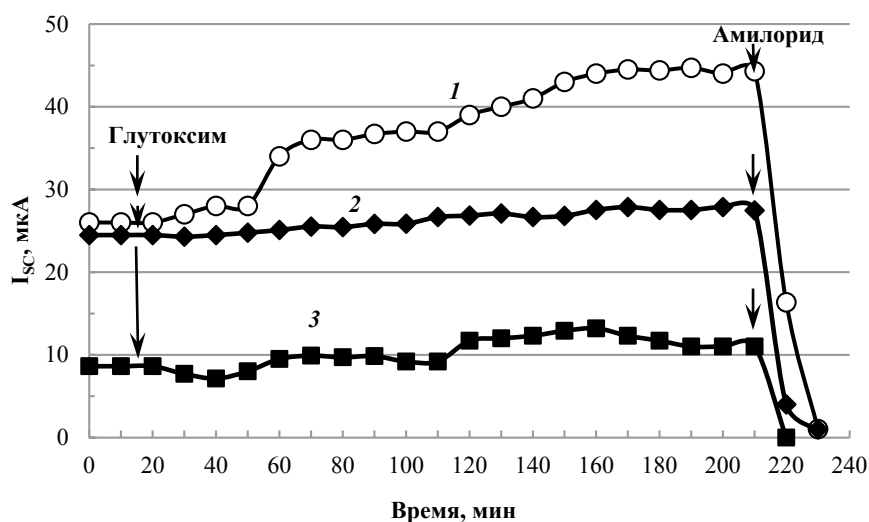


Рисунок 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{SC} через кожу лягушки в ответ на действие глутоксима и антагониста рецепторов сигма-1 аминазина

Известно, что многие Na^+ -транспортирующие белки содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенями для внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей [2, 3]. Однако добавление в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, блокатора ENaC амилорида (20 мкМ), вызывало полное подавление транспорта Na^+ (рис. 1). Это свидетельствует о том, что влияние глутоксима на транспорт Na^+ обусловлено в основном модуляцией активности ENaC.

Таким образом, нами показано модулирующее влияние антагониста рецепторов сигма-1 аминазина на эффект глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. Полученные данные свидетельствуют об участии рецепторов данного типа в сигнальных каскадах, запускаемых глутоксимом в эпителии кожи лягушки, и приводящих к стимуляции транспорта Na^+ . Результаты указывают также на нежелательность совместного применения в клинической практике препарата глутоксим и нейролептика аминазина.

Список литературы / References:

1. Наточин Ю.В. *Основы физиологии почки*. Л.: Наука, 1982, 184 с. [Natochin, Yu.V. *Fundamentals of kidney physiology*. Leningrad: Nauka, 1982. 184 p.]
2. Boldyrev A.A., Bulygina E.R. Na/K-ATPase and oxidative stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1997, vol. 834, pp. 666-668.
3. Firsov D., Robert-Nicoud M., Gruender S., Schild L., Rossier B.C. Mutational analysis of cysteine-rich domain of the epithelium sodium channel (ENaC): Identification of cysteines essential for channel expression at the cell surface. *J. Biol. Chem.*, 1999, vol. 274, pp. 2743-2749.
4. Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Effect of disulfide containing compounds on Na^+ transport in frog skin. *Dokl. Akad. Nauk*, 2008, vol. 421, no. 5, pp. 709-712.
5. Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Antonov V.G., Butov S.N. Involvement of tyrosine and phosphatidylinositol kinases in oxidized glutathione and glutoxim regulation of Na^+ transport in frog skin. *Cell and Tissue Biology*, 2010, vol. 4, no. 3, pp. 273-279.
6. Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Lebedev O.E., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. The effect of glutoxim on Na^+ transport in frog skin: the role of cytoskeleton. *Cell and Tissue Biology*, 2012, vol. 6, no. 3, pp. 248-253.
7. Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Inhibitors of the cyclooxygenase oxidation pathway of arachidonic acid suppress the stimulating effect of glutoxim on Na^+ transport in frog skin. *Dokl. Biol. Sci.*, 2013, vol. 451, no. 1, pp. 193-195.
8. Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. The inhibitors of Arp2/3 complex and WASP proteins modulate the effect of glutoxim on Na^+ transport in frog skin. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2016, vol. 467, pp. 102-104.
9. Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Lipoxygenases modulate the effect of glutoxim on Na^+ transport in the frog skin epithelium. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2017, vol. 474, pp. 193-195.
10. Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdrachev A.D. Epoxygenase inhibitors attenuate the stimulatory effect of glutoxim on Na^+ transport in frog skin. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2018, vol. 480, pp. 1-3.
11. Benos D.J., Stanton B.A. Functional domains within the degenerin/epithelial sodium channel (Deg/ENaC) superfamily of ion channels. *J. Physiol.*, 1999, vol. 520, pp. 631-644.
12. Kellenberger S., Schild L. Epithelial sodium channel/Degenerin family of ion channels: a variety of function for a shared structure. *Physiol. Rev.*, 2002, vol. 82, pp. 735-767.
13. Rousseaux C.G., Greene S.F. Sigma receptors [σ R]: biology in normal and diseased states. *J. Recept. Signal. Trans.*, 2016, vol. 36, pp. 327-388.
14. Hellewell S.B., Bruce A., Feinstein G., Orringer J., Williams W., Bowen W.D. Rat liver and kidney contain high densities of sigma 1 and sigma 2 receptors: characterization by ligand binding and photoaffinity labeling. *Eur. J. Pharmacol.*, 1994, vol. 268, pp. 9-18.
15. Su T.-P., Hayashi T., Maurice T., Buch S., Ruoho A.E. The sigma-1 receptor chaperone as an inter-organelle signaling modulator. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2010, vol. 31, pp. 557-566.
16. Cobos E.J., Entrena J.M., Nieto F.R., Cendán C.M., Del Pozo E. Pharmacology and therapeutic potential of sigma(1) receptor ligands. *Curr. Neuropharmacol.*, 2008, vol. 6, pp. 344-366.
17. Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Бутов С.Н., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Влияние нейролептиков на транспорт Na^+ в коже лягушки. *Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2017*, Севастополь, 2017, т.1, с. 272-275. [Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G. The effect of neuroleptics on Na^+ transport in frog skin. *Modern trends in biological physics and chemistry. BPPC-2017*, Sevastopol, 2017, vol. 1, pp. 272-275 (In Russ.)]
18. Itzhak Y., Ruhland M., Krahling H. Binding of umespirone to the sigma receptor: evidence for multiple affinity states. *Neuropharmacol.*, 1990, vol. 29, pp. 181-184.
19. Carnally S.M., Johannessen M., Henderson R.M., Jackson M.B., Edwardson J.M. Demonstration of a direct interaction between σ -1 receptors and acid-sensing ion channels. *Biophys. J.*, 2010, vol.98, pp. 1182-1191.
20. Herrera Y., Katnik C., Rodriguez J.D., Hall A.A., Willing A., Pennypacker K.R., Cuevas J. Sigma-1 receptor modulation of acid-sensing ion channel a (ASIC1a) and ASIC1a-induced Ca^{2+} influx in rat cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008, vol. 327, pp. 491-502.

AMINAZINE MODULATES THE EFFECT OF IMMUNOMODULATOR GLUTOXIM
ON Na⁺ TRANSPORT IN FROG SKIN

Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Butov S.N., Krutetskaya N.I., Antonov V.G.

Saint-Petersburg State University,

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

Abstract. Using voltage-clamp technique, the involvement of sigma-1 receptors in the effect of glutoxim on Na⁺ transport in frog skin was investigated. We have shown that preincubation of the frog skin with sigma-1 receptor antagonist – aminazine – 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.

Key words: frog skin, transepithelial Na⁺ transport, glutoxim, aminazine.