

ТРИФЛУОПЕРАЗИН МОДУЛИРУЕТ ТРАНСПОРТ Na^+ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ**Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., 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: 04.07.2019

Аннотация. 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. Рецепторы сигма-1 представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в плазматической мембране и в мембране эндоплазматического ретикулума на границе с митохондриями. Однако роль сигма-1 рецепторов в регуляции транспорта Na^+ в эпителиальных системах практически не изучалась. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать участие сигма-1 рецепторов в регуляции транспорта Na^+ в коже лягушки. В экспериментах использовали антагонист сигма-1 рецепторов – нейролептик фенотиазинового ряда трифлуоперазин. С использованием метода фиксации потенциала показано, что обработка кожи лягушки 20 мкг/мл трифлуоперазина снижает транспорт Na^+ в коже лягушки. Обнаружено также, что ингибирующий эффект трифлуоперазина на транспорт Na^+ различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, и характеризуется двухфазной кинетикой изменения тока короткого замыкания при приложении трифлуоперазина со стороны апикальной поверхности кожи лягушки. Сходные результаты были получены нами ранее при исследовании влияния на транспорт Na^+ в коже лягушки другого антагониста сигма-1 рецепторов, также нейролептика фенотиазинового ряда – хлорпромазина. Таким образом, в настоящей работе и ранее, нами показано модулирующее влияние структурно различных антагонистов рецепторов сигма-1 на трансэпителиальный транспорт Na^+ , что свидетельствует об участии сигма-1 рецепторов в регуляции транспорта Na^+ в эпителии кожи лягушки.

Ключевые слова: кожа лягушки, трансэпителиальный транспорт Na^+ , сигма-1 рецепторы, трифлуоперазин.

ВВЕДЕНИЕ

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. Транспорт Na^+ в осморегулирующих эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, работа которой обеспечивает создание и поддержание электролитического и водного гомеостаза. 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 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^+ [2]. 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 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 [3, 4]. Их лигандами являются эндогенные стероиды, антидепрессанты, антипсихотические, противосудорожные и анальгетические средства [5]. Сигма-1 рецепторы взаимодействуют с многочисленными белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвуют в модуляции многих клеточных процессов [6, 7]. В последнее время появляются данные о том, что сигма-1 рецепторы участвуют в модуляции активности протон-активируемых ионных каналов (ASICs) – одного из представителей суперсемейства Deg/ENaC. На клетках эмбриональной почки человека (линия HEK-293) показано, что сигма-1 рецепторы прямо взаимодействуют с ASICs, образуя комплекс со стехиометрией 1 сигма-рецептор / 1 субъединица ASIC [8]. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать участие сигма-

1 рецепторов в регуляции трансэпителиального транспорта Na^+ и активности ENaC в коже лягушки. В экспериментах использовали антагонист сигма-1 рецепторов – нейролептик фенотиазинового ряда трифлуоперазин (трифтазин, стелазин) [9].

МЕТОДИКА

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 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 рисунке приведены результаты типичных экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляют: $I_{SC} = 47,32 \pm 5,11$ мкА; $V_{OC} = -81,42 \pm 10,04$ мВ; $g_T = 1,73 \pm 0,44$ мСм.

Показано, что обработка кожи лягушки блокатором сигма-1 рецепторов трифлуоперазином снижает транспорт Na^+ в коже лягушки. Обнаружено также, что степень и кинетика ингибирующего действия трифлуоперазина на транспорт Na^+ различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи (рисунок 1). В среднем (по данным 10 экспериментов), изменение электрических характеристик кожи лягушки после добавления 20 мкг/мл трифлуоперазина было следующим: I_{SC} уменьшился на $9,13 \pm 3,45$ или $29,79 \pm 11,34$ %, V_{OC} уменьшился на $28,06 \pm 10,13$ или $31,79 \pm 14,16$ %, а g_T уменьшилась на $21,84 \pm 9,42$ или увеличилась на $6,89 \pm 1,56$ % при приложении трифлуоперазина со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно. Результаты, представленные на рисунке 1, свидетельствуют о том, что приложение трифлуоперазина к апикальной поверхности кожи вызывает двухфазное изменение I_{SC} : подавление I_{SC} , наблюдаемое в течение 30-40 мин после приложения агента, сменяющееся некоторым увеличением I_{SC} , наблюдаемым в течение второго часа после приложения трифлуоперазина. В случае добавления трифлуоперазина со стороны базолатеральной поверхности кожи, наблюдается последовательное снижение I_{SC} в течение первого часа после приложения агента. Фазы увеличения I_{SC} в этом случае не наблюдалось.

Результаты, представленные в настоящей работе, согласуются с данными, полученными нами ранее при сравнительном исследовании влияния на транспорт Na^+ в коже лягушки двух структурно различных антагонистов сигма 1 рецепторов – нейролептика фенотиазинового ряда хлорпромазина и производного бутирофенона – галоперидола. Хлорпромазин (аминазин), также как и трифлуоперазин, относится к первому поколению типичных нейролептиков фенотиазинового ряда, широко применяемых в качестве антипсихотических, миорелаксирующих, седативных средств, а также для лечения шизофрении и других психических заболеваний [10]. Ранее нами было показано, что обработка кожи лягушки 50 мкг/мл хлорпромазина снижает трансэпителиальный транспорт Na^+ в коже лягушки [11]. При этом обнаружено, что ингибирующий эффект хлорпромазина различается в зависимости от приложения агента со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, и также характеризуется двухфазной кинетикой изменения I_{SC} при приложении хлорпромазина со стороны апикальной поверхности кожи лягушки.

Полученные результаты также согласуются с данными литературы. Так, обнаружено, что приложение 100 мкМ трифлуоперазина со стороны базолатеральной мембраны, вызывает снижение I_{SC} и V_{OC} в мочевом пузыре жабы [12]. Двухфазное дозо-зависимое изменение I_{SC} под действием трифлуоперазина показано для изолированной кожи лягушки *Rana esculenta* [13, 14]. Однако в этом случае, добавление трифлуоперазина вызывало стимуляцию транспорта Na^+ через кожу лягушки. В цитируемых работах также высказывается предположение о том, что молекулярные механизмы, вовлеченные в регуляцию трифлуоперазином транспорта Na^+ в коже лягушки, различаются в зависимости от приложения агента к апикальному или базолатеральному домену полярных клеток эпителия. Так, наиболее вероятно, что влияние трифлуоперазина на I_{SC} в случае приложения агента к апикальной поверхности связано с модуляцией активности ENaC [14] или с изменением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} [13], тогда как влияние трифлуоперазина на I_{SC} при приложении

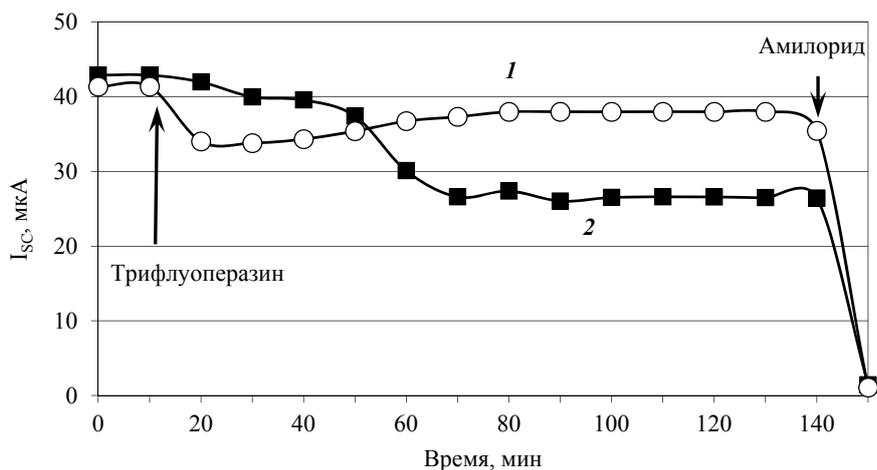


Рисунок 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{sc} через кожу лягушки в ответ на приложение блокатора сигма-1 рецепторов трифлуоперазина, добавленного со стороны апикальной (1) или базолатеральной (2) поверхности кожи лягушки. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных Na^+ -каналов (ENaC) – амилорид (20 мкМ)

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 [13, 14]. Известно, что трифлуоперазин является антагонистом Ca^{2+} -связывающего белка кальмодулина, играющего ключевую роль в регуляции процессов Ca^{2+} -сигналикации [15]. Однако, данные о том, что различные производные фенотиазина (хлорпромазин и трифлуоперазин) обладают сходным влиянием на I_{sc} , свидетельствует о том, что влияние трифлуоперазина на транспорт Na^+ в коже лягушки осуществляется, по-видимому, без участия комплекса Ca^{2+} -кальмодулин [14].

Транспорт Na^+ в эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие многочисленные Na^+ -транспортирующие белки, локализованные в различных мембранах клетки. Однако введение в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) вызывало полное подавление I_{sc} (рисунок 1), что свидетельствует о том, что влияние антагониста сигма-1 рецепторов трифлуоперазина на транспорт Na^+ связано, преимущественно, с модуляцией активности ENaC.

Таким образом, в настоящей работе и ранее, нами показано модулирующее влияние структурно различных антагонистов рецепторов сигма-1 на трансэпителиальный транспорт Na^+ , что свидетельствует об участии сигма-1 рецепторов в регуляции транспорта Na^+ в эпителии кожи лягушки. Полученные данные позволяют также предположить, что влияние антагонистов сигма-1 рецепторов на транспорт Na^+ в коже лягушки осуществляется при участии различных белковых и липидных сигнальных комплексов, ассоциированных с апикальным или базолатеральным доменами поляризованных эпителиальных клеток. Полученные нами данные о влиянии трифлуоперазина на трансэпителиальный транспорт Na^+ способствуют более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия производных фенотиазина.

Список литературы / References:

1. Наточин Ю.В. *Основы физиологии почки*. Л.: Наука, 1982, 184 с. [Natochin Yu.V. *Fundamentals of kidney physiology*, L.: Nauka, 1982, 184 p. (In Russ.)]
2. 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.
3. Rousseaux C.G., Greene S.F. Sigma receptors [σ Rs]: biology in normal and diseased states. *J. Recept. Signal. Trans.*, 2016, vol. 36, pp. 327-388.
4. 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.
5. 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.
6. Penke B., Fulop L., Szucs M., Frecska E. The role of sigma-1 receptor, an intracellular chaperone in neurodegenerative diseases. *Curr. Neuropharmacol.*, 2018, vol. 16, pp. 97-116.
7. 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.

8. 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.
9. Schuster D.I., Arnold F.J., Murphy R.B. Purification, pharmacological characterization and photoaffinity labeling of sigma receptors from rat and bovine brain. *Brain Res.*, 1995, vol. 670, pp. 14-28.
10. 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.
11. 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*, 2017, т. 2, 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. *Russian Journal of Biological Physics and Chemistry*, 2017, vol. 2, pp. 272-275. (In Russ.)]
12. Levine S.D., Kachadorian W.A., Levin D.N., Schlondorff D. Effects of trifluoperazine on function and structure of toad urinary bladder. Role of calmodulin vasopressin-stimulation of water permeability. *J. Clin. Invest.*, 1981, vol. 67, no. 3, pp. 662-72.
13. Bjerregaard H.F., Nielsen R. Trifluoperazine stimulated sodium transport by increased prostaglandin E_2 synthesis in isolated frog skin (*Rana esculenta*). *Acta. Physiol. Scand.*, 1986, vol. 127, no. 1, pp. 75-85.
14. Bjerregaard H.F., Nielsen R. Trifluoperazine stimulated sodium transport through the apical surface of isolated frog skin. *Acta. Physiol. Scand.*, 1988, vol. 134, no. 1, pp. 43-52.
15. Feldkamp M.D., O'Donnell S.E., Yu L., Shea M.A. Allosteric effects of the antipsychotic drug trifluoperazine on the energetics of calcium binding by calmodulin. *Proteins*, 2010, vol. 78, no. 10, pp. 2265-82.

TRIFLUOPERAZINE MODULATES Na^+ TRANSPORT IN FROG SKIN

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

Saint-Petersburg State University

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

Abstract. The skin of amphibians and other isolated epithelial systems are classic model objects for the study of ion transport mechanisms through biological membranes. By the ability to transport electrolytes and by the response to certain hormones, the skin and bladder of amphibians are similar to the distal renal tubules, which allow the data obtained on these objects to be used to determine the water and ion transport mechanisms in kidney cells. Sigma-1 receptors are unique ligand-regulated molecular chaperones located in the plasmalemma and endoplasmic reticulum membrane at the boundary with mitochondria. However, the role of sigma-1 receptors in Na^+ transport regulation in epithelial systems is not fully understood. In this regard, it was appropriate to study the involvement of sigma-1 receptors in Na^+ transport regulation in frog skin. In the experiments, we used the sigma-1 receptor antagonist – the phenothiazine derivative neuroleptic trifluoperazine. Using voltage-clamp technique, we have shown that preincubation of the frog skin with 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ trifluoperazine inhibits Na^+ transport in frog skin. It was also observed that trifluoperazine inhibitory effect on Na^+ transport depended on the application of the agent from the apical or basolateral surface of the skin and was characterized by biphasic short-circuit current changes upon application of trifluoperazine from the skin apical surface. Similar data were obtained by us earlier when studying the effect of another sigma-1 receptor antagonist phenothiazine neuroleptic chlorpromazine on Na^+ transport in frog skin. Thus, in this study and earlier we showed that structurally different sigma-1 receptor antagonists modulate transepithelial Na^+ transport, indicating the involvement of sigma-1 receptors in regulation of Na^+ transport in frog skin epithelium.

Key words: *frog skin, transepithelial Na^+ transport, sigma-1-receptors, trifluoperazine.*