

НЕЙРОЛЕПТИК ТРИФЛУОПЕРАЗИН ПОДАВЛЯЕТ СТИМУЛИРУЮЩЕЕ ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРА ГЛУТОКСИМА НА ТРАНСПОРТ Na^+ В КОЖЕ ЛЯГУШКИ

Мельницкая А.В.¹, Крутецкая З.И.¹, Антонов В.Г.², Крутецкая Н.И.¹, Бадюлина В.И.¹

¹ Санкт-Петербургский государственный университет

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

² Военно-Медицинская академия им. С.М. Кирова

ул. Академика Лебедева, 6, г. Санкт-Петербург, 194044, РФ

Поступила в редакцию: 10.07.2020

Аннотация. Кожа лягушки – классический модельный объект для изучения механизмов трансэпителиального транспорта ионов. Ранее нами было обнаружено, что транспорт Na^+ в коже лягушки модулируется различными окисляющими и восстанавливающими агентами. При этом впервые показано, что окисленный глутатион (GSSG) и препарат глутоксим® (динатриевая соль GSSG с нанодобавкой d-металла, «ФАРМА–ВАМ», Санкт-Петербург), приложенные к базолатеральной поверхности кожи лягушки, имитируют действие инсулина и стимулируют трансэпителиальный транспорт Na^+ . Сигма-1 рецепторы представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, широко экспрессированные в центральной нервной системе и в периферических тканях, в том числе в клетках почки и печени. Сигма-1 рецепторы взаимодействуют с многочисленными белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвуют в модуляции многих клеточных процессов. Ранее нами было показано, что лиганд рецепторов сигма-1 нейролептик трифлуоперазин (ТФП) подавляет транспорт Na^+ в коже лягушки. В то же время известно, что некоторые клинические случаи требуют совместного применения иммуномодуляторов и нейролептиков. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможное участие рецепторов сигма-1 во влиянии глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. В экспериментах использовали лиганд рецепторов сигма-1 – нейролептик фенотиазинового ряда ТФП. С использованием метода фиксации потенциала на эпителии кожи лягушки впервые показано, что 20 мкг/мл ТФП, приложенный с апикальной или базолатеральной поверхности кожи, снижает стимулирующее влияние 100 мкг/мл глутоксима на транспорт Na^+ . Результаты свидетельствуют об участии рецепторов сигма-1 в сигнальных каскадах, запускаемых глутоксимом в эпителии кожи лягушки и приводящих к стимуляции транспорта Na^+ , и указывают также на нежелательность совместного применения в клинической практике препарата глутоксим и производных фенотиазина.

Ключевые слова: кожа лягушки, трансэпителиальный транспорт Na^+ , глутоксим, 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. Различные белковые компоненты этой системы могут являться мишенью для окислительного стресса. Ранее нами было обнаружено, что транспорт Na^+ в коже лягушки чувствителен к окислительному стрессу и модулируется различными окисляющими и восстанавливающими агентами, такими как цистамин, цистин, окисленный глутатион (GSSG) и препарат глутоксим® (динатриевая соль GSSG с нанодобавкой d-металла; «ФАРМА – ВАМ», Санкт-Петербург), приложенными к апикальной или базолатеральной поверхности кожи [2]. 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 глутоксим имитировали действие инсулина и стимулировали трансэпителиальный транспорт Na^+ . В дальнейшем, с использованием широкого спектра фармакологических агентов, нами было впервые показано, что в регуляции глутоксимом транспорта Na^+ в коже лягушки принимают участие различные структурные элементы клетки и компоненты многих сигнальных систем. Однако молекулярные механизмы, лежащие в основе регуляторного действия глутоксима на транспорт Na^+ , во многом еще не ясны.

Сигма-1 рецепторы представляют собой уникальные лигандрегулируемые молекулярные шапероны, локализованные в плазматической мембране и в мембране эндоплазматического ретикула 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]. Ранее нами было показано, что лиганд рецепторов сигма-1 нейрорепептик трифлуоперазин (ТФП) подавляет транспорт Na^+ в коже лягушки [8]. В то же время известно, что некоторые клинические случаи требуют совместного применения иммуномодуляторов и нейрорепептиков. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать возможное участие рецепторов сигма-1 во влиянии глутоксима на транспорт Na^+ в эпителии кожи лягушки. В экспериментах использовали антагонист сигма-1 рецепторов – нейрорепептик фенотиазинового ряда ТФП [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 мМ): 110 NaCl, 2,5 KCl, 3 CaCl₂, 5 Tris HCl, pH 7,4. Опыты проводили при комнатной температуре (22–23 °С).

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 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. На рисунке приведены результаты типичных экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Значения электрических характеристик кожи лягушки в контроле в среднем (по данным 10 экспериментов) составляют: $I_{SC} = 38,2 \pm 4,2$ мкА; $V_{OC} = -79,2 \pm 11,0$ мВ; $g_T = 1,7 \pm 0,6$ мСм.

Показано, что глутоксим (100 мкг/мл), приложенный к базолатеральной поверхности кожи лягушки, подобно инсулину стимулирует транспорт Na^+ . После приложения глутоксима, I_{SC} возрос на $39,2 \pm 7,4$ %; V_{OC} – на $50,1 \pm 9,0$ %; величина g_T не изменилась (здесь и далее по тексту $M \pm m$, n (число опытов) = 10).

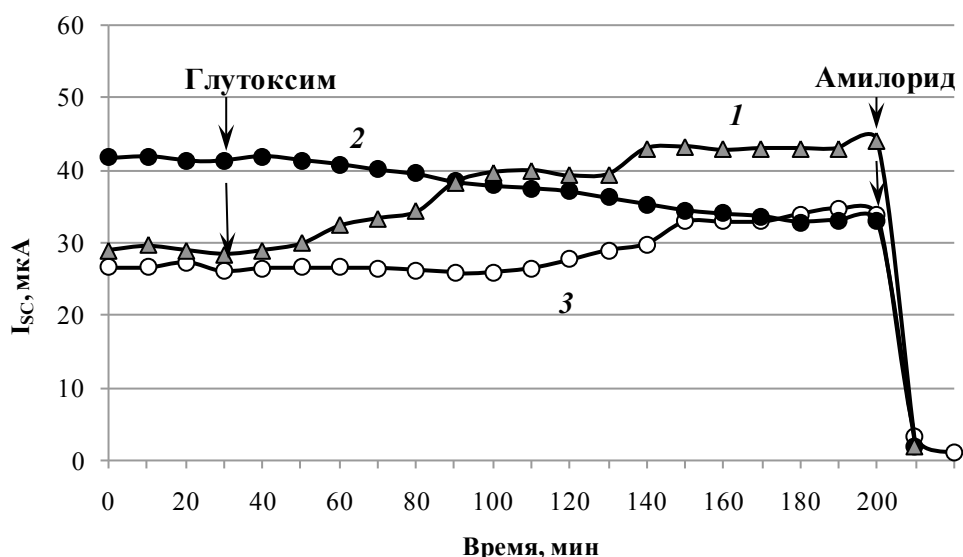


Рисунок 1. Кинетика изменения тока короткого замыкания I_{SC} через кожу лягушки в ответ на действие глутоксима и лиганда рецепторов сигма-1 – ТФП. (1) – I_{SC} после добавления 100 мкг/мл глутоксима к базолатеральной поверхности интактной кожи; (2) – I_{SC} после добавления глутоксима к коже лягушки, предварительно обработанной в течение 30 мин 20 мкг/мл ТФП, приложенного со стороны апикальной поверхности кожи; (3) – I_{SC} после добавления глутоксима к коже лягушки, предварительно обработанной в течение 30 мин 20 мкг/мл ТФП, приложенного со стороны базолатеральной поверхности кожи. В конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор амилорид-чувствительных эпителиальных Na^+ -каналов (ENaC) амилорид (20 мкМ)

Обнаружено, что ТФП снижает стимулирующее влияние глутоксида на транспорт Na^+ . В среднем, после обработки апикальной или базолатеральной поверхности кожи ТФП (20 мкг/мл) в течение 30 мин перед приложением к базолатеральной поверхности кожи 100 мкг/мл глутоксида, I_{SC} уменьшается на $12,4 \pm 3,5$ или увеличивается на $6,4 \pm 2,1$ %, V_{OC} уменьшается на $30,0 \pm 8,1$ или увеличивается на $5,5 \pm 1,1$ %, а g_{T} увеличивается на $10,1 \pm 3,1$ % или не изменяется, при приложении ТФП со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно.

Обнаружено также, что степень ингибирующего действия ТФП на эффект глутоксида на транспорт Na^+ различается в зависимости от приложения ТФП со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи (рис. 1). Результаты, представленные на рисунке 1, свидетельствуют о том, что ТФП значительно сильнее снижает стимулирующее влияние глутоксида на транспорт Na^+ при действии агента со стороны апикальной поверхности кожи лягушки. Так, приложение ТФП к апикальной поверхности кожи вызывает не только полное подавление стимулирующего действия глутоксида на транспорт Na^+ , но и приводит к снижению транспорта Na^+ в коже лягушки (рис. 1, кривая 2). Тогда как предварительная обработка базолатеральной поверхности кожи ТФП вызывает снижение, но не подавление стимулирующего действия глутоксида (рис. 1, кривая 3).

Транспорт Na^+ в эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие многочисленные Na^+ -транспортирующие белки, локализованные в различных мембранах клетки. Известно, что многие Na^+ -транспортирующие белки содержат многочисленные остатки цистеина, которые являются мишенями для внутри- и внеклеточных окислителей и восстановителей [10, 11]. Однако введение в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) вызывало полное подавление I_{SC} (рис. 1), что свидетельствует о том, что влияние глутоксида на транспорт Na^+ связано, преимущественно, с модуляцией активности ENaC .

Результаты, представленные в настоящей работе, согласуются с данными, полученными нами ранее при сравнительном исследовании участия в регуляции иммуномодулятором глутоксидом транспорта Na^+ в эпителии кожи лягушки двух структурно различных антагонистов сигма-1 рецепторов – нейролептика фенотиазинового ряда хлорпромазина и производного бутирофенона – галоперидола. Хлорпромазин (аминазин), также как и ТФП, 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 [12]. Нами было показано, что хлорпромазин значительно сильнее снижает стимулирующее действие глутоксида на транспорт Na^+ . Кроме того, ингибирующий эффект галоперидола и хлорпромазина более выражен при действии агентов со стороны апикальной поверхности кожи лягушки [13]. Таким образом, результаты, представленные в настоящей работе и ранее, позволяют предположить, что влияние лигандов сигма-1 рецепторов на транспорт Na^+ в коже лягушки осуществляется при участии различных белковых и липидных сигнальных комплексов, ассоциированных с апикальным или базолатеральным доменом поляризованных эпителиальных клеток, а также свидетельствуют о том, что различные производные фенотиазина (хлорпромазин и ТФП) обладают сходным влиянием на I_{SC} и эффект глутоксида на транспорт Na^+ в коже лягушки.

Полученные нами результаты согласуются также 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 [14], так и опосредованное влияние агонистов/антагонистов сигма-1 рецепторов на ASICs, при участии дополнительных сигнальных молекул, таких как гетеротримерные G- белки и комплекс кальцинеурин с адаптерным белком AKAP150 [15]. Полученные нами данные о том, что ингибирующее влияние ТФП на эффект глутоксида значительно более выражено при добавлении ТФП со стороны апикальной поверхности кожи, позволяют предположить, что основные мишени для действия лигандов рецепторов сигма-1 локализованы именно в апикальных, а не в базолатеральных мембранах клеток эпителия кожи лягушки.

Таким образом, в настоящей работе впервые на эпителии кожи лягушки показано, что лиганд рецепторов сигма-1 – нейролептик фенотиазинового ряда ТФП модулирует влияние глутоксида на транспорт Na^+ , что свидетельствует об участии рецепторов сигма-1 в сигнальных каскадах, запускаемых глутоксидом в эпителии кожи лягушки, и приводящих к стимуляции транспорта Na^+ . Полученные нами данные о влиянии трифлуоперазина способствуют более детальному пониманию молекулярных механизмов фармакологического действия производных фенотиазина, а также указывают на нежелательность совместного применения в клинической практике препарата глутоксид и 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. 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, № 5, pp. 709-712.
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. Мельницкая А.В., Крутецкая З.И., Крутецкая Н.И., Антонов В.Г. Трифлуоперазин модулирует транспорт Na^+ в коже лягушки. *Актуальные вопросы биологической физики и химии*, 2019, т. 4, № 1, с. 90-93. [Melnitskaya A.V., Krutetskaya Z.I., Antonov V.G., Krutetskaya N.I. Trifluoperazine modulates Na^+ transport in frog skin. *Russ. J. Biol. Phys. Chem.*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 90-93. (In Russ.)]
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. Boldyrev A.A., Bulygina E.R. Na/K-ATPase and oxidative stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1997, vol. 834, pp. 666-668.
11. 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.
12. 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.
13. Крутецкая З.И., Мельницкая А.В., Антонов В.Г., Ноздрачев А.Д. Антагонисты рецепторов сигма-1 галоперидол и хлорпромазин модулируют влияние глутоксима на транспорт Na^+ в коже лягушки. *ДАН*, 2019, т. 484, № 5, с. 629-632. [Krutetskaya Z.I., Melnitskaya A.V., Antonov V.G., Nozdachev A.D. Sigma-1 receptor antagonists haloperidol and chlorpromazine modulate the effect of glutoxim on Na^+ transport in frog skin. *Dokl. Biochem. Biophys.*, 2019, vol. 484, pp. 63-65. (In Russ.)]
14. 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.
15. 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 (ASIC1a) and ASIC1a-induced Ca^{2+} influx in rat cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2008, vol. 327, pp. 491-502.

NEUROLEPTIC TRIFLUOPERAZINE ATTENUATES STIMULATORY EFFECT OF IMMUNOMODULATOR GLUTOXIM ON Na^+ TRANSPORT IN FROG SKIN

Melnitskaya A.V.¹, Krutetskaya Z.I.¹, Antonov V.G.², Krutetskaya N.I.¹, Badulina V.I.¹

¹ Saint-Petersburg State University

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

² Kirov Medical Academy

Lebedeva str., 6, Saint-Petersburg, 194044, Russia

Abstract. The skin of amphibians is a classic model object for the study of transepithelial ion transport mechanisms. Previously, we found that Na^+ transport in frog skin epithelial cells is modulated by oxidizing and reducing agents. For the first time we showed that oxidized glutathione (GSSG) and drug glutoxim® (disodium salt of GSSG with a nano additive of a d-metal, PHARMA-VAM, Saint-Petersburg), mimic insulin effect and stimulate transepithelial Na^+ transport when applied to the frog skin basolateral surface. Sigma-1 receptors are unique ligand-regulated molecular chaperones widely expressed in central nervous system and in peripheral tissues, including kidney and liver cells. Sigma-1 receptors interact with target proteins, including ion channels and receptors, and modulate many cellular processes. We have previously shown that sigma-1 receptor ligand neuroleptic trifluoperazine (TFP) inhibits Na^+ transport in frog skin. It is known that some of the clinical cases require concomitant use of immunomodulators and neuroleptics. Thus, it was appropriate to study the involvement of sigma-1 receptors in glutoxim effect on Na^+ transport in frog skin. Phenothiazine derivative neuroleptic TFP, the ligand of sigma-1 receptor, was used in our experiments. Using voltage-clamp technique, we have shown for the first time that frog skin preincubation with 20 $\mu\text{g/ml}$ TFP attenuates the stimulatory effect of 100 $\mu\text{g/ml}$ glutoxim on Na^+ transport. The results indicate the involvement of sigma-1 receptors in signaling cascades triggered by glutoxim in frog skin epithelium and leading to Na^+ transport stimulation and also suggest that a combined use of drug glutoxim and phenothiazine derivatives in clinical practice is undesirable.

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