

Москва, 2005, т. 2, с. 155-174. [Dontsov A.E, Ostrovsky M.A. Antioxidant role of the screening pigments of the eye-melanins and ommochromes and the physicochemical mechanisms of their action. *Chemical and biological kinetics. Newest Horizons*, Moscow, 2005, vol. 2, p. 155-174. (In Russ.)]

2. Багиров Р.М., Насиров Э.Ф., Багирова О.Ш., Турабова Г.А. Исследование взаимодействия ионов железа с меланосомами. *Труды V Международной научно-технической конференции «Актуальные проблемы физики», Баку*, 2008, с. 174-176. [Bagirov R.M., Nasirov E.F., Bagirova O.Sh., Turbavova G.A. Investigation of the interaction of iron ions with melanosomes. *Proceedings of the V International Scientific and Technical Conference "Actual Problems of Physics"*, Baku, 2008, p. 174-176. (In Russ.)]

3. Бидзилия Н.И., Зезина Н.В. Выделения растительных меланинов и изучение их радиозащитных свойств. *Физиол. и биохим. культурных растений*, 1971, т. 3, № 1, с. 55. [Bidziliya N.I., Zezina N.V. Isolation of plant melanins and study of their radioprotective properties. *Physiol. And biochem. Cultivated plants*, 1971, vol. 3, no. 1, p. 55. (In Russ.)]

4. Фабричный П.Б., Похолок К.В. *Мессбауэровская спектроскопия и её применение для химической диагностики неорганических материалов*. М.: МГУ, 2012, 142 с. [Fabrichniy P.B., Pokholok K.V. *Mossbauer spectroscopy and its application for the chemical diagnosis of inorganic materials*, Moscow: MSU, 2012, 142 p. (In Russ.)]

### ВЛИЯНИЕ НЕЙРОЛЕПТИКОВ НА ТРАНСПОРТ Na<sup>+</sup> 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

**Аннотация:** С использованием метода фиксации потенциала исследовано влияние двух структурно различных нейролептиков галоперидола и хлорпромазина на транспорт Na<sup>+</sup> в коже лягушки. Впервые показано, что галоперидол и хлорпромазин модулируют трансэпителиальный транспорт Na<sup>+</sup>. Полученные результаты свидетельствуют также о том, что регуляторное влияние данных антипсихотических агентов на транспорт Na<sup>+</sup> в коже лягушки осуществляется при участии различных сигнальных механизмов.

**Ключевые слова:** кожа лягушки, трансэпителиальный транспорт Na<sup>+</sup>, галоперидол, хлорпромазин.

### THE EFFECT OF NEUROLEPTICS ON Na<sup>+</sup> 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 influence of two structurally different neuroleptics haloperidol and chlorpromazine on Na<sup>+</sup> transport in frog skin was investigated. It was shown for the first time that haloperidol and chlorpromazine modulate the transepithelial Na<sup>+</sup> transport. The results obtained also suggest that the regulatory effect of these antipsychotic agents on Na<sup>+</sup> transport in frog skin is mediated by distinct signaling mechanisms.

**Key words:** frog skin, transepithelial Na<sup>+</sup> transport, haloperidol, chlorpromazine.

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]. Транспорт Na<sup>+</sup> в эпителиальных тканях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие Na<sup>+</sup>-транспортирующие белки и сигнальные каскады, локализованные в различных мембранах клетки. Белковые компоненты этой системы являются мишенью для действия широкого спектра гормонов и фармакологических агентов.

Нейролептики – лекарственные средства различной химической природы, подавляющие специфические проявления психозов, способные оказывать транквилизирующее и седативное действие. Эти лекарственные средства нашли широкое применение в качестве антипсихотических, миорелаксирующих, седативных средств, а также для лечения шизофрении и других психических заболеваний [2]. Нейролептики принято разделять на две группы: типичные (классические) нейролептики (производные фенотиазина, тиоксантена, бутирофенона и дифенилбутилпиперидина) и атипичные нейролептики (производные дибензодиазепина, g-карболина и бензамиды) [2]. Известно, что все антипсихотические агенты обладают высокой нейротоксичностью и большим числом побочных эффектов, таких как гипотония, снижение тепловой чувствительности и значительное увеличение веса [2, 3]. Однако механизмы действия нейролептиков изучены недостаточно полно. Влияние же нейролептиков на трансэпителиальный транспорт Na<sup>+</sup> практически не исследовалось. В связи с этим, представлялось целесообразным исследовать влияние различных антипсихотических агентов на трансэпителиальный транспорт Na<sup>+</sup> в коже лягушки. В экспериментах использовали типичные антипсихотические средства – нейролептик фенотиазинового ряда хлорпромазин (аминазин) и один из наиболее сильных нейролептиков, производное бутирофенона – галоперидол.

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 CaCl<sub>2</sub>, 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:  $I_{SC} = 13,07 \pm 3,38$  мкА;  $V_{OC} = -79,94 \pm 5,34$  мВ;  $g_T = 0,16 \pm 0,05$  мСм.

Впервые показано, что обработка кожи лягушки антипсихотическими агентами снижает транспорт  $Na^+$  в коже лягушки. Обнаружено также, что степень ингибирующего действия галоперидола или хлорпромазина на транспорт  $Na^+$  различается в зависимости от приложения агентов со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи. В среднем (по данным 10 экспериментов) изменение электрических характеристик кожи лягушки после добавления 100 мкг/мл галоперидола к апикальной или базолатеральной поверхности кожи, было следующим:  $I_{SC}$  уменьшился на  $70,14 \pm 15,35$  или на  $21,32 \pm 8,12$  %,  $V_{OC}$  уменьшился на  $48,34 \pm 9,17$  или на  $8,48 \pm 2,87$  %, а  $g_T$  уменьшилась на  $40,24 \pm 7,35$  или на  $14,39 \pm 4,08$  % при приложении галоперидола со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно. В случае обработки кожи лягушки 50 мкг/мл хлорпромазина изменение электрических характеристик в среднем (по данным 10 экспериментов) было следующим:  $I_{SC}$  уменьшился на  $10,91 \pm 2,09$  или на  $40,48 \pm 6,34$  %,  $V_{OC}$  уменьшился на  $13,24 \pm 2,14$  или на  $33,09 \pm 5,48$  %, а  $g_T$  не изменилась или уменьшилась на  $9,69 \pm 3,05$  % при приложении хлорпромазина со стороны апикальной или базолатеральной поверхности кожи, соответственно.

Результаты, представленные на рисунках 1 и 2, также свидетельствуют о том, что галоперидол и хлорпромазин по-разному модулируют трансэпителиальный транспорт  $Na^+$  в коже лягушки. Так, при приложении галоперидола и хлорпромазина к апикальной поверхности кожи, наибольшим ингибирующим действием на транспорт  $Na^+$  обладает галоперидол, тогда как добавление хлорпромазина вызывает двухфазное изменение  $I_{SC}$ : подавление  $I_{SC}$ , наблюдаемое в течение первого часа после приложения агента, сменяющееся существенным увеличением  $I_{SC}$ , наблюдаемым в течение второго часа после приложения хлорпромазина. В то же время, в случае добавления нейролептиков со стороны базолатеральной поверхности кожи, большим ингибирующим действием на транспорт  $Na^+$  обладает хлорпромазин. Наиболее вероятно предположить, что подобные различия обусловлены тем, что регуляция галоперидолом и хлорпромазином транспорта  $Na^+$  в коже лягушки осуществляется при участии различных белковых и липидных сигнальных комплексов, ассоциированных с апикальным и базолатеральным доменами поляризованных эпителиальных клеток.

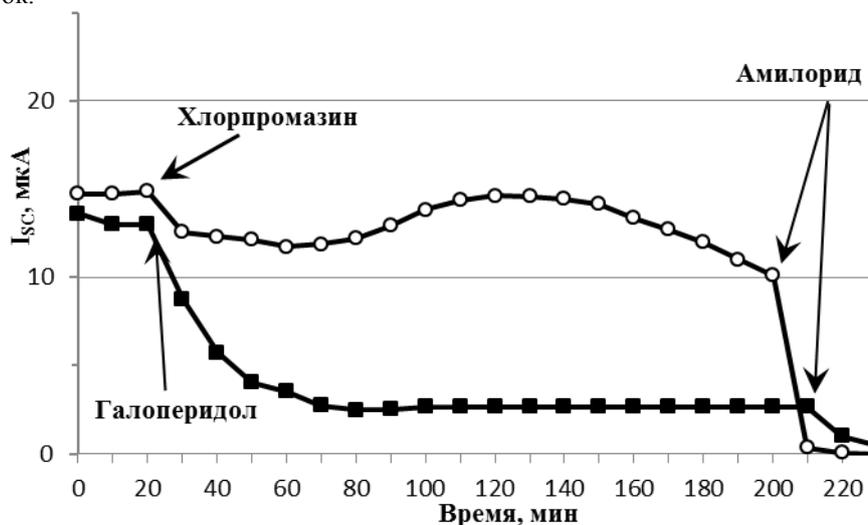


Рисунок 1 – Кинетика изменения тока короткого замыкания  $I_{SC}$  через кожу лягушки в ответ на приложение к апикальной поверхности кожи 100 мкг/мл галоперидола и 50 мкг/мл хлорпромазина; в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ)

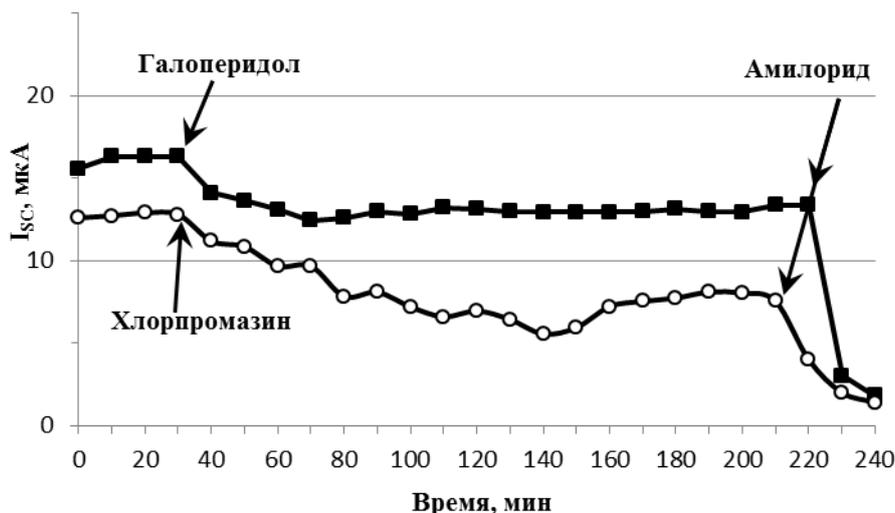


Рисунок 2 – Кинетика изменения тока короткого замыкания  $I_{sc}$  через кожу лягушки в ответ на приложение к базолатеральной поверхности кожи 100 мкг/мл галоперидола и 50 мкг/мл хлорпромазина; в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи, добавляли блокатор ENaC амилорид (20 мкМ)

Полученные результаты согласуются с данными литературы. Так, обнаружена способность хлорпромазина ингибировать активность  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -АТФазы [4] и понижать внутриклеточную концентрацию  $\text{Na}^+$  в клетках печени крысы (*Rattus norvegicus*) и жабы (*Bufo marinus*) [5]. Показано также, что хлорпромазин ингибирует активность ENaC, экспрессированных в ооцитах лягушки *Xenopus* [6].

Известно, что нейролептик галоперидол является антагонистом сигма-1 рецепторов [7, 8]. 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 как в центральной нервной системе, так и в периферических тканях, в том числе в клетках почки и печени [9, 10]. Их лигандами являются эндогенные стероиды, антидепрессанты, антипсихотические, противосудорожные и анальгетические средства [2, 7]. Сигма-1 рецепторы взаимодействуют с многочисленными белками-мишенями, включая ионные каналы и рецепторы, а также участвуют в модуляции многих клеточных процессов [11]. В последнее время появляются данные о том, что рецепторы данного типа участвуют в модуляции активности протон-активируемых ионных каналов (ASICs) - одного из представителей суперсемейства Deg/ENaC, к которому принадлежат и ENaC, играющие ключевую роль в транспорте  $\text{Na}^+$  в реабсорбирующих эпителиях [12]. Полученные нами данные, согласно которым наблюдается практически полное подавление транспорта  $\text{Na}^+$  при добавлении галоперидола к апикальной поверхности кожи, а также значительно менее выраженный ингибирующий эффект галоперидола, добавленного со стороны базолатеральной поверхности кожи, позволяют предположить, что основные мишени для действия антагониста сигма-1 рецепторов галоперидола локализованы именно в апикальных, а не в базолатеральных мембранах клеток эпителия кожи лягушки.

Транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителиях представляет собой сложную, многокомпонентную систему, в работе которой принимают участие многочисленные  $\text{Na}^+$ -транспортирующие белки, локализованные в различных мембранах клетки, многие из которых могут являться мишенями для влияния нейролептиков. Однако введение в конце каждого эксперимента в раствор, омывающий апикальную поверхность кожи лягушки, блокатора ENaC амилорида (20 мкМ) вызывало полное подавление  $I_{sc}$  (см. рисунки 1 и 2), что свидетельствует о том, что влияние нейролептиков на транспорт  $\text{Na}^+$  связано, преимущественно, с модуляцией активности ENaC.

Таким образом, нами впервые показано модулирующее влияние нейролептиков галоперидола и хлорпромазина на транспорт  $\text{Na}^+$  в эпителии кожи лягушки. Полученные данные позволяют также предположить, что в основе регуляторного действия производных фенотиазина и бутирофенона на транспорт  $\text{Na}^+$  лежат различные регуляторные механизмы.

#### 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. (In Russ.)]
2. 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.
3. Dilsaver S.C. Antipsychotic agents: a review. *Am. Fam. Phys.*, 1993, vol. 47, pp. 199-204.
4. Van Dyke R.W., Schar Schmidt B.F. Effects of chlorpromazine on  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPase pumping and solute transport in rat hepatocytes. *Am. J. Physiol.*, 1987, vol. 253, pp. 613-621.
5. Else P., Mansfield K. Activation of sodium transport and intracellular sodium lowering by the neuroleptic drug chlorpromazine. *Biochem. Pharmacol.*, 1997, vol. 54, pp. 275-281.

6. Awayda M.S., Shao W., Guo F., Zeidel M., Hill W.G. ENaC – Membrane interactions: regulation of channel activity by membrane order. *J. Gen. Physiol.*, 2004, vol. 123, pp. 709-727.
7. 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.
8. Cobos E.J., Del Pozo E., Baeyens J.M. Irreversible blockade of sigma-1 receptors by haloperidol and its metabolites in guinea pig brain and SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.*, 2007, vol. 102, pp. 812-825.
9. Rousseaux C.G., Greene S.F. Sigma receptors [ $\sigma$ Rs]: biology in normal and diseased states. *J. Recept. Signal. Trans.*, 2016, vol. 36, pp. 327-388.
10. 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.
11. 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.
12. Carnally S.M., Johannessen M., Henderson R.M., Jackson M.B., Edwardson J. M. Demonstration of a direct interaction between  $\sigma$ -1 receptors and acid-sensing ion channels. *Biophys. J.*, 2010, vol. 98, pp. 1182-1191.

### МЕХАНО-ХЕМИОСМОТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ СОПРЯЖЕНИЯ

Касумов Э.А., Касумов Р.Э., Касумова И.В.

Научно-производственный центр «КОРВЕТ»

дер. Чулпаново, стр. 1, 2-о Домодедово, Московская область, 142000, РФ

e-mail: kasumov\_eldar@mail.ru

**Аннотация.** Одной из главных промежуточных продуктов химической энергии в живых организмах является АТФ. Она синтезируется в основном в  $H^+$ - $F_1F_0$ -АТФ азах, используя энергию фотона либо от окисления питания, либо от солнечной энергии через процессы окислительного - или фотофосфорилирования в энергопреобразующих мембранах митохондрий, хлоропластов и бактерий. Мы предлагаем механо-хемиосмотическую модель сопряжения переноса электронов с синтезом АТФ и циклического низкоамплитудного набухания-сокращения. Согласно этой модели, образуется асимметричный контакт между димерами противоположных  $bc_1$  комплексов внутрикристного пространства митохондрий при сокращении, который является механическим регулятором переноса электронов от [2Fe-2S] кластера к гему  $c_1$ . В этой модели, ОН группы переносятся в матрикс,  $H^+$  медленно (около 9 мсек) во внутрикристное пространство (при этом происходят поляризация мембраны, восстановление цит  $c_1$  и сокращение внутрикристного пространства). Движение протонов в матрикс вызывает нейтрализацию гидроксильных ионов, в результате чего выделяется энергия. Таким образом, основная энергия расходуется на синтез АТФ, на доставку фосфатных ионов в гексамер с помощью С-конца  $\alpha$ -спирали  $\gamma$ -субъединицы как на лифте протв энергетического барьера, образование фосфорильных групп и освобождение из гексамера синтезированных молекул АТФ.

**Ключевые слова:** сопряжение, синтез АТФ, перенос электронов, набухание-сокращение.

### MECHANO-CHEMIOSMOTHIC MODEL OF CONTRACTING

Kasumov E.A., Kasumomov R.E., Kasumova I.V.

Scientific-productional Centre «KORVET@»

Chulanovo vil., bld. 1, dist. Domodedovo, Moscow region, 142000, Russia

e-mail: kasumov\_eldar@mail.ru

**Abstract.** ATP is a main intermediate of chemical energy in the living organisms. It is mainly synthesized in  $H^+$ - $F_1F_0$ -ATPases by utilizing energy equal to energy of foton either from oxidation of foods or from light via the process of oxidative- or photo-phosphorylation in energy transducing membranes of mitochondria, chloroplasts and bacteria. We propose a mechano-chemiosmotic model of electron transfer coupling ATP synthesis and cyclic low amplitude swelling-shrinkage. According to this model, an asymmetric contact between dimers of opposite  $bc_1$  complexes inside the intracristae space is formed during shrinkage of mitochondria, which is a mechanical regulator of electron transfer from [2Fe-2S] cluster to heme  $c_1$ . In this model ОН is transferred into matrix and  $H^+$  slowly (about 8 msec) into intra-cristae during energization (a polarization of membrane, a reduction of cyt  $c_1$  and a shrinkage of intra-cristae space occur). The movement of protons to the matrix causes neutralization of hydroxyl ions, as a result of which energy is released. Such, the main energy is consumed for the synthesis of ATP, for delivery of phosphate ions in the hexamer with help C-terminal  $\alpha$ -helix of  $\gamma$ -subunit as on a lift against the energy barrier, a formation of phosphoryl groups and the release of ATP molecules, synthesized from the hexamer.

**Key words:** coupling, ATP synthesis, electron transfer, swelling-shrinkage.

Одной из главных особенностей живых организмов является их способность извлекать и трансформировать энергию фотона из окружающей среды в результате окислительно-восстановительных реакций. Основным интермедиатом химической энергии в них является АТФ, большая часть которого синтезируется в энергопреобразующих мембранах митохондрий, бактерий и хлоропластов. В разные годы возникали химическая [1], конформационная [2], хемиосмотическая [3] гипотезы, позволяющие объяснить, каким образом, освобождающаяся энергия при окислении субстрата или при фотолизе трансформируется в энергию химической связи в молекуле АТФ.