

ГАЛОПЕРИДОЛ — МОДУЛЯТОР ИОННОГО ТРАНСПОРТА КЛЕТОК *CHARA CORALLINA*

© О. М. Жерелова,¹ А. А. Катаев,^{2,*} В. М. Грищенко,³ Р. Ш. Штанчаев¹

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино, Московская обл., 142290,

²Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Московская обл., 142290,

и ³Институт биологического приборостроения РАН, Пущино, Московская обл. 142290;

* электронный адрес: aakka1952@mail.ru

Исследовано влияние антагониста дофаминовых D₂-рецепторов галоперидола (ГП) на функционирование ионных каналов (Ca²⁺, K⁺ и Cl⁻) плазматической мембраны клеток *Chara corallina* и на функциональные свойства цитоскелета. ГП блокировал Ca²⁺-каналы плазмалеммы. Помимо уменьшения амплитуды кальциевого тока в присутствии ГП замедлялась кинетика активации и инактивации кальциевых каналов. Действие ГП было обратимым, после его удаления характеристики развития кальциевого тока восстанавливались. ГП не оказывал влияния на Ca²⁺-активируемые хлорные каналы. ГП ингибировал движение цитоплазмы, связанное с микрофиламентным комплексом. При удалении ГП из омывающего клетку раствора движение цитоплазмы восстанавливалось. Полученные результаты позволяют предположить, что в присутствии ГП концентрация свободного Ca²⁺ в цитоплазме увеличивается и что в Ca²⁺-каналах плазмалеммы клеток *Ch. corallina* имеются сайты связывания, специфические как для дофаминовых рецепторов, так и для их антагонистов.

Ключевые слова: галоперидол, ионные каналы, плазмалемма, цитоплазма, харовые водоросли, *Chara corallina*.

Принятые сокращения: ГП — галоперидол, ИПВ — искусственная прудовая вода.

Прогресс в изучении структуры и функции дофаминовых рецепторов во многом связан с открытием и применением в научно-исследовательской и клинической практике их антагонистов, в частности производного бутирофенона — галоперидола (ГП), являющегося блокатором постсинаптических дофаминовых рецепторов типа D₂ (Парнышкова и др., 2011). Нарушение или несбалансированное усиление деятельности внутриклеточных систем, связанных с D₂-рецепторами, сопутствует развитию таких нейродегенеративных патологий, как шизофрения и паркинсонизм (Howes, Karim, 2009). По этой причине ГП нашел свое применение в медицинской практике в качестве нейролептика, оказывающего седативное и антипсихотическое действие.

Современный взгляд на этиологию нейродегенеративных заболеваний непосредственно связан с участием в их развитии ионов Ca²⁺ и ионных каналов (Ehling et al., 2011; Рязанцева и др., 2012). Известно, что кроме дофаминовых рецепторов ГП взаимодействует также и с ионными каналами возбудимых мембран (Ogata et al., 1989; Akamine et al., 2002; Yang et al., 2005; Dunkan et al., 2009). Однако механизм его взаимодействия с нейрональной мембраной и ион-транспортными системами клеток изучен недостаточно. В связи с этим возникает необходимость детально исследовать влияние ГП на систему ионного транспорта клетки — кальциевые, калиевые и хлорные каналы, причем особый интерес представляет выяснение механизма действия ГП на Ca²⁺-каналы

L-типа и участие в этом процессе цитоскелета. Дело в том, что поведение цитоскелетного белка актина регулируется ионами внутриклеточного Ca²⁺ (Williamson, Ashley, 1982) и изменяется под воздействием дофамина, способного полимеризовать глобулярный актин и формировать пучки актиновых нитей в клетке (Мошков и др., 2010).

Вещества, играющие роль нейромедиаторов в ЦНС животных, обнаружены также и в растениях, где они выполняют регуляторную и сигнальную функции (Roschina, 2001). В частности, влияние дофамина на ионную проницаемость подтверждено в ряде исследований на растительных объектах, таких как клетки корнеплодов красной свеклы (Roshchina, 2001), показавших снижение натриевой утечки и выход из клеток Ca²⁺ и Mg²⁺. Дофамин и другие биогенные амины являются универсальными агентами раздражимости в самых разных, эволюционно отдаленных систематических группах живых организмов (Жерелова и др., 2014). Различия отмечаются в основном в частных механизмах межклеточной сигнализации у животных и растений, в особенностях энергетического и метаболического обменов, в их скорости.

Для комплексного исследования влияния ГП на ионные каналы плазматической мембраны было бы вполне обоснованным использовать в качестве удобной, доступной и дешевой тест-модели наряду с лабораторными животными и культурами клеток-мишеней такой растительный объект, как клетки водоросли *Chara corallina*. Плаз-

малемма этих клеток имеет селективные ионные каналы (K^+ , Ca^{2+} и Cl^-), которые по своим электрофизиологическим характеристикам во многом подобны ионным каналам животных клеток (Tester, 1990; Piñeros, Tester, 1997). Правомерность использования такой клеточной модели подтверждается значительной гомологией в структуре генов многих семейств ионных каналов растений и соответствующих каналов животных клеток (Ward et al., 2009). Одной из важных особенностей клеток *Ch. corallina* является возможность визуального наблюдения за движением в них цитоплазмы (Kataev et al., 2012). Этот процесс в клетках *Charophyta* генерируется взаимодействием субкортикального актина междуузлий с эндоплазматическим миозином (Shimmen, Yokota, 2004).

Гигантские (длина 6—12 см, диаметр 0.6—0.8 мм) электровозбудимые клетки пресноводных водорослей *Ch. corallina* обладают рядом преимуществ при проведении электрофизиологических экспериментов, а именно: они позволяют использовать простую светомикроскопическую технику для микроэлектродных манипуляций, длительно изучать электрофизиологические характеристики плазмалеммы как с наружной, так и с внутренней стороны, разделять регистрацию K^+ , Ca^{2+} -токов и Ca^{2+} -активируемых Cl^- -токов (Lunevsky et al., 1983; Kataev et al., 1984; Berestovsky, Kataev, 2005). Таким образом, плазмалемма клеток *Ch. corallina* и других клеток *Charophyta* является более адекватной моделью плазматической мембраны по сравнению с искусственными липидными везикулами и другими экспериментальными моделями и позволяет исследовать на них механизмы взаимодействия биологически активных соединений с клеткой-мишенью и структурами ее трансмембранного транспорта. Возможности такого использования этой модели ранее были представлены нами в ряде публикаций (Drinyaev et al., 2001; Zherelova et al., 2009; Kataev et al., 2012).

Одной из основных задач предлагаемой работы является проверка возможности использования клеток *Ch. corallina* в качестве реальной модели клетки-мишени для изучения взаимодействия биологически активных соединений с ионными каналами клеточной мембраны. В качестве такого соединения использовали ГП, обладающий антипсихотическим и нейролептическим действием.

Материал и методика

Эксперименты выполнены на гигантских клетках пресноводной водоросли *Chara corallina*, которую выращивали и содержали в стеклянных банках в искусственной прудовой воде (ИПВ) следующего состава (в мМ): 0.1 KCl, 1.0 NaCl, 0.1 CaCl₂ при 18—20 °С. Перед экспериментом интернодальные клетки отделяли от соседних с помощью ножниц и содержали в растворе ИПВ. Регистрацию переходных токов плазмалеммы клеток *Ch. corallina* при изменении потенциала на мембране проводили в режиме фиксации напряжения на изолированном с помощью воздушных мостиков рабочем участке клетки длиной 2 мм по четырехэлектродной методике (Жерелова и др., 2014).

Процедура измерения токов на клетках харовых водорослей детально описана ранее (Lunevsky et al., 1983; Berestovsky, Kataev, 2005; Kataev et al., 2012). Микроэлектроды изготавливали из стеклянных капилляров на микроузлище МЭ-4 (Россия). Сопротивление микроэлектро-

дов, заполненных раствором 0.2 М KCl, составляло около 1—2 МОм. Для фиксации напряжения на мембране по четырехэлектродной схеме использовали усилитель Dagan 8500 (США), а в качестве управляющего и регистрирующего устройства — компьютеры с платами ЦАП/АЦП-Data Translation DT2801A и Lcard 1251. Для мониторинга эксперимента использовали специализированный пакет программ Bio-Qest и PClamp 6. Специализированную программу WinWCP 4.4.7 (University of Strathclyde) использовали для обработки кривых тока.

В качестве маточного раствора использовали фармакологический (аптечный) препарат ГП (водный раствор для внутривенного введения, концентрация действующего вещества 5 мг/мл или 13.3 мМ, ОАО «Мосхимфармпрепараты» им. Н. А. Семашко, Россия). Стандартный наружный раствор ИПВ в экспериментальной ячейке содержал (в мМ): 0.1 KCl, 1 NaCl, 0.5 CaCl₂, 1 HEPES/Tris, pH 7.3. Растворы Tris, HEPES, EGTA, сахароза (Sigma Chemical Co.), NaCl, KCl, CaCl₂, KOH (Fluka) готовили на деионизированной воде. Исследуемые концентрации вещества нормализованы к объему рабочего отсека камеры (1 мл).

Скорость движения цитоплазмы в клетках *Ch. corallina* регистрировали с помощью бинокулярного светового микроскопа МБС-2 (Россия), снабженного видеокамерой Sony DCR-TRV19E. Детали этого эксперимента подробно описаны и опубликованы нами ранее (Kataev et al., 2012).

Анализ полученных результатов проводили с помощью программ SigmaPlot 11 (Jandel Scientific) и Origin 8 (OriginLab Corporation). Графики представляют средние (статистически обработанные) результаты всех серий экспериментов. Число проведенных экспериментов (n) указано в подписях к рисункам.

Результаты

Влияние ГП на электрофизиологические параметры плазмалеммы клеток *Ch. corallina* исследовали при его разных концентрациях в наружном растворе, омывающем клетку, наблюдая развитие эффектов взаимодействия ГП с ионными каналами во времени. Пример записи изменения в характере развития переходного тока, вызванного в ответ на деполяризацию мембраны, в присутствии ГП приведен на рис. 1, а. Представлены токи до (кривая 1) и после внесения 10 мкМ ГП снаружи на выделенный рабочий участок клетки (кривые 2—4). В присутствии ГП происходит уменьшение амплитуды входящих Ca^{2+} - и Ca^{2+} -зависимого Cl^- -токов, которые, как было показано ранее (Lunevsky et al., 1983), индуцированы активацией селективными Ca^{2+} - и Ca^{2+} -активируемыми Cl^- -каналами плазмалеммы харовых водорослей. Помимо подавления тока ГП замедлял скорость его активации и инактивации. На рис. 1, б показаны изменение амплитуды тока во времени (кривая 1) и увеличение времени достижения пикового значения тока (кривая 2) в присутствии 10 мкМ ГП.

Для выяснения механизма селективного действия препарата на кальциевые и Ca^{2+} -зависимые Cl^- -каналы мы разделили кальциевую и хлорную компоненты интегрального тока. Для этого концентрацию ионов Ca^{2+} в наружном растворе увеличили до 20 мМ, что привело к ускорению процесса инактивации Ca^{2+} -тока и разделению во времени кальциевого и хлорного токов (рис. 2, б). На

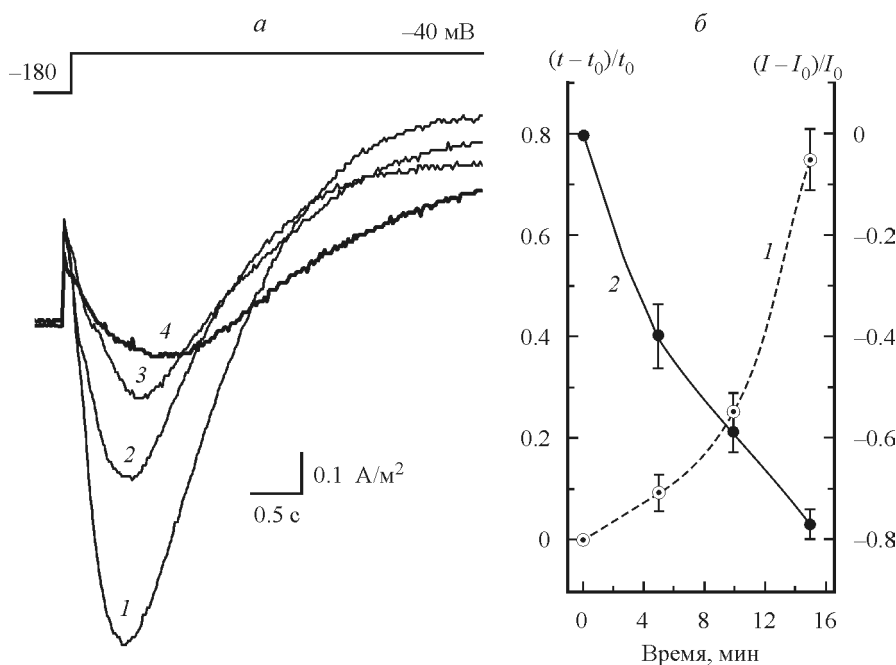


Рис. 1. Изменение амплитуды и кинетики развития интегрального тока плазмалеммы *Chara corallina* (а), а также зависимость амплитуды тока и времени достижения его пикового значения (б) при действии 10 мкМ галоперидола (ГП).

а — кривые: 1 — контроль, 2–4 — соответственно через 5, 10 и 15 мин после введения ГП; командный импульс напряжения на мембране показан вверху: от -180 до -40 мВ. б — нормированные кривые 1 и 2 — соответственно изменения амплитуды тока (I) и времени (t) достижения его пикового значения; вертикальные отрезки — ошибка среднего ($n = 12$).

рис. 2 показано типичное развитие тока (рис. 2, а) в растворе ИПВ (при 0.5 мМ Ca^{2+}), где Ca^{2+} - и Cl^- -компоненты тока сливаются, а при повышенной до 20 мМ концентрации ионов Ca^{2+} в наружном растворе происходит разделение компонентов тока за счет увеличения скорости

инактивации Ca^{2+} -каналов (рис. 2, б). На рис. 2, в показано времязависимое действие 50 мкМ ГП на кальциевую компоненту тока. Видно, что препарат блокирует Ca^{2+} -каналы и влияет на кинетику развития тока. Кинетика ГП-индуцированного ингибирования Ca^{2+} -тока зависела

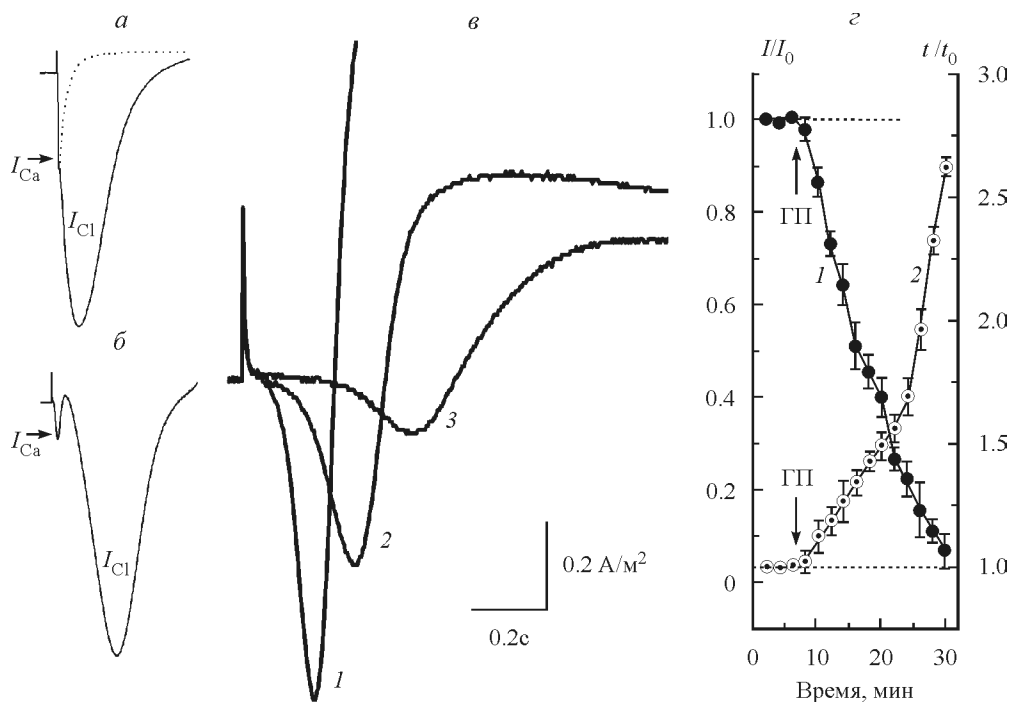


Рис. 2. Действие галоперидола (ГП) на кальциевые каналы.

а — интегральный ток в растворе ИПВ (при 0.5 мМ CaCl_2); б — трансформация интегрального тока в растворе ИПВ, содержащем 20 мМ CaCl_2 ; в — зависимость от времени изменения кальциевой компоненты интегрального тока в присутствии 50 мкМ ГП в контроле (кривая 1), через 15 (2) и 30 (3) мин; з — кинетика изменения амплитуды Ca^{2+} -тока (1) и смещения его пикового значения во времени (2); вертикальные отрезки — ошибка среднего ($n = 6$).

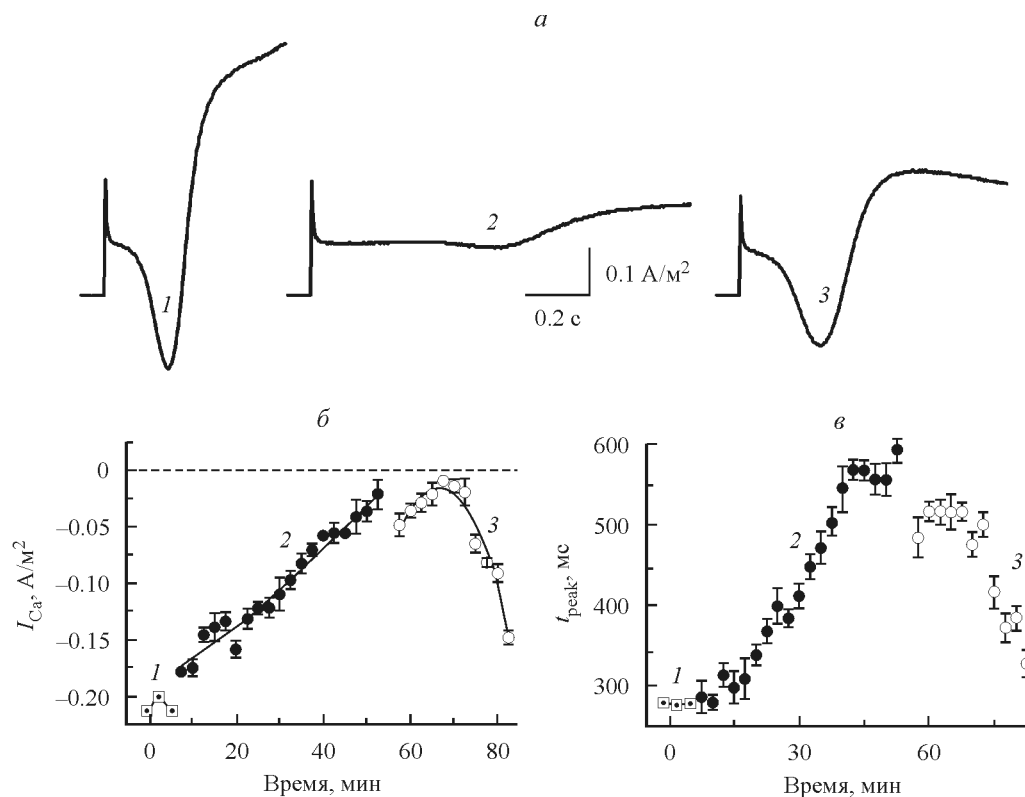


Рис. 3. Отмывка клеток от галоперидола (ГП): восстановление амплитуды (I_{Ca}) и кинетики развития Ca^{2+} -тока.

a — кривые: 1 — I_{Ca} в контроле, 2 — в присутствии 50 мкМ ГП, 3 — Ca^{2+} -ток после 10-кратного промывания клетки раствором ИПВ без ГП; *б* — кинетика блокирования и восстановления Ca^{2+} -тока после отмывки от ГП на участках кривой: 1 (квадратики) — контроль, 2 (черные кружки) — в присутствии 50 мкМ ГП, 3 (белые кружки) — после отмывки от ГП; *в* — изменение кинетики развития Ca^{2+} -тока (смещение и восстановление после отмывки времени достижения пикового значения тока), 1—3 — то же, что и на рис., *б*. Каждую точку снимали через 2.5 мин от предыдущего измерения, вертикальные отрезки — ошибка среднего ($n = 8$).

от времени его воздействия на клетку. При концентрации ГП 50 мкМ через 20—25 мин Ca^{2+} -ток полностью подавляется (рис. 2, *з*).

Эффект блокирования Ca^{2+} -тока галоперидолом оказался обратимым. После удаления препарата с помощью 10-кратной смены наружного раствора происходило частичное восстановление кальциевого тока (рис. 3, *а*). Амплитуда Ca^{2+} -тока через 25 мин возрастала до уровня ~75 % от первоначального, при этом восстанавливалась и кинетика развития тока (рис. 3, *а*, кривая 3). На рис. 3, *б* (кривая 2) даны зависимость амплитуды тока от времени действия 50 мкМ ГП на клетку и процесс восстановления амплитуды тока после удаления ГП (рис. 3, *б*, кривая 3), а на рис. 3, *в* — зависимость от времени достижения пикового значения Ca^{2+} -тока в тех же условиях.

На рис. 1, *а* также видно, что наряду с подавлением ГП кальциевого тока идет уменьшение амплитуды Ca^{2+} -зависимой хлорной компоненты интегрального тока. Это могло быть следствием уменьшения кальциевой проводимости мембраны. Для исключения влияния кальциевых каналов на характер развития Cl^- -тока необходимо было провести прямую активацию Cl^- -каналов, введя ионы Ca^{2+} в клетку с помощью внутриклеточной перфузии Ca^{2+} -содержащего раствора в цитоплазму, минуя кальциевые каналы. Тогда можно было бы сравнить поведение Cl^- -каналов в контроле и в присутствии ГП и проверить предположение о прямом влиянии ГП на Cl^- -каналы. Для решения этой задачи были проведены эксперименты на перфузированных изнутри клетках с

предварительно удаленным тонопластом (Kataev et al., 1984). В этом режиме активация Cl^- -каналов ведется путем прямого введения ионов Ca^{2+} в клетку и не зависит от состояния кальциевых каналов. На рис. 4, *а* показан контрольный хлорный ток, развивающийся в ответ на введение внутрь клетки ионов Ca^{2+} в концентрации 0.2 мМ. На рис. 4, *б* показана активация Cl^- -каналов в присутствии 50 мкМ ГП снаружи клетки в растворе ИПВ в течение 20 мин. Видно, что амплитуда и кинетика развития хлорного тока остались без изменений, переходные токи в контроле и в присутствии препарата практически не различались. Введение 10 мкМ ГП внутрь клетки также не оказывало влияния на развитие Ca^{2+} -зависимого Cl^- -тока. На этом основании можно сделать вывод о том, что ГП не изменяет состояние Ca^{2+} -активируемых Cl^- -каналов плазмалеммы клеток *Ch. corallina*.

На рис. 5 показаны мгновенные вольт-амперные характеристики (МВАХ), полученные в разные моменты времени — до (кривая 1) и после введения в наружный раствор, омывающий клетку, 10 мкМ ГП (кривые 2 и 3). Токвые кривые получены при подаче пилообразного напряжения амплитудой 230 мВ и длительностью 30 мс. Емкостный ток в точке пересечения всех МВАХ, указывающей на потенциал реверсии тока (E_R), $I_R = C(dV/dt) = 0.08$ мкА. Скорость изменения пилообразного напряжения была подобрана таким образом, чтобы за это короткое время не было активации Ca^{2+} -каналов. Одна точка пересечения всех МВАХ ($E_R = -152$ мВ) указывает на то, что в этом режиме регистрируется изменение только од-

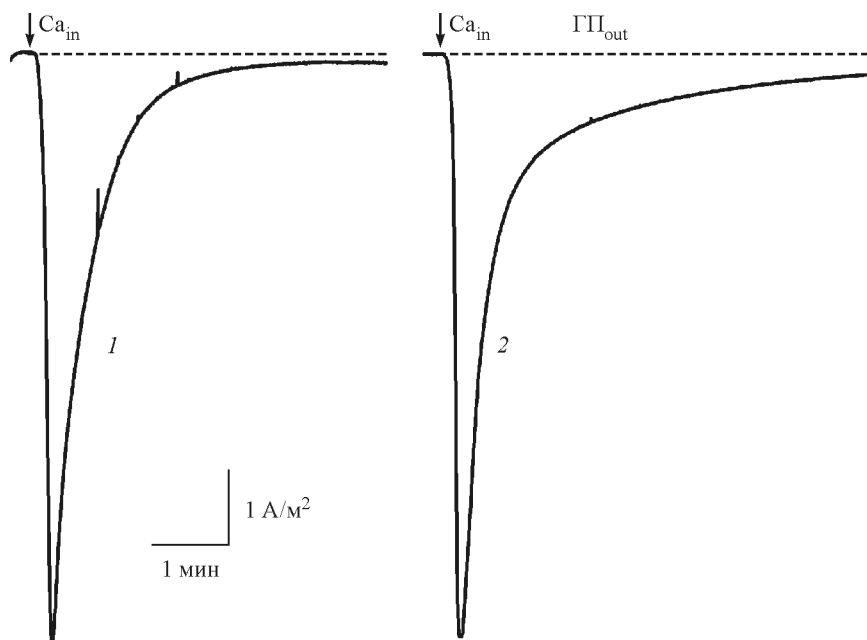


Рис. 4. Действие галоперидола (ГП) на Ca^{2+} -активируемые хлорные каналы перфузируемой изнутри плазмалеммы клеток с удаленным тонопластом.

Кривая 1 — контроль, показана типичная запись Ca^{2+} -активируемого хлорного тока, развивающегося в ответ на замену внутри клетки бескальциевого раствора (с EGTA) на раствор с Ca^{2+} , 2 — та же процедура активации хлорного тока после 20-минутного действия 50 мкМ ГП снаружи клетки (ГП_{out}). $V_m = -100$ мВ. Наружный раствор: ИПВ, содержащий 160 мМ сахарозы; раствор для внутриклеточной перфузии при удалении тонопласта содержал (в мМ): 10 KCl, 3 EGTA, 20 HEPES/Tris, 240 сахарозы. Для активации Cl⁻-каналов внутриклеточный раствор с хелатором EGTA заменяли на раствор с 0.2 мМ CaCl_2 (момент замены указан стрелкой). На рисунке приведена типичная запись одного из четырех повторяющихся экспериментов ($n = 4$).

ного типа проводимости, а именно K^+ -каналов. Если в этот процесс внести вклад другого типа каналов, с другим потенциалом реверсии, то это приведет к смещению и «рассыпанию» единой точки E_R . Учитывая ступенчатое уменьшение тока при изменении напряжения в присутствии ГП по сравнению с контролем (рис. 1, кривые 4 и 1

соответственно), можно заключить, что ГП влияет на проводимость мембраны, блокируя K^+ -каналы.

Одновременно с изменениями электрофизиологических показателей в клетках мы наблюдали значительные изменения скорости движения цитоплазмы, параметра, который является одним из важнейших показателей фи-

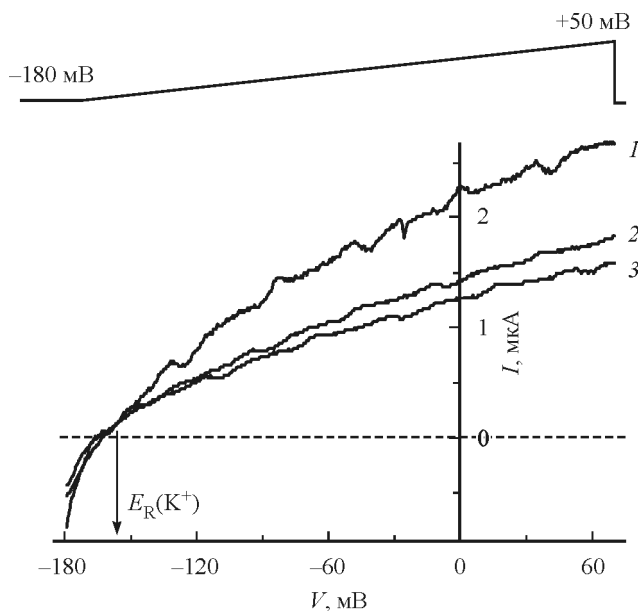


Рис. 5. Изменение калиевой проводимости плазмалеммы в присутствии галоперидола (ГП).

Приведены мгновенные вольт-амперные характеристики (МВАХ), полученные с помощью подачи пилообразного напряжения с уровня -180 до $+50$ мВ длительностью 30 мс. Показаны последовательно снятые МВАХ до (кривая 1) и после введения 50 мкМ галоперидола через 3 и 5 мин (кривые 2 и 3 соответственно). Приведена типичная запись одного из повторяющихся экспериментов ($n = 7$).

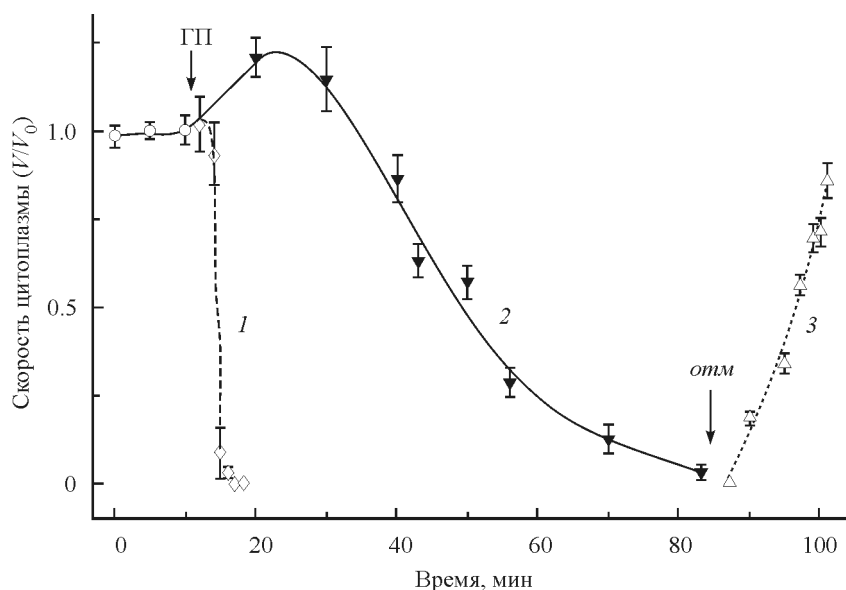


Рис. 6. Влияние галоперидола (ГП) в концентрациях 0.25 (1) и 0.15 (2) мкМ на скорость движения цитоплазмы в клетках *Chara corallina*.

3 — восстановление движения цитоплазмы после удаления ГП. Стрелками показаны моменты введения препарата и начала отмывки (отм) от него (n = 6).

зиологического состояния растительных клеток (Verchot-Lubicz, Goldstein, 2010). Использование разработанной нами ранее техники (Kataev et al., 2012) позволило обнаружить, что ГП не только замедляет движение цитоплазмы в клетках *Ch. corallina*, но и полностью его останавливает (рис. 6). При удалении препарата из омывающего клетку раствора движение цитоплазмы быстро восстанавливалось (рис. 6, кривая 3). В контрольных клетках скорость движения цитоплазмы оставалась неизменной в течение 72 ч.

Обсуждение

В настоящей работе, являющейся логическим продолжением изучения влияния нейротрансмиттеров на электровозбудимую мембрану и цитоскелет модельной клетки-мишени *Ch. corallina* (Жерелова и др., 2014), нами впервые исследовано взаимодействие ГП с ионными каналами плазмалеммы и цитозолем растительных клеток. Полученные результаты указывают на довольно широкий диапазон влияния данного нейрорептика как на плазмалемму, так и на другие структуры клеток *Ch. corallina*, что позволяет провести значительные аналогии в действии ГП на ион-транспортные системы клеток *Charophyta* и животных клеток.

Известно, что ГП способен изменять активность разных типов ионных каналов (калиевых, натриевых и кальциевых) в зависимости от типа клеток (Ogata et al., 1989; Akamine et al., 2002; Yang et al., 2004; Dunkan et al., 2009), причем его активность проявляется в довольно низких концентрациях. Так, было показано, что для IC_{50} ингибирования токов K^+ при участии АТФ достаточно концентрации ГП 1.6 мкМ и концентрации K^+ 2 мМ, а при 150 мМ $[K^+]_{out}$ необходимо уже 23.9 мкМ ГП. Действие этого вещества на K^+ -АТФ-каналы было потенциалзависимым и скоротечным (Yang et al., 2004). При этом блокада K^+ -каналов в нейронах коры головного мозга у мышей осуще-

ствлялась с цитоплазматической стороны канала (Yang et al., 2005). Имеются все основания полагать, что и в нашем случае изменение наклона мгновенных вольт-амперных характеристик K^+ -токов плазмалеммы клеток *Ch. corallina* в процессе действия ГП может объясняться блокадой K^+ -каналов.

Было показано также, что ГП подавлял амплитуду натриевого тока в ганглиозных клетках сетчатки 5—10-суточных крыс. IC_{50} составляла 27.1 мкМ, а концентрации, использованные в исследовании, составляли 2—200 мкМ (Ito et al., 1997). Предполагается, что побочные эффекты ГП при лечении шизофрении, паркинсонизма, наркозависимости и т. д., такие как дискинезия, каталепсия и гипоксический стресс, могут быть обусловлены блокирующим действием данного нейрорептика на ионные (в частности, натриевые) каналы (Ito et al., 1997). Чтобы уменьшить побочные действия при применении ГП, необходим поиск веществ, которые нивелировали бы отрицательные последствия его длительного приема. В этом отношении представляют интерес работы по исследованию действия блокаторов Ca^{2+} -каналов L-типа и ГП (Flaim et al., 1985; Kozlovskii et al., 1996; Biala, 2000; Kim et al., 2006; Bishnoi et al., 2008).

Являясь универсальным мессенджером, ионы кальция играют ключевую роль в жизнедеятельности клетки, запуская, в частности, реакции сигнальной системы. Выяснение роли этих ионов в механизме взаимодействия клетки с лекарственными препаратами является весьма существенным для определения селективности и других фармакологических свойств испытываемых веществ. В нашем исследовании показано, что ГП в концентрации 10 мкМ подавлял амплитуду Ca^{2+} -тока, но не Ca^{2+} -зависимого Cl^- -тока, что может свидетельствовать об избирательном влиянии ГП на системы возбудимости клетки. Отчасти этот вывод согласуется с результатами терапевтического исследования нарушений хлорной проводимости, сопровождающей развитие кистозного фиброза. При этом было выявлено, что ГП способен увеличивать внут-

рикеточный Ca^{2+} , однако его концентрация, вероятно, недостаточна для того, чтобы активировать Cl^- -каналы (Liang et al., 2009). Следует отметить, что в нашем случае наблюдаются сильное смещение максимума амплитуды развивающихся токов при действии на клетку ГП и увеличение латентного периода развития Ca^{2+} -тока во времени по сравнению с результатами исследования взаимодействия препарата с Ca^{2+} -каналами L-типа в кардиомиоцитах (Tarabova et al., 2009).

Характерно, что эффект блокирования Ca^{2+} -токов оказался обратимым: ГП хорошо отмывался и исходные параметры ионных каналов восстанавливались. Это может означать, что структурные элементы мембраны не повреждаются действием ГП на клетку, а их модификация носит обратимый характер. Такая особенность взаимодействия ГП с клеткой очень важна, поскольку он широко используется как лекарственный препарат и неинвазивное обратимое взаимодействие его с клеточной мембраной свидетельствует о безопасности его применения. Вполне возможно также, что неполное восстановление характеристик тока после удаления препарата может быть обусловлено присутствием высокоаффинных сайтов связывания ГП с рецепторами Ca^{2+} -каналов.

Кроме того, было установлено, что ГП замедляет и останавливает во времени движение цитоплазмы клеток *Ch. corallina*, причем удаление ГП из омывающей клетку среды приводит к восстановлению движения цитоплазмы. Эффект замедления скорости и остановки движения цитоплазмы в клетке харовой водоросли в присутствии ГП, возможно, связан с изменением концентрации свободного Ca^{2+} в цитоплазме. Известно, что поведение цитозоля и формирующих его цитоскелетных белков регулируется внутриклеточным кальцием (Williamson, Ashley, 1982). При деполяризации мембраны открываются потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы и ионы Ca^{2+} входят внутрь клетки, увеличивая внутриклеточную концентрацию свободного Ca^{2+} , которая в покое составляет 10^{-7} — 10^{-8} М. Изменение $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ при деполяризации мембраны и открытии потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов может приводить к изменению агрегатного состояния цитозольного актина и скорости цитоплазматических потоков (Williamson, Ashley, 1982).

Актин — универсальный белок цитоскелета — участвует в таких процессах жизнедеятельности клетки, как саморегулирующаяся сборка-разборка цитоскелета, а также контрактильное взаимодействие в комплексе с актинассоциированным белком миозином. Актин способствует формированию единой внутриклеточной системы цитозоля, связывающей воедино ядро, цитоплазму, плазматическую мембрану и другие органеллы. Функциональная универсальность актинового элемента цитоскелета представляет большой интерес для исследования его роли во многих клеточных процессах. Так, полимеризация актинового цитоскелета культивируемых раковых клеток при добавлении дофамина в высокой концентрации подавляет их жизнеспособность (Парнышкова и др., 2011). Было показано, что ГП, будучи антагонистом D_2 -рецепторов, не влияет на способность дофамина полимеризовать глобулярный актин цитоскелета маутнеровского нейрона (Мошков и др., 2010). Характерно, что ГП в отдельности также приводил к изменению актинсодержащих элементов синапсов, хотя эти изменения в отличие от эффектов дофамина не были статистически значимыми.

Известно, что ГП и его аналог спиперон увеличивают концентрацию ионов свободного Ca^{2+} в цитоплазме эпи-

телиальных клеток. Возможно, что это объясняется высвобождением Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума (Liang et al., 2009). В работе Ким и соавторов (Kim et al., 2006) сообщается, что ГП индуцировал приток ионов кальция в клетку через Ca^{2+} -каналы L-типа, причем увеличение Ca^{2+} , вызванное ГП, делало клетки гиппокампа более подверженными окислительному стрессу. Вызванный галоперидолом приток Ca^{2+} в клетку через Ca^{2+} -каналы L-типа влиял на состояние нейронов, вероятно в результате снижения порога активации канала в присутствии ГП (Kim et al., 2006).

Увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме в нашем случае неминуемо приведет к уменьшению амплитуды Ca^{2+} -тока, так как мы имеем дело с Ca^{2+} -зависимыми кальциевыми каналами L-типа. Ранее нами было показано (Жерелова др., 1987), что амплитуда Ca^{2+} -тока зависит от концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{in}}$ в цитоплазме. При концентрации Ca^{2+} более 10^{-6} М, амплитуда кальциевого тока уменьшается на 80 %. Увеличение концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме и его взаимодействие с микрофиламентными структурами цитоскелета могут объяснить замедление и остановку движения цитоплазмы (Tomimaga et al., 1983). Также и Ca^{2+} -чувствительные K^+ -каналы могут реагировать на изменение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , если они Ca^{2+} -инактивируемые.

Таким образом, полученные в настоящей работе результаты указывают на то, что механизмы действия ГП на клетки харовой водоросли и на клетки животных, по крайней мере в функциональном плане, аналогичны. Использование плазмалеммы клеток *Ch. corallina* в качестве модельного тест-объекта при скрининге лекарственных веществ представляется перспективным для дальнейшего изучения действия ГП и специфических блокаторов Ca^{2+} -каналов на ион-транспортные системы клеток-мишеней.

Авторы выражают признательность Д. А. Мошкову за помощь в проведении работы.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 16-04-01759).

Список литературы

- Жерелова О. М., Катаев А. А., Берестовский Г. Н. 1987. Регуляция кальциевых каналов плазмалеммы *Nitellopsis obtusa* внутриклеточным кальцием. Биофизика. 32 (2) : 448—450. (Zherelova O. M., Kataev A. A., Berestovsky G. N. 1987. The regulation of plasma membrane calcium channel *Nitellopsis obtusa* by intracellular calcium. Biophysics. 32 (2) : 448—450.)
- Жерелова О. М., Катаев А. А., Грищенко В. М., Штанчаев Р. Ш., Мошков Д. А., Медведев Б. И. 2014. Взаимодействие дофамина с ионными каналами плазмалеммы и цитоскелетом клеток *Chara corallina*. Биомед. журн. medline.ru (www.medline.ru). 15 (67) : 834—846. (Zherelova O. M., Kataev A. A., Grishchenko V. M., Stanchaev R. S., Moshkov D. A., Medvedev B. I. 2014. Interaction of neuromediator dopamine with the ionic channels of chara corallina cell plasmalemma. www.medline.ru 15 (67) : 834—846.)
- Мошков Д. А., Абрамова М. Б., Шубина В. С., Лавровская В. П., Павлик Л. Л., Лежнев Э. И. 2010. Влияние дофамина на жизнеспособность клеток ВНК-21. Бюл. эксперим. биол. мед. 149 (3) : 335—339. (Moshkov D. A., Abramova M. B., Shubina V. S., Lavrovskaya V. P., Pavlik L. L., Lezhnev E. I. 2010. Effect of dopamine on viability of ВНК-21 cells. Bull. Exp. Biol. Med. 149 (3) : 359—363.)

- Парнышкова Е. Ю., Лавровская В. П., Безгина Е. Н., Павлик Л. Л., Лежнев Э. И., Мошков Д. А. 2011. Морфологические основы влияния дофамина на жизнеспособность опухолевых клеток НЕР-2. Морфология. 140 (6) : 69—74. (Parnyshkova E. I., Lavrovskaya V. P., Bezgina E. N., Pavlik L. L., Lezhnev E. I., Moshkov D. A. 2011. Morphological bases of dopamine effect on NER-2 tumor cells viability. Morfologiya. 140 (6) : 69—74.)
- Рязанцева М. А., Можеева Г. Н., Казначеева Е. В. 2012. Кальциевая гипотеза болезни Альцгеймера. Усп. физиол. наук. 43 (4) : 59—72. (Ryazantseva M. A., Mozhayeva G. N., Kaznacheyeva E. V. 2012. Calcium hypothesis of Alzheimer disease. Usp. Fiziol. Nauk. 43 (4) : 59—72.)
- Akamine T., Nishimura Y., Ito K., Uji Y., Yamamoto T. 2002. Effects of haloperidol on K⁺ currents in acutely isolated rat retinal ganglion cells. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 43 : 1257—1261.
- Berestovsky G. N., Kataev A. A. 2005. Voltage-gated calcium and Ca²⁺-activated chloride channels and Ca²⁺ transients: voltage-clamp studies of perfused and intact cells of *Chara*. Eur. Biophys. J. 34 : 973—986.
- Biala G. 2000. Haloperidol-induced catalepsy is influenced by calcium channel antagonists. Acta Pol. Pharm. 57 : 233—237.
- Bishnoi M., Chopra K., Kulkarni S. K. 2008. Protective effect of L-type calcium channel blockers against haloperidol-induced orofacial dyskinesia: a behavioural, biochemical and neurochemical study. Neurochem. Res. 33 : 1869—1880.
- Drinyaev V. A., Mosin V. A., Kruglyak E. B., Sterlina T. S., Kataev A. A., Berestovsky G. N., Kokoz Y. M. 2001. Effect of avermectins on Ca²⁺-dependent Cl⁻ currents in plasmalemma of *Chara corallina* cells. J. Membr. Biol. 182 : 71—79.
- Duncan C. E., Schofield P. R., Weickert C. S. 2009. K_v channel interacting protein 3 expression and regulation by haloperidol in midbrain dopaminergic neurons. Brain Res. 1304 : 1—13.
- Ehling P., Bittner S., Budde T., Wiendl H., Meuth S. G. 2011. Ion channels in autoimmune neurodegeneration. FEBS Lett. 585 : 3836—3842.
- Flaim S. F., Brannan M. D., Swigart S. C., Gleason M. M., Muschek L. D. 1985. Neuroleptic drugs attenuate calcium influx and tension development in rabbit thoracic aorta: effects of pimozide, penfluridol, chlorpromazine, and haloperidol. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 82 : 1237—1241.
- Howes O. D., Kapur S. 2009. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III — the final common pathway. Schizophr. Bull. 35 : 549—562.
- Ito K., Nishimura Y., Uji Y., Yamamoto T. 1997. Haloperidol effects on Na⁺ current in acutely isolated rat retinal ganglion cells. Jpn. J. Ophthalmol. 41 : 221—225.
- Kataev A. A., Andreeva-Kovalevskaya Z. I., Solonin A. S., Ternovsky V. I. 2012. Bacillus cereus can attack the cell membranes of the alga *Chara corallina* by means of HlyII. Biochim. biophys. acta. 1818 (5) : 1235—1241.
- Kataev A. A., Zherelova O. M., Berestovsky G. N. 1984. Ca²⁺-induced activation and irreversible inactivation of chloride channels in the perfused plasmalemma of *Nitellopsis obtusa*. Gen. Physiol. Biophys. 3 : 447—462.
- Kim H. S., Yumkham S., Choi J. H., Kim E.-K., Kim Y. S., Ryu S. H., Suh P.-G. 2006. Haloperidol induces calcium ion influx via L-type calcium channels in hippocampal HN33 cells and renders the neurons more susceptible to oxidative stress. Mol. Cells. 22 : 51—57.
- Kozlovskii V. L., Prakh'e I. V., Kenunen O. G. 1996. The influence of calcium channel blockers on the effects of haloperidol and phenamine in mice and rats. Eksp. Klin. Farmakol. 59 : 12—15.
- Liang L., MacDonald K., Schwiebert E. M., Zeitlin P. L., Guggino W. B. 2009. Spiperone, identified through compound screening, activates calcium-dependent chloride secretion in the airway. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 296 : 131—141.
- Lunevsky V. Z., Zherelova O. M., Vostrikov I. Ya., Berestovsky G. N. 1983. Excitation of *Characeae* cell membranes as a result of activation of calcium and chloride channels. J. Membr. Biol. 72 : 43—58.
- Ogata N., Yoshii M., Narahashi T. 1989. Psychotropic drugs block voltage-gated ion channels in neuroblastoma cells. Brain Res. 476 : 140—144.
- Pineros M., Tester M. 1997. Calcium channels in higher plant cells: selectivity, regulation and pharmacology. J. Exp. Bot. 48 (Spec. No) : 551—577.
- Roshchina V. V. 2001. Neurotransmitters in plant life. Enfield, Plymouth: Sci. Publ. 283 p.
- Shimmen T., Yokota E. 2004. Cytoplasmic streaming in plants. Curr. Opin. Cell Biol. 16 : 68—72.
- Tarabová B., Nováková M., Lacinová L. 2009. Haloperidol moderately inhibits cardiovascular L-type calcium current. Gen. Physiol. Biophys. 28 : 249—259.
- Tester M. 1990. Plant ion channels: whole-cell and single channel studies. Tansley review № 21. New Phytologist. 114 : 305—340.
- Tominaga Y., Shimmen T., Tazawa M. 1983. Control of cytoplasmic streaming by extracellular Ca²⁺ in permeabilized *Nitella* cells. Protoplasma. 116 : 75—77.
- Verchot-Lubicz J., Goldstein R. E. 2010. Cytoplasmic streaming enables the distribution of molecules and vesicles in large plant cells. Protoplasma. 240 : 99—107.
- Ward J. M., Maser P., Schroeder J. I. 2009. Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. Ann. Rev. Physiol. 71 : 59—82.
- Williamson R. E., Ashley C. C. 1982. Free Ca²⁺ and cytoplasmic streaming in the alga *Chara*. Nature. 296 : 647—650.
- Yang S. B., Major F., Tietze L. F., Rupnik M. 2005. Block of delayed-rectifier potassium channels by reduced haloperidol and related compounds in mouse cortical neurons. J. Pharmacol. Exp. Ther. 315 : 352—362.
- Yang S.-B., Proks P., Ashcroft F. M., Rupnik M. 2004. Inhibition of ATP-sensitive potassium channels by haloperidol. Br. J. Pharmacol. 143 : 1—8.
- Zherelova O. M., Kataev A. A., Grishchenko V. M., Knyazeva E. L., Permyakov S. E., Permyakov E. A. 2009. Interaction of antitumor alpha-lactalbumin-oleic acid complexes with artificial and natural membranes. J. Bioenerg. Biomembr. 41 : 229—237.

Поступила 3 III 2016

HALOPERIDOL MODULATES IONIC TRANSPORT OF *CHARA CORALLINA* CELLSO. M. Zherelova,¹ A. A. Kataev,^{2,*} V. M. Grishchenko,³ R. S. Shtanchaev¹¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290;² Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290,and ³ Institute for Biological Instrumentation RAS, Pushchino, Moscow Region, 142290;

* e-mail: aakka1952@mail.ru

The effect of the haloperidol (HP), a dopamine D₂-receptor antagonist on the function of ionic channels of the electrically excitable plasma membrane and on the cytoskeleton of *Chara corallina* cells was investigated. Haloperidol was shown to block plasmalemmal Ca²⁺ channels. Apart from Ca²⁺ current reduction, the presence

of HP slowed the kinetics of both activation and inactivation of ionic channels. The influence of haloperidol on the membrane structure was reversible. After removal of the neuromodulator, both the amplitude and the kinetics of the current development were seen to be completely restored. HP had no effect on Ca^{2+} -activated chloride channels. Haloperidol inhibited cytoplasmic motion related to microfilamentary complex. Once haloperidol was removed from cell washing solution, cytoplasmic motion was restored. These results let us to assume that in the presence of HP the concentration of free Ca^{2+} in cytoplasm increases. Also it can be assumed that plasmalemmal Ca^{2+} -channels of *Ch. corallina* cells contain binding sites similar to dopamine receptors and their antagonists.

Key words: haloperidol, ionic channels, plasmalemma, cytoskeleton, *Charophytes*, *Chara corallina*.
