

на правах рукописи

ТИХОНОВА

Татьяна Борисовна

МЕХАНИЗМЫ БЛОКАДЫ КАНАЛОВ ГЛУТАМАТНЫХ ИОНОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ
AMPA И NMDA ТИПОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ КАТИОНАМИ

03.03.01 – Физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2010

Работа выполнена в лаборатории биофизики синаптических процессов Учреждения
Российской академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова РАН

Научный руководитель:

Член-корреспондент, доктор биологических наук, профессор РАН Магазаник Лев Гиршевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук Виктор Исаевич Говардовский

доктор биологических наук Елена Валентиновна Казначеева

Ведущее учреждение:

Учреждение Российской Академии Наук Институт Биофизики Клетки РАН

Защита диссертации состоится 13 апреля 2010 г. в 11 часов
на заседании диссертационного совета (Д 002.127.01) по защите диссертаций на соискание
ученой степени кандидата биологических наук
в Учреждении Российской академии наук Институте эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова РАН по адресу:

Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Учреждения Российской
академии наук Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН
(Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44).

Автореферат разослан ____ марта 2010 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук, профессор

М.Н. Маслова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Глутамат является основным возбуждающим медиатором в центральной нервной системе позвоночных (Collingridge & Singer, 1990; Nakanishi, 1992). После высвобождения из пресинаптических терминалей глутамат активирует три типа ионотропных рецепторов: NMDA, AMPA и каинатные. Такая классификация основана на избирательной чувствительности к соответствующим агонистам, однако эти типы отличаются и по многим другим фармакологическим и биохимическим свойствам; в то же время общая организация каналов этих типов рецепторов предполагается сходной (Dingledine, 1999).

Изменение экспрессии ионотропных рецепторов глутамата является одним из механизмов, регулирующих эффективность синаптической передачи, что лежит в основе процессов памяти и обучения (Bliss & Collingridge, 1993). Нарушение нормальной экспрессии глутаматных ионотропных рецепторов наблюдается при различных патологиях нервной системы: AMPA-рецепторов - при умственной отсталости, вызванной синдромом ломкой X-хромосомы, каинатных рецепторов - при болезни Хантингтона. Изменение субъединичного состава AMPA-рецепторов при ишемии приводит к увеличению входа кальция в клетку, вызывающего ее гибель (Doble, 1999; Lee et al., 1999; Bowie, 2008). Некоторые заболевания сопровождаются повышенным выбросом глутамата, поэтому вещества, способные блокировать глутаматные рецепторы, рассматриваются как нейропротективные агенты. Так, например, блокатор каналов NMDA-рецепторов – мемантин - активно используется в клинической практике при лечении болезни Альцгеймера (Lipton, 2004).

Вовлеченность глутаматных рецепторов в такое разнообразие физиологически значимых процессов обуславливает актуальность изучения их структуры и способов модуляции. Одним из способов ингибирования является блокада каналов. Учитывая, что каналоблокаторами могут выступать соединения со сравнительно простой и, следовательно, предсказуемой структурой, данные о механизме их действия используются и для изучения структурных детерминант самих каналов (Sobolevsky et al., 1999; Bolshakov et al., 2000; Bolshakov et al, 2003; Tikhonov, 2007). Изучению механизмов блокады каналов NMDA-рецепторов посвящено достаточно большое число работ (Sobolevsky et al., 1999; Соболевский и Ходоров, 2000; Bolshakov et al, 2003), в то время как анализ механизмов блокады каналов AMPA-рецепторов носит фрагментарный характер. В настоящее время нет

достаточных данных для сравнения механизмов блокады каналов AMPA- и NMDA-рецепторов.

Цель исследования: изучение механизмов блокады каналов Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов органическими катионами (производными адамантана, фенилциклогексила, дифенила) и сравнение механизмов действия блокаторов этого класса на каналы NMDA- и Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов.

Задачи исследования:

1. Провести сравнение особенностей механизмов блокады каналов NMDA- и AMPA-рецепторов на примере дикатионного производного фенилциклогексила ИЭМ-1925.
2. Исследовать потенциалозависимость действия дикатионных органических блокаторов (производных адамантана, фенилциклогексила, дифенила) на каналы AMPA-рецепторов, возможность существования «ловушки» блокаторов этого класса в закрытых каналах AMPA-рецепторов и стабильность этого состояния.
3. Проверить возможность действия блокаторов на каналы AMPA-рецепторов изнутри клетки.
4. Проверить влияние концентрации внеклеточного натрия на параметры блокады каналов AMPA-рецепторов.

Научная новизна. В работе всесторонне проанализирован механизм действия органических блокаторов - дикатионных производных адамантана, фенилциклогексила и др. гидрофобных группировок - на каналы Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов. Впервые показано, что даже сравнительно крупные блокаторы, содержащие дифенильную или фенилциклогексильную группировку, размеры которых превышают 10 \AA , способны проникать внутрь клетки через открытые каналы AMPA-рецепторов. Впервые показано, что блокатор, оставшийся в канале AMPA-рецепторов после его закрытия, с течением времени покидает канал, проникая внутрь клетки. Постоянное присутствие блокатора во внеклеточном растворе не восполняет уход блокатора из закрытых каналов, что может приводить к зависимости блокады от частоты стимуляции *in vivo*. Впервые показано, что сайт связывания в канале доступен для внеклеточных блокаторов этого класса только после активации AMPA-рецептора, а для внутриклеточных - и в открытых, и в закрытых каналах. Проникающие ионы внеклеточного натрия ослабляют блокаду каналов AMPA-рецепторов этими соединениями, по-видимому, за счет конкуренции за сайт связывания.

Кроме того, на примере дикатионного производного фенилциклогексила ИЭМ-1925 впервые было проведено сравнение механизмов блокады каналов NMDA- и Ca^{2+} -

проницаемых AMPA-рецепторов. Показано, что механизмы блокады каналов этих типов рецепторов различны. Так, проникновения блокатора внутрь клетки ни из открытых, ни из закрытых каналов NMDA-рецепторов не наблюдалось. Потенциалозависимость эффекта «ловушки» в каналах NMDA-рецепторов указывает на существование двух сайтов связывания для ИЭМ-1925 (Bolshakov et al., 2003). Оснований для того, чтобы предположить существование второго сайта в каналах AMPA-рецепторов, не выявлено.

Теоретическая и практическая значимость работы. Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что структура воротного механизма каналов Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов расположена выше сайта связывания дикатионных блокаторов, производных адамантана, фенилциклогексила, дифенила, и при закрытии канала стерического перекрывания в области селективного фильтра не происходит. Вопрос о локализации воротного механизма AMPA-рецепторов широко обсуждается в литературе (Qian & Johnson, 2002; Kuner et al., 2003; Wollmuth & Sobolevsky, 2004) и имеет значение для фундаментального исследования строения и функционирования ионных каналов.

Помимо новой информации о структуре канала и воротного механизма, полученные результаты важны для исследований, нацеленных на создание новых нейропротективных средств. Различия в потенциалозависимости и в скоростях проникновения внутрь клетки могут определять эффекты, наблюдаемые в экспериментах с этими блокаторами на более сложных системах: в срезах мозга и в условиях целого организма. В частности, обнаруженный в работе эффект «самоотмыва» должен приводить к зависимости угнетения глутаматергической синаптической передачи от частоты стимуляции. Можно предположить, что в результате этого более выраженная блокада возбуждения и губительного входа ионов Ca^{2+} внутрь клетки будет достигаться при избыточной активации Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов в условиях патологии, и в меньшей степени затрагивать нормальную синаптическую передачу.

Положения, выносимые на защиту:

1. Механизмы блокады дикатионными производными адамантана, фенилциклогексила, дифенила каналов NMDA- и Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов отличны.
2. Дикатионные производные адамантана, фенилциклогексила, дифенила могут проникать внутрь клетки как через открытые, так и через закрытые каналы Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов.
3. Сайт связывания блокаторов расположен ниже воротного механизма канала Ca^{2+} -проницаемого AMPA-рецептора.

4. Молекулы блокаторов конкурируют за сайт связывания с проникающими ионами натрия в каналах Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов.

Апробация работы. Результаты исследования доложены и обсуждены на 7-ой, 8-ой и 10-ой Всероссийских медико-биологических конференциях молодых исследователей «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2004 г., 2005 г. и 2007 г.), межвузовской научно-технической конференции «XXXII неделя науки СПбГПУ» (Санкт-Петербург, 2004), политехническом симпозиуме «Молодые ученые – промышленности северо-западного региона» (Санкт-Петербург, 2004), XIX и XX Съездах физиологического общества им. И.П. Павлова (Екатеринбург, 2004, Москва, 2007), 11-ой Пущинской международной школе-конференции «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2007), научной конференции «Ионные каналы: структура и функции» (Санкт-Петербург, 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 7 статей в реферируемых журналах и тезисы 9 докладов.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 140 страницах и состоит из введения, обзора литературы, обобщения обзора литературы, характеристики материалов и методов исследования, результатов исследования, обсуждения результатов, выводов, заключения, списка литературы, включающего 231 источник. Диссертация иллюстрирована 4 таблицами и 40 рисунками.

Материалы и методы исследования Крыс линии Вистар (возраст 13 – 18 дней) декапитировали под уретановым наркозом. Мозг быстро извлекали и охлаждали до 2 – 4°C. Затем на вибраторе «Campden Instruments» (Великобритания) приготавливали поперечные срезы стриатума и гиппокампа толщиной 250 мкм, которые сохраняли в растворе (мМ): NaCl – 124, KCl – 5, CaCl_2 – 1.3, MgCl_2 – 2, NaHCO_3 – 26, NaH_2PO_4 – 1.24, D-глюкоза – 10. Раствор аэрировали карбогеном (95% O_2 , 5% CO_2), pH 7.4–7.5, при 24–26°C. Нейроны, экспрессирующие определенный вид глутаматных рецепторов, изолировали из срезов методом вибродиссоциации (Vorobjev, 1991). Для исследования NMDA-рецепторов выбирали пирамидные нейроны поля CA1 гиппокампа, а для исследования Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов – гигантские интернейроны стриатума. Для идентификации нейронов использовали морфологический и фармакологический критерии.

Регистрацию трансмембранных токов осуществляли методом локальной фиксации потенциала. Микропипетку заполняли раствором (мМ): CsF – 100, CsCl – 40, NaCl – 5, CaCl_2 – 0.5, EGTA – 5, HEPES – 10 (pH доводили до 7.2 с помощью CsOH). Внеклеточный раствор содержал (мМ): NaCl – 143, KCl – 5, CaCl_2 – 2.5, D-глюкоза – 18, HEPES – 10 (pH доводили

до 7.4, добавляя HCl). При исследовании AMPA-рецепторов во внеклеточный раствор добавляли MgCl₂ в концентрации 2 мМ. NMDA-рецепторы активировали аппликацией NMDA (40 мкМ) в присутствии глицина (10 мкМ), AMPA-рецепторы – каинатом (100 мкМ). Для аппликации использовалась система быстрой замены растворов (Vorobjev et al., 1996) или 8-канальная система замены растворов с электромагнитными клапанами и шаговым двигателем RSC-200 «BioLogic» (Франция). Время смены растворов составляет для этих систем примерно 10-15 мс. Регистрацию проводили в конфигурации “целая клетка” с помощью усилителя ЕРС-8 «НЕКА Elektronik» (Германия). Контроль мембранного потенциала, управление системой аппликации, регистрацию и анализ данных осуществляли с помощью компьютера. Использовались реактивы фирм «Sigma» (США), «Tocris» (США). Использованные блокаторы были синтезированы в Институте Экспериментальной Медицины РАМН. Статистическая обработка проводилась с использованием программы Microcal(TM) Origin 6.0. Все результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение в серии как минимум четырех экспериментов.

Потенциалозависимость действия блокаторов анализировалась с помощью модели Вудхол (Woodhull, 1973) для непроникающих (1) и проникающих (2) блокаторов:

$$B = \frac{100\%}{1 + \frac{K_D}{C} \exp\left(\frac{z\delta_m VF}{RT}\right)} \quad (1)$$

$$B = \frac{100\%}{1 + \frac{K_D}{C} \exp\left(\frac{z\delta_m VF}{RT}\right) + \frac{K_p}{C} \exp\left(\frac{-z\delta_p VF}{RT}\right)} \quad (2)$$

где В – процент равновесной блокады, K_D и K_p – константа диссоциации и константа проникновения блокатора внутрь клетки; δ_m и δ_p – параметр потенциалозависимости, отражающий глубину залегания сайта связывания в мембранном поле канала, и параметр потенциалозависимости отмыва блокатора внутрь клетки, соответственно. С – концентрация блокатора. R, T и F имеют свои стандартные значения.

Потенциалозависимость отмыва из закрытых каналов определялась по формуле (3)

$$T = 100 \exp\left(-k_{-c} t \exp\left(\frac{-z\delta_{-c} VF}{RT}\right)\right) \quad (3)$$

Где T - процент «ловушки», k_{-c} - константа скорости отмыва из закрытых каналов при 0 мВ, δ_{-c} - параметр, характеризующий потенциалозависимость отмыва из закрытых каналов, t - межстимульный интервал, V – мембранный потенциал, z – заряд молекулы блокатора.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнение механизмов блокады каналов NMDA- и Ca²⁺-проницаемых AMPA-рецепторов. Для сравнения механизмов блокады каналов AMPA- и NMDA-рецепторов было выбрано дикатионное производное фенилциклогексила ИЭМ-1925. При потенциале на мембране -80 мВ блокирующая активность и кинетика отмыва ИЭМ-1925 в присутствии агониста сходны на этих подтипах рецепторов (Bolshakov et al., 2000; Tikhonov et al., 2002), поэтому оно является удобным инструментом для такого сравнения.

Проведенные исследования показали, что степень угнетения токов через открытые каналы AMPA- и NMDA-рецепторов, вызываемая 3 мкМ ИЭМ-1925, зависела от потенциала на мембране (рис. 1), что типично для заряженных молекул, связывающихся в канале. В случае NMDA-рецепторов потенциалозависимость действия ИЭМ-1925 согласовывалась с простейшей теорией блокады каналов: блокада монотонно нарастала при гиперполяризации, достигая 100% (рис.1); кинетика отмыва ИЭМ-1925 монотонно замедлялась при гиперполяризации (данные не показаны). В случае AMPA-рецепторов блокада тоже возрастала в диапазоне потенциалов от 0 до -100 мВ, однако при дальнейшей гиперполяризации блокада выходила на плато (около 80% блока). Кинетика отмыва блокатора из открытых каналов при этом начинала ускоряться (данные не показаны).

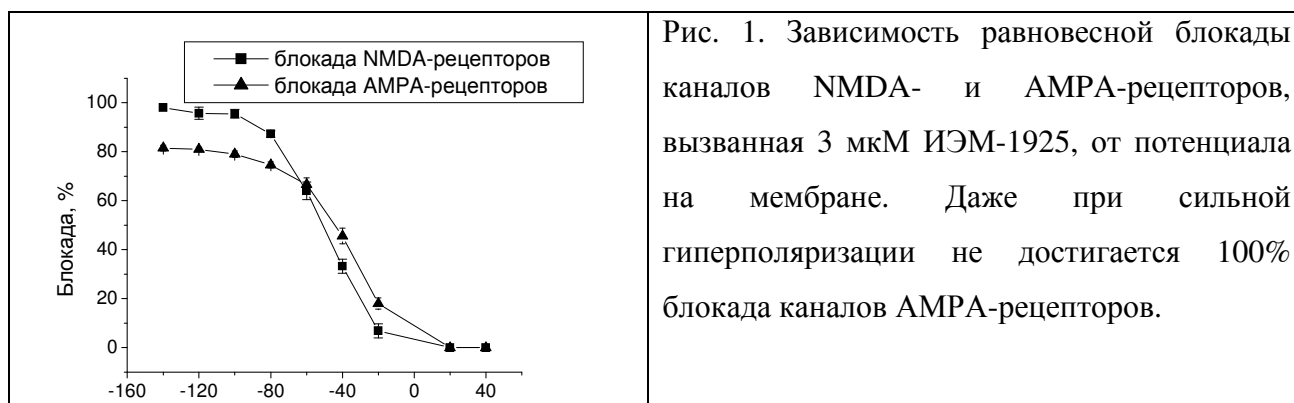


Рис. 1. Зависимость равновесной блокады каналов NMDA- и AMPA-рецепторов, вызванная 3 мкМ ИЭМ-1925, от потенциала на мембране. Даже при сильной гиперполяризации не достигается 100% блокада каналов AMPA-рецепторов.

Вторая серия экспериментов была посвящена исследованию взаимодействия блокатора с закрытыми каналами. Внеклеточная аппликация даже высоких концентраций (1 мМ) ИЭМ-1925 не вызывала блокады закрытых каналов ни в случае AMPA-, ни в случае NMDA-рецепторов (данные не показаны), т.е. молекула блокатора может связываться, только когда канал открыт. При этом ИЭМ-1925 был способен оставаться в каналах как AMPA-, так и NMDA-рецепторов после их закрытия (эффект «ловушки»). Эффект «ловушки» исследовался с помощью протокола, проиллюстрированного на рисунке 2. Согласно этому протоколу

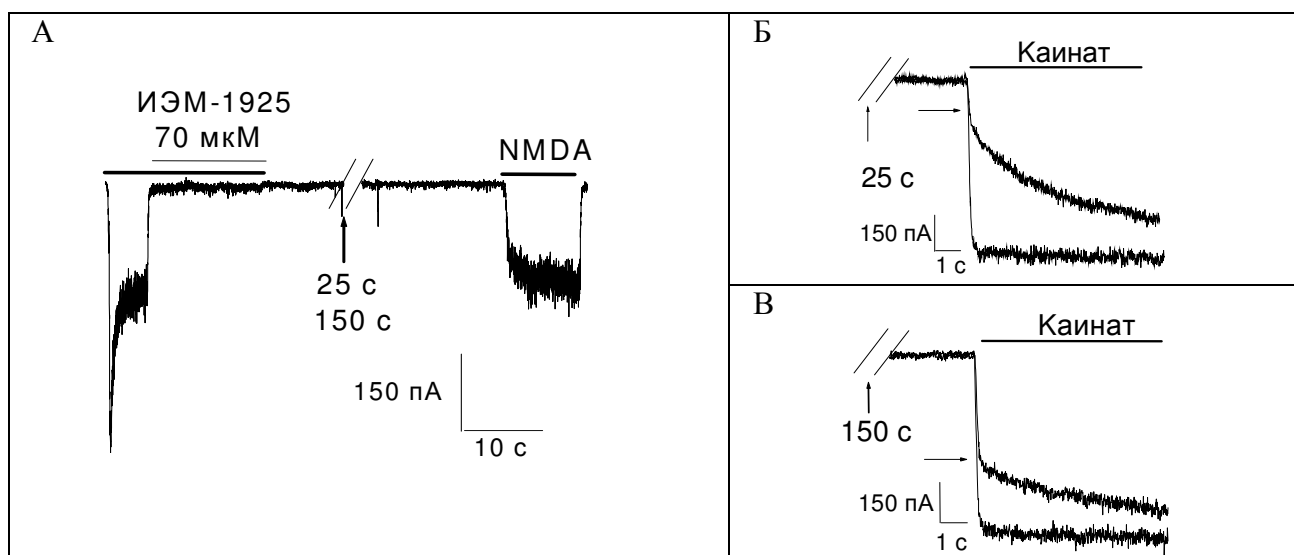


Рис. 2. ИЭМ-1925 вымывается из «ловушки» в закрытых каналах в случае AMPA-, но не в случае NMDA-рецепторов. А «Ловушка» в каналах NMDA-рецепторов. Проиллюстрирован экспериментальный протокол. Тестовый ответ на агонист регистрировался через 25 или 150 с после удаления агониста и блокатора из раствора. Тестовый ответ отличается от контрольного благодаря тому, что каналы после закрытия остались заблокированными (подробнее см. в тексте). В случае NMDA-рецепторов формы тестовых ответов после 25- и 150-секундного интервала были одинаковыми, свидетельствуя о том, что вымывания ИЭМ-1925 из закрытых каналов NMDA-рецепторов не наблюдалось. Б-В «Ловушка» в каналах AMPA-рецепторов. Приведено наложение контрольного и тестового ответов на агонист через 25 (Б) и 150 с (В). Стрелками обозначены точки излома тестовых ответов. Уменьшение амплитуды медленной фазы нарастания тестового ответа при большем временном интервале свидетельствует о том, что из каналов AMPA-рецепторов в отсутствие агониста происходит постепенное вымывание блокатора.

сначала регистрировался контрольный ответ на агонист, затем следовала коаппликация агониста с блокатором для развития блокады открытых каналов. После окончания этой аппликации каналы закрывались, и молекулы блокатора могли остаться внутри поры канала. Через фиксированный промежуток времени (межстимульный интервал) регистрировался тестовый ответ на агонист. Нарастание тестового ответа было двухфазным: быстрая фаза отражала активацию агонистом неблокированных рецепторов, а медленная – отмыв блокатора после открытия каналов. Таким образом, относительная амплитуда медленной фазы нарастания тестового ответа соответствовала доле рецепторов, оставшихся заблокированными, т.е. проценту «ловушки». При увеличении межстимульного интервала

было обнаружено, что в случае AMPA-рецепторов блокатор постепенно вымывался из закрытых каналов (рис. 2). В случае NMDA-рецепторов такого вымывания не наблюдалось.

Исследование потенциалозависимости эффекта «ловушки» показало, что в соответствии с данными, полученными ранее (Bolshakov et al., 2003), процент «ловушки», измеренный после 25-секундного межстимульного интервала в случае NMDA-рецепторов уменьшался при деполяризации: при -80 мВ он составлял $55 \pm 6\%$ (n=6), а при -40 мВ - $26 \pm 9\%$ (n=7). Это, по-видимому, объясняется существованием двух сайтов связывания для молекулы блокатора в канале NMDA-рецептора. В случае AMPA-рецепторов процент «ловушки» при 25-секундном межстимульном интервале от потенциала не зависел.

Таким образом, мы показали, что характеристики механизма блокады каналов NMDA и Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов дикатионным производным фенилциклогексила ИЭМ-1925 (потенциалозависимость блокады, потенциалозависимость и временная зависимость эффекта «ловушки») не идентичны.

Исследование механизма блокады каналов Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов производными адамантана, фенилциклогексила и дифенила.

При сравнении особенностей механизмов действия дикатионного производного фенилциклогексила ИЭМ-1925 на каналы NMDA- и Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов был обнаружен ряд особенностей, которые были проанализированы более подробно. Для этого был расширен круг блокаторов (рис 3).

Для анализа потенциалозависимости равновесной блокады оценивалось угнетение стационарных токов при действии одной концентрации блокатора в диапазоне потенциалов от -140 до +40 мВ. Для каждого блокатора выбиралась концентрация, вызывающая 20-30% блок при потенциале -40 мВ. Такой выбор равноэффективных концентраций позволил сравнить потенциалозависимость блокаторов с

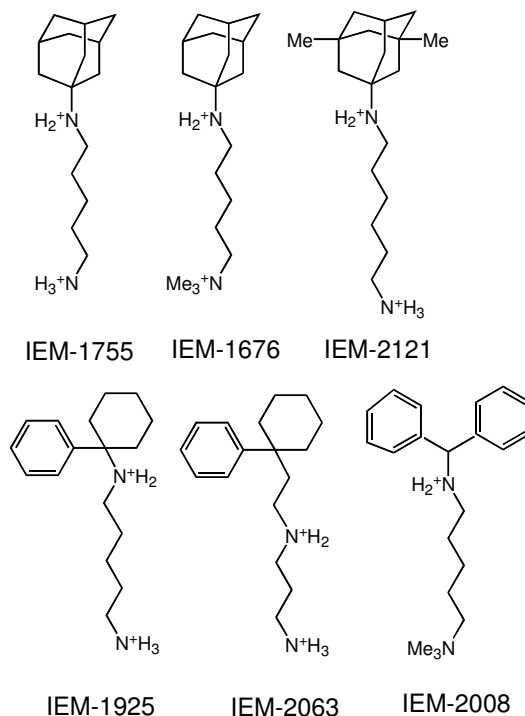


Рис. 3. Структура блокаторов

различными активностями. Результаты представлены на рисунке 4. При положительных потенциалах ни один из шести исследованных блокаторов не вызывал угнетения токов. Это означает, что потенциалонезависимый компонент блокады отсутствует или очень мал. Для всех шести исследованных блокаторов потенциалозависимость блокады не соответствовала классическим представлениям, согласно которым блокада должна монотонно нарастать при гиперполяризации, достигая 100%. Блокада производными адамантана (ИЭМ-1676 и ИЭМ-1755) возрастала в диапазоне потенциалов от 0 до -60 мВ, а при дальнейшей гиперполяризации уменьшалась. При действии производных фенилциклогексила (ИЭМ-1925 и ИЭМ-2063) и диметиладамантана (ИЭМ-2121) блокада увеличивалась с гиперполяризацией, однако при -100 мВ достигала насыщения на уровне 65 – 80% блока, и при дальнейшем уменьшении потенциала не возрастала. В ряде экспериментов наблюдалась тенденция к уменьшению блока, однако эти изменения не были статистически достоверны. Блокада производным дифенила ИЭМ-2008 обладала сходной потенциалозависимостью, но

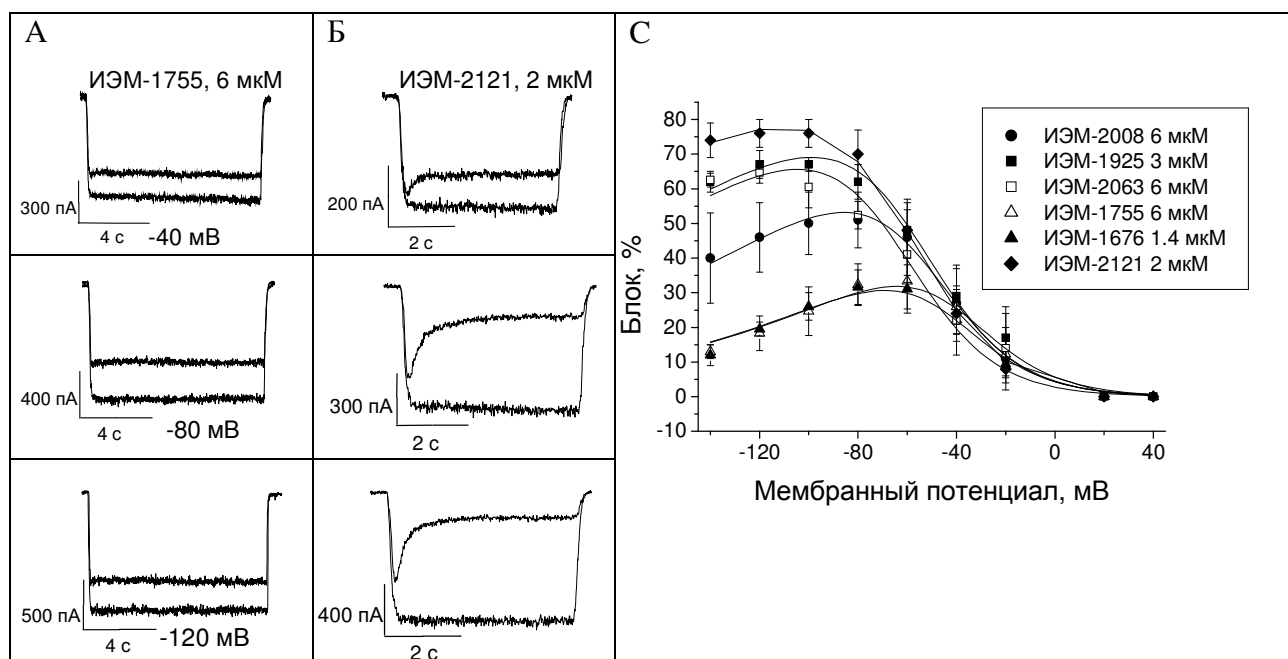


Рис. 4 Потенциалозависимость блокады каналов AMPA-рецепторов дикаationными соединениями. А и Б – примеры ответов на 100 мкМ каината в отсутствие/присутствии блокаторов при -40, -80 и -120 мВ. С – усредненные кривые потенциалозависимости блокады. При положительных потенциалах блокирующий эффект пренебрежимо мал. При гиперполяризации наблюдается либо насыщение блокады на уровне менее 100%, либо постепенное уменьшение блокады. Кривые аппроксимации получены при использовании формулы (2), где $z=2$, $\delta_m=0.7$, $\delta_p=0.15$

достигала максимума при меньших по абсолютной величине потенциалах, и тенденция к уменьшению блокады при сильной гиперполяризации была более очевидна. Такая потенциалозависимость не может быть описана уравнением (1) (смотри материалы и методы), применяемой при классической блокаде. Однако приведенные данные успешно аппроксимировались уравнением (2), описывающим блокаду с возможностью проникновения блокатора внутрь клетки, увеличивающейся при сильной гиперполяризации. Причем, все кривые могли быть аппроксимированы при одних и тех же параметрах $\delta_m=0.70$ и $\delta_p=0.15$, задающими положение энергетического минимума (сайта связывания) и относительного положения энергетических барьеров для блокатора в электрическом поле канала, соответственно. Таким образом, различия кривых потенциалозависимости блокады, вызываемой исследованными соединениями, могут определяться изменением только констант связывания и констант проникновения внутрь клетки при неизменных значениях δ_m и δ_p .

Кинетика отмыва блокаторов в присутствии каината анализировалась при трех значениях потенциала на мембране: -40, -80, -120 мВ. Если блокатор не может проникать через канал внутрь клетки, то кинетика его отмыва должна замедляться с гиперполяризацией. Однако в случае ИЭМ-1925 отмыв переставал замедляться при гиперполяризации от -80 до -120 мВ, отмыв ИЭМ-1676 и ИЭМ-2008 ускорялся с гиперполяризацией, а кинетика отмыва ИЭМ-2121 и ИЭМ-2063 обладала немонотонной потенциалозависимостью (данные не показаны). Полученные результаты исследования кинетики отмыва дикатионных блокаторов согласовались с возможностью проникновения блокаторов внутрь клетки после связывания внутри поры канала.

Таким образом, совокупность данных о потенциалозависимости кинетики и потенциалозависимости равновесной блокады свидетельствует о том, что дикатионные блокаторы, производные адамантана, фенилциклогексила, дифенила, способны проникать внутрь клетки через открытые каналы Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов.

Исследование эффекта «ловушки» в закрытых каналах AMPA-рецепторов, проводившееся с помощью протокола, приведенного на рисунке 2, показало, что все исследованные соединения были способны оставаться в каналах после их закрытия. Для исследования кинетики вымывания блокаторов варьировался межстимульный интервал, т.е. время между окончанием коаппликации блокатора с агонистом, приводящее к «ловушке» блокатора внутри закрытого канала, и следующей, тестирующей, аппликацией агониста. Концентрации блокаторов были следующие: ИЭМ-1925, ИЭМ-1676, ИЭМ-2121 – 70 мкМ,

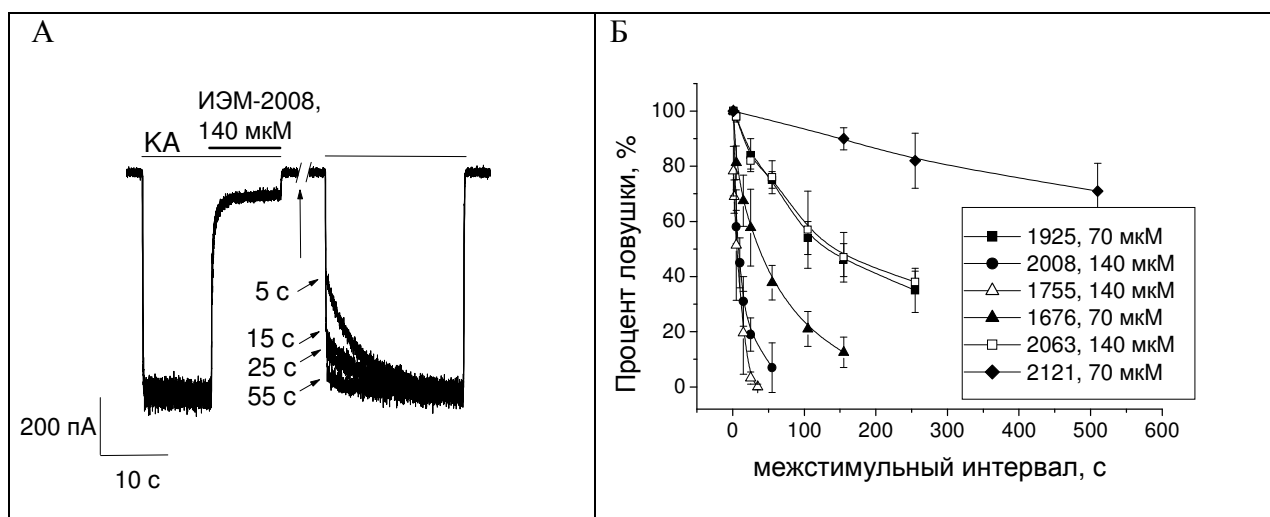


Рис. 5. Зависимость «ловушки» блокаторов в каналах AMPA-рецепторов от длительности межстимульного интервала. А – пример наложения регистрируемых токов для ИЭМ-2008. Тестовая аппликация каината (100 мкМ) производилась через 5 – 55 с после удаления блокатора и каината из раствора. Процент «ловушки» уменьшался с увеличением межстимульного интервала. Б – усредненные зависимости процента «ловушки» от длительности межстимульного интервала. Несмотря на различные скорости уменьшения процента «ловушки», этот эффект был характерен для всех исследованных блокаторов.

ИЭМ-2008, ИЭМ-1755, ИЭМ-2063 – 140 мкМ. При коротком межстимульном интервале (0.5 с) доля каналов, в которых остался блокатор, была близка к 100% для всех соединений. При увеличении межстимульного интервала для всех шести блокаторов процент «ловушки» экспоненциально уменьшался.

Для исследования потенциалозависимости вымывания блокатора из закрытых каналов AMPA-рецепторов протокол для изучения «ловушки» был модифицирован, как показано на рисунке 6. Мембранный потенциал скачкообразно меняли только на время межстимульного интервала, т.е. того времени, когда каналы находились в закрытом состоянии. Контрольный и тестовый ответ на агонист регистрировали при потенциале -80 мВ. Для ИЭМ-1925 и ИЭМ-2063 был выбран межстимульный интервал 150 с, для ИЭМ-2008 – 10 с, ИЭМ-1755 – 5 с, для ИЭМ-1676 – 20 с, для ИЭМ-2121 – 250 с. Зависимость процента «ловушки» от потенциала оценивалась при помощи формулы (3). Полученные данные показаны на рисунке 6. Для всех соединений скорость отмыва в отсутствие агониста монотонно увеличивалась с гиперполяризацией, свидетельствуя о том, что вымывание осуществляется за счет ухода блокатора внутрь клетки. Параметр потенциалозависимости δ_{-c} был сходным для всех блокаторов: 0.12 - 0.18.

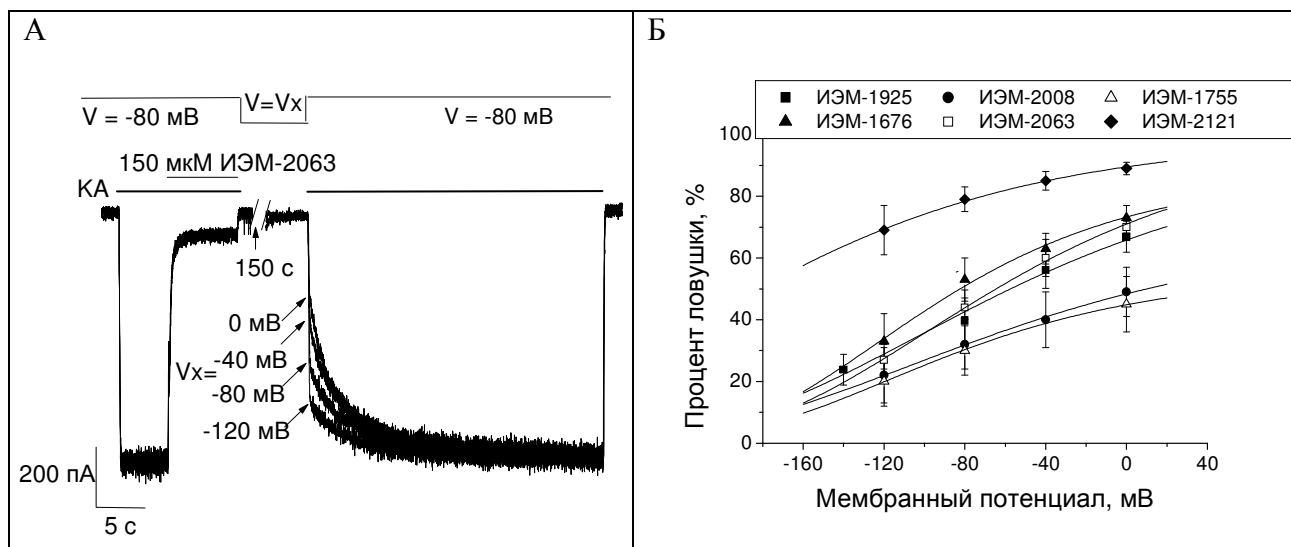


Рис. 6. Потенциалозависимость ухода блокаторов из «ловушки» в каналах AMPA-рецепторов. А – пример наложения регистрируемых токов для ИЭМ-2063 иллюстрирует используемый протокол. Контрольную и тестирующую аппликации каината и блокаду каналов осуществляли при мембранном потенциале -80 мВ. На время межстимульного интервала потенциал скачкообразно меняли на определенную величину. Процент «ловушки» уменьшался при гиперполяризации. Б – усредненные зависимости ухода из «ловушки» от потенциала. Данные аппроксимированы при помощи уравнения (3). Несмотря на различия в скоростях ухода блокаторов из «ловушки» все они проявляют сходную потенциалозависимость.

Таким образом, молекулы блокаторов постепенно покидали закрытые каналы Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов. Потенциалозависимость этого процесса указывает на то, что вымывание осуществляется во внутриклеточную среду. Данный эффект позволяет сделать вывод о том, что активационные ворота канала расположены выше сайта связывания блокатора.

«Самоотмыв» блокаторов из каналов AMPA-рецепторов.

При внеклеточной аппликации блокаторы не достигают сайта связывания внутри канала в отсутствие агониста. С другой стороны, блокатор, находящийся в «ловушке» внутри канала, в отсутствие агониста способен покинуть канал AMPA-рецептора. Комбинация этих двух эффектов была продемонстрирована в протоколе, предусматривающем постоянное присутствие 5 мкМ ИЭМ-1925 или 15 мкМ ИЭМ-1676 во внеклеточной среде (рис. 7). Во время первой коаппликации агониста с блокатором регистрируется развитие блокады. После

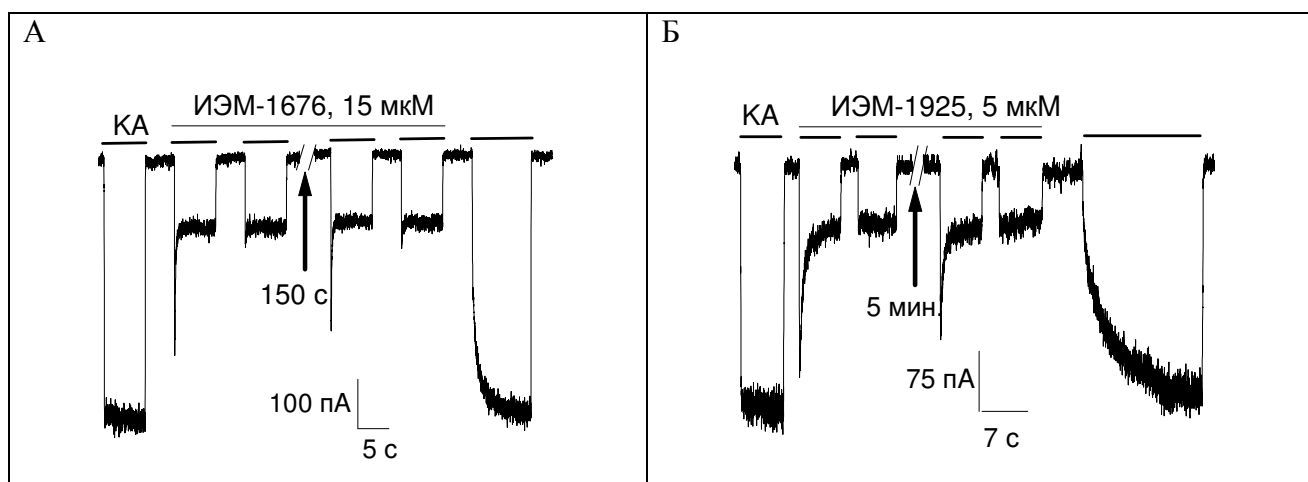


Рис. 7. «Самоотмыв» из каналов AMPA-рецепторов в постоянном присутствии блокатора в окружающем растворе. Примеры «самоотмыва» ИЭМ-1676 (А) и ИЭМ-1925 (Б). (Пояснения смотри в тексте).

короткого межстимульного интервала развития блокады нет благодаря «ловушке» блокатора в закрытых каналах. Однако за длительный межстимульный интервал молекулы блокатора покидают закрытые каналы, в результате чего при следующей коапликации блокатора с агонистом снова регистрируется развитие блокады.

*Таким образом, вымывание из закрытых каналов AMPA-рецепторов наблюдается даже в постоянном присутствии блокатора во внешнем растворе. Данный эффект может приводить к зависимости блокады соединениями этого класса от частоты стимуляции *in vivo*.*

Блокада каналов AMPA рецепторов изнутри клетки.

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что все исследованные блокаторы способны проникать внутрь клетки через каналы AMPA-рецепторов. Если это так, то можно предположить и возможность обратного эффекта – блокады каналов AMPA-рецепторов изнутри.

Для исследования возможности блокады открытых каналов AMPA-рецепторов изнутри регистрировалась зависимость стационарного тока, вызываемого каинатом (100 мкМ), от поддерживаемого на мембране потенциала (вольт-амперная характеристика). Как показано на рисунке 8, добавление блокатора ИЭМ-1676 в раствор для заполнения пипетки приводило к концентрационно- и потенциалозависимой блокаде открытых каналов AMPA-рецепторов. В контроле зависимость имела линейный характер. 1 мМ ИЭМ-1676 не вызывал

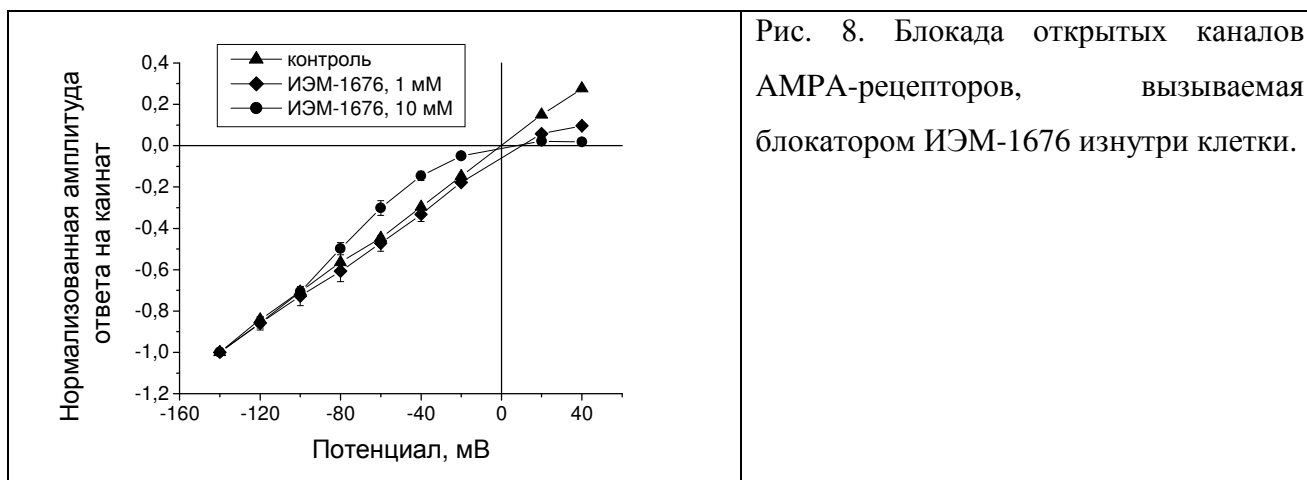


Рис. 8. Блокада открытых каналов AMPA-рецепторов, вызываемая блокатором ИЭМ-1676 изнутри клетки.

изменений при отрицательных потенциалах, однако приводил к появлению входящего выпрямления. Увеличение концентрации ИЭМ-1676 до 10 мМ приводило к отклонению кривой от контрольной и при отрицательных потенциалах.

ИЭМ-1676 блокировал изнутри и закрытые каналы AMPA-рецепторов (рис. 9). Потенциалозависимость блокады как открытых, так и закрытых каналов AMPA-рецепторов,

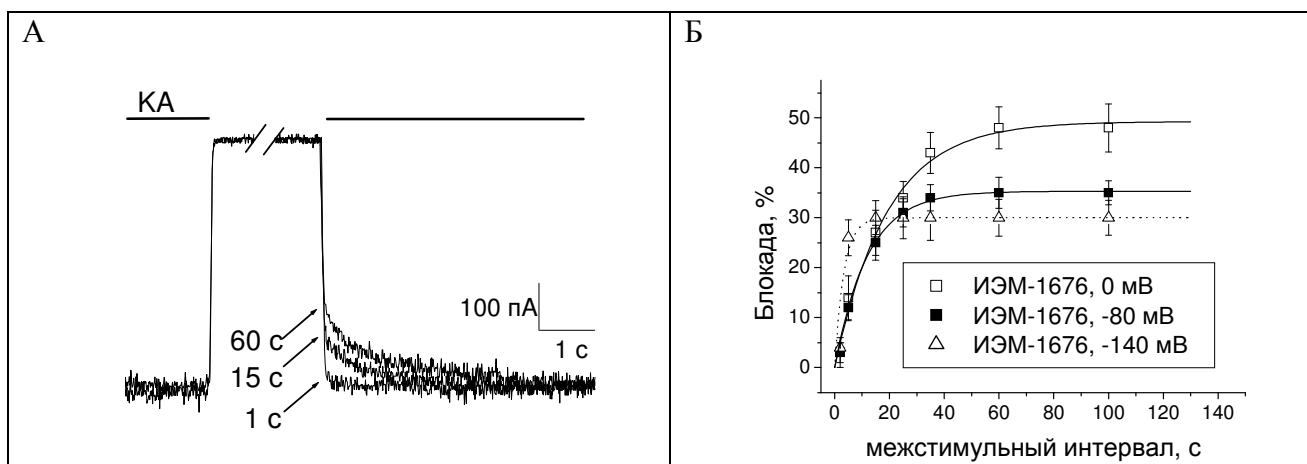


Рис. 9. Блокада закрытых каналов внутриклеточным ИЭМ-1676 (0.5 мМ). А – экспериментальный протокол. Медленная фаза нарастания ответа на каинат отражает блок закрытых каналов. Относительная амплитуда медленной фазы увеличивалась с увеличением промежутка времени между аппликациями каината (межстимульного интервала), отражая кинетику развития блока закрытых каналов. Б – потенциалозависимость блокады закрытых каналов изнутри. Деполяризация приводила к более выраженному блоку и к более медленному его развитию. При -140 мВ блокада достигала равновесного значения в течение 10 с.

вызываемой внутриклеточной аппликацией ИЭМ-1676, согласовывалась с исходным предположением о том, что блокатор может достигать того же сайта связывания в канале, что и при блокаде, вызываемой внеклеточной аппликацией блокатора. Этот вывод подтверждает и ряд других данных:

- 1) Согласованность потенциалозависимости блокады открытых каналов, вызываемой вне- и внутриклеточным блокатором.
- 2) Конкурентноподобные отношения при действии вне- и внутриклеточного блокатора.
- 3) Корреляция между чувствительностью к внутри- и внеклеточному блокатору. Для Ca^{2+} -непроницаемых AMPA-рецепторов, нечувствительных к внеклеточной аппликации блокаторов этого класса, не наблюдалось действия блокаторов и изнутри клетки.
- 4) Сходство кинетики отмыва блокатора, оказавшегося внутри поры канала в результате блокады закрытого канала изнутри и в результате «ловушки» внеклеточного блокатора.

Таким образом, дикатионные блокаторы способны блокировать как открытые, так и закрытые каналы AMPA-рецепторов изнутри клетки. Причем вне- и внутриклеточный блокатор взаимодействуют с одним и тем же сайтом связывания в канале.

Влияние концентрации внеклеточного натрия на параметры блокады каналов AMPA-рецепторов

Фактором, существенно влияющим на активность каналоблокаторов, является их взаимодействие с токонесущими ионами. В данной части работы исследовалось влияние снижения концентрации внеклеточного Na^+ со 155 до 65 мМ на блокаду Ca^{2+} -проницаемых каналов AMPA-рецепторов дикатионным производным фенилциклогексила ИЭМ-1925. Изменение осмолярности компенсировались добавлением сахарозы.

Характер кривой потенциалозависимости равновесной блокады, вызываемой 1 мкМ

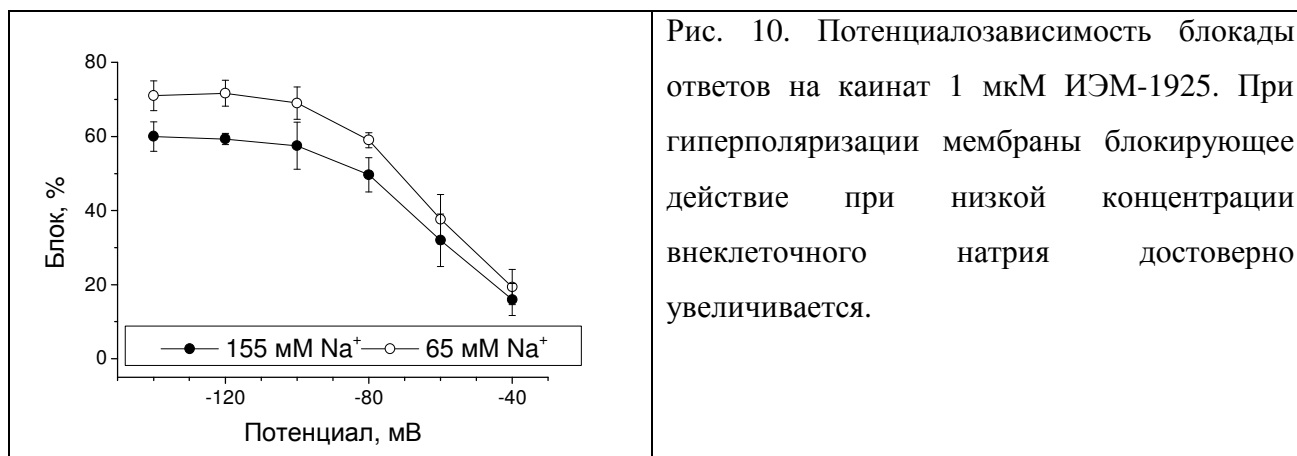


Рис. 10. Потенциалозависимость блокады ответов на каинат 1 мкМ ИЭМ-1925. При гиперполяризации мембраны блокирующее действие при низкой концентрации внеклеточного натрия достоверно увеличивается.

ИЭМ-1925, при снижении концентрации внеклеточного натрия качественно не менялся (рис. 10): блокада нарастала при гиперполяризации в диапазоне от -40 до -100 мВ, а затем выходила на плато. При -40 мВ процент блокады в низком и нормальном натрии практически совпадал, однако при более отрицательных потенциалах блокада в низком натрии была более эффективна.

Одна из возможных причин такого усиления блокады при понижении концентрации внеклеточного натрия состоит в том, что ион натрия и блокатор конкурируют за сайт связывания в канале. Если это так, то при уменьшении концентрации натрия должна возрасти константа скорости связывания блокатора с каналом, т.е. ускорится кинетика развития блокады. Другим вариантом является связывание иона и блокатора в разных, но взаимодействующих сайтах. В этом случае присутствие иона в своем специфическом сайте должно уменьшать сродство блокатора к его сайту. Этот эффект должен проявляться в том, что при уменьшении концентрации натрия замедлится кинетика отмыва. Поэтому для выяснения причин усиления блокады при понижении концентрации внеклеточного натрия необходимо было сравнить кинетику взаимодействия ИЭМ-1925 с каналами АМРА-рецепторов при нормальном и сниженном натрии. Результат представлен на Рис. 11. Очевидно, что скорость отмыва блокатора остается постоянной, то есть не зависит от концентрации внеклеточного натрия. Напротив, развитие блокирующего эффекта несколько ускоряется при снижении натрия. При потенциале -120 мВ средне-взвешенная постоянная

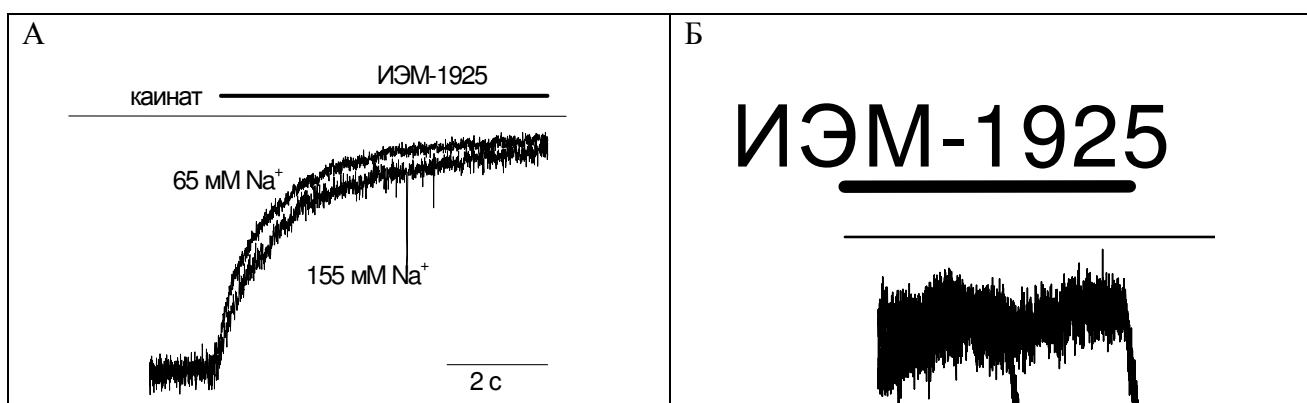


Рис. 11. Кинетика развития блока (А) и отмыва ИЭМ-1925 (Б) в присутствии каината. Кинетика развития блока ускоряется при снижении внеклеточной концентрации натрия, в то время как кинетика отмыва остается неизменной. Поскольку токи в нормальном и сниженном натрии отличаются по амплитуде, на рисунке величины токов нормированы для наглядного сравнения кинетики. На рисунке (Б) кривые сдвинуты по горизонтали.

времени спада тока уменьшается с 0.49 ± 0.05 до 0.38 ± 0.04 с. Это позволяет заключить, что антагонистические отношения между ионом натрия и блокирующим ионом носят конкурентный характер.

Исследование эффекта «ловушки» ИЭМ-1925 в растворах с нормальной и сниженной концентрацией натрия показало, что внеклеточный натрий не оказывал влияния ни на возможность блокатора оставаться в каналах AMPA-рецепторов после их закрытия, ни на скорость вымывания блокатора из закрытых каналов. Такой результат был вполне ожидаем, т.к. если активационные ворота канала расположены с внеклеточной стороны от сайта связывания блокатора, то при закрытом состоянии канала ионы натрия внешней среды не оказывают влияния на «ловушку» блокатора и кинетику выхода блокатора из «ловушки» внутрь клетки.

Таким образом, токонесущие ионы натрия ослабляют блокирующее действие катионом ИЭМ-1925 за счет конкуренции за место связывания в канале.

Выводы:

1. Совокупность данных по потенциалозависимости кинетики и потенциалозависимости равновесной блокады свидетельствует о том, что производные адамантана, фенилциклогексила, дифенила способны проникать внутрь клетки через открытые каналы Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов, но не NMDA-рецепторов.
2. Производные адамантана, фенилциклогексила, дифенила способны оставаться в каналах как Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов, так и NMDA-рецепторов после закрытия. Однако после этого молекулы блокаторов способны покидать каналы AMPA-, но не NMDA-рецепторов. Потенциалозависимость этого процесса указывает на то, что вымывание осуществляется во внутриклеточную среду.
3. Постоянное присутствие блокатора во внеклеточной среде не препятствует вымыванию блокаторов из закрытых каналов AMPA-рецепторов («эффект самоотмыва»). Это может приводить к зависимости блокады синаптических токов от частоты стимуляции *in vivo*.
4. Производные адамантана, фенилциклогексила, дифенила способны блокировать как открытые, так и закрытые каналы Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов изнутри клетки. Причем и вне- и внутриклеточный блокатор взаимодействуют с одним и тем же сайтом связывания в канале.
5. Токонесущие ионы натрия ослабляют блокирующее действие катионом ИЭМ-1925 за счет конкуренции за место связывания в канале Ca^{2+} -проницаемого AMPA-рецептора.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. Тихонова Т.Б., Тихонов Д.Б., Магазаник Л.Г. Особенности блокады ионных каналов глутаматных рецепторов NMDA и AMPA подтипов дикатионным производным фенилциклогексила// Биологические мембраны – 2005. - Т. 22. - № 4. - С. 290-299.
2. Dorofeeva N.A., Tikhonov D.B., Barygin O.I., Tikhonova T.B., Salnikov Y.I., Magazanik L.G. Action of extracellular divalent cations on native alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate (AMPA) receptors// J. Neurochem. – 2005 – V. 95 – N. 6 – P. 1704-1712.
3. Лукомская Н.Я., Лаврентьева В.В., Старшинова Л.А., Жабко Е.П., Горбунова Л.В., Тихонова Т.Б., Гмиро В.Е., Магазаник Л.Г. Влияние блокаторов каналов ионотропных глутаматных рецепторов на развитие пентилентетразолового киндлинга у мышей// Росс.физиол.журн. им. И.М. Сеченова – 2005 – Т. 91 - N. 11 – С. 1241-51.
4. Магазаник Л.Г., Тихонов Д.Б., Тихонова Т.Б., Лукомская Н.Я. Механизмы блокады каналов глутаматных рецепторов: значение для структурных и физиологических исследований// Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2006. - Т. 92. - № 1. - С. 27-38.
5. Tikhonova T.B., Barygin O.I., Gmiro V.E., Tikhonov D.B., Magazanik L.G. Organic blockers escape from trapping in the AMPA receptor channels by leaking into the cytoplasm// Neuropharmacology – 2008 – V. 54 – N.4 – P. 653-664.
6. Tikhonova T.B., Tikhonov D.B., Magazanik L.G. Common binding site for externally and internally applied AMPA receptor channel blockers// J. Mol Neurosci. – 2009 – V. 39 – N. 1-2 – P. 169-74.
7. Тихонова Т.Б., Магазаник Л.Г., Тихонов Д.Б. (принята к печати в Росс.физиол.журн. им. И.М. Сеченова). Влияние ионного состава внешней среды на блокаду ионных каналов AMPA рецепторов.

Тезисы докладов

1. Тихонова Т.Б., Дорофеева Н.А. Особенности блокады подтипов глутаматных ионотропных рецепторов органическими катионами// Материалы межвузовской научно-технической конференции «XXXII неделя науки СПбГПУ» - Санкт-Петербург – 2004 - С. 45-46.

2. Тихонова Т.Б., Дорофеева Н.А. Особенности блокады NMDA и AMPA рецепторов органическими катионами// Материалы семинаров политехнического симпозиума «Молодые ученые – промышленности северо-западного региона» – Санкт-Петербург – 2004 - С. 75.
3. Лукомская Н.Я., Рукояткина Н.И., Горбунова Л.В., Гмиро В.Е., Жабко Е.П., Лаврентьева В.В., Старшинова Л.А., Тихонова Т.Б., Магазаник Л.Г. (2004) Исследование участия различных подтипов глутаматных рецепторов в механизме судорожного синдрома, вызываемого у мышей введением коразола// Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. Тезисы докладов XIX Съезда физиологического общества им. И.П. Павлова. – Екатеринбург – 2004 - Часть 1. Т. 90 - № 8 - С. 260.
4. Тихонова Т.Б. Особенности блокады подтипов глутаматных ионотропных рецепторов органическими катионами// Тезисы докладов VII Всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей “Человек и его здоровье” – Санкт-Петербург – 2004 - С. 293-294.
5. Тихонова Т.Б. Механизмы блокады глутаматных рецепторов NMDA и AMPA типов// Материалы VIII всероссийской конференции молодых исследователей «Человек и его здоровье». Вестник молодых ученых – Санкт-Петербург – 2005 - С. 120.
6. Тихонова Т.Б., Барыгин О.И. Проникновение органических блокаторов через селективный фильтр открытых и закрытых каналов глутаматных рецепторов AMPA типа// Тезисы докладов десятой всероссийской медико-биологической конференции молодых исследователей “Человек и его здоровье” – Санкт-Петербург – 2007 - С. 449-450.
7. Тихонова Т.Б., Барыгин О.И. Проникновение органических блокаторов через селективный фильтр открытых и закрытых каналов глутаматных рецепторов AMPA типа// Тезисы 11-ой пушкинской международной школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» - Пушкино – 2007 - С. 21.
8. Тихонова Т.Б., Барыгин О.И., Гмиро В.Е., Тихонов Д.Б. Проникновение органических блокаторов через ионные каналы AMPA рецепторов// Тезисы докладов XX съезда физиологического общества имени И.П. Павлова – Москва – 2007 - С. 444.
9. Тихонова Т.Б., Тихонов Д.Б., Магазаник Л.Г. Особенности строения и механизмов функционирования ионных каналов AMPA-рецепторов, выявляемые при помощи

каналоблокаторов// Материалы научной конференции «Ионные каналы: структура и функции». Биологические мембраны – Санкт-Петербург - 2009 - Т. 26 – N. 4 – С. 331.