

На правах рукописи

Шелых Татьяна Николаевна

**МЕХАНИЗМЫ МОДУЛИРОВАНИЯ
МЕДЛЕННЫХ НАТРИЕВЫХ КАНАЛОВ ($\text{Na}_v1.8$)
СЕРДЕЧНЫМИ ГЛИКОЗИДАМИ И ПРОИЗВОДНЫМИ
ГАММА-ПИРИДОНОВ**

03.00.25. – гистология, цитология, клеточная биология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Санкт-Петербург

2009

Работа выполнена в Межлабораторной группе биохимических основ репродукции клеток Института цитологии РАН и в Лаборатории физиологии возбудимых мембран Института физиологии им. И.П. Павлова. РАН

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Воробьев Владимир Иосифович
Институт цитологии РАН,

доктор биологических наук
Крылов Борис Владимирович
Институт физиологии
им. И.П. Павлова РАН

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Негуляев Юрий Алексеевич,
Институт цитологии РАН,

доктор биологических наук,
Крутецкая Зоя Ириарховна,
Санкт-Петербургский
Государственный Университет,
Биолого-почвенный факультет

Ведущая организация: Институт эволюционной
физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова РАН

Защита состоится “27” марта 2009 года в 12 часов на заседании

Диссертационного совета Д.002.230.01 при Институте цитологии РАН по адресу:

194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий проспект, д. 4

e-mail: cellbio@mail.cytpb.rssi.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН.

Автореферат разослан “25” февраля 2009 года

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Е.В.Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В основе многих физиологических процессов (передача электрических и химических сигналов, сокращение, секреция) лежит работа ионных каналов биологических мембран. Ионным каналам свойственны избирательная проницаемость для ионов и способность открываться и закрываться при различных воздействиях на мембрану. Несколько упрощенно ионные каналы можно разделить на лиганд-управляемые и потенциалозависимые. Эта классификация, однако, постоянно требует уточнения в связи с обнаружением как новых каналов, так и новых молекулярных механизмов их модуляции. В этом отношении большой интерес представляет способность мембранных рецепторов, расположенных вблизи ионных каналов, регулировать функциональную активность последних. Выяснение физиологической роли таких новых молекулярных структур, образующих единую систему мембранный рецептор - ионный канал, представляется весьма актуальным.

Физиологически активные вещества, воздействуя на систему мембранной сигнализации мембранный рецептор – ионный канал, могут иметь несколько “рецептирующих” зон, представляющих собой части аминокислотных последовательностей макромолекул рецептора и канала. В последнем случае применима гипотеза о так называемом “модулированном рецепторе” (Strichartz, 1973; Hille, 1977; Можаяева и др., 1980). В первом случае, когда центром связывания атакующей молекулы служит мембранный рецептор, включаются трансдукторные процессы, усиливающие на порядки молекулярный рецепторный сигнал и передающие его на мембранный ионный канал. Воздействия на указанные трансдукторные процессы открывают новые возможности модулирования возбудимости ионного канала, что должно иметь важные физиологические последствия на системном уровне. Такой подход особенно интересен в практическом отношении при исследовании механизмов ноцицепции.

Потенциалозависимые натриевые каналы ($Na_v1.1$ - $Na_v1.9$) являются важнейшими молекулярными структурами, обеспечивающими возбудимость. Большой интерес представляет исследование роли натриевых каналов в передаче ноцицептивной информации. Существует две причины, по которым потенциалозависимые натриевые каналы считаются перспективными мишенями для исследования антиноцицептивного эффекта. Во-первых, они лежат в основе генерации потенциалов действия, в результате выключения этих каналов полностью блокируется передача нервных импульсов и, тем самым, прерываются все сигналы, включая ноцицептивные. Во-вторых, представляется особенно перспективным осуществление рецептор-опосредованной модуляции возбудимости ответственных за

кодирование ноцицептивных ответов медленных натриевых каналов ($Na_v1.8$). Подход такого рода позволит сохранить способность передачи ноцицепторами сигналов других модальностей (тактильных и температурных), избирательно выключив высокочастотную компоненту их импульсной активности, кодирующую болевой сигнал при возникновении хронической боли.

Медленные тетродотоксиннечувствительные (ТТХ_r, $Na_v1.8$) натриевые каналы определяют процесс кодирования ноцицептивных сигналов в афферентах и сенсорных нейронах (Borovikova et al., 1997; Cardenas et al., 1997). Модуляторы активности этих каналов являются субстанциями, применение которых представляется перспективным с точки зрения разработки новых анальгетических лекарственных препаратов.

В 1999 году был предложен новый механизм (Крылов и др., 1999) модулирования возбудимости медленных натриевых ($Na_v1.8$) каналов, связанный с активацией опиоидоподобных рецепторов. Трансдукторную функцию в этом случае выполняет Na^+ , K^+ -АТФаза. Механизмы модуляции натриевых каналов $Na_v1.8$ исследуются в настоящей работе при непосредственном воздействии на мембранный рецептор производными гамма-пиридонов (все воздействия устранялись неспецифическим блокатором опиоидных рецепторов налоксоном) и при воздействии на Na^+ , K^+ -АТФазу сердечными гликозидами.

Многие γ -пиридоны широко используются в различных областях медицины для лечения заболеваний, вызванных избыточным содержанием в плазме крови различных микроэлементов (Thompson et al., 2006). Благодаря своим свойствам γ -пиридоны представляют интерес как перспективный материал для создания анальгетиков нового поколения, мембранной мишенью действия которых могут служить опиоидоподобные рецепторы.

В клинической практике и в физиологических экспериментах сердечные гликозиды используют для специфического ингибирования активности Na^+ , K^+ -АТФазы – натриевого насоса, утилизирующего энергию гидролиза АТФ для активного транспорта ионов Na^+ и K^+ через мембраны клеток. Эта насосная функция Na^+ , K^+ -АТФазы хорошо известна. Она необходима для поддержания мембранного потенциала клетки в строго определенном диапазоне.

В настоящей работе исследуется дополнительная – трансдукторная – функция натриевого насоса. Она была обнаружена при исследовании сенсорных нейронов (Крылов и др. 1999), кардиомиоцитов (Xie and Askari, 2002). В настоящее время эта функция интенсивно исследуется в клетках разных тканей (Mohammadi et al., 2001; Lencesova et al., 2004; Zhang et al., 2006). Важно, что трансдукторная функция Na^+ , K^+ -АТФазы может активироваться оубаином (Xie and Askari, 2002; Liang et al., 2007). Поскольку очень низкие

(наномолярные) концентрации оуабаина были обнаружены в системном кровотоке (Schoner and Schiener-Bobis, 2005), представляется важным исследование физиологической роли трансдукторной функции Na^+, K^+ -АТФазы при воздействии указанных очень низких концентраций сердечного гликозида. Можно предположить, что эндогенный оуабаин может вызывать антиноцицептивный эффект.

Учитывая тот факт, что специфическое рецептор-опосредованное или трансдуктор-опосредованное модулирование характеристик медленных натриевых каналов остается малоизученным, можно предположить, что результаты, полученные в этой области, окажутся востребованными при разработке новых фармакологических подходов к решению проблемы хронической периферической боли (Gold, 2008).

Цель и задачи исследования. Целью работы было исследование механизма системы мембранной сигнализации: опиоидоподобный рецептор - Na^+, K^+ -АТФаза – медленные натриевые каналы ($\text{Na}_v1.8$) сенсорных нейронов. В ходе исследования были поставлены и решены следующие задачи:

1. Выяснить возможные молекулярные механизмы действия γ -пиридонов на медленные натриевые каналы ($\text{Na}_v1.8$).
2. Изучить возможные механизмы воздействия ряда представителей сердечных гликозидов на модулирование возбудимости медленных натриевых каналов ($\text{Na}_v1.8$).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. С помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp method) получены доказательства, свидетельствующие о рецептор-опосредованном действии γ -пиридонов на мембрану сенсорного нейрона.
2. Установлено, что представители сердечных гликозидов – оуабаин, дигоксин и кардиотонический стероид оуабагин различаются на порядки по своей способности модулировать трансдукторную функцию Na^+, K^+ -АТФазы путем снижения потенциалочувствительности активационной воротной системы медленных натриевых каналов $\text{Na}_v1.8$.
3. Полученные результаты свидетельствуют о том, что кроме сайта связывания сердечных гликозидов, ответственного за ингибирование насосной функции, в молекуле Na^+, K^+ -АТФазы присутствует еще один сайт, специфическое связывание гликозидов с которым модулирует трансдукторную функцию Na^+, K^+ -АТФазы.

Научная новизна. Впервые было показано, что 5-гидрокси-2-гидроксиметил- γ -пиридон (АК1) и 5-гидрокси-1-метил- γ -пиридон-2-карбоновая кислота (АК2) способны

уменьшать потенциалочувствительность натриевых каналов $Na_v1.8$, причем наблюдаемый эффект устранялся при предварительном приложении в наружный раствор неспецифического блокатора опиоидных рецепторов налоксона в концентрации 50 мкмоль/л и блокатора Na^+,K^+ -АТФазы оубаина в концентрации 200 мкмоль/л. Это свидетельствует о возможном участии опиодоподобных рецепторов в специфическом связывании этих сигнальных молекул и также подтверждает важную роль Na^+,K^+ -АТФазы в процессе передачи ноцицептивного сигнала на активационное воротное устройство $Na_v1.8$ канала. Нами впервые было показано, что приложение оубаина в низких (эндогенных) концентрациях способно модулировать возбудимость медленных натриевых каналов $Na_v1.8$. Указанный эффект не устранялся при предварительном приложении в наружный раствор блокатора опиоидных рецепторов налтрексона в концентрации 50 мкмоль/л. В данном случае, вероятно, мишенью атакующей молекулы служит дополнительный сайт связывания оубаина, являющийся частью аминокислотной последовательности молекулы Na^+,K^+ -АТФазы. Специфическое связывание гликозидов с этим сайтом модулирует трансдукторную функцию Na^+,K^+ -АТФазы, что должно приводить, в свою очередь, к аналгетическому эффекту на системном уровне.

Теоретическое и практическое значение работы. Полученные данные представляются важными для понимания молекулярных механизмов действия γ -пиридонов и сердечных гликозидов на мембрану сенсорных нейронов. Результаты и выводы работы могут быть использованы для чтения учебных курсов по молекулярной биологии и нейробиологии, а также в медицине и фармакологии при создании новых аналгетических лекарственных препаратов.

Апробация работы. Основные положения работы доложены и обсуждены на: Политехническом симпозиуме “Молодые ученые – промышленности Северо-Западного региона” (Санкт-Петербург, 2006), Всероссийском форуме студентов, аспирантов и молодых ученых “Наука и инновации в технических университетах” (Санкт-Петербург, 2007), конференции “Механизмы регуляции и взаимодействия физиологических систем организма человека и животных в процессах приспособления к условиям среды” (Санкт-Петербург – Колтуши, 2007), конференции с международным участием “Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патофизиологических состояний мозга” (Санкт-Петербург – Колтуши, 2008), 2-ой Санкт-Петербургской конференции фонда А. Гумбольдта: “Технологии 21-го века: биологические, физические, информационные и социальные аспекты” (Санкт-Петербург, 2008).

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 140 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и

методов исследования, экспериментальных результатов, обсуждения результатов, выводов, заключения и списка литературы, содержащего 188 источников. Работа иллюстрирована 34 рисунками.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объект исследования. Для выполнения экспериментальной части работы применяли модифицированный нами метод краткосрочного культивирования диссоциированных сенсорных нейронов (Kostyuk et al., 1981; Elliott and Elliott, 1993).

Эксперименты были выполнены на культивируемых изолированных нейронах спинальных ганглиев крыс линии *Wistar*. Дорзальные ганглии выделяли из областей L₅ - S₁ спинного мозга и помещали в раствор Хенкса. Ферментативную обработку проводили в течение 5-12 мин. (в зависимости от возраста крыс) при 37 °С в растворе следующего состава: 1 мл раствора Хенкса, 1 мл среды Игла, 2 мг/мл коллагеназы (тип 1А), 1 мг/мл проназы-Е (Kostyuk et al., 1981). В качестве буфера использовали 10 ммоль/л Нерес Na (рН=7.4). После ферментативной обработки ганглии тщательно отмывали путем центрифугирования (1 мин, 900 об/мин) и последующей сменой надосадочной жидкости. Для отмывки и культивирования использовалась среда на основе среды Игла (ЕМЕМ) с добавлением глутамина (2 ммоль/л), эмбриональной сыворотки коровы (10 %), глюкозы (0.6 %), гентамицина 40 ед/мл. Механическую диссоциацию производили путем пипетирования. К полученной клеточной суспензии добавляли культуральную среду до достижения соответствующей плотности клеток в объеме чашки Петри. Культуру клеток, состоящую преимущественно из нейронов спинальных ганглиев, получали с помощью предварительного осаждения ненейрональных клеток (шванновских клеток и фибробластов) на пластиковой поверхности 60-миллиметровой чашки Петри в течение 25 мин при 37° С. Далее клетки культивировали на покрытой коллагеном поверхности 16-миллиметровых чашек Петри. Коллаген получали из хвостов крыс. Регистрацию электрической активности нейронов производили спустя 1-2 ч после завершения культивирования. Клетки использовали в опытах в течение одних сут.

Регистрация ионных токов. В работе использовали метод локальной фиксации напряжения (patch-clamp method) в конфигурации “регистрация активности целой клетки” (“whole-cell”) (Hamill et al., 1981). Эксперименты проводили с помощью аппаратно-программного комплекса, включающего в себя усилитель ЕРС 7 (patch-clamp L/M-ЕРС 7), аналого-цифровой преобразователь (АЦП) и цифро-аналоговый преобразователь (ЦАП) (ТОО “Центр речевых технологий”), IBM-совместимый персональный компьютер и

разработанный в Лаборатории физиологии возбудимых мембран пакет программ для автоматизации научных исследований (Крылов и др., 1996). Достоверность различий величин эффективного заряда активационной воротной системы (Z_{eff}) оценивали с помощью Т - критерия Стьюдента.

Растворы. В работе использовались стандартные растворы (концентрации представлены в ммоль/л) для исследования кинетических характеристик натриевых каналов. Внеклеточный раствор: NaCl - 65, CaCl₂ - 2, MgCl₂ - 2, Choline Cl - 70, HEPES Na - 10, тетродотоксин (ТТХ) - 0.0001, рН 7.4. Внутриклеточный раствор: CsF - 100, NaCl - 10, CsCl - 40, MgCl₂ - 2, HEPES Na - 10, рН 7.2. Исключение ионов калия позволило избавиться от всех компонентов калиевого тока, а ионы фтора во внутриклеточном растворе обеспечивали блокирование кальциевых токов (Kostyuk et al., 1975; Elliott and Elliott, 1993). В работе использовались реактивы фирмы “Sigma”, за исключением 5-гидрокси-2-гидроксиметил- γ -пиридона (АК1), синтезированного по методу (Heyns and Vogelsang, 1954), и 5-гидрокси-1-метил- γ -пиридон-2-карбоновой кислоты АК2, полученной согласно другой методике (Molenda et al., 1994). Для выделения медленных натриевых токов во внеклеточный раствор вводили 100 нмоль/л тетродотоксина (Almers and Levinson, 1975). Это приводило к полному устранению быстрых натриевых токов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование влияния производных γ -пиридона на медленные натриевые каналы.

Действие АК1 (5-гидрокси-2-гидроксиметил- γ -пиридона) в концентрации 1 мкмоль/л и АК2 (5-гидрокси-1-метил- γ -пиридон-2-карбоновой кислоты) в такой же концентрации, приложенных с наружной стороны мембраны, приводило к снижению эффективного заряда (Z_{eff}) активационной воротной системы медленных натриевых каналов $\text{Na}_v1.8$. Именно этот параметр был выбран нами в качестве количественного показателя, отражающего эффект воздействия АК1 и АК2. Для его количественного измерения были построены “пиковые” вольт-амперные характеристики обычным способом (Hodgkin and Huxley, 1952a). При подаче на мембрану последовательности ступенек напряжения (Е) регистрировали амплитудные значения токов (I_{max}), которые могут быть представлены в виде функции I_{max} (Е). Основной эффект, позволяющий обнаружить количественную связь между потенциалочувствительностью активационной воротной системы ТТХ_r натриевых каналов и воздействием исследуемых производных γ -пиридона, проявляется в изменении крутизны левой ветви вольт-амперной характеристики. Этот эффект можно представить на графике

зависимости хордовой проводимости от потенциала $G_{Na}(E)$. Эта функция строится следующим образом:

$$G_{Na}(E) = I_{max}(E)/(E-E_{Na}), \quad (1)$$

где E_{Na} - величина потенциала реверсии натриевого тока, $I_{max}(E)$ - амплитудное значение тока при деполяризующем потенциале E . Функция $G_{Na}(E)$ имеет начальный S-образный участок, крутизна которого отражает особенности потенциалочувствительности активационного процесса. Изменение крутизны именно этого участка четко проявляется при воздействии исследуемых агентов. Можно предположить, что число открытых каналов (N_o) пропорционально величине хордовой проводимости $G_{Na}(E)$, а число закрытых каналов (N_c) соответствует $\{G_{Na}^{max} - G_{Na}(E)\}$. Тогда (Hodgkin and Huxley, 1952a; Алмерс, 1981).

$$\lim_{E \rightarrow -\infty} (N_o/N_c) = \lim_{E \rightarrow -\infty} [G_{Na}(E) / \{G_{Na}^{max} - G_{Na}(E)\}] \rightarrow C \exp[Z_{eff}eE/kT], \quad (2)$$

где C - константа, Z_{eff} - эффективный заряд, выраженный в единицах заряда электрона e (Hodgkin and Huxley, 1952b), k - постоянная Больцмана, T - абсолютная температура. Очевидно, что при $E \rightarrow -\infty$ указанная функция представляет собой одну экспоненту. Она может быть наглядно представлена с удовлетворительной точностью с помощью регрессионной прямой, проходящей через начальный участок кривой лимитирующей проводимости (Алмерс, 1981). Действие исследуемых γ -пиридонов приводило к изменению величины Z_{eff} с 6.5 ± 0.2 ($n=14$, контроль) до 4.7 ± 0.3 ($n=14$) после приложения АК1 и до 4.9 ± 0.4 ($n=18$) при воздействии АК2 (рис. 1). В ряде случаев снижение эффективного заряда сопровождалось сдвигом активационной кривой вправо. Обнаруженный эффект устранялся при предварительном приложении в наружный раствор неспецифического блокатора опиоидных рецепторов налоксона (50 мкмоль/л). Полученные результаты свидетельствуют о рецептор-опосредованном действии γ -пиридонов на мембрану сенсорного нейрона. В данном случае мишенью атакующей молекулы АК1 (АК2), вероятно, служит опиоидоподобный мембранный рецептор. Наши данные также подтверждают участие Na^+, K^+ -АТФазы в качестве трансдуктора в передаче сигнала от опиоидоподобных рецепторов на активационное воротное устройство $Na_v1.8$ канала подобно тому, как это было обнаружено ранее (Крылов и др. 1999). Свидетельством этому служит тот факт, что ингибитор Na^+, K^+ -АТФазы оубаин в концентрации 200 мкмоль/л полностью устранял эффекты исследованных производных γ -пиридона (рис. 1).

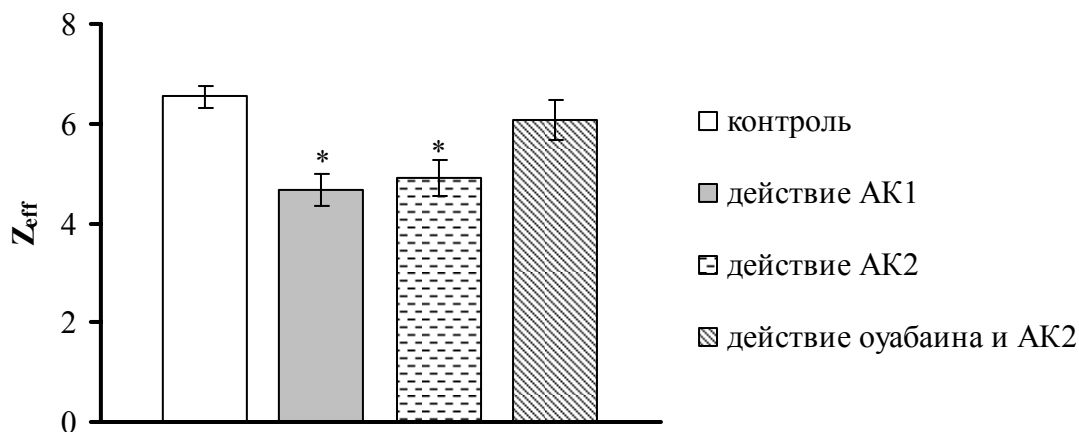


Рис. 1. Снижение эффективного заряда активационной воротной системы медленных натриевых каналов $\text{Na}_v1.8$ после воздействия АК1 и АК2.

Показаны средние значения Z_{eff} и их стандартное отклонение. * - значения статистически достоверны, (уровень статистической значимости $p < 0.05$).

Исследование влияния сердечных гликозидов на медленные натриевые каналы

Действие сердечных гликозидов оубаина, дигоксина и кардиотонического стероида оубагенина было исследовано с помощью метода локальной фиксации потенциала. После внеклеточного приложения 1 нмоль/л оубаина величина эффективного заряда снижалась с контрольного значения $Z_{\text{eff}} = 6.7 \pm 0.4$ ($n=15$) до 4.8 ± 0.5 ($n=15$) (рис. 2). Детальное исследование эффектов низких концентраций оубаина показало, что влияние этого гликозида на эффективный заряд и, как следствие, на трансдукторную функцию Na^+, K^+ -АТФазы носит монотонный дозозависимый характер в диапазоне от 1 пмоль/л до 1 мкмоль/л (рис.3). Дальнейшее повышение концентрации исследуемого агента приводило к его воздействию на насосную функцию Na^+, K^+ -АТФазы, опосредованному другим механизмом. Приложение 100 нмоль/л оубагенина способствовало изменению значения Z_{eff} до 4.8 ± 0.3 ($n=10$). Отметим, что снижение эффективного заряда до 4.8 при воздействии оубагенина наблюдалось в ответ на два порядка большую концентрацию по сравнению с концентрацией оубаина (рис. 2). Отсутствие рамнозильного остатка (именно этим отличается молекула оубагенина от молекулы оубаина) приводило к резкому снижению эффективности оубагенина по отношению к модуляции трансдукторной функции Na^+, K^+ -АТФазы. Обнаруженный эффект исследуемых субстанций не устранялся предварительным действием неспецифического блокатора опиоидных рецепторов налтрексона (50 мкмоль/л), что может свидетельствовать о непосредственном (не рецептор-опосредованном)

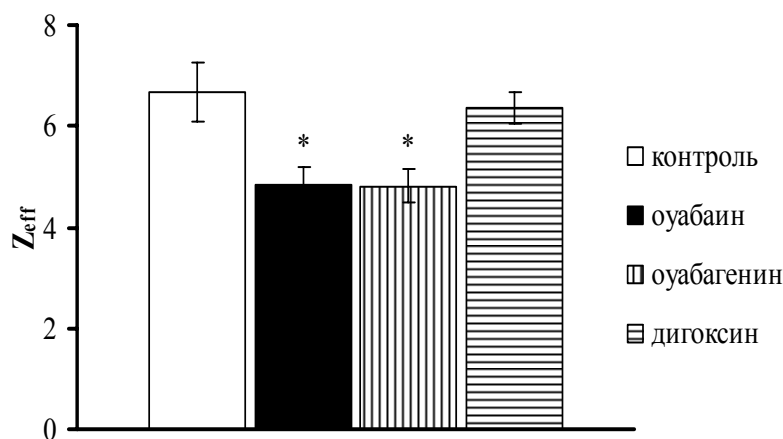


Рис. 2. Снижение эффективного заряда активационной воротной системы медленных натриевых каналов $Na_v1.8$ после воздействия оубаина, оубагенина, дигоксина.

Показаны средние значения Z_{eff} и их стандартное отклонение. * - значения статистически достоверны, (уровень статистической значимости $p < 0.05$).

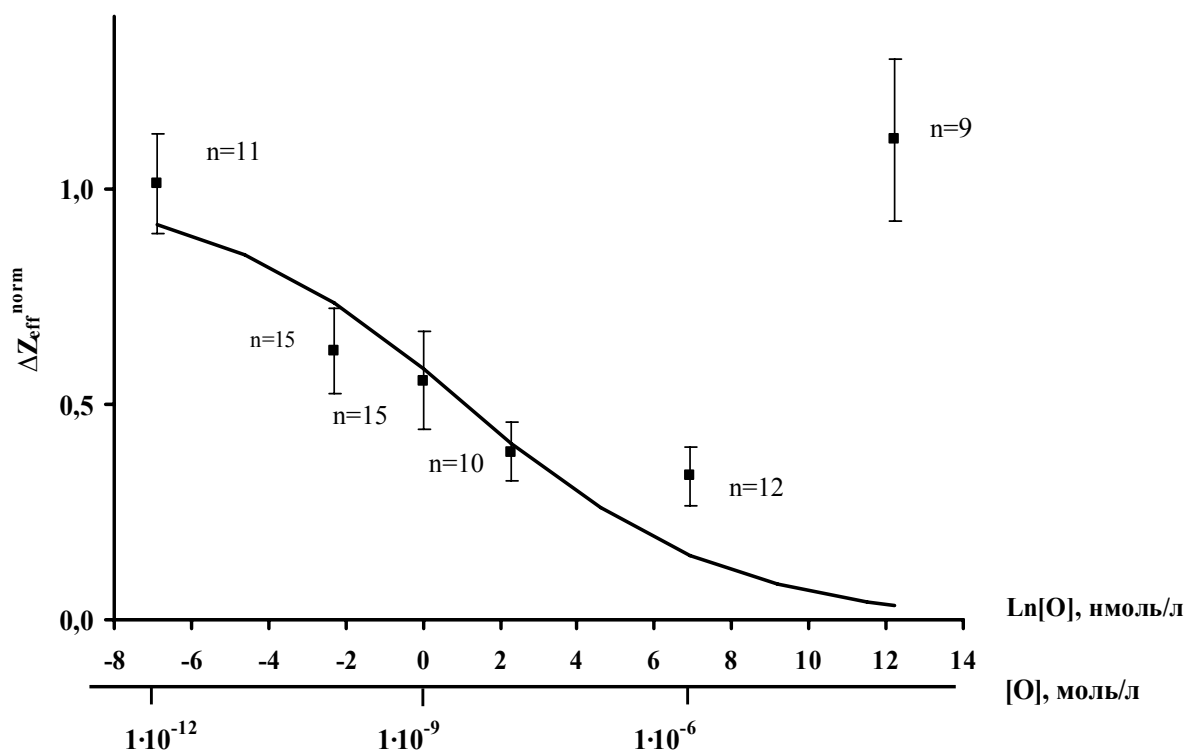


Рис. 3. Дозозависимое снижение относительной величины эффективного заряда активационной воротной системы медленных натриевых каналов $Na_v1.8$ при воздействии оубаина.

Средние значения и ошибки среднего представляют результат нескольких измерений (n- их число в скобках). Сплошная кривая – результаты расчетов с использованием уравнения Хилла: $\Delta Z_{eff}^{norm} = \Delta Z_{eff} / \Delta Z_{eff}^{max} = \{Z_{eff} - Z_{eff}^{min}\} / \{Z_{eff}^{max} - Z_{eff}^{min}\} = 1 - \{1 / [1 + (K_D / [O])^X]\}$, где Z_{eff}^{max} и Z_{eff}^{min} – максимальное (эффект при максимальном воздействии агента) и минимальное (без его воздействия) значение эффективного заряда, при $K_D = 3$ нмоль/л и $X = 0.3$. Ось абсцисс – логарифм концентрации оубаина [O], на дополнительной оси показаны соответствующие концентрации оубаина, ось ординат – относительное изменение величины эффективного заряда.

взаимодействии оубаина и оубагенина с соответствующим сайтом Na^+, K^+ -АТФазы. Действие 100 нмоль/л дигоксина с наружной стороны мембраны не влияло на величину эффективного заряда активационной воротной системы медленных натриевых каналов (рис. 2). Можно заключить, что особенности химической структуры молекулы дигоксина не позволяют ему активировать трансдукторный сайт связывания молекулы Na^+, K^+ -АТФазы. Полученные данные указывают на высокую избирательность воздействия оубаина на этот сайт. Все перечисленные результаты позволяют предположить, что кроме сайта связывания, ответственного за ингибирование насосной функции белкового комплекса, в молекуле Na^+, K^+ -АТФазы существует еще один рецепторный сайт, специфическое связывание с которым модулирует трансдукторную функцию Na^+, K^+ -АТФазы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Механизмы действия гамма-пиридонов. В настоящей работе нами предпринята попытка выяснения особенностей механизмов модулирования возбудимости медленных натриевых каналов при рецептор-опосредованном и трансдуктор-опосредованном воздействии на эффективный заряд их активационного воротного устройства. В первой части нашей работы были исследованы два представителя производных гамма-пиридона. Их эффект полностью устранялся налоксоном, что указывает на участие опиоидоподобного мембранного рецептора в механизме их мембранного связывания. Выбор АК1 и АК2 обусловлен не только их хорошо известной физиологической активностью на системном уровне, но и особенностью химического строения этих молекул. Она заключается в том, что обе эти молекулы в физиологически адекватных условиях способны хелатировать свободные ионы кальция. Действительно, результаты квантовохимических расчетов, в процессе которых была осуществлена полная оптимизация геометрических параметров молекул АК1 и АК2 в формах свободных кислот, их анионов, кальциевых солей, хелатных комплексов с Ca^{2+} и кальциевых солей хелатных комплексов (Рогачевский и др., 2009) указывают на то, что молекулы АК1 и АК2 связываются с не идентифицированным опиоидоподобным мембранным рецептором в форме кальциевой соли хелатного комплекса с Ca^{2+} ; при этом основной вклад в энергетику лиганд-рецепторного взаимодействия вносит образование ионных связей между Ca^{2+} и отрицательно заряженными функциональными группами в составе рецептора. Подчеркнем, что потеря способности хелатировать ионы кальция, наблюдающаяся у других производных гамма-пиридонов, должна приводить к отсутствию модулирования возбудимости медленных натриевых каналов подобно тому, как это имеет место в случае гамма-пиронов (Рогачевский и др., 2006; Рогачевский и др., 2007).

Практическая значимость полученных результатов заключается в том, что способность γ -пиридонов снижать возбудимость медленных натриевых каналов позволяет предсказать их возможное использование в качестве высокоэффективных анальгетиков, избирательно “выключающих” ноцицептивную компоненту афферентной импульсации.

Механизмы действия сердечных гликозидов. Во второй части работы были исследованы два сердечных гликозида: оубаин, дигоксин и кардиотонический стероид оубагенин. Как и в предыдущем случае, важно проанализировать влияние химической структуры выбранных для эксперимента субстанций на их способность модулирования возбудимости медленных натриевых каналов. При помощи высоко-чувствительного метода локальной фиксации потенциала нами впервые обнаружено, что оубаин снижает эффективный заряд активационного воротного устройства натриевых каналов $Na_v1.8$ в концентрации 1 нмоль/л, что свидетельствует о высокой избирательности воздействия гликозида. Действие оубагенина оказалось менее специфичным. Тот факт, что обнаруженный эффект исследуемых веществ не устраняется предварительным действием неспецифического блокатора опиоидных рецепторов налтрексона, исключает возможное участие в передаче сигнала опиоидных рецепторов, т.е. тот механизм, который был рассмотрен в предыдущей части работы по отношению к производным γ -пиридона. Как мы уже отмечали выше, хорошо известна гипотеза “модулированного рецептора” (Strichartz, 1973; Hille, 1977; Можалева и др., 1980), согласно которой биологически активное вещество взаимодействует непосредственно с рецептором, представляющим собой часть аминокислотной последовательности ионного канала. Полученные результаты указывают на то, что именно по такому механизму оубаин и оубагенин модулируют трансдукторную функцию Na^+,K^+ -АТФазы. В данном случае “модулированным” рецептором, с которым взаимодействуют указанные субстанции, являются аминокислотные последовательности, формирующие сайт Na^+,K^+ -АТФазы, отвечающий за трансдукторную функцию фермента.

В наших экспериментах зарегистрирована очень высокая чувствительность активационного воротного устройства медленных натриевых каналов к оубаину. Величина K_D при построении дозозависимости этого процесса составила 3 нмоль/л. Очевидно, что изменение возбудимости этих каналов приводит к снижению частоты разрядов мембраны исследуемого сенсорного нейрона в физиологически адекватных условиях (Карымова и др., 2008).

Можно предположить, что рассматриваемый молекулярный механизм действия очень низких концентраций оубаина на мембрану сенсорного нейрона является пока единственным объяснением физиологических эффектов эндогенного оубаина (его концентрация в крови человека составляет 0.5 нмоль/л). Модуляция, с помощью таких

концентраций оубаина, мембранного потенциала покоя за счет воздействия на насосную функцию Na^+, K^+ -АТФазы представляется маловероятной. Действительно, пороговая величина оубаин-зависимого тока мембраны сенсорных нейронов, зарегистрированная с помощью метода локальной фиксации напряжения (Hamada et al., 2003), не может превышать 10 пА при концентрации оубаина 0.1 мкмоль/л. Тогда, поскольку входное сопротивление (оно определяется обратной проводимостью каналов тока утечки) исследованного нами сенсорного нейрона составляет в среднем 5 нОм, тогда оубаин-зависимое изменение мембранного потенциала в этом случае не может превышать 2 мВ. Очевидно, что уменьшение на почти два порядка концентрации оубаина должно привести к пропорциональному (Hamada et al., 2003) снижению оубаин-зависимого тока и, следовательно, к такому изменению мембранного потенциала, которое будет соответствовать уровню шума. Это означает, что очень низкие (наномолярные) концентрации оубаина не должны приводить к изменению частоты повторных ответов мембраны сенсорного нейрона в физиологически адекватных условиях.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что особенности химического строения молекул исследованных веществ безусловно определяют их способность модулирования возбудимости медленных натриевых каналов. Эксперименты, проведенные при помощи метода органотипической культуры ткани (Лопатина и др., 2008), и результаты квантово-химических расчетов (Рогачевский и др., 2008) свидетельствуют о способности молекул оубаина и оубагенина активировать трансдукторный сайт связывания Na^+, K^+ -АТФазы в виде хелатного комплекса с ионами кальция. Основной вклад в энергетику формирования указанного комплекса вносит образование ион-ионных связей между Ca^{2+} и нуклеофильными функциональными группами в составе связывающего сайта Na^+, K^+ -АТФазы, ответственного за модуляцию трансдукторной функции этого белкового комплекса. Удаление рамнозильного остатка при переходе от молекулы оубаина к молекуле оубагенина, видимо, влияет на аффинность указанных молекул к трансдукторному рецепторному сайту АТФазы, что проявляется в увеличении действующей концентрации оубагенина на два порядка по сравнению с оубаином. Отсутствие рассматриваемого эффекта при воздействии дигоксина, вероятно, связано с его неспособностью хелатировать ионы кальция и тем самым взаимодействовать с трансдукторным сайтом фермента. Наши данные свидетельствуют о том, что обнаруженный механизм лиганд-рецепторного связывания отличается от известного способа блокирования насосной функции Na^+, K^+ -АТФазы высокими концентрациями указанных агентов. В последнем случае нет необходимости в образовании хелатного комплекса с ионами кальция, поскольку в данном процессе участвует другой сайт связывания этого фермента.

Эндогенный оуабайн в низких концентрациях выделяется в системный кровоток из гипоталамуса, гипофиза и коры надпочечников. В экспериментах на разных объектах обнаружено увеличение содержания оуабайна в крови и межклеточной жидкости до наномолярных концентраций при стрессе, утомлении, наличии воспалительных процессов в организме (Schoner and Schiener-Bobis, 2005). Полученные нами результаты свидетельствуют о наличии у эндогенного оуабайна анальгетических свойств.

ВЫВОДЫ

1. 5-гидрокси-2-гидроксиметил- γ -пиридон (AK1) и 5-гидрокси-1-метил- γ -пиридон-2-карбоновая кислота (AK2) в концентрации 1 мкмоль/л снижают возбудимость медленных натриевых каналов $Na_v1.8$. Эффекты указанных γ -пиридонов полностью устраняются налоксоном и высокими концентрациями оуабайна, что свидетельствует о взаимодействии AK1 и AK2 с опиодоподобными рецепторами, связанными с медленными натриевыми каналами, и об участии Na^+, K^+ -АТФазы в передаче ноцицептивного сигнала.
2. Зависимость величины эффективного заряда от концентрации оуабайна носит U-образный характер, что обусловлено двумя различными механизмами лиганд-рецепторного связывания указанного агента. Трансдуктор-опосредованный механизм взаимодействия описан уравнением Хилла, причем его константа диссоциации составляет 3 нмоль/л. Этот механизм связан с активацией дополнительного сайта связывания оуабайна, являющегося частью аминокислотной последовательности молекулы Na^+, K^+ -АТФазы.
3. Оуабегенин в концентрации 100 нмоль/л снижает эффективный заряд. Дигоксин в концентрации 100 нмоль/л не влияет на потенциалочувствительность медленных натриевых каналов. Особенности химического строения указанных молекул определяют их способность к модулированию возбудимости медленных натриевых каналов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Карымова Е.В., Плахова В.Б., Шелых Т.Н. Молекулярные механизмы модуляции болевых сигналов // Политехнический Симпозиум, материалы конференции “Молодые ученые – промышленности Северо-Западного региона”, Санкт-Петербург, 2006. С. 194.

Плахова В.Б., Карымова Е. А., Шелых Т.Н. Механизм действия ряда производных 4-пиридона на мембрану сенсорного нейрона // Мат. Всероссийского форума студентов, аспирантов и молодых ученых “Наука и инновации в технических университетах”. Санкт-Петербург. 10-12 окт. 2007. С. 183-184.

Рогачевский И.В., Плахова В.Б., Шелых Т.Н. Изучение механизма лиганд-рецепторного связывания 5-гидрокси-2-гидроксиметил-4-пиридола // Мат. конференции “Механизмы регуляции и взаимодействия физиологических систем организма человека и животных в процессах приспособления к условиям среды”. Санкт-Петербург – Колтуши. 25-27 сент. 2007. С. 66.

Крылов Б.В., Шелых Т.Н., Рогачевский И.В., Плахова В.Б., Подзорова С.А. γ -Пиридоны как возможные действующие субстанции анальгетических лекарственных препаратов // Сборник трудов под ред. А.П. Кудинова, Г.Г. Матвиенко “Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования, образование”. 2007. Т. 10. С. 202-214.

Шелых Т.Н., Рогачевский И.В., Плахова В.Б., Домнин И.Н., Подзорова С.А., Крылов Б.В. Снижение возбудимости ноцицепторов при воздействии гамма-пиридонов // Сенсорные системы. 2008. Т.33. №3. С. 255-263.

Шелых Т.Н., Подзорова С.А., Плахова В.Б. Оуабаин модулирует трансдукторную функцию натриевого насоса // Мат. конференции с международным участием “Нейрохимические механизмы формирования адаптивных и патофизиологических состояний мозга”. Санкт-Петербург – Колтуши. 10-12 сент. 2008. С. 160.

Rogachevskii I.V., Shelykh T.N. The putative mechanism of ligand-receptor binding of two gamma-pyridone derivatives // The 2nd St.-Petersburg Humboldt-Kolleg Conference “Technologies of the 21st Century: Biological, Physical, Informational and Social Aspects”. Saint-Petersburg. October 7–9. 2008. P. 35.

Рогачевский И.В., Плахова В.Б., Шелых Т.Н. Квантовохимическое исследование электронного строения и механизмов лиганд-рецепторного связывания ряда производных γ -пиридола и γ -пирона // Журнал общей химии. 2009. Т. 79. № 1. С. 106-119.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Almers W., Levinson R. Tetrodotoxin binding to normal and depolarized frog muscle and conductance of a single sodium channel // J. Physiol. 1975. V. 247. N 2. P. 483-509.

Borovikova L.V., Borovikov D.V., Ermishkin V.V., Revenko S.V. The resistance of cutaneous feline C-fiber mechano-heat-sensitive unit termination to tetrodotoxin and its possible relation to tetrodotoxin-resistant sodium channels // Primary Sensory Neuron. 1997. V. 2. N 1. P. 65-75.

Cardenas C.G., Del Mar L.P., Cooper B.Y., Scroggs R.S. 5HT₄ receptors couple positively to tetrodotoxin-insensitive sodium channels in a subpopulation of capsaicin-sensitive rat sensory neurons // J. Neuroscience. 1997. V. 17. N 19. P. 7181-7189.

Elliott A.A., Elliott J.R. Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia // J. Physiol. (Lond.). 1993. V. 463. N 1. P. 39-56.

Gold M.S. Na(+) channel blockers for the treatment of pain: context is everything, almost // *Exp Neurol.* 2008. V. 210. N 1. P. 1-6.

Hamada K., Matsuura H., Sanada M., Toyoda F., Omatsu-Kanbe M., Kashiwagi A., Yasuda H. Properties of the Na⁺/K⁺ pump current in small neurons from adult rat dorsal root ganglia // *Br J Pharmacol.* 2003. V. 138. N 8. P. 1517-1527.

Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches // *Pflugers Arch.* 1981. V. 391. N 2. P. 85-100.

Heyns K., Vogelsang G. Über γ -Pyrone und γ -Pyridone, II. Mitteil.: Darstellung und Eigenschaften einiger substituierter γ -Pyridone // *Chem. Ber. Bd.* 1954. V. 87. N 9. P. 1377-1384.

Hille B. Local anesthetics: Hydrophilic and hydrophobic pathways for the drug-receptor reaction // *J. Gen. Physiol.* 1977. V. 69. N 4. P. 497-515.

Hodgkin A.L., Huxley A.F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo* // *J. Physiol.* 1952a. V. 116. N 4. P. 449-472.

Hodgkin A.L., Huxley A.F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve // *J. Physiol.* 1952b. V. 117. N 4. P. 500-544.

Kostyuk P.G., Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. Effect of internal fluoride and phosphate on membrane currents during intracellular dialysis of nerve cells // *Nature.* 1975. V. 257. N 5528. P. 691-693.

Kostyuk P.G., Veselovsky N.S., Tsyndrenko A.Y. Ionic currents in the somatic membrane of rat dorsal root ganglion neurons // *Neuroscience.* 1981. V. 6. N 12. P. 2423-2430.

Liang M., Tian J., Liu L., Pierre S., Liu J., Shapiro J., Xie Z.J. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. N 14. P. 10585-10593.

Lencesova L., O'Neil A., Resneck W.G., Bloch R.J., Blaustein M.P. Plasma membrane-cytoskeleton-endoplasmic reticulum complexes in neurons and astrocytes // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. N 4. P. 2885-2893.

Mohammadi K., Kometiani P., Xie Z., Askari A. Role of protein kinase C in the signal pathways that link Na⁺/K⁺-ATPase to ERK1/2 // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. N 45. P. 42050-42056.

Molenda J.J., Jones M.M., Basinger M.A. Enhancement of iron excretion via monoanionic 3-hydroxypyrid-4-ones. // *J. Med. Chem.* 1994. V. 37. N 1. P. 93-98.

Schoner W., Schiener-Bobis G. Endogenous cardiac glycosides: hormones using the sodium pump as signal transducer // *Semin. Nephrol.* 2005. V. 25. N 5. P. 343-551.

Strichartz G.R. The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine // *J. Gen. Physiol.* 1973. V. 62. N 1. P. 37-57.

Thompson K. H., Barta C. A., Orvig C. Metal complexes of maltol and close analogues in medicinal inorganic chemistry. // *Chem. Soc. Rev.* 2006. V. 35. N 6. P. 545-556.

Xie Z., Askari A. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer // *Eur. J. Biochem.* 2002. V. 269. N 10. P. 2434-2439.

Zhang S.B., Malmersjo S., Li J., Ando H., Aizman O., Uhlen P., Mikoshiba K., Aperia A. Distinct Role of the N-terminal Tail of the Na, K-ATPase Catalytic Subunit as a Signal Transducer // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. N 31. P. 21954-21962.

Алмерс В. Воротные токи и движение зарядов в возбудимых мембранах // *Мембраны: ионные каналы / М. "Мир".* 1981. С. 129-236.

Карымова Е. А., Катина И. Е., Плахова В. Б., Подзорова С. А., Кулов М. А., Иванов В. К., Крылов Б. В. Возможный механизм кодирования ноцицептивных сигналов: роль медленных натриевых каналов // *Сенсорные системы.* 2008. Т. 22. № 3. С. 257-270.

Крылов Б.В., Дербенев А.В., Подзорова С.А., Людыно М.И., Кузьмин А.В., Изварина Н.Л. Морфин уменьшает чувствительность к потенциалу медленных натриевых каналов // *Физиол. журнал.* 1999. Т. 85. № 2. С. 225-236.

Лопатина Е.В., Пеннийнен В.А., Рогачевский И.В., Крылов Б.В. Фармакологическая модуляция трансдукторной функции Na^+, K^+ -АТФазы. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины // 2008. Т. 146. № 10. С. 1673-1683.

Можаяева Г.Н., Наумов А.П., Носырева Е.Д. Кинетика спада натриевого тока при реполяризации аксональной мембраны в норме и в присутствии токсина скорпиона // Нейрофизиология. 1980. Т. 12. № 5. С. 541-549.

Рогачевский И.В., Плахова В.Б., Домнин И.Н., Подзорова С.А., Крылов Б.В. Физиологическая роль гамма-пионов // Клиническая патофизиология. 2006. № 1. С. 15-24.

Рогачевский И.В., Плахова В.Б., Лопатина Е.В., Крылов Б.В. Технология создания новых лекарственных препаратов на основе производных гамма-пиона // Новые технологии и их применение. 2007. № 2. С. 46-53.

Рогачевский И.В., Лопатина Е.В., Пеннийнен В.А., Крылов Б.В. Неэмпирический конформационный анализ хелатных комплексов молекулы оуабаина с Ca^{2+} и возможный механизм модуляции трансдукторной функции Na^+, K^+ -АТФазы // Журнал общей химии. 2008. Т. 78. № 10. С. 1673-1683.

Рогачевский И.В., Плахова В.Б., Шелых Т.Н. Квантовохимическое исследование электронного строения и механизмов лиганд-рецепторного связывания ряда производных γ -пиридола и γ -пиона // Журнал общей химии. 2009. Т. 79. № 1. С. 106-119.