

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской академии наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной
научно-квалификационной работы (диссертации)

**«Механизмы действия лигандов
протон-управляемых ионных каналов»**

Штейников Василий Юрьевич
06.06.01 - Биологические науки
03.03.01 – Физиология

Научный руководитель:
Член-корр. РАН, доктор биологических наук
Тихонов Д.Б.

ИЭФБ РАН
Санкт-Петербург
2020

Общая характеристика работы

Актуальность исследования

Нейрональный ответ на понижение pH среды был впервые продемонстрирован в работе Krishtal and Pidoplichko, 1980. Белки, ответственные за эту реакцию, были идентифицированы значительно позднее, в работе Waldmann et al., 1997 как катионные каналы суперсемейства DEG/ENaC (Kellenberger and Schild, 2015). У позвоночных обнаружено 5 генов протон-управляемых ионных каналов, среди которых 3 (ASIC1-3) экспрессируются в нервной системе и формируют функциональные тримерные каналы (Wiemuth et al., 2014). Для ASIC1 и 2 также существуют а и b сплайс варианты, которые могут быть скомбинированы в тримеры в различных сочетаниях. ASIC1a, ASIC2a и ASIC2b экспрессируются преимущественно в центральной нервной системе (Wemmie et al., 2003), тогда как ASIC1b и ASIC3 больше распространены на периферии. Для всех типов протон-управляемых ионных каналов характерна селективная натриевая проводимость, а гомомеры ASIC1a также проницаемы для кальция (Hesselager et al., 2004).

В нормальных условиях каналы ASIC участвуют в реализации синаптической пластичности (Du et al., 2014) и формировании памяти (Bilkei-Gorzo et al., 2012), а на периферии - являются компонентом системы болевой и механо-чувствительности (Cheng et al., 2018). Также была показана их роль в различных патологических процессах, в ходе которых происходит закисление внутренней среды организма - ишемии, множественном склерозе, травматических повреждениях (Wemmie et al., 2013). Протон-управляемые ионные каналы являются одним из принципиальных медиаторов гибели нейронов, связанной с закислением.

На настоящий момент ASIC каналы не являются терапевтической мишенью, несмотря на показанный анальгетический эффект при их блокаде. Во многом это связано с отсутствием известных высокоспецифичных модуляторов (Cristofori-Armstrong and Rash, 2017). В физиологической роли протон-управляемых ионных каналов также остаются невыясненные вопросы. Среди них - сравнительно невысокая амплитуда синаптических токов, опосредуемых ASIC, а также проблема десенситизации (Tikhonov et al., 2019). При подпороговой стимуляции (слабом, медленном падении pH) эти каналы десенситизируют, минуя активацию, и остаются неактивными до возвращения pH среды к нейтральным значениям (Hesselager et al., 2004). Возможно, что в нормальных условиях функция протон-управляемых ионных

каналов опосредуется биологическими модуляторами, потенцирующими их ответ и препятствующими десенситизации.

В ходе предыдущих исследований в нашей лаборатории был обнаружен новый класс лигандов протон-управляемых ионных каналов, гидрофобные моноамины (Tikhonova et al., 2015). Это низкомолекулярные вещества с гидрофобным ядром и положительно заряженной аминогруппой. Среди них были найдены как положительные модуляторы активности каналов, так и ингибиторы. Были также проведены первичные исследования их структурно-функциональных взаимоотношений (Nagaeva et al., 2016a), однако многие вопросы касательно детальных механизмов действия моноаминов оставались неизученными. Также практически не рассматривалось действие этого класса лигандов на каналы ASIC3.

Ещё одним потенциальным направлением исследований стал поиск биологических модуляторов активности протон-управляемых ионных каналов. Ранее, по аналогии с синтетическими моноаминами, был идентифицирован потенциатор каналов ASIC1a гистамин (Nagaeva et al., 2016b). Его действие в дальнейшем также было продемонстрировано в *in vitro* модели гигантских синапсов каликса Хельда (Gonzalez-Inchauspe et al., 2020), где каналы ASIC1a участвуют в регуляции синаптической пластичности. Таким образом было принято решение проверить другие лиганды гистаминовых рецепторов на предмет активности в отношении ASIC каналов, а также расширить круг поиска биологических модуляторов, включив в него низкомолекулярные соединения (в частности, аминокислоты), постоянно присутствующие в цереброспинальной жидкости либо выделяющиеся в значительных концентрациях в синаптическую щель.

Цель и задачи исследования

Цель исследования:

Основной целью исследования было детальное описание механизмов действия гидрофобных моноаминов и близких по структуре веществ на протон-управляемые ионные каналы.

В рамках исследования также были поставлены следующие **задачи**:

1. Произвести скрининг лигандов гистаминовых рецепторов на предмет потенциальных модуляторов протон-управляемых ионных каналов по аналогии с собственно гистамином;

2. Разработать экспериментальную схему для подробного описания механизма действия индивидуального лиганда (мемантина), применимую для дальнейшего изучения более широкого спектра веществ;
3. Использовать вышеупомянутую схему для характеристики действия гидрофобных моноаминов на протон-управляемые каналы 1 и 3;
4. Опираясь на данные, полученные на предыдущих этапах исследований, произвести поиск потенциальных лигандов ASIC среди низкомолекулярных веществ, присутствующих в физиологических условиях.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Небольшие структурные модификации могут повысить эффективность гистамина в отношении ASIC1a каналов. Однако в целом, перекрытие между модуляторами гистаминовых рецепторов и протон-управляемых ионных каналов представляется незначительным.
2. Ингибирование амплитуды ответа ASIC1a мемантином происходит по механизму блока канала "foot in the door". Но также для него был обнаружен противоположный по знаку эффект, потенцияция десенситизированных каналов за счёт кислотного сдвига кривой десенситизации.
3. Действие гидрофобных моноаминов на каналы ASIC1a определяется комбинацией их эффектов на активацию и десенситизацию канала. Эти эффекты реализуются независимо друг от друга и могут наблюдаться одновременно в подходящих условиях.
4. Действие гидрофобных моноаминов на каналы ASIC3 также имеет 2 компонента, влияющих на пиковый и постоянный токи. За счёт перекрытия кривых активации и десенситизации ASIC3 разделить эти эффекты значительно сложнее. Основным способом дискриминации в данном случае является кинетика.
5. Наиболее перспективными среди изученных потенциальных модуляторов протон-управляемых ионных каналов в физиологических условиях представляются гистидин и глутамат. Глутамат может присутствовать в высоких концентрациях в синаптической щели, и гистидин действует в концентрации, сопоставимой с таковой в цереброспинальной жидкости.

Научная новизна работы

В представленной работе впервые описывается активность лигандов гистаминовых рецепторов в отношении протон-управляемых ионных каналов ASIC1a и ASIC2a. Действие гидрофобных моноаминов на каналы ASIC1a, описанное в

предыдущих статьях лаборатории, получило детальную характеристику с описанием его механизмов и двухкомпонентной природы. Набор исследуемых веществ был расширен включением гуанидин-замещенных аналогов, впервые показано действие этой группы веществ на десенситизацию протон-управляемых ионных каналов. Нам удалось провести аналогии с эффектами, вызываемыми этими веществами на каналы ASIC3. Также были описаны присущие только ASIC3 особенности, продиктованные различными скоростями кинетики отдельных компонентов действия лигандов. В работе впервые показано модуляторное действие нескольких аминокислот на ASIC1a, в частности, глутамата и гистидина, активных в концентрациях, близких к физиологическим.

Апробация работы

По материалам диссертации опубликовано 6 работ в печатных изданиях. Из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ, и 2 тезиса конференций. Результаты работы представлены и обсуждены на 2 российских и международных конференциях, FENS Regional Meeting (Печ, Венгрия, 2017 г.) и XXII Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2019 г.).

Теоретическое и практическое значение работы

Протон-управляемые ионные каналы являются потенциальной мишенью при лечении инсульта, множественного склероза, болевых синдромов и других патологических состояний. Данные, полученные в ходе идентификации активности ранее описанных веществ других фармакологических групп, а также при поиске новых лигандов для этих каналов, могут быть использованы при разработке специализированных модуляторов для применения в клинической практике. Принципиальным для дальнейшего направленного синтеза также является понимание механизма действия модуляторов ASIC и их структурно-функциональных взаимоотношений. ASIC участвуют и в нормальной работе нервной системы (регуляции синаптической пластичности, активности амигдалы, болевой и механо-чувствительности). Выявление потенциальных модуляторов их активности в физиологических условиях может помочь в лучшем понимании их роли в нервной системе. Присутствие возможных фоновых потенциаторов активности также может оказать влияние на использующиеся в настоящий момент *in vitro* модели.

Материалы и методы исследования

Клеточная культура CHO (Chinese hamster ovary cells), культивировалась в CO₂ инкубаторе при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Для роста клеток применялась среда DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) с включением 10% эмбриональной коровьей сыворотки и 5% гентамицина.

Трансфекция проводилась с помощью вещества Lipofectamine 2000 (Invitrogen, USA). Для использования в экспериментах клеточная культура высевалась на покровные стёкла площадью около 25 мм², равномерно распределённые по дну чашки Петри диаметром 35 мм. В процессе трансфекции использовалось 0.5 мкг плазмиды необходимого типа каналов (ASIC1a, 2a или 3) в сочетании с 0.5 мкг плазмиды, содержащей GFP.

Для регистрации активности каналов использовался **внеклеточный раствор** следующего состава (в mM): NaCl 143, KCl 5, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 2, D-глюкоза 18, HEPES 10, MES 10; pH раствора доводился до 7.4 добавлением NaOH. **Внутрипипеточный раствор** содержал (в mM): CsF 100, CsCl 40, NaCl 5, CaCl₂ 0.5, EGTA 5, HEPES 10; pH раствора доводился до 7.2 добавлением CsOH.

Стоковые растворы исследуемых веществ готовились в концентрации $5 \cdot 10^{-2}$ М и затем разводились во внеклеточном растворе до получения необходимой концентрации. При необходимости pH раствора дополнительно корректировался с помощью HCl или NaOH после добавления действующего вещества.

Для **быстрой перфузии растворов** использовалась система типа мэнифолд из 8 каналов под давлением, управлявшейся через программу Patchmaster.

В зависимости от экспериментальной задачи **протоколы подачи веществ** отличались по нескольким параметрам. Время подачи нейтрального и активирующего раствора с пониженным pH зависело от типа исследуемых каналов. Так, для ASIC1a применялось соотношение 20 с активации и 40 с отмыва, для ASIC2a - 40 и 20 с, и для ASIC3 - 30 и 20 с соответственно. Это было продиктовано особенностями ответа данного типа каналов (в частности, наличия стационарного компонента ответа и времени его выхода на плато), а также скоростью их восстановления из десенситизированного состояния.

Исследуемые вещества подавались в нескольких возможных вариантах. Постоянное присутствие лиганда (и в активирующем, и в нейтральном растворах) позволяет оценить его действие в типичных физиологических условиях, тогда как

подача только в активирующем растворе отражает действие в основном на открытые каналы, и, соответственно, в нейтральном - на закрытые или десенситизированные (для этого рН нейтрального раствора понижался, но не достигал порога активации). В последнем варианте, для снижения влияния лиганда на открытые каналы, перед активацией производилась 3 с подача нейтрального раствора без действующего вещества.

Электрофизиологические эксперименты проводились с помощью метода локальной фиксации потенциалов в протоколе «целая клетка». Регистрация активности ASIC каналов проводилась спустя 48-72 часа после трансфекции, трансфицированные клетки идентифицировались по зеленой флуоресценции при помощи микроскопа Leica DM IL (Leica Microsystems, Germany). Трансмембранные токи регистрировались с использованием комбинации усилителя EPC-8 и ЦАП-АЦП LHM 8+8 (НЕКА Elektronik, Germany). Мембранный потенциал устанавливался на -80 мВ, кроме экспериментов по исследованию потенциал-зависимости действия веществ, что отдельно уточняется в тексте. Данные записывались на персональный компьютер с помощью программы Patchmaster (НЕКА Elektronik, Germany) для последующего оффлайн анализа. Эксперименты проводились при комнатной температуре 22-24°C. Активация каналов повторялась до получения трех ответов с разницей амплитуды в пределах 10% друг от друга, это повторялось для контроля, исследуемого вещества и отмыва.

Первичный анализ данных проводился с помощью программы pClamp 10 (Molecular Devices, USA). Для оценки полумаксимальной концентрации исследуемых веществ и фиттинга спада ответов использовалась программа OriginPro 8.1 (OriginLab, USA).

Для статистического анализа данных использовалась программа IBM SPSS (USA). Статистически значимыми считались результаты с $p < 0.05$. Данные на графиках и в тексте представлены в формате «значение \pm стандартное отклонение» с $N \geq 5$.

Результаты и обсуждение

Действие лигандов гистаминовых рецепторов на ASIC каналы

Развивая результаты по активности гистамина на ASIC, полученные в нашей лаборатории ранее (Nagaeva et al., 2016b), на первом этапе исследований было принято решение охарактеризовать активность набора лигандов гистаминовых рецепторов (H^*R). Можно предположить, что они также будут влиять на протон-управляемые

ионные каналы. Для работы было отобрано 2 модифицированных формы гистамина, стабильный метаболит 1-метилгистамин и агонист H3R рецепторов α -метилгистамин. Агонисты рецепторов H3R иметит и рецепторы H2R димаприт были включены для оценки влияния замены аминокислотной группы и имидазольного кольца на остаток изотиомочевина. Обратный агонист H1R дифенгидрамин и антагонист H1R трипеленамин были выбраны из-за сходства их структуры с недавно описанным модулятором протон-управляемых каналов IEM-2044 (Tikhonova et al., 2015). Наконец, H3R антагонист тиоперамид и антагонист H4R A943931 представляли интерес из-за их уникальной структуры. Для сравнения в эксперименты также был включен собственно гистамин.

Результаты первичного скрининга активности данных веществ на ASIC1a показаны на рисунке 1А и В. Скрининг проводился в концентрации 500 мкМ, исследуемое вещество присутствовало как в нейтральном, так и в активирующем растворе. Для наиболее активных веществ также были построены кривые концентрационной зависимости (Рис. 1Б). По сравнению с гистамином, модифицированные формы оказались более эффективными. Фиттинг кривой концентрационной зависимости α -метилгистамина с помощью уравнения Хилла показал максимальную потенциацию в 340% и $EC_{50} = 350 \pm 90$ мкМ. При сравнении действия α -метилгистамина и 1-метилгистамина в концентрации 1 мМ, оба вещества вызывали большую потенциацию ASIC1a, чем гистамин (парный t-тест, $n=7$, $p < 0.05$). Значительный эффект был показан также для тиоперамида, с потенциацией ответа $78 \pm 72\%$ ($n = 12$) в концентрации 500 мкМ. Однако значительная вариабельность его действия между отдельными клетками оказалась проблематичной для более детального анализа. Статистически значимую потенциацию вызывал также димаприт, хотя его эффект и был слабее, чем для других лигандов $54 \pm 9\%$ ($n = 6$). Единственным обнаруженным ингибитором ASIC1a среди исследуемых веществ был A943931, уменьшавший амплитуду токов на $54 \pm 14\%$, с $IC_{50} = 665 \pm 236$ мкМ ($n = 7$).

Опираясь на предыдущие работы лаборатории (Nagaeva et al., 2016a) по механизмам действия лигандов ASIC1a, мы поставили задачу установить принципы действия для нескольких веществ из описанной группы. Для детального анализа были выбраны димаприт в качестве потенциатора и A943931 в качестве ингибитора.

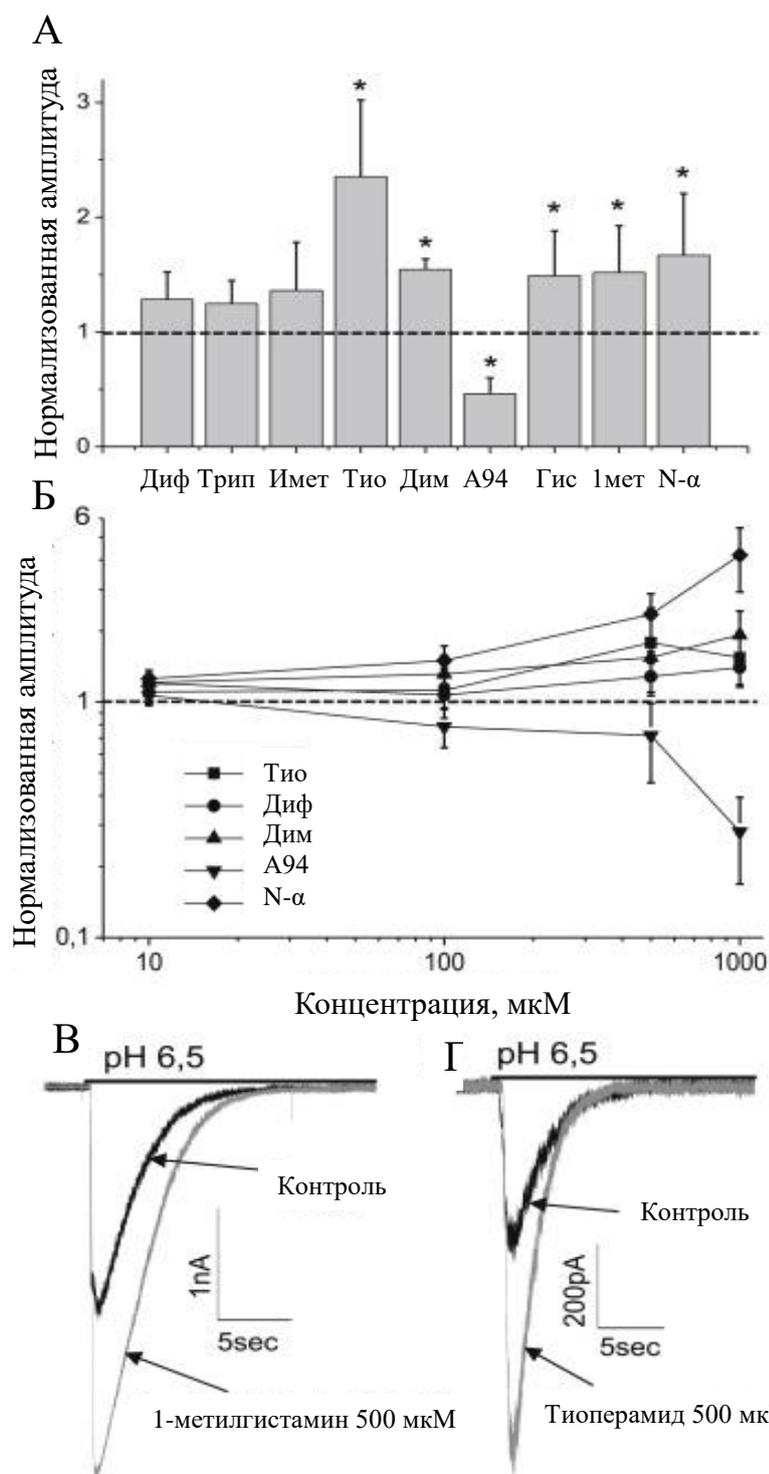


Рисунок 1. Действие лигандов гистаминовых рецепторов на ASIC1a. А – результаты скрининга активности веществ в концентрации 500 мкМ и активирующем рН=6.5. Б – концентрационная зависимость действия отдельных модуляторов. В, Г – примеры ответов.

Сначала была протестирована потенциал-зависимость действия этих веществ (Рис. 2 А-В). Эффект димаприла не значимо не отличался при мембранном потенциале -40, -80 и -140 мВ ($n = 6$, односторонний ANOVA, $P = 0.195$). С другой стороны, ингибирующее действие А943931 упало до $41 \pm 15\%$ при -40 мВ, и возросло до $74 \pm 9\%$ ($n = 5$) при мембранном потенциале -140 мВ.

Результаты анализа рН-зависимости действия веществ также различались (Рис. 2 Г-Е). Понижение рН активирующего раствора до 5.0 не влияло на эффективность А943931, но практически полностью убирало потенциацию димапримом до $9 \pm 6\%$ ($n = 6$).

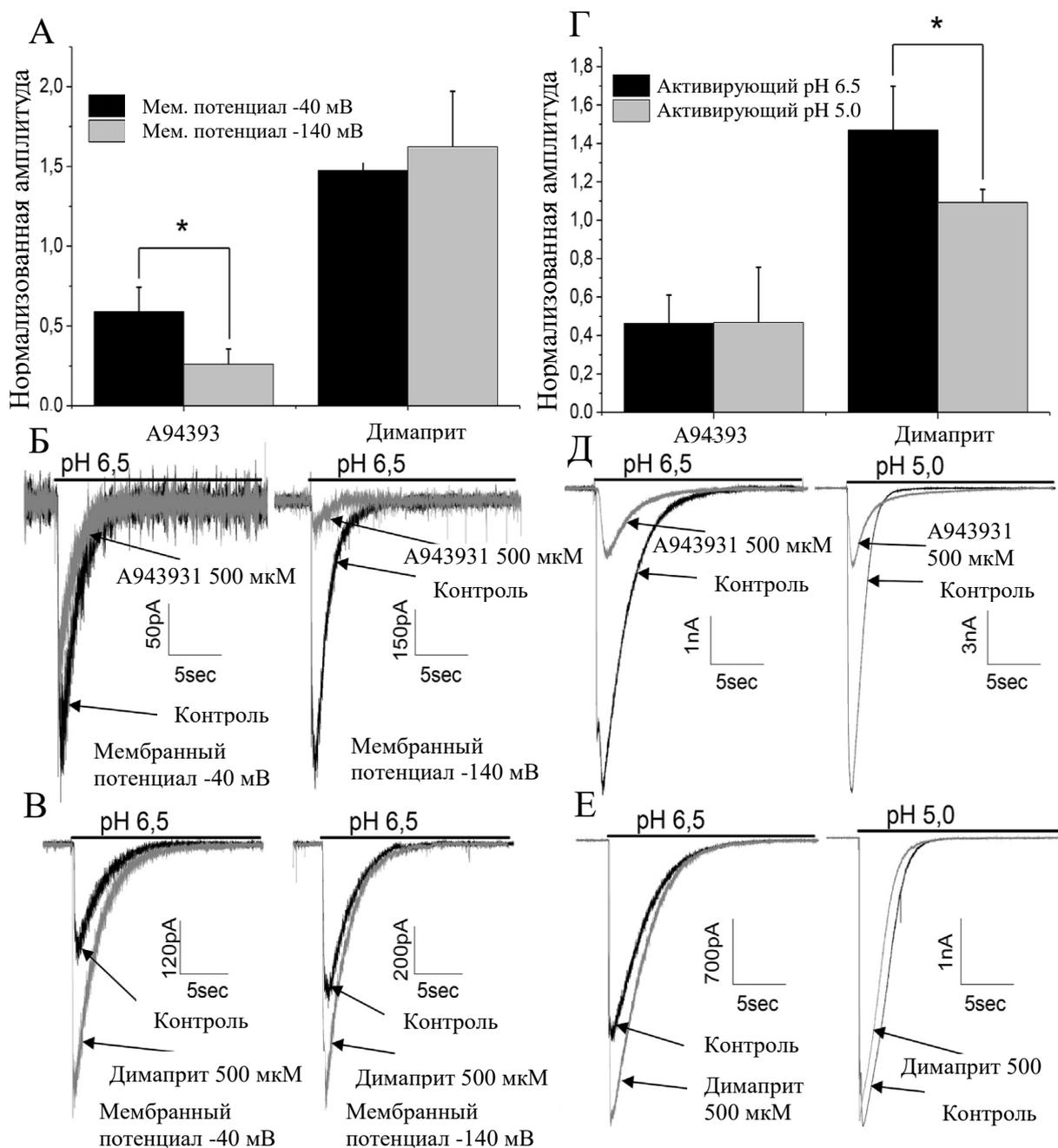


Рисунок 2. Потенциал- и рН-зависимость действия лигандов гистаминовых рецепторов. А – Сравнение эффектов димаприла и А943931 при мембранном потенциале -40 и -140 мВ, Б и В – примеры токов в этих условиях. Г - Сравнение эффектов димаприла и А943931 при активирующем рН=6.5 и 5.0, Д и Е – примеры токов в этих условиях.

На основании этих данных можно сделать вывод, что действие димаприла сводится к сдвигу кривой активации каналов в щелочную сторону. Это повышает

чувствительность каналов к сравнительно высоким рН, но не влияет на максимальную активацию, достигаемую при рН=5.0. В свою очередь, A943931 демонстрирует типичные характеристики каналоблокатора. Также можно заключить, что замещение имидазольного кольца или аминогруппы гистамина значительно снижает эффективность лиганда в качестве потенциатора ASIC1a, исходя из величины действия иметита и димаприта. С другой стороны, модификации гистамина (1-метилгистамин и N α -метилгистамин) повышали его эффект в статистически значимой, но не слишком масштабной манере.

Для ASIC2a единственным веществом со статистически значимым эффектом оказался тиоперамид, хотя и его действие было довольно слабым с потенциацией амплитуды ответа в $23 \pm 16\%$ (n = 5). Увеличение концентрации до 1 мМ принципиально не изменило наблюдаемой картины, хотя эффект тиоперамида и увеличился до $38 \pm 10\%$ (n = 5). Манипуляции с активирующим рН и мембранным потенциалом также не привели к значимым изменениям. В целом, как и сам гистамин (Nagaeva et al., 2016b), лиганды гистаминовых рецепторов практически не влияют на активность каналов ASIC2a.

Механизм действия мемантина ASIC1a каналы

Ингибирование амплитуды ответа ASIC1a и действие на кинетику

Следующим этапом исследований стало подробное описание механизма действия мемантина на каналы ASIC1a. Мемантин является блокатором NMDA рецепторов и используется в терапии болезни Альцгеймера. В предыдущих работах нашей лаборатории он был также охарактеризован как ингибитор каналов ASIC1a (Tikhonova et al., 2015).

Сначала были оценены потенциал- и рН-зависимость действия мемантина. Вещество присутствовало только в активирующем растворе в концентрации 1 мМ, с нейтральным раствором с рН=7.4. Сравнение ответов, вызываемых закислением до 6.5 и 5.5 представлено на рисунке 3 А. Уровень ингибирования ($76 \pm 18\%$, n=17 для рН=6.5 и $64 \pm 23\%$, n=9 для рН=5.5) не был статистически значимо различным в этих экспериментах.

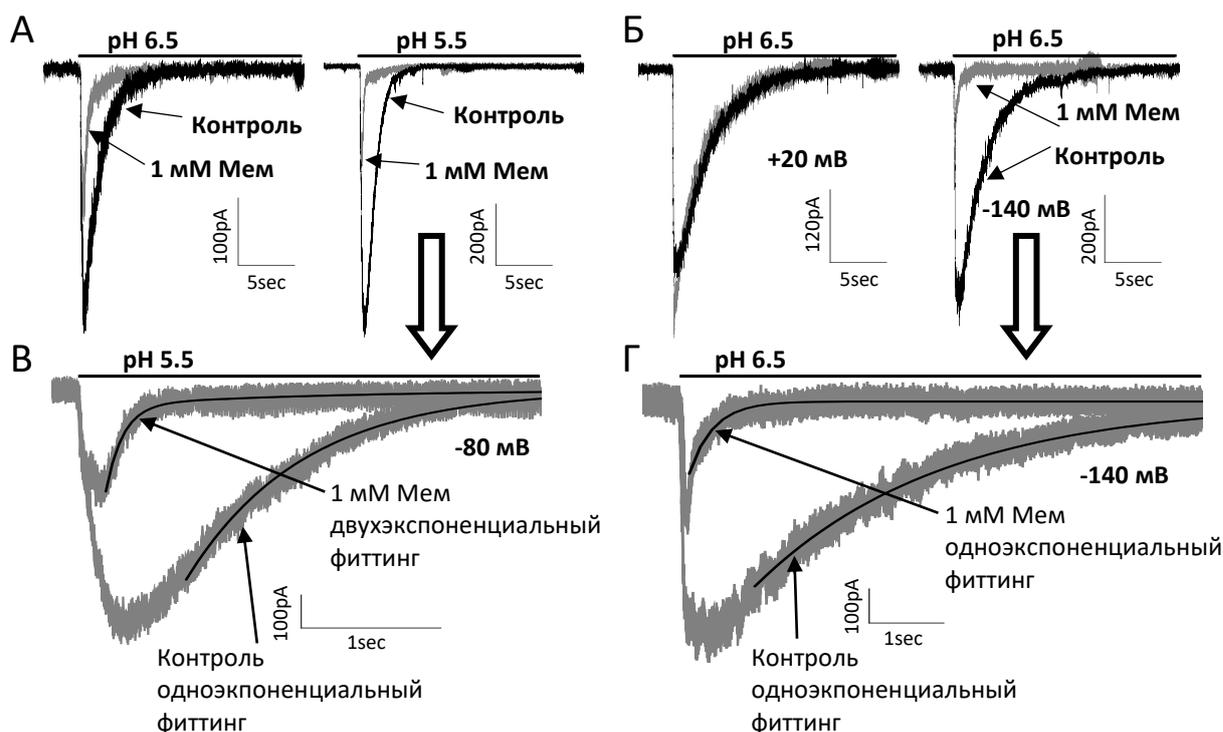


Рисунок 3. Механизмы ингибирования ответа ASIC1a мемантином. Примеры зависимости действия от pH (А) и мембранного потенциала (Б). Влияние на кинетику ответа (В,Г).

Затем, используя аналогичные условия, была произведена оценка потенциал-зависимости ингибирующего эффекта мемантина. Для катионных ингибиторов ионных каналов потенциал-зависимость характерна в случае, если вещество связывается в пору канала, попадая под действие электрического поля клеточной мембраны. Действие мемантина при мембранном потенциале -140 мВ усиливалось ($52 \pm 15\%$, $n=10$), тогда как при $+20$ мВ ингибирующий эффект становился статистически незначимым (Рис. 3Б). Эти данные указывают на блокаду поры канала, как основной механизм ингибирования протон-управляемых ионных каналов ASIC1a мемантином.

В предыдущей статье (Tikhonova et al., 2015) также было отмечено влияние мемантина на константу времени спада ответа. Мы изучили этот эффект более подробно. Для контрольных ответов фиттинг может быть успешно произведен с помощью одной экспоненты, приводя к значениям 2.3 ± 0.56 с, $n=21$ при -80 мВ и 1.87 ± 0.78 с, $n=8$ при -140 мВ, без статистически значимых отличий между группами. Однако в присутствии мемантина для адекватного фиттинга кривой спада появляется необходимость в добавлении второй экспоненты (Рис. 3В). Для мембранного потенциала -80 мВ выделяются быстрая и медленная компоненты (0.55 ± 0.19 и 3.82 ± 1.21 с, $n=14$), которые становятся быстрее при активирующем pH=5.5 (0.29 ± 0.11 ,

2.34±0.78 с, n=8), и при потенциале -140 мВ доминирующей становится уже быстрая компонента, возвращаясь к одноэкспоненциальному фиттингу (0.36±0.15 с, n=10) (Рис. 3Г). Таким образом мы видим, что мемантин ускоряет спад ответа в потенциал-зависимой манере, приводя к появлению второй быстрой компоненты спада, которая становится основной при гиперполяризации мембраны. Такое действие служит дополнительным аргументом в пользу блока открытого канала как основного механизма ингибирования ASIC1а мемантином.

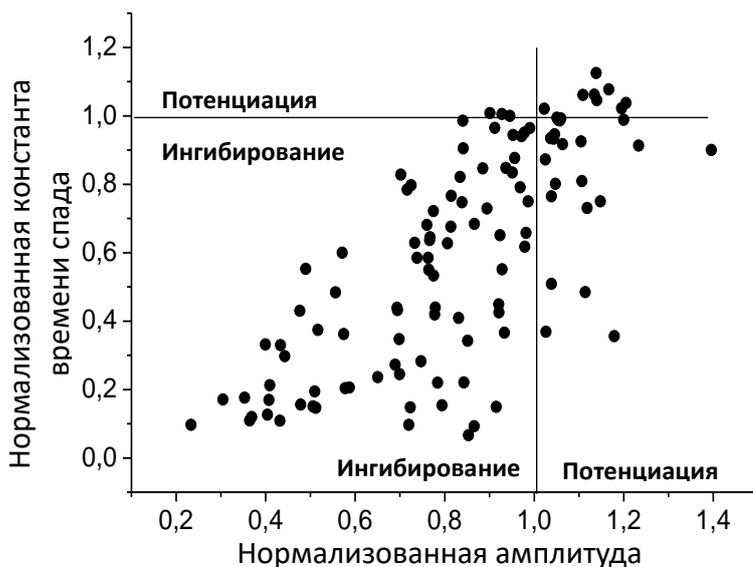


Рисунок 4. Корреляция между действием мемантина на амплитуду и константу времени спада.

Для оценки взаимодействия между эффектами мемантина амплитуду ответа и кинетику мы объединили данные, полученные в различных условиях (активирующий рН, мембранный потенциал и концентрация мемантина) и провели корреляционный анализ (Рис. 4). В случае двухэкспоненциального фиттинга использовались взвешенные значения константы спада. Несмотря на значительный разброс значений, мы получили сильную корреляцию между эффектами ($r=0.73$ $n=117$). Для описания взаимодействия этих двух эффектов также был введен параметр суммарного переносимого заряда, оценивавшийся как площадь под кривой ответа. Концентрационная и потенциал-зависимости эффекта мемантина на амплитуду, константу времени спада ответа и суммарный переносимый заряд представлены на рисунке 5А и Б. Из них очевидно, что основу ингибирующего действия составляет ускорения спада ответа (что в свою очередь ведёт к значительному падению переносимого заряда), тогда как влияние на амплитуду значительно слабее, и является скорее следствием "подрезания" пика ответа при ускорении инактивации. IC_{50} действия мемантина при -80 мВ, оцененное с

помощью уравнения Хилла, даёт значения 4537 ± 1013 мкМ для амплитуды, 678 ± 72 мкМ для константы времени спада, и 514 ± 41 мкМ для общего переносимого заряда.

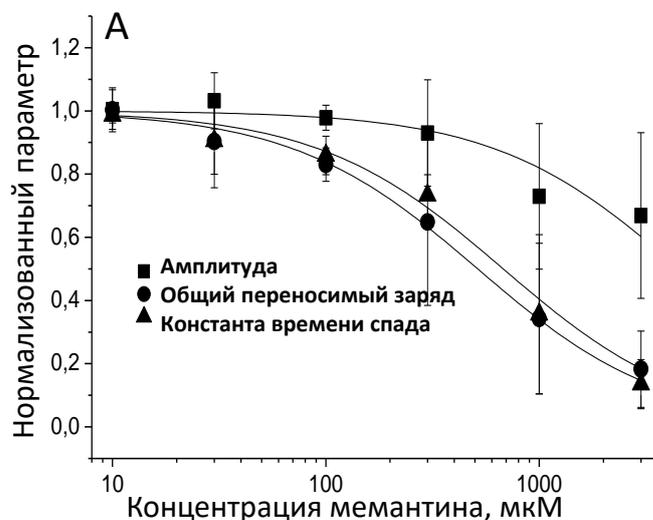
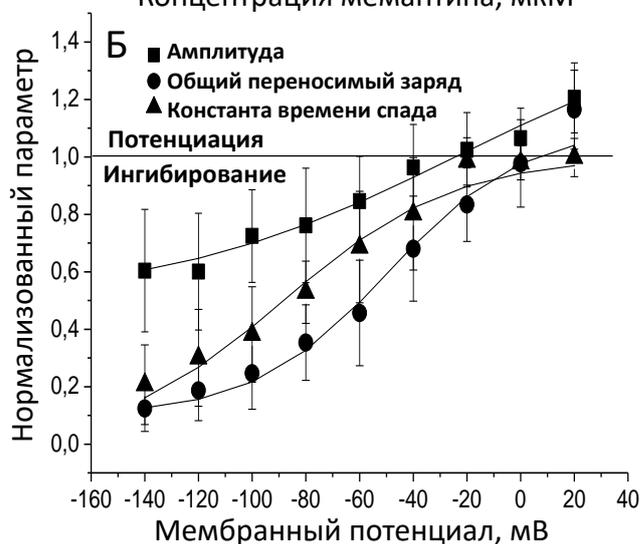


Рисунок 5. Зависимость действия мемантина на амплитуду, общий переносимый заряд и константу времени спада от концентрации (А) и мембранного потенциала (Б)



Потенциал-зависимость эффекта была оценена с помощью модели Woodhull. При потенциале 0 мВ мы получили значение $IC_{50} = 8167 \pm 1298$ мкМ и электрическую глубину сайта связывания (долю электрического поля мембраны от поверхности до сайта связывания $\delta = 0.66 \pm 0.07$ для действия мемантина на константу времени спада. Однако, при положительных значениях мембранного потенциала мемантин имел слабый потенцирующий эффект на амплитуду ответа и суммарный переносимый заряд (Рис. 5Б). Так как эффект не достигал насыщения оценить полумаксимальную концентрацию не представлялось возможным, при этом значения глубины сайта связывания для амплитуды и суммарного переносимого заряда соответствовали 0.25 ± 0.02 и 0.54 ± 0.04 .

Таким образом мы можем заключить, что действие мемантина опосредуется в основном ускорением спада ответа, а ингибирование амплитуды скорее является побочным эффектом. Этот эффект может быть вызван очень быстрым связыванием мемантина (опережающим развитие ответа), что приведет к ускорению инактивации каналов. Однако более вероятной представляется медленная блокада канала, возникающая в процессе развития ответа. Это также подтверждается явной потенциал-зависимостью эффекта.

Блокада канала по механизму «foot in the door»

В стандартных экспериментальных протоколах, использовавшихся в экспериментах, описанных в предыдущем разделе, исследуемое вещество присутствовало только в активирующем растворе с пониженным рН. Следовательно, открытым оставался вопрос, может ли мемантин связываться с закрытой конформацией ионного канала. Чтобы прояснить этот момент мы использовали 2 дополнительных протокола – с веществом, добавленным и в нейтральный, и в активирующий растворы, и с мемантином только в нейтральном растворе. Если лиганд присутствовал в растворе постоянно или был добавлен только в активирующий раствор, его эффекты были практически идентичны как для амплитуды ($73 \pm 30\%$ и $76 \pm 18\%$, $n=5$), так и для ускорения константы времени спада ($50 \pm 18\%$ и $54 \pm 14\%$, $n=5$). Но в третьем варианте эффект мемантина пропадал (Рис. 6А). Отсюда можно сделать вывод, что мемантин связывается только с открытой формой канала. Существует 2 основных варианта блокады открытого канала. Блокаторы с механизмом ловушки (trapping) заходят в канал в его открытой форме и не могут покинуть пору, пока канал не активируется снова. Следовательно, в случае блокатора с механизмом ловушки при первой активации в присутствии лиганда эффект будет значительно ослаблен, пока не установится концентрационное равновесие. Блокаторы типа «foot in the door» препятствуют нормальному закрытию канала, и не могут накапливаться в пору. Исходя из того, что эффект мемантина достигает максимума с первой активации (Рис. 6Б), и не мы можем заключить, что для мемантина присущ блок типа «foot in the door».

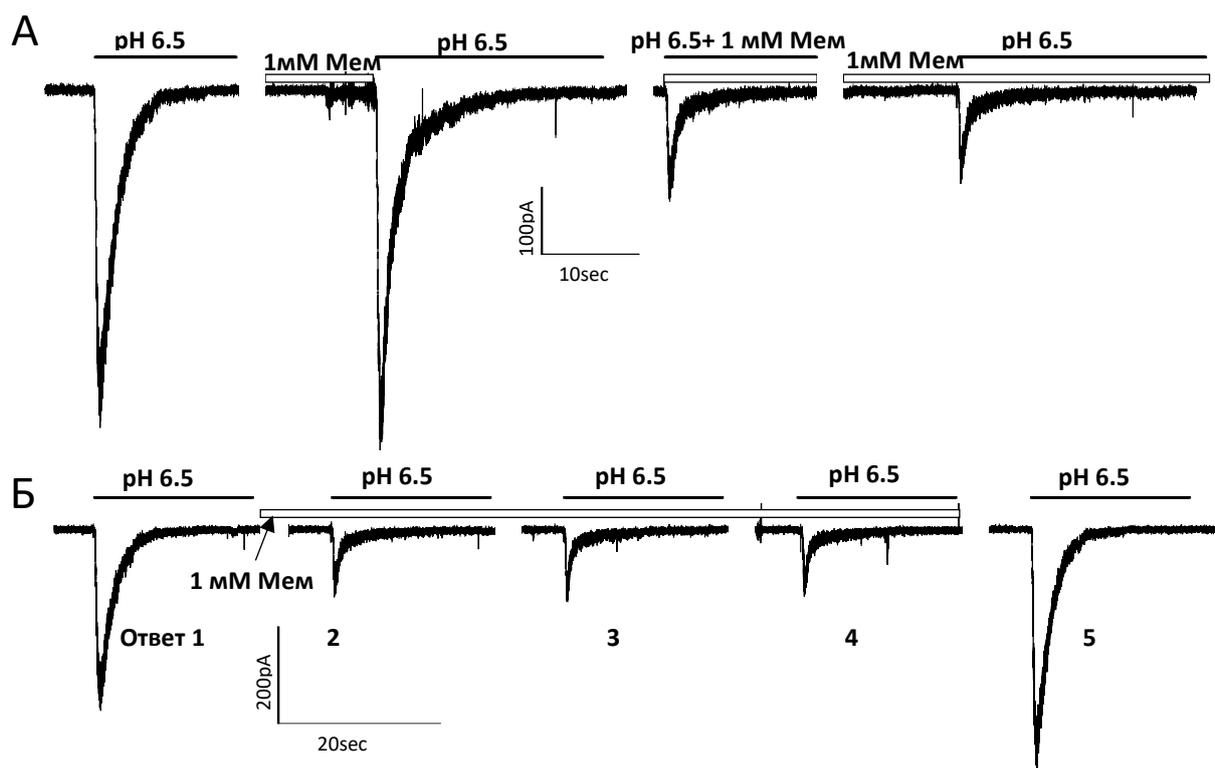


Рисунок 6. Зависимость действия мемантина от протокола аппликации (А). Отсутствие развития блокады при последовательных активациях (Б).

Согласно данным, полученным при положительных значениях мембранного потенциала, мемантин также оказывал слабое потенцирующее действие, что нехарактерно для каналоблокаторов. В попытках сделать этот эффект более явным мы использовали дополнительные протоколы аппликации, в которых исследуемое вещество присутствовало только в нейтральном растворе, либо во всех рабочих растворах. В результате, при мембранном потенциале 0 мВ, статически значимая потенциация ($23 \pm 12\%$, $n=8$) была достигнута только в случае, когда мемантин присутствовал в нейтральном растворе, указывая на возможное взаимодействие с закрытыми каналами. Для оценки рН зависимости этого эффекта мы изменили рН нейтрального раствора до 7.1 (что ведёт к частичной десенситизации каналов) и повторили ранее описанные варианты подачи мемантина при мембранном потенциале - 80 мВ. Как и раньше, мы наблюдали ингибирование ответа в присутствии вещества в активирующем растворе, но, если модулятор был добавлен только в нейтральный - это вело к увеличению амплитуды ($241 \pm 38\%$, $n=5$), без воздействия на кинетику. Если мемантин присутствовал во всех растворах наблюдался смешанный эффект - более слабая потенциация с ускорением спада ответа. Различные сочетания экспериментальных условий (рН активирующего и нейтрального раствора, схема

апликации и мембранный потенциал) также были протестированы (Рис. 7). С помощью измеренной рН зависимости этого эффекта мы можем утверждать, что мемантин сдвигает pH_{50} кривой десенситизации ASIC1a на 0.06 в кислотную сторону, что ведёт к снижению пропорции десенситизированных каналов при подпороговом понижении рН среды.

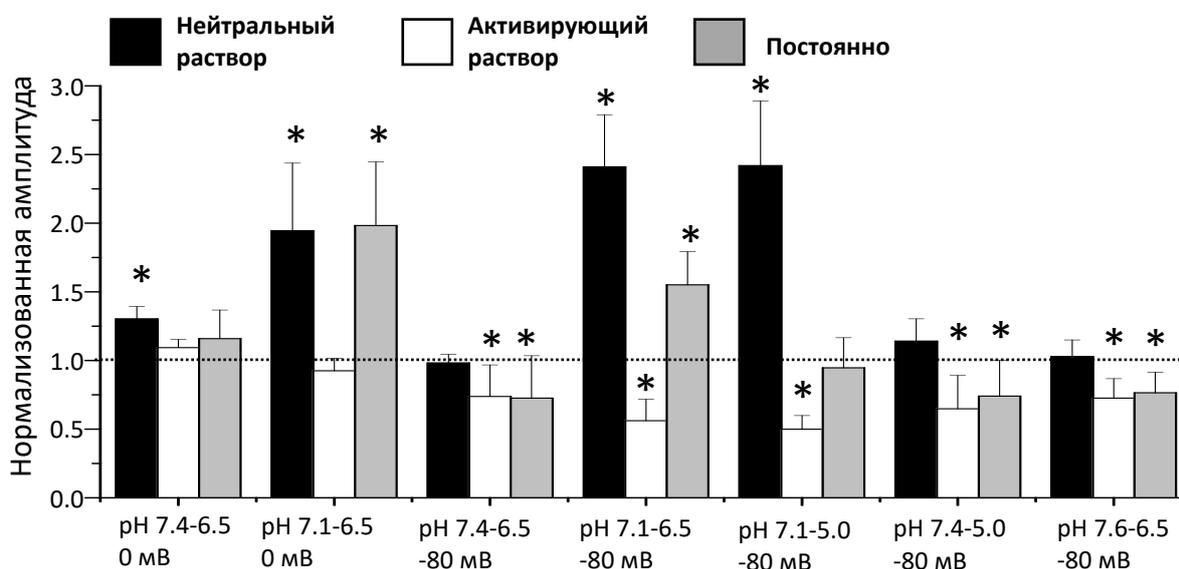


Рисунок 7. Взаимодействие экспериментальных параметров (протокола аппликации вещества, рН активирующего и нейтрального раствора и мембранного потенциала) с действием мемантина.

Действие гидрофобных моноаминов на каналы ASIC1a

На следующем этапе исследований было принято решение охарактеризовать действие более широкого круга гидрофобных моноаминов на ASIC1a с учётом данных, полученных в ходе описания активности мемантина. Таким образом первичный скрининг состоял из двух частей. В первой исследуемые вещества подавались в активирующем растворе с $pH=6.5$ (Рис. 8А). Результаты здесь в основном перекрывались с предыдущими статьями (Tikhonova et al., 2015, Nagaeva et al., 2016a, 2016b). Гистамин и IEM-2044 потенцировали амплитуду ответа, 9-аминоакридин - ингибировал. Из новых результатов - производные адамантана имели эффект, сходный с мемантином, с блокадой для IEM-2163 ($22\pm 22\%$, $n=6$) и IEM-2151 ($12\pm 20\%$, $n=5$) (Рис. 8А). Для них также было характерно изменение кинетики ответа и ускорение инактивации каналов, с появлением двухэкспоненциального спада (константы времени спада 227 ± 74 мс и 2197 ± 996 мс, $n=6$). Во второй части эксперимента было описано действие на десенситизированные каналы, с модуляторами, присутствовавшими в нейтральном растворе с $pH=7.1$. Масштабы эффектов здесь выросли на порядок,

независимо от типа действия вещества на активацию. Наиболее активным показал себя 9-аминоакридин, потенцировавший ответ на $1688 \pm 549\%$, $n=13$, фактически снимая эффект

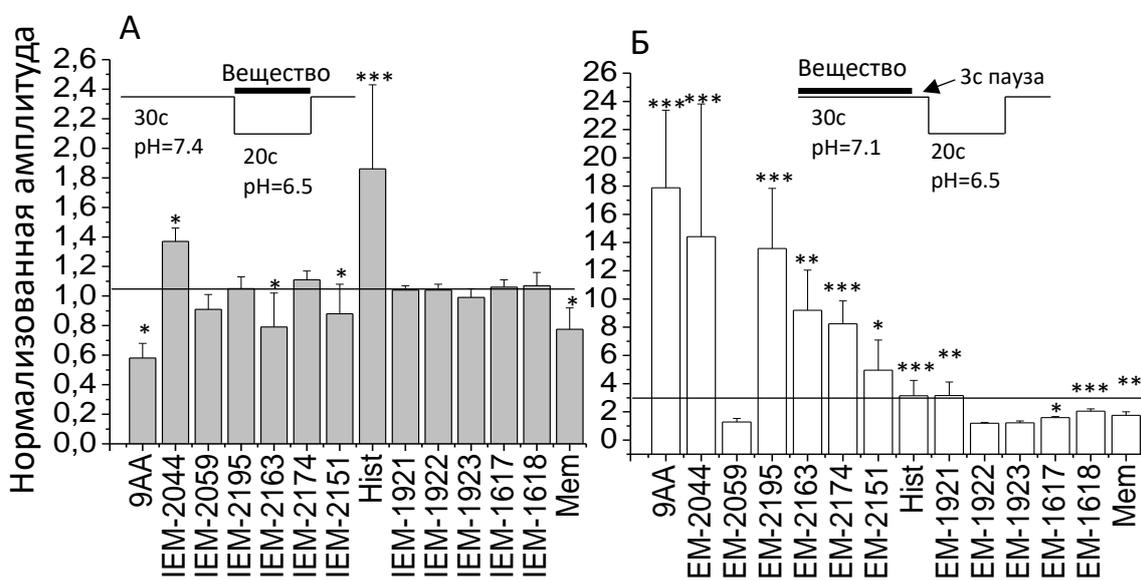


Рисунок 8. Действие гидрофобных моноаминов на активацию (А) и десенситизацию (Б) ASIC1a.

десенситизации. Важно отметить, что метилированные по аминогруппе аналоги гидрофобных моноаминов (IEM-2059 против IEM-2044, IEM-1922 и 1923 против 1921) теряли свою активность, как и в случае с их действием на активацию (Рис. 8Б).

Для определения механизмов действия для нескольких репрезентативных веществ был проведен анализ потенциал и рН зависимости (Рис. 9). Действие 9-аминоакридина и IEM-2044 пропадало при максимальной активации при рН=5.0, и не менялось под влиянием мембранного потенциала, указывая на сдвиг кривой активации (0.17 в кислотную сторону для 9aa и 0.35 в щелочную для IEM-2044). Для IEM-2163 была показана выраженная потенциал-зависимость, что ожидаемо для вещества, близкого по структуре к мемантину. Однако при использовании активирующего рН=5.0 его ингибирующий эффект возрастал по сравнению с 6.5. Такое поведение может объясняться взаимодействием двух эффектов - потенциал-зависимой блокады канала, и щелочным сдвигом кривой активации (оцененным в 0.26), который в обычных условиях маскируется ингибирующим действием.

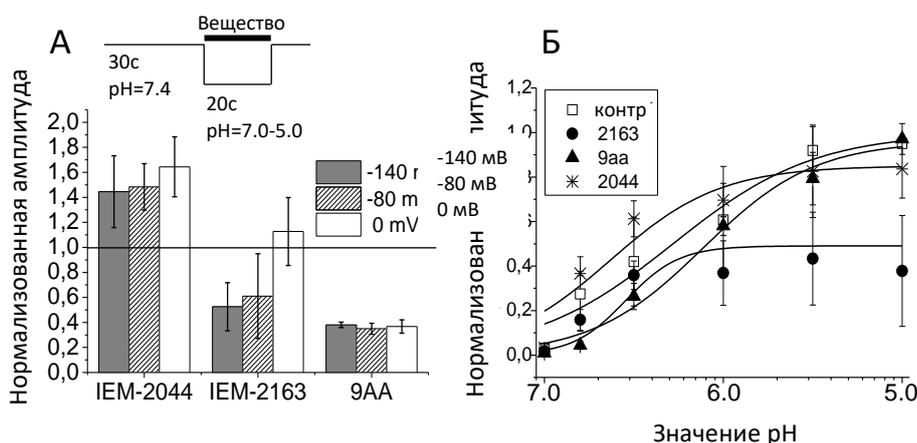


Рисунок 9. Потенциал (А) и pH (Б) зависимость действия гидрофобных моноаминов на активацию ASIC1a.

В свою очередь, действие гидрофобных моноаминов на десенситизированные каналы опосредуется кислотным сдвигом кривой десенситизации, аналогичным ранее показанному действию мемантина. Хотя нужно отметить, что величина эффекта для отдельных веществ (9-аминоакридин, IEM-2044) была в разы больше. Сдвиг pH50 кривой десенситизации для 9aa был оценен в 0.22, $EC_{50}=201.73 \pm 22.12$ мкМ, для IEM-2044 - в 0.08, $EC_{50}=824.31 \pm 101.89$ мкМ (Рис. 10).

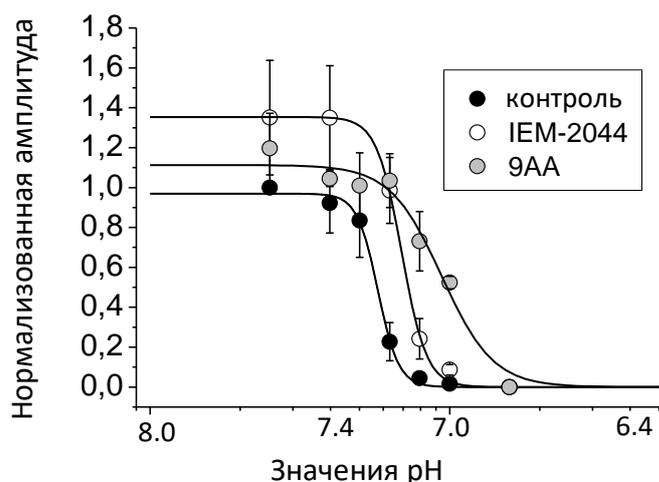


Рисунок 10. Сдвиг кривой десенситизации ASIC1a под действием гидрофобных моноаминов.

Действие гидрофобных моноаминов на каналы ASIC3

Так как ранее в наших работах ASIC3 практически не затрагивались, в первичный скрининг активности помимо гидрофобных моноаминов были также включены несколько модуляторов гистаминовых рецепторов и антидепрессантов, влиявших на другие типы протон-управляемых ионных каналов (Рис. 11). Также важно отметить нелинейную pH зависимость ответа ASIC3, из-за чего скрининг проводился с двумя значениями pH активирующего раствора, 6.85 и 6.0. Вещества присутствовали только в активирующем растворе в концентрации 500 мкМ. Исследуемые вещества влияли на оба компонента ответа, пиковый и постоянный токи. Для ответа при pH=6.85 было характерно ингибирование пикового компонента (с максимальным эффектом у IEM-

2195 $85 \pm 7\%$, $n=6$), за исключением IEM-2117, который потенцировал ответ на $42 \pm 21\%$ ($n=5$). Для постоянного компонента тока наоборот, типичной была потенциация (максимум для IEM-2117 $382 \pm 84\%$, $n=5$), кроме ингибиторов IEM-2151 ($29 \pm 4\%$, $n=5$) и IEM-2163 ($42 \pm 21\%$, $n=9$). При использовании активирующего раствора с $pH=6.0$ эффекты на пиковый компонент ответа фактически исчезли, тогда как действие на постоянный ток стало даже более выраженным, с потенциацией IEM-2117 достигавшей $498 \pm 96\%$ ($n=5$) и ингибированием IEM-2163 $54 \pm 23\%$ ($n=8$).

Потенцирование постоянного компонента тока сопровождалось замедлением инактивации каналов, с наиболее выраженным эффектом для IEM-2195, который менял константу времени спада с 462 ± 143 мс ($n=8$) в контроле до 4891 ± 1996 мс ($n=6$). На основании первичного скрининга можно заключить, что эффекты на пиковый и постоянный компоненты ответа независимы друг от друга (и, вероятно, опосредуются различными механизмами и/или сайтами связывания). Также для действия гидрофобных моноаминов на пиковый компонент характерна выраженная pH зависимость.

Для дальнейшего изучения были выбраны 2 вещества с сильным, противоположным действием, IEM-2163 и IEM-2195. Для обоих веществ была оценена pH зависимость действия - оба модулятора показали кислотный сдвиг $pH50$ кривой активации каналов на 0.09, объясняя их ингибирующее действие на пиковый компонент ответа. Также была произведена оценка концентрационной зависимости эффектов. В $pH=6.85$ фиттинг ингибирующего эффекта IEM-2195 на пик ответа с помощью уравнения Хилла даёт значения $IC_{50} = 21 \pm 15$ мкМ. В $pH=6.0$ мы не получили эффекта вплоть до концентрации в 1 мМ, при этом дальнейшее повышение концентрации приводило к нарушению стабильности гигаомного контакта и низкой выживаемости клеток. При этом действие на постоянный компонент удалось измерить с $EC_{50} = 784.2 \pm 122.8$ мкМ. Для IEM-2163 было показано значимое ингибирование обоих компонентов ответа при $pH=6.85$ ($IC_{50}=245.64 \pm 16.62$ мкМ для пика и 117.3 ± 5.6 мкМ для постоянного тока). Как и IEM-2195 это вещество не оказывало влияния на пик ответа в $pH=6.0$, однако эффект на постоянный компонент оказался довольно необычным. Вплоть до 1 мМ мы наблюдали ингибирование до $52 \pm 16\%$ ($n=5$), но при дальнейшем повышении концентрации возникал обратный эффект, с ростом постоянного тока на $84 \pm 111\%$ ($n=5$). Вероятной причиной подобного нелинейного поведения является сочетание двух независимых эффектов - сдвига pH -

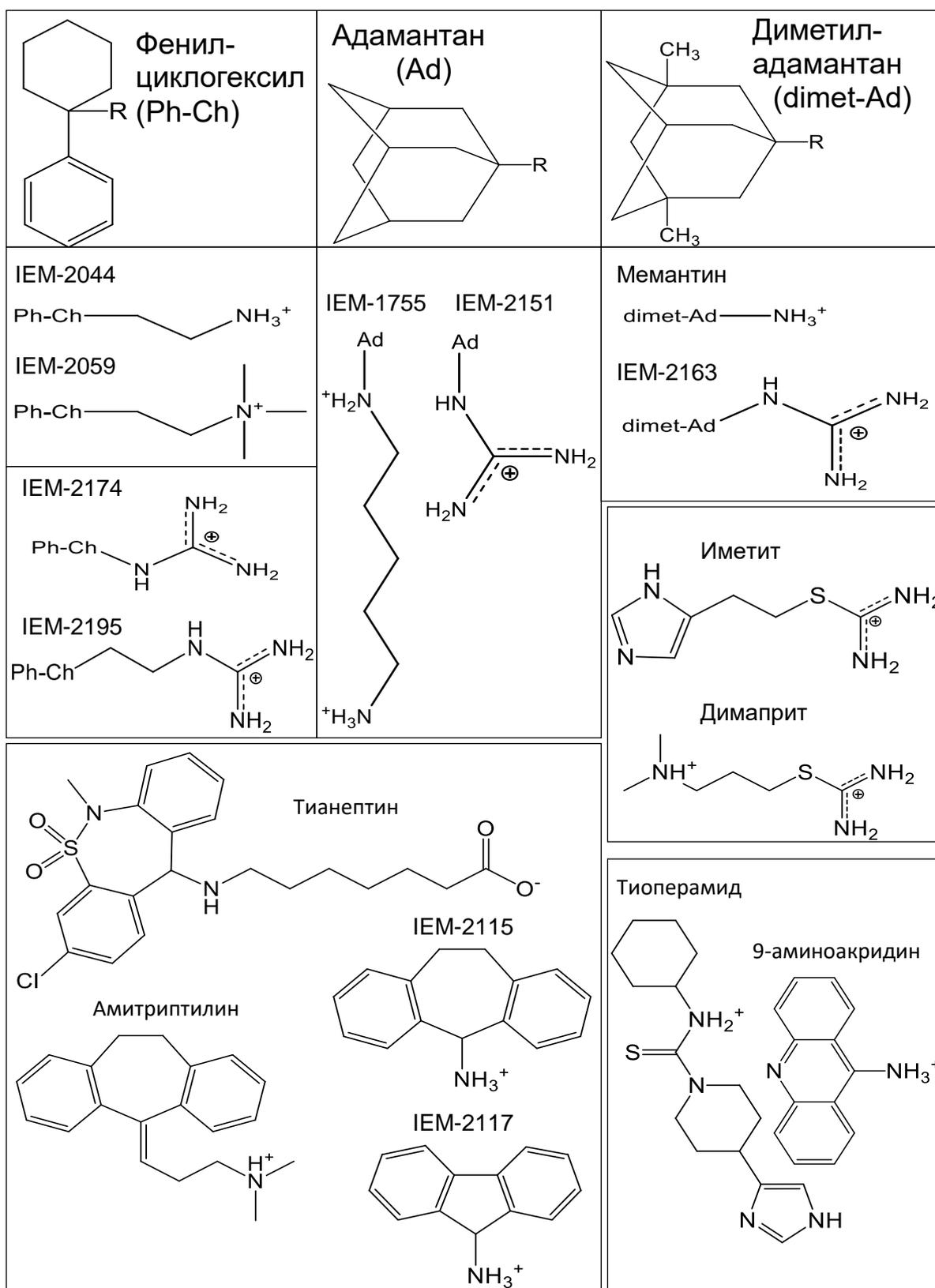


Рисунок 11. Структуры исследованных веществ. В первичный скрининг для ASIC3 были также включены модуляторы гистаминовых рецепторов и антидепрессанты.

зависимости активации каналов в низких концентрациях и замедление десенситизации при их повышении.

Экспериментируя с протоколами аппликации веществ, мы также установили, что для ингибирования пикового компонента при $pH=6.85$ вещества должны провзаимодействовать с открытой конформацией канала - подача модуляторов только в нейтральном растворе между активациями не приводило к снижению пика. Более того, для IEM-2163 этот протокол приводит к потенциации постоянного компонента тока ($143\pm 41\%$, $n=5$), тогда как в остальных случаях для него характерно ингибирование. Это также может указывать на независимость этих эффектов и более медленную кинетику потенцирующего компонента.

Развитие эффекта на постоянный ток также носило немонотонный характер. Ингибирование IEM-2163 было максимальным в первой аппликации, и постепенно уменьшалось для последующих ответов. Более того, в начале отмыва наблюдался дополнительный скачок амплитуды постоянного тока, который затем возвращался к контрольным значениям (Рис. 12). IEM-2195 имел только потенцирующий эффект, однако и для него наблюдался скачок амплитуду ответа в начале отмыва. Это может указывать на то, что быстрое ингибирование характерно для обоих веществ, однако в случае IEM-2195 оно маскируется более выраженным потенцирующим действием. В пользу этой гипотезы также говорит отсутствие скачка амплитуды при подаче вещества только в нейтральном растворе, где вещества практически не взаимодействовали с открытыми каналами и не могли вызвать быстрый ингибирующий эффект.

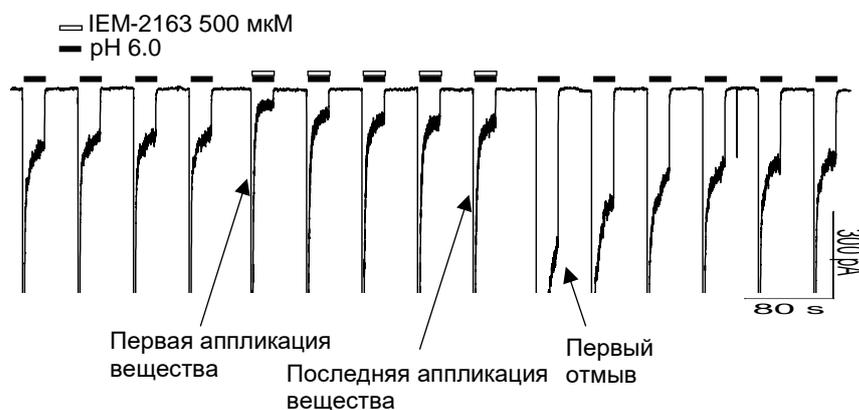


Рисунок 12.
Немонотонное развитие эффекта IEM-2163.

Наличие постоянного компонента в ответе ASIC3 позволяет также избежать прямого взаимодействия с активацией каналов. Для этого мы подавали исследуемые вещества в активирующем растворе уже после того, как ответ выходил на плато. В этом эксперименте также обнаружались неожиданные эффекты. Изменения амплитуды постоянного тока соответствовали нашим предыдущим результатам, но в момент подачи и отключения подачи растворов, содержащих IEM-2163 и IEM-2195, мы наблюдали дополнительные пики (Рис. 13). Мы предполагаем, что это продиктовано

быстрой кинетикой ингибирующего компонента действия веществ, что ведёт к изначальному выходящему току. Если каналы, с которыми связался модулятор, затем переходят в инактивированное состояние и удерживаются в нём, то по его удалению из раствора мы увидим дополнительный входящий пик. Для дополнительного входящего пика мы также измерили концентрационную зависимость, получив значения $EC_{50}=269.06\pm 15.35$ мкМ для IEM-2195 и $EC_{50}=319.69\pm 44.08$ мкМ для IEM-2163. Сходные дополнительные пики были также показаны для действия IEM-2044 и 9-аминокридина, но отсутствовали для IEM-1755 и 2059.

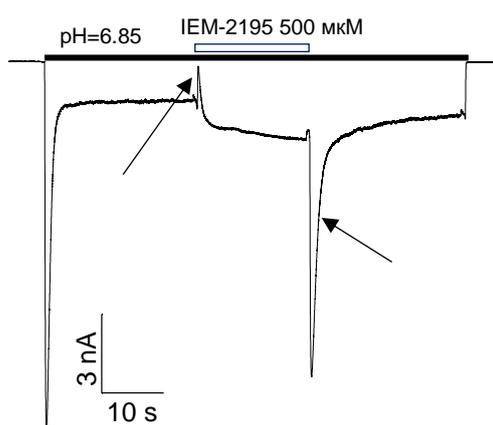


Рисунок 13. Дополнительные пики возникающие, при воздействии вещества на постоянный компонент ответа.

Предварительные данные по действию биологических модуляторов на ASIC1a

Используя данные, полученные на предыдущих этапах исследований, мы решили произвести поиск потенциальных лигандов протон-управляемых ионных каналов среди физиологических кандидатов. Одной из принципиальных проблем в изучении роли ASIC в синаптических процессах является низкая амплитуда протон-управляемых токов. Более того, несмотря на установленную роль ASIC в патологических процессах, остаётся невыясненным, как сохраняется их активность при длительном закислении среды. Например, в ходе развития ишемического процесса в мозге можно ожидать постепенного падения pH среды, который затем будет сохраняться на сниженном уровне длительное время. В этих условиях протон-управляемые ионные каналы должны переходить в десенситизированное состояние, минуя активацию.

Потенциальным объяснением для вышеописанных вопросов может быть присутствие во внутренней среде организма биологических модуляторов активности ASIC, потенцирующих амплитуду их ответов и предотвращающих десенситизацию. Вторая мода действия представлялась нам наиболее перспективной, исходя из наших

результатов по гидрофобным моноаминам. Складывалось странное впечатление, что для снятия десенситизации ASIC1a может быть использована едва ли не случайная низкомолекулярная органика, если у нее была незамещенная аминогруппа.

Таким образом, мы пришли к идее тестирования активности аминокислот на протон-управляемых ионных каналах. Работа была разделена на два основных этапа - первым была проверка медиаторных аминокислот в сравнительно высоких концентрациях. Учитывая синаптическую экспрессию ASIC в нейронах, локальная концентрация нейромедиаторов в синаптической щели может достигать нескольких мМ такой подход можно рассматривать как близкий к физиологическим условиям.

В первичный скрининг были включены глутамат, глицин и ГАМК. Также были протестированы синтетические агонисты глутаматэргических рецепторов каинат и NMDA. Для большинства из них не было обнаружено активности в концентрациях вплоть до 5 мМ, за исключением глутамата. Для него в концентрации 500 мкМ была показана потенциация амплитуды ответа в $45 \pm 15\%$ ($n=7$). Дальнейшее описание концентрационной зависимости позволило оценить значение $EC_{50}=648 \pm 365$ мкМ. Этот эффект был опосредован типичным сдвигом кривой активации в щелочную сторону с 6.28 ± 0.08 до 6.53 ± 0.19 (Рис.14).

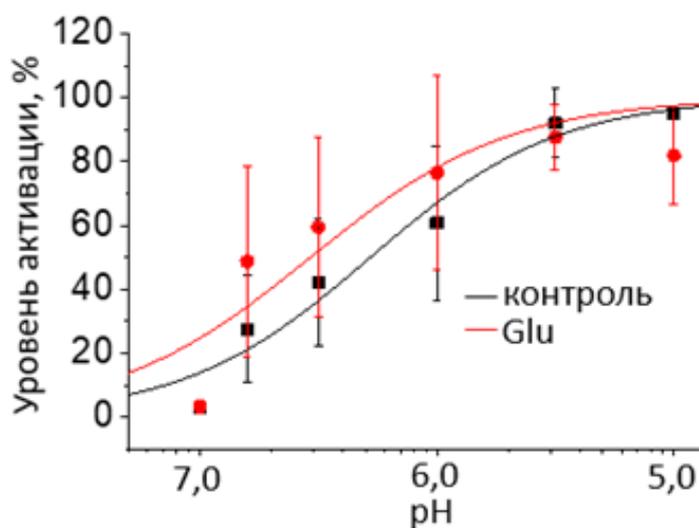


Рисунок 14. Сдвиг кривой активации ASIC1a под действием 500 мкМ глутамата.

Глутамат также вызывал незначительный сдвиг pH_{50} кривой десенситизации в кислую сторону на 0.03.

Также были протестированы основные аминокислоты, присутствующие в цереброспинальной жидкости. Среди них наибольшую активность продемонстрировал гистидин, действующий по тому же механизму сдвига кривой активации в щелочную сторону. Примечательно, что $EC_{50}=11.04 \pm 0.64$ мкМ (Рис. 15) примерно соответствует его концентрации в физиологических условиях.

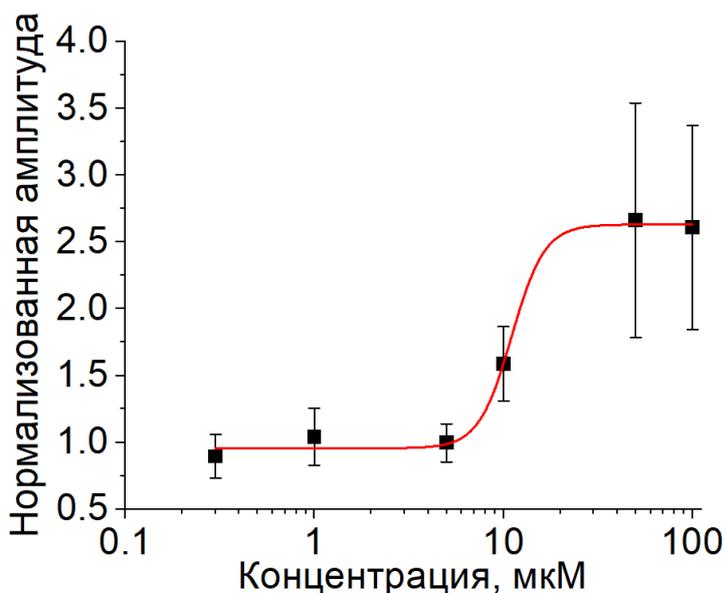


Рисунок 15. Концентрационная кривая действия гистидина на активацию ASIC1a.

Выводы

1. Модификации структуры гистамина, такие как 1-метилгистамин и N-а-метилгистамин, приводят к небольшому повышению эффективности действия вещества на каналы ASIC1a. Среди других лигандов гистаминовых рецепторов активность показали также потенциатор тиоперамид и ингибитор A943931, но в целом для их действия требовалась высокая концентрация. Вещества этой группы не действуют на гомомерные каналы ASIC2a.
2. Эффект мемантина на протон-управляемые ионные каналы ASIC1a состоит из двух компонентов. Первый из них - блок поры открытого канала, второй - сдвиг кривой десенситизации в кислотную сторону. Оба механизма могут действовать на канал одновременно и требуют использования специальных экспериментальных протоколов для их изоляции.
3. Для действия гидрофобных моноаминов и близких по структуре веществ на протон-управляемые каналы ASIC1a характерно сочетание двух независимых компонентов, влияющих на активацию и десенситизацию каналов. Эти компоненты действуют независимо друг от друга и могут быть противоположно направленными. Оба компонента действия подавляются при метилировании свободной аминогруппы исследуемого вещества.
4. За счёт перекрытия значений pH активации и десенситизации каналов ASIC3 полная изоляция компонентов действия, описанных для ASIC1a, затруднена. Тем не менее, полимодальное действие гидрофобных моноаминов можно установить за счёт различной кинетики эффектов активации и десенситизации.

5. Среди исследованных аминокислот и аминокислотных медиаторов наибольшую эффективность на каналах ASIC1a показали глутамат и гистидин. Оба вещества потенцируют амплитуду ответа каналов за счёт сдвига кривой активации в щелочную сторону, с небольшим эффектом на десенсibilизацию. Оба модулятора действуют в физиологических концентрациях и потенциально могут участвовать в регуляции активности ASIC in vivo.

Список публикаций по теме работы

Статьи:

1. V.Y. Shteinikov, A.S. Korosteleva, T.B. Tikhonova, N.N. Potapieva, D.B. Tikhonov. Ligands of histamine receptors modulate acid-sensing ion channels. // *Biochemical and Biophysical Research Communications*, V. 490, Issue 4, 2017, Pages 1314-1318.
2. V.Y. Shteinikov, T.B. Tikhonova, V.S. Korkosh, D.B. Tikhonov. Potentiation and block of ASIC1a by memantine. // *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2018, V. 38, Issue 4, Pages 869-881
3. V.Y. Shteinikov, O.I. Barygin, V.E. Gmiro, D.B. Tikhonov. Multiple modes of action of hydrophobic amines and their guanidine analogues on ASIC1a. // *European Journal of Pharmacology*, 2019, V. 844, Pages 183-194.
4. V.Y. Shteinikov, N.N. Potapieva, V.E. Gmiro, D.B. Tikhonov. Hydrophobic amines and their guanidine analogues modulate activation and desensitization of ASIC3. // *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, V. 20, Article 1713.

Тезисы:

1. Shteinikov V., Tikhonov D. Modes and mechanism of memantine action on ASIC1a channels. // FENS Regional Meeting, Pecs, Hungary. – 2017.
2. Евланенков К.К., Штейников В.Ю. Влияние нейромедиаторов на активность протон-управляемых ионных каналов. // XXII Международная медико-биологическая конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье» - 20 апреля 2019 г., Санкт-Петербург – 2019 – С.178-179.

Список цитируемой литературы:

1. Bilkei-Gorzo, Andras, Susanne Erk, Britta Schürmann, Daniela Mauer, Kerstin Michel, Henning Boecker, Lukas Scheef, Henrik Walter, and Andreas Zimmer. “Dynorphins Regulate Fear Memory: From Mice to Men.” *The Journal of Neuroscience* 32, no. 27 (2012): 9335–43.
2. Cheng, Yuan-Ren, Bo-Yang Jiang, and Chih-Cheng Chen. “Acid-Sensing Ion Channels: Dual Function Proteins for Chemo-Sensing and Mechano-Sensing.” *Journal of Biomedical Science* 25, no. 1 (2018): 46.
3. Cristofori-Armstrong, Ben, and Lachlan D. Rash. “Acid-Sensing Ion Channel (ASIC) Structure and Function: Insights from Spider, Snake and Sea Anemone Venoms.” *Neuropharmacology, Venom-derived Peptides as Pharmacological Tools*, 127 (2017): 173–84.
4. Du, Jianyang, Leah R. Reznikov, Margaret P. Price, Xiang-ming Zha, Yuan Lu, Thomas O. Moninger, John A. Wemmie, and Michael J. Welsh. “Protons Are a Neurotransmitter That Regulates Synaptic Plasticity in the Lateral Amygdala.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, no. 24 (2014): 8961–66.

5. González-Inchauspe, Carlota, María Natalia Gobetto, and Osvaldo D. Uchitel. "Modulation of Acid Sensing Ion Channel Dependent Protonergic Neurotransmission at the Mouse Calyx of Held." *Neuroscience* 439 (2020): 195–210.
6. Hesselager, Mette, Daniel B. Timmermann, and Philip K. Ahring. "PH Dependency and Desensitization Kinetics of Heterologously Expressed Combinations of Acid-Sensing Ion Channel Subunits." *Journal of Biological Chemistry* 279, no. 12 (2004): 11006–15.
7. Kellenberger, Stephan, and Laurent Schild. "International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCI. Structure, Function, and Pharmacology of Acid-Sensing Ion Channels and the Epithelial Na⁺ Channel." *Pharmacological Reviews* 67, no. 1 (2015): 1–35.
8. Krishtal, O. A., and V. I. Pidoplichko. "A Receptor for Protons in the Nerve Cell Membrane." *Neuroscience* 5, no. 12 (1980): 2325–27.
9. Nagaeva, Elina I., Natalia N. Potapieva, Maxim V. Nikolaev, Valery E. Gmiro, Lev G. Magazanik, and Denis B. Tikhonov. "Determinants of Action of Hydrophobic Amines on ASIC1a and ASIC2a." *European Journal of Pharmacology* 788 (2016a): 75–83.
10. Nagaeva, Elina I., Tatiana B. Tikhonova, Lev G. Magazanik, and Denis B. Tikhonov. "Histamine Selectively Potentiates Acid-Sensing Ion Channel 1a." *Neuroscience Letters* 632 (2016b): 136–40.
11. Tikhonov, D. B., L. G. Magazanik, and E. I. Nagaeva. "Ligands of Acid-Sensing Ion Channel 1a: Mechanisms of Action and Binding Sites." *Acta Naturae* 11, no. 1 (2019): 4–13.
12. Tikhonova, Tatiana B., Elina I. Nagaeva, Oleg I. Barygin, Natalia N. Potapieva, Konstantin V. Bolshakov, and Denis B. Tikhonov. "Monoamine NMDA Receptor Channel Blockers Inhibit and Potentiate Native and Recombinant Proton-Gated Ion Channels." *Neuropharmacology* 89 (2015): 1–10.
13. Waldmann, R., G. Champigny, F. Bassilana, C. Heurteaux, and M. Lazdunski. "A Proton-Gated Cation Channel Involved in Acid-Sensing." *Nature* 386, no. 6621 (1997): 173–77.
14. Wemmie, John A., Candice C. Askwith, Ejvis Lamani, Martin D. Cassell, John H. Freeman, and Michael J. Welsh. "Acid-Sensing Ion Channel 1 Is Localized in Brain Regions with High Synaptic Density and Contributes to Fear Conditioning." *The Journal of Neuroscience* 23, no. 13 (2003): 5496–5502.
15. Wemmie, John A., Rebecca J. Taugher, and Collin J. Kreple. "Acid-Sensing Ion Channels in Pain and Disease." *Nature Reviews. Neuroscience* 14, no. 7 (2013): 461–71.
16. Wiemuth, Dominik, Marc Assmann, and Stefan Gründer. "The Bile Acid-Sensitive Ion Channel (BASIC), the Ignored Cousin of ASICs and ENaC." *Channels* 8, no. 1 (2014): 29–34.