

УДК 573.7:612.603

О. В. Жук^{1,2}, д-р біол. наук, проф., **В. Г. Зіньковський**^{1,2}, д-р біол. наук, пров. наук. співроб., **О. А. Станкевич**¹, канд. хим. наук, ст. наук. співроб., **М. С. Жук**¹, канд. біол. наук, мол. наук. співроб.

¹ Одеський національний університет ім. І. І. Мечникова, ПНДЛ-5, вул. Дворянська, 2, Одеса, 65026, Україна;

² Опольський університет, кафедра молекулярної та експериментальної біології, вул. Камінки, 4, Ополь, 45564, Польща

ДОСЛІДЖЕННЯ І МОДЕЛЮВАННЯ ПРОЦЕСІВ МОДУЛЯЦІЇ IN VITRO ГАМК-ЕРГІЧНИХ НЕЙРОНІВ ЗВОРОТНИМИ АГОНІСТАМИ. І. ОБҐРУНТУВАННЯ КІНЕТИЧНОЇ СХЕМИ

Обґрунтована кінетична схема взаємодії ГАМК-рецепторних комплексів ((ГАМК-рк) з γ -аміномасляною кислотою і екзогенними лігандами, що є теоретичною основою інтерпретації результатів дослідження процесів модуляції in vitro ГАМК-ергічних нейронів зворотними агоністами. Визначено основні фази динаміки змін іонного струму нейронів, що індукується прикладенням різних лігандів ГАМК-рк і проведено порівняння з теоретичною кінетичною схемою рецепторно — лігандної взаємодії.

Ключові слова: ГАМК-рецепторний комплекс, екзогенні ліганди, кінетика взаємодії, нейрони клітин Пуркін'є.

Дослідження у галузі нейрофармакології та нейрофізіології дозволили висунути і обґрунтувати принципові положення про провідне значення дефіциту гальмівних амінокислот у розвитку ряду патологічних станів ЦНС, таких як епілепсія, афективні розлади, пресинильна деменція, хвороба Паркінсона, хорея Гентингтона [1–3]. Привалююче положення отримала концепція про основоположну роль ГАМК_A — медіаторної системи у механізмах розвитку ряду патологій [4, 5].

За дослідження ефектів біологічно активних сполук електрофізіологічними методами, як і за інших фармакологічних підходів, вивчаються якісні і кількісні характеристики рецепторно-лігандної взаємодії, тому що фармакологічна відповідь цілісного організму є наслідком процесів, що відбуваються на молекулярному рівні [6].

Мета даного дослідження полягає в теоретичному обґрунтуванні кінетичної схеми механізмів і кінетики взаємодії ГАМК, ГАМК_A-рецепторно-іонофорних комплексів (ГАМК-рк) і фізіологічно активних лігандів (М) на підставі вивчення характеристик процесів дії зворотних агоністів на мембранні рецептори ГАМК-медіаторної системи. Цифрові дані отримували шляхом виміру макроскопічних струмів, що реєструються від цілої клітини (нейронів клітин Пуркін'є).

Теоретичне обґрунтування кінетичної схеми взаємодії ГАМК-рк з γ -аміномасляною кислотою і екзогенними лігандами

Для обґрунтування механізмів і кінетики взаємодії ГАМК (G), ГАМК_A-рецепторно-іонофорних ансамблів (ГАМК-рк – R) і фізіологічно активних лігандів — модифікаторів функціонування R (M) пропонуємо схему, представлену на рис. 1.

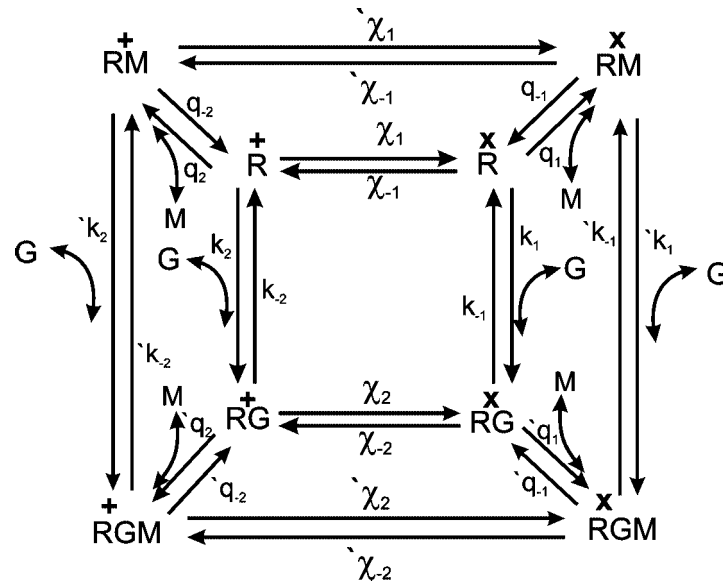


Рис. 1. Кінетична схема взаємодії ГАМК-рецепторно-іонофорних ансамблів (R) з γ -аміномасляною кислотою (G) і екзогенними лігандами (M) з утворенням рецепторно-медіаторних (RG), рецепторно-лігандних (RM) і рецепторно-медіаторно-лігандних комплексів (RGM).

Примітка: R і його комплекси з G і M утворюють дві (альтернативні) конформації — з високою провідністю іонофору (позначено надстрокою знаком "x") і низкою (позначене "+"). Константи швидкості (процеси першого порядку) конформаційної конверсії позначені літерою капша — "χ" з відповідними підрядковими індексами і нарядковими значками. Процеси утворення і розпаду рецепторно-медіаторного комплексу характеризуються константами швидкості, позначеними літерами "k" з відповідними індексами. Константи швидкості утворення рецепторно-лігандних комплексів позначено літерами "q".

Ця кінетична схема є марківською і допускає реалізацію в ній тільки одиничних незалежних подій [7]. Застосування марківських кінетичних схем для інтерпретації процесів функціонування ГАМК-рк є ефективним і необхідним, бо, як було показано раніше [8–10], одиничні комплекси ГАМК із ГАМК-рецептором [RG] існують у двох альтернативних станах: з низькою хлорною провідністю іонофору (RG^+)

і високою його провідністю ($R G^x$) (2, 4 п). З'єднання агоністів з комплексом ГАМК-ГАМК-рецептор також існують у двох функціональних станах ($R G M^+$ і $R G M^x$) з низькою і високою провідністю іонофору.

Тоді фармакологічні ефекти екзогенних лігандів є наслідком:

а) відмінностей у ймовірності перебування $R G$ і $R G M$ у станах з низькою і високою провідністю. В умовах рівноваги:

$$\frac{[R G^x]}{[R G^+]} = \frac{\chi_2}{\chi_{-2}} < \frac{[R G M^x]}{[R G M^+]} = \frac{\chi_2}{\chi_{-2}},$$

провідність мембрани (нейрона) у присутності M зростає;

б) розходжень у швидкостях конкуруючих процесів утворення комплексів $R G^x$ і $R G^+$ з R^x і R^+ , а також $R G M^x$ і $R G M^+$ з $R M^x$ і $R M^+$.

Якщо припустити, що процеси конверсії $R^x \rightleftharpoons R^+$ і $R M^x \rightleftharpoons R M^+$, що обумовлені величинами констант $\chi_1, \chi_{-1}, \chi_1'$ і χ_{-1}' мають малі характеристичні часи (τ_1 і τ_1'): $\tau_1 = (\chi_1 + \chi_{-1})^{-1} \ll (\chi_2 + \chi_{-2})^{-1} = \tau_2$ і $\tau_1' = (\chi_1' + \chi_{-1}')^{-1} \ll (\chi_2' + \chi_{-2}')^{-1} = \tau_2'$, що обґрунтовано експериментально [6], то в інтервалах часу (t) від $t \gg \tau_1$ до $t \ll \tau_2$ і $t \gg \tau_1'$ до $t \ll \tau_2'$ при $M \rightarrow \infty$:

$$[R G^x] \approx [R_0] \frac{k_1}{k_1 + k_2}$$

$$[R G M^x] \approx [R_0] \frac{k_1}{k_1 + k_2}.$$

Якщо відносна ефективність першого процесу ($k_1/(k_1+k_2)$) менша, ніж другого, то після додавання в середовище ГАМК у присутності ліганда (M) провідність нейронної мембрани зростає більш значно. Цей ефект кінетичний, при тривалій експозиції ($t \geq \tau_2, t \geq \tau_2'$) провідність визначається тільки величинами констант конформаційної конверсії (див. пункт "а").

Раніше припускали, що ГАМК-рк у відсутності ГАМК у середовищі представлений тільки формою з низькою провідністю іонофору і на цьому засновували "немарківське" моделювання [11], однак недавно були виконані експериментальні дослідження кінетики ГАМК-рецептора з реєстрацією його функціональних станів [6], що дає можливість провадити аналіз кінетики цих процесів у відповідності зі схемою, представленою на рис. 1.

Використання найбільш простих біофізичних (молекулярно-біологічних) експериментальних моделей — розімкнених клітинних мембран,

що містять рецепторно-іонофорні комплекси (метод "patch clamp"), дозволяє досліджувати безпосередньо величину іонного струму крізь іонофор [1, 12]. Особливостями методу є відсутність зміни різниці потенціалів і концентрації досліджуваного компонента (іонів хлору) у розчинах з обох сторін мембрани в інтервалі досліджу. У зв'язку з цим величина іонного струму прямопропорційна провідності мембрани (величині, обернено пропорційній її опору). Вимірюючи величини хлорного струму, можна безпосередньо визначати зміни кількості рецепторно-іонофорних комплексів у формі з високою провідністю іонофору за окремих і сумісних впливів на них різних концентрацій медіаторів і екзогенних лігандів [1]. Нейрон, що переживає, функціонує в умовах, відхилених від стану концентраційної рівноваги між внутрішнім вмістом і вмістом іонів у навколишньому середовищі [11] і енергозатратно, з постійною швидкістю (припустимо, що ця умова зберігається в інтервалі досліджу) транспортує у внутрішнє середовище ті іони, які без затрат енергії виділяються у зовнішнє середо-

вище через іонофори з високою провідністю (R^x , $R^x G$, $R^x G M$) [13–15]. Після прикладання (аплікації) до нейронів медіатора (ГАМК), який взаємодіє з рецепторно-іонофорною системою у внутрішньому середовищі нейрона, знижується вміст часток (іонів Cl^-), що виділяються в зовнішнє середовище через іонофори. Тому в процесі досліджу величину струму, який реєструється, тільки умовно можна вважати прямопропорційною провідності мембрани. В дійсності відбувається процес "десенситизації" нейрона, в основі механізму якого лежить обмеженість об'єму клітини і пов'язані з цим відхилення вмісту компонентів клітини від їх концентраційної рівноваги із середовищем, а також обмежена швидкість енергозатратного надходження іонів усередину клітини [6]. З іншого боку, якщо дослідження методом "patch clamp" є найбільш цінним (прямим) способом визначення механізмів взаємодії R, G і різних M, то дослідження провідності переживаючих нейронів демонструють кінетику наслідків аплікації G і різних M до функціонуючих клітин, тобто лежать в основі інтерпретації фармакологічних ефектів.

У зв'язку зі сказаним, необхідний узагальнений опис у термінах кінетичної схеми, представленої на рис. 1, наслідків взаємодії R, G і різних M як за умов "patch clamp", так і за умов переживаючих нейронів. Необхідним етапом є попередній аналіз динаміки іонного струму нейронів, індукованого прикладанням різних лігандів ГАМК-рецепторно-іонофорних ансамблів (рис. 2 а, б), і визначення основних фаз процесів, що спостерігаються, шляхом зіставлення з процесами, представленими на рис. 1.

Позначимо на рис. 2 п'ять основних фаз зміни величини іонного струму, індукованого застосуванням ГАМК:

I — іонний струм, що реєструють до прикладання ГАМК, використовується в дослідженнях як контрольна (базова) величина;

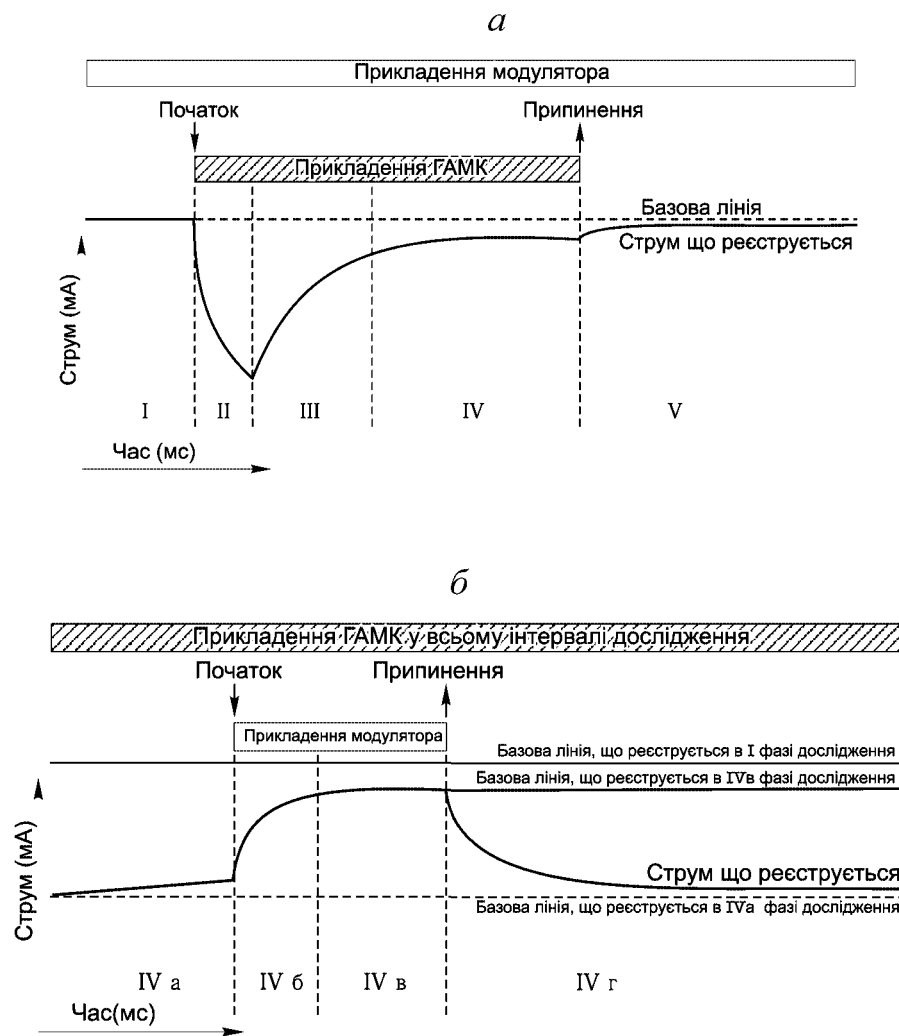


Рис. 2. Принципова схема дослідження зміни величини іонного струму нейрона Пуркін'є, індукованого розчином ГАМК

- II — зростаючий експонентно іонний струм внаслідок утворення частки RG^x . Експонентний множник процесу дорівнює величині $\{[G_i(k_1 + k_2) + k_{-1} + k_{-2}] \approx (G_i k_1 + k_{-1})$ [6], де G_i — i -тая концентрація застосованої ГАМК.
- III — іонний струм, що швидко (експонентно) знижується, обумовлений процесом конформаційної (рівноважної) конверсії часток: $RG^+ \rightleftharpoons RG^x$. Експонентний множник процесу дорівнює: $(\chi_2 + \chi_{-2})$. На межі фаз II й III спостерігається максимальна величина іон-

ного струму, яка дорівнює приблизно

$$\left\{ R_0 \left(\frac{k_1}{k_1+k_2} \right) \left[\frac{(k_1+k_2)G_1}{(\chi_2+\chi_{-2})} \right] \cdot \frac{\chi_2+\chi_{-2}}{G_1(k_1+k_2)-(\chi_2+\chi_{-2})} \right\},$$

де R_0 — кількість ГАМК-ре-

цепторів у досліджуваному об'єкті;
 IV — фаза "фізіологічної десенситизації" нейрона (у дослідженнях провідності розімкнених мембран нейронів (patch clamp) — не спостерігається, обумовлена зміною (підвищенням) CL — провідності (відносно вихідної у фазі I) нейрональної мембрани, внаслідок присутності в ній рівноважної кількості комплексів ГАМК-рецепторно-іонофорних ансамблів з ГАМК у стані з високою провідністю іонофору (RG^x);

V — фаза експонентного зниження струму після припинення прикладення розчину ГАМК — визначається процесом дисоціації часток, експонентний множник дорівнює (k_{-1}).

Якщо прикладення до нейрона ГАМК здійснюється на тлі попереднього застосування екзогенного ліганду (M_1), то ГАМК-рк (частки R^+

і R^x) попередньо взаємодіє з M_1 , утворюючи RM^+ і RM^x . Якщо цей процес швидкий, тобто $(M_1(q_1+q_2)+q_{-1}+q_{-2})^{-1} \ll$ інтервалу часу між прикладаннями M_1 і G_1 , то у фазах II–V присутні переважно частки

RM^x , RM^+ , RMG^+ і RMG^x . Отже, для опису фаз II–V необхідно у вищевикладеному поясненні замінити усі величини констант швидкостей (наприклад, k_1 , χ_{-1} і т. д.) на відповідні, але позначені надрядковим знаком "штрих" (наприклад, k_1' , χ_{-1}' і т. д.). Якщо процес утворення

RM^x і RM^+ повільний, то це може бути визначене і кількісно оцінене внаслідок послідовних, виконаних через визначені часові інтервали, аплікацій розчинів ГАМК.

Наступна експериментальна модель (рис. 2 б) полягала в аплікації до нейронів Пуркін'є розчинів різних екзогенних лігандів — зворотних агоністів ГАМК-медіаторної системи (пікротоксину, бензпеніциліну, бемегріді, бензофенону та ін.) у четвертій фазі зміни ГАМК-індукованого струму. Передбачається, що безпосередньо перед прикладенням лігандів (фаза IVа) ГАМК-рецепторний комплекс знаходиться в стані,

близькому до стану рівноваги конформерів RG^+ і RG^x . З моменту прикладення зворотного агоніста (M) (фаза IVб) починають утворюватися його комплекси з RG^+ і RG^x — RMG^+ і RMG^x . Якщо константи швидко-

стей конформаційної конверсії процесу $RGM^+ \xrightleftharpoons[\chi_{-2}]{\chi_2} RG^xM^x$ відмінні від

таких у вихідному процесі $RM^+ \xrightleftharpoons[\chi_{-2}]{\chi_2} RM^x$, (наприклад, $\frac{\chi_2}{\chi_{-2}} < \frac{\chi_2}{\chi_{-2}}$), то

сумарна кількість рецепторно-лігандних комплексів, представлених формами (RG і $\bar{R}G$), в інтервалі IVб фази знижується експонентно (експонентний множник дорівнює: $(M_1 / (q_1 + q_{-1}))$). Якщо концентрація зворотного агоніста (M_1) є високою [$(M_1 / (q_{-1} / q_1)) \gg R_0$], то в нейрональній мембрані практично всі ГАМК-рецепторні комплекси представлені структурами RMG і $\bar{R}MG$.

У зв'язку з цим, на підставі оцінки величин хлорного струму, що реєструється до прикладення ГАМК, в IVа і в IVв фази, можна визначити ступінь впливу зворотного агоніста на конформаційні стани ГАМК-рк нейронів.

Імовірність перебування комплексу ГАМК-рецепторно-іонофорного ансамблю з ГАМК (RG) у стані $\bar{R}G$ складає $(\chi_2 / (\chi_2 + \chi_{-2}))$, а RMG у стані — $(\bar{\chi}_2 / (\bar{\chi}_2 + \bar{\chi}_{-2}))$ прямопропорційна величинам струму в IVа й IVв фазах відповідно.

Після припинення прикладення ліганда до нейрона комплекси RMG і $\bar{R}MG$ дисоціюють, внаслідок чого струм, що реєструється, зростає експоненційно, з константою швидкості процесу рівною q_{-1} .

Зазначена кінетична схема і основні фази динаміки змін іонного струму нейронів, що індукуються прикладенням різних лігандів ГАМК-рк, є теоретичною основою для інтерпретації результатів експериментальних досліджень.

Література

1. *Fundamental Neuroscience*. Eds. Zigmond M. J., Bloom F. E., Landis S. C., Roberts J. L., Squire L. R. — San Diego: Academic Press, 1999. — 1600 p.
2. Макулькин Р. Ф. Механизм образования и ликвидации комплексов эпилептической активности в коре головного мозга. — Автореф. дис. д-ра. мед. наук. — М.: 1982. — 33 с.
3. Chebib M., Johnston G. A. GABA — activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology // *J. Med. Chemistry*. — 2000. — V. 43 (8). — P. 1427–1447.
4. GABA: Receptor, Transporters and Metabolism. Eds. C. Tanaka, N. G. Bowery. Birkhauser Vollerlag. Bastl — Bjston — Berlin, 1999 — 228 p.
5. Шандра А. А., Годлевский Л. С., Брусенцов А. И. Киндлинг и эпилептическая активность. — Одеса: Астропринт, 1999. — 275 с.
6. Зиньковский В. Г., Головенко Н. Я., Жук О. В. и др. Фармакологічний аналіз рецепторно-лігандної взаємодії. — К.: Академперіодика, 2001. — 208 с.
7. Рубин А. Б. Биофизика. Кн. 1 Теоретическая биофизика. — М.: Высшая школа, 1987. — 319 с.
8. Mohler H., Richards J. C. Benzodiazepine receptor // *Neuropharmacol.* — 1984. — V. 23, № 2. — P. 233–242.
9. Rastogi S. K., Ticku M. K. Anticonvulsant profile of drugs which facilitate GABAergic transmission on convulsions mediated by a GABA-ergic mechanism // *Neuropharmacology*. — 1986 — V. 25. — P. 175–185.
10. Tober C, Loscher W., Honack D., Bartsch R. AWD 140–190: a potent anticonvulsant in the amygdale — kindling model of partial epilepsy // *Epilepsia*. — 2001. — V. 42(5). — P. 590–599.

11. Галактионов С. Т., Голубович В. П., Шендерович М. Д., Ахрем А. А. Введение в теорию рецепторов. — Минск: Наука, 1986. — 286 с.
12. Akaike N., Inoue M, Krishtal O. A. "Concentration-clamp" study of gamma-aminobutyric acid-induced chloride current kinetics in frog sensory neurones // J. Physiol. — 1986 — V. 379. — P. 171–185.
13. Комиссаров И. В. Механизмы химической чувствительности синаптических мембран. — К.: Наукова думка, 1986 — 240 с.
14. Костюк П. Г., Крышталъ О. А. Механизмы электрической возбудимости нервной клетки. — М.: Наука, 1981. — 204 с.
15. Биофизика. — К.: Вища школа, 1988. — 503 с.

О. В. Жук^{1,2}, **В. Г. Зиньковский**^{1,2}, **О. А. Станкевич**¹, **М. С. Жук**¹

¹ Одесский национальный университет им. И. И. Мечникова, ПНИЛ-5,
ул. Дворянская, 2, Одесса, 65026, Украина;

² Опольский университет,
кафедра молекулярной и экспериментальной биологии,
ул. Каминка, 4, Ополе, 45564, Польша.

ИССЛЕДОВАНИЕ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ МОДУЛЯЦИИ IN VITRO ГАМК-ЭРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ОБРАТНЫМИ АГОНИСТАМИ. I. ОБОСНОВАНИЕ КИНЕТИЧЕСКОЙ СХЕМЫ

Резюме

Обоснована кинетическая схема взаимодействия ГАМК-рецепторных комплексов (ГАМК-рк) с γ -аминомасляной кислотой и экзогенными лигандами, являющаяся теоретической основой интерпретации результатов исследования процессов модуляции *in vitro* обратными агонистами ГАМК-эргических нейронов. Определены основные фазы динамики изменений ионного тока нейронов, индуцируемые приложением различных лигандов ГАМК-рк и проведено сравнение с теоретической кинетической схемой рецепторно-лигандного взаимодействия.

Ключевые слова: ГАМК-рецепторный комплекс, экзогенные лиганды, кинетика взаимодействия, нейроны клеток Пуркинью.

O. V. Zhuk^{1,2}, **V. G. Zinkovsky**^{1,2}, **E. A. Stankevich**¹, **M. S. Zhuk**¹

¹ Odessa National University after I. I. Mechnikov, PSRL-5,
Dvoryanskaya St., 2, Odessa, 65026, Ukraine.

² University of Opole, Department of Molecular Biology,
Kominki str., 4, Opole, 45564, Poland

RESEARCH AND MODELLING OF PROCESSES OF MODULATION IN VITRO GABA-ERGIC NEURONES BY THE INVERSE AGONISTES. I. A SUBSTANTIATION OF THE KINETIC SCHEME

Summary

The kinetic scheme of interaction GABA-reception of complexes (GABA-rk) with γ -aminobutyric acid and exogenic ligands which is a theoretical basis of interpretation of results of research of processes modulation *in vitro* GABA neurons the inverse

agonists is proved. The basic phases of dynamics of changes of an ionic current neurons are determined, defiant the appendix various ligands of GABA-rk and comparison with the theoretical kinetic scheme receptor-ligands interactions carry out.

Keywords: GABA-receptors complex, exogenic ligand, kinetic interactions, neurons of cells Purkinie.