

УДК 573.7:612.603

М. В. Копаница¹, канд. біол. наук, наук. співроб., **О. В. Жук**^{2,3}, д-р біол. наук, проф., пров. наук. співроб., **В. Г. Зіньковський**^{2,3}, д-р біол. наук., пров. наук. співроб., **О. А. Станкевич**², канд. хим. наук, ст. наук. співроб., **М. С. Жук**², канд. біол. наук, мол. наук. співроб.

¹ Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця, відділ клітинної мембранології, вул. Богомольця, 4, Київ, 01024, Україна;

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

³ Опольський університет, кафедра молекулярної та експериментальної біології, вул. Камінка, 4, Опольце, 45564, Польща.

ДОСЛІДЖЕННЯ І МОДЕЛЮВАННЯ ПРОЦЕСІВ МОДУЛЯЦІЇ IN VITRO ГАМК-ЕРГІЧНИХ НЕЙРОНІВ ЗВОРОТНИМИ АГОНІСТАМИ. II. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ

З'ясовували механізми і кінетику взаємодії зворотніх агоністів з ГАМК-рецепторними комплексами (ГАМК-рк) із використанням для їх інтерпретації марківських кінетичних схем. За дослідження ГАМК-залежних струмів нейронів (клітин Пуркінє) показано, що пеніцилін і бемегрид є лігандами з низькою спорідненістю, що неселективно взаємодіють як з рецептором, так і з його комплексом з ГАМК, а пікротоксин і 5-орто-2'-хлор-2-амінобензофенон, утворюють стійкий комплекс "рецептор-ГАМК-ліганд" з низькою провідністю іонофору.

Ключові слова: ГАМК- медіаторна система, зворотні агоністи, нейрони.

Дуже важливим у моделюванні особливостей функціонування рецепторних систем при дії на них модуляторів є можливість використання результатів, отриманих за безпосереднього впливу лігандів на клітину [1,2].

Дослідження провідності переживаючих нейронів Пуркін'є в умовах дії медіатора і модуляторів лежать в основі інтерпретації фармакологічних ефектів біологічно активних сполук і дозволяє провести порівняльну характеристику дії ксенобіотиків на досліджувану функціональну систему [3,4].

Теоретичною основою інтерпретації результатів даних досліджень є кінетична схема взаємодії ГАМК-рецепторне — іонофорних ансамблів (R) з γ -аміномасляною кислотою (G) і екзогенними лігандами (M) з утворенням рецепторне — медіаторних, рецепторне-лігандних і рецепторне — медіаторно-лігандних комплексів (RG, RM і RGM) у високо- і низькопровідних конформаціях (x і +). Ця кінетична схема представлена у попередній статті.

Мета даної роботи полягає у вивченні процесів взаємодії ГАМК і фармакологічно активних сполук (зворотних агоністів) з мембранними рецепторами ГАМК-медіаторної системи шляхом виміру макроскопічних струмів, що реєструються від нейронів клітин Пуркін'є.

Матеріал і методи

Методика проведення електрофізіологічного експерименту на нейронах Пуркін'є мозочка шурів була аналогічна наведеній у [5].

Струми, викликані прикладенням 500 мкМ ГАМК, реєструвалися методом "patch-clamp" у конфігурації від "цілої клітини". Для досліджень використовували скляні мікропіпетки, виготовлені відповідно до методики [6]. Фіксацію мембранного потенціалу здійснювали подачею заданої напруги на два хлор-срібних електроди, один із яких був опущений у міжклітинний розчин, інший — у внутрішньоклітинний. Міжклітинний розчин був такого складу (млмоль): NaCl — 130; KCl — 5; CaCl₂ — 2; MgCl₂ — 1,5; глюкоза — 10, HEPES — 10 (pH 7,4). Внутрішньоклітинний розчин був таким (млмоль): Cs — 100; NaCl — 10; Tris-Cl — 30; EDTA — 1; MgATP — 2 (pH 7,25 підтримувалася Tris-ОН буфером). Cs був обраний як основний блокатор K⁺, що є активатором ГАМК_B-рецептора. Після заповнення мікропіпетки внутрішньоклітинним розчином її опір складав 2–4 мОм. Розчини, що містять ліганди (бензпеніцилін, пікротоксин, бемерід, 5-бром-2'-хлор-2-амінобензофенон (БФ — бензофенон)), подавалися відповідно до методики, описаної в [6]. Функціонування каналів реєстрації струмів (аналого-цифровий перетворювач), їх частота й амплітуда контролювалися за допомогою комп'ютера. Первинну обробку даних (вимір амплітуди, нормалізацію і т.д.) провадили за допомогою програми "AnDatRa", мовою Delphi 1.0. Електрофізіологічним показником була швидкість зміни струму за асоціації речовини з відкритими каналами (τ_{on}) і при дисоціації її від блокованих каналів (τ_{off}). Статистичну обробку даних і побудову графіків здійснювали з використанням програмного пакета Microcal Origin 3.5 (Microcal Software, Inc., Northampton MA, USA).

Результати та їх аналіз

Для дослідження використовували дві схеми дослідів (див. попередню статтю — рис. 2 а,б). Як видно з рис. 1–3, за попереднього прикладення до нейронів ГАМК для всіх досліджених екзогенних лігандів (бензпеніцилін, пікротоксин, бемерід, бензофенон) — зворотних агоністів ГАМК-рк-характерним є зниження величин ГАМК-залежних іонних струмів. Звертає на себе увагу те, що зниження іонного струму після аплікації бензпеніциліну і бемеріду настає практично миттєво (характеристичний час процесу менше 20 мс). Ефект прикладення ліганда є максимальним уже при першому застосуванні ГАМК (рис. 1, 2). В протилежність зазначеному, прикладення пікротоксину

і бензофенону супроводжується більш повільним зниженням іонного струму (рис. 3, 4).

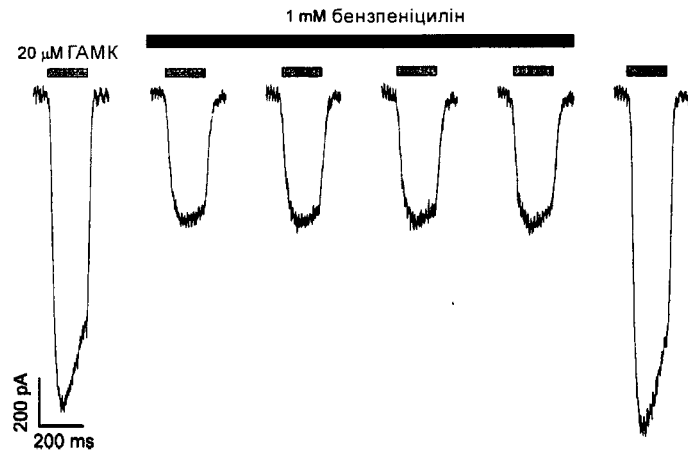


Рис. 1. Модуляція макроскопічних ГАМК-активованих струмів, реєстрованих від мембрани (реєстрація струму крізь мембрану) ізолюваного нейрона Пуркін'є до і після інкубації його у 1 мМ розчині бензпеніциліну

Примітка: після контрольної реєстрації бензпеніцилін додавали за 15 с до наступної аплікації ГАМК і залишали у позаклітинному розчині на протязі трьох аплікацій медіатора

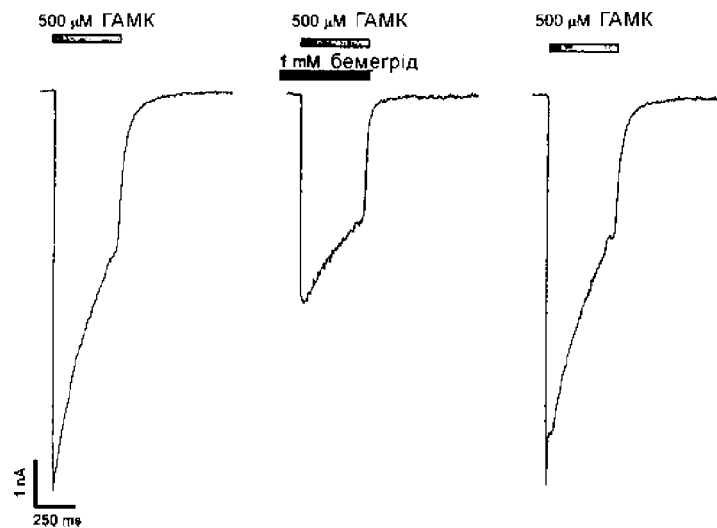


Рис. 2. Модуляція макроскопічних ГАМК-активованих струмів, реєстрованих від мембрани ізолюваного нейрона Пуркін'є за одноразової аплікації 1мМ розчину бепегриду

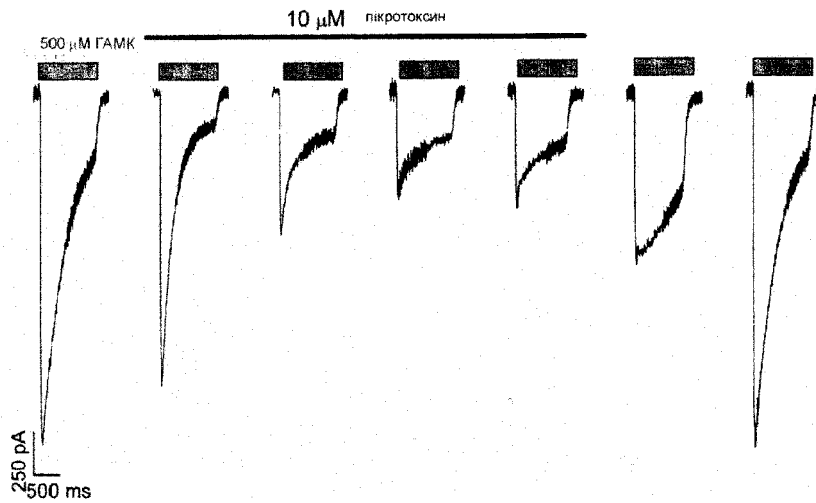


Рис. 3. Модуляція макроскопічних ГАМК-активованих струмів, відведених від мембрани ізольованого нейрону Пуркін'є за одноразової аплікації 1мМ розчину пікротоксину

Примітка: умови реєстрації — див. рис. 1

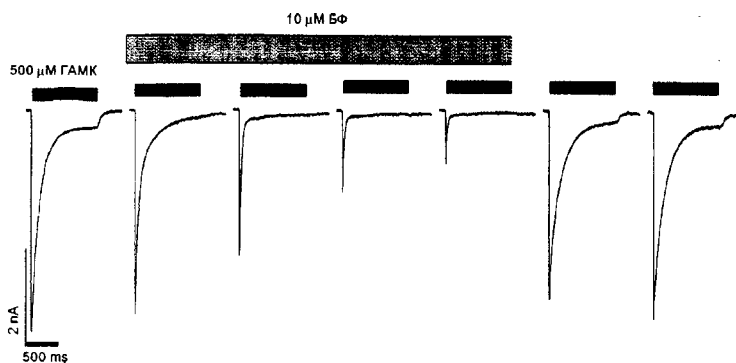


Рис. 4. Модуляція макроскопічних ГАМК-активованих струмів, відведених від мембрани ізольованого нейрону Пуркін'є до і після інкубації його у 10 мМ розчині бензофенону

Примітка: умови реєстрації — див. рис. 1

Час напівзниження чутливості нейрональної мембрани до впливу ГАМК в умовах прикладення пікротоксину (рис. 3) складає 5 хв., після прикладення бензофенону — більше 6 хв. (рис. 4). Зниження ГАМК-індукованого струму обумовлено процесом взаємодії ліганду (М) з ГАМК-рк (R) з утворенням частки (RG), що не трансформується під впливом ГАМК у високопровідну конформацію.

Дослідження у відповідності з другою дослідною схемою (див. попередню статтю — рис. 2 б) впливу зворотних агоністів на провідність нейрональної мембрани в умовах рівноваги конформерів ($RG \leftrightarrow RG$) (рис. 5) дозволило одержати додаткову інформацію про механізми взаємодії зворотних агоністів з комплексом ГАМК-рецептор-ГАМК (RG) і альтернативне оцінити їхні відмінності й особливості.

Використання формального апарата, що відповідає схемі на рис. 1 попередньої статті, уможливило на підставі характеристичних часів процесів, що протікають у фазах IV б і IV в, визначити кінетичні параметри цих процесів (табл. 1).

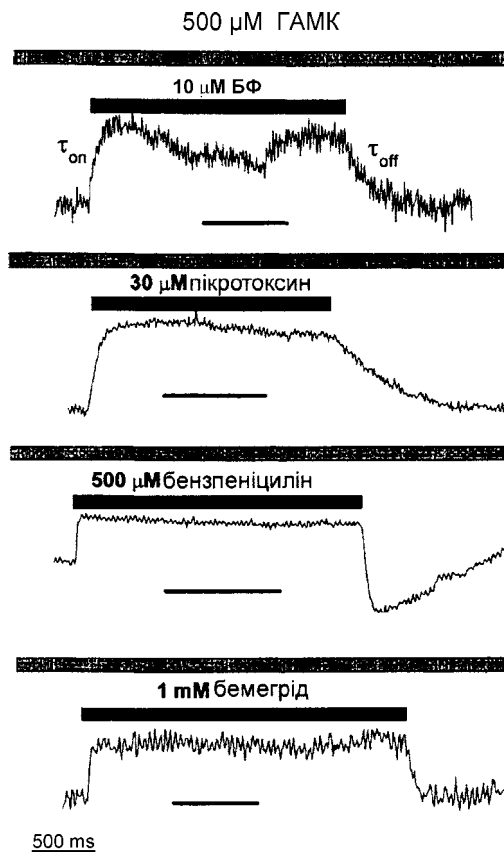


Рис. 5. Модуляція зворотними агоністами макроскопічних ГАМК-активованих струмів ізольованого нейрону Пуркін'є у стаціонарній (IV) фазі дії медіатору

Бензпеніцилін і бемеград, як і в попередній серії дослідів, виявили більш високу швидкість взаємодії з ГАМК-рк (у формі комплексу з ГАМК (RG)). Для процесів їхньої взаємодії характерні високі значення константи (q_{-1}) швидкості розпаду комплексу ($M+RG \xrightleftharpoons[q_{-1}]{q_1} RGM$)

визначає швидке досягнення стану рівноваги (τ_{on}) і повернення нейрона у вихідний стан, (τ_{off}). Рівноважні константи цих процесів (табл. 2) низькі. Це дозволяє охарактеризувати пеніцилін і бемеград як ліганди з низькою спорідненістю до ГАМК-рк і його комплексу з ГАМК. Вони неселективно взаємодіють як з рецептором, так і з його комплексом з ГАМК і є блокаторами ГАМК-рк, оскільки утворюють з ним комплекс із низькою провідністю іонофору.

Таблиця 1

Характеристичні часи (τ) процесів зміни величин іонного струму внаслідок прикладення в IV фазі до нейронів Пуркін'є розчинів зворотних агоністів ГАМК-рк

Ліганд	$\tau_{on} = (\lambda q_1 [M_i] + \lambda q_{-1})^{-1}$ (мсек)	$\tau_{off} = k_2$ (мсек)
Бензпеніцилін (1 мМ)	5,53±0,73	25,60±4,39
Пікротоксин (30 мкМ)	45,38±3,24	596,6±205,57
Бемеград (1 мМ)	5,47±0,85	38,12±11,71
БФ(10 мкМ)	75,38±5,20	162,36±49,34

Таблиця 2

Кінетичні показники процесів взаємодії агоністів і ГАМК-рк нейронів Пуркін'є

Ліганд	$K_m = \lambda q_{-1} / \lambda q_1$	$(\lambda q_1 [M_i] + \lambda q_{-1})$ сек	λq_{-1} сек ⁻¹	$\lambda q_1 [M_i]$	λq_1
Бензпеніцилін(1 мМ)	275,4±11,5	134,8±9,2	39,1±4,7	142±5,8	0,14±0,02
Пікротоксин (30 мкМ)	2,5±0,98	22,0±2,4	1,2±0,13	20,3±3,4	0,21 ±0,01
Бемеград (1 мМ)	121,6±14,7	137±8,0	26,2±2,2	156±7,8	0,16±0,05
БФ(10 мкМ)	8,2±0,78	13,3±1,2	6,2±1,4	7,1±1,1	0,71 ±0,04

Пікротоксин і бензофенон мають інші властивості — характеризуються низькою швидкістю взаємодії з ГАМК-рк у відсутності ГАМК. У присутності в середовищі ГАМК, що визначає утворення комплексів ГАМК-рецептор-ГАМК (RG), ці сполуки виявляють високу спорідненість (табл. 2) до рецепторного комплексу. Для комплексу "ліганд-рецептор-ГАМК" (RGM) характерна низька швидкість дисоціації.

Тому в основі механізму фармакологічної активності досліджуваних сполук можливо лежить процес утворення стійкої частки (RGM) з низькою провідністю іонофору. Наші результати і роботи інших авторів [5] показали, що кінетика процесу блокування струму ГАМК похідними бензофенону істотно відрізняється від відповідних показників для пікротоксину і пеніциліну. Для похідних бензофенону є характерним біекспоненційний процес зниження струму ГАМК (у фазі дисенситизації), у той час як інші досліджені зворотні агоністи не змінювали моноекспоненційну залежність зниження ГАМК-залежного струму.

Висновок

Дослідження динаміки змін іонного струму нейронів (клітин Пуркін'є), індукованих прикладенням медіатору і різних лігандів ГАМК_A-рк, дозволяє охарактеризувати пеніцилін і бемеград як ліганди із низькою спорідненістю, що неселективно взаємодіють як з рецептором, так і з його комплексом з ГАМК. В основі механізму фармакологічної активності пікротоксину і бензофенону припускається процес утворення стійкої частинки "ліганд — рецептор — ГАМК" з низькою провідністю іонофору.

Література

1. Сигворс Ф., Сакман Я, Неер З. Регистрация одиночных каналов: — М.: Мир, 1987. — 448 с.
2. Jackson M. B., Lecar H., Mothers D. A., Barker J. L. Single channel currents activated by γ -aminobutyric acid, muscimol, and (-)-pentobarbital in cultured mouse spinal neurons // *J. Neurosci.* — 1982. — V. 2. — № 7: — P. 889–894.
3. *Benzodiazepin / GABA receptor and chloride channels. Structural and Functional Properties.* Ed. A. R. Liss, inc., New York. 1986. — 238 p.
4. Комиссаров И. В. Активация синаптических рецепторов и ее аллостерическая регуляция // *Нейрофизиология* — 2000. — Т. 32. № 1. — С. 56–68.
5. Копаница М. В., Якубовська Л. М., Руденко О. Р., Криштал О. А. Modulation of GABA_A receptor-mediated currents by benzophenone derivatives in isolated rat purkinje neurons // *Neuropharmacology.* — 2002. — V. 43(4). — P. 764–777.
6. Врублевский С. В., Валеев А. Е., Черневская Н. К. Метод быстрой смены тестирующих растворов при исследованиях изолированных клеток // *Физиол. журн.* — 1985. — Т. 31. № 2. — С. 241–242.

М. В. Копаница¹, О. В. Жук^{2,3}, В. Г. Зиньковский^{2,3},
О. А. Станкевич², М. С. Жук²

¹ Институт физиологии им. А. А. Богомольца,
отдел клеточной мембранологии,
ул. Богомольца, 4, Киев, 01024, Украина;

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

³ Опольский университет,
кафедра молекулярной и экспериментальной биологии,
ул. Каминка, 4, Ополье, 45564, Польша.

ИССЛЕДОВАНИЕ И МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОЦЕССОВ МОДУЛЯЦИИ IN VITRO ГАМК-ЭРГИЧЕСКИХ НЕЙРОНОВ ОБРАТНЫМИ АГОНИСТАМИ. II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Резюме

Изучены механизмы и кинетика взаимодействия обратных агонистов с ГАМК_A-рецепторно-ионоформным комплексом с использованием для их интерпретации марковских кинетических схем. В условиях исследования ГАМК-зависимых то-

ков нейронів (кліток Пуркінє) показано, що пеніцилін і бемегрид можуть бути охарактеризовані як ліганди з низьким сродством, неселективно взаємодіючі як з рецептором, так і його комплексом з ГАМК, а пікротоксин і 5-орто-2'-хлор-2-амінобензофенон — як ліганди, що утворюють стійку частину "рецептор-ГАМК-ліганд" з низькою провідністю іонофора.

Ключевые слова: ГАМК-рецепторний комплекс, обернені агоністи, нейрони.

M. V. Kopanitsa¹, **O. V. Zhuk**^{2,3}, **V. G. Zinkovsky**^{2,3},
E. A. Stankevich², **M. S. Zhuk**²

¹ Bogomoletz Institute of Physiology, Department of Cellular Membranology,
Bogomoletz Street 4, Kyiv, 01024, Ukraine;

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

³ University of Opole, Department of Molecular Biology,
Kominki str., 4, Opole, 45564, Poland.

RESEARCH AND MODELLING OF PROCESSES OF MODULATION IN VITRO GABA-ERGIC NEURONS BY THE INVERSE AGONISTS. II. A EXPERIMENTAL STUDY

Summary

Mechanisms and the characteristic of processes kinetic interactions of the inverse agonists with GABA_A-rk with use for their interpretation markose kinetic scheme are investigated. The single channel recording of GABA-induced currents in Purkine cells have shown that penicillin and bemegrade are ligands with low affinity, non-selectively interactions with GABA_A receptor in a presence or absence of GABA. Picrotoxine and 5-ortho-2-chlorin-2-aminobenzophenon can form a stable complex "ligand-receptor-GABA" with low conduction of the ion channel.

Keywords: GABA-receptors complex, inverses agonists, neurons.