

ПОИСК НЕПЕПТИДНЫХ БЛОКАТОРОВ ПРОТОН-ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ ИОННЫХ КАНАЛОВ

Е.В. Литасова, М.А. Думпис, С.В. Куликов, Л.Б. Пиотровский, О.А. Крышталь*

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, г. Санкт-Петербург

*Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, г. Киев

SEARCH OF NON-PEPTIDE BLOCKERS OF THE PROTON-SENSITIVE ION CHANNELS

E.V. Litasova, M.A. Doumpis, S.V. Kulikov, L.B. Piotrovskii, O.A. Kryshtal

Abstract. The paper publishes the results of a search for non-peptide blockers of proton-sensitive ion channels.

Key words: non-peptide blockers.

Методами теоретического конформационного анализа изучено трехмерное строение пептида FMRFa (Phe-Met-Arg-Phe-амида), лиганда протон-чувствительных ионных каналов. На основании этих данных предложена структура соединений, способных ингибировать эти ионные каналы. Синтез ряда дизамещенных производных аргинина и оценка их биологических свойств на изолированных нейронах спинальных и тригеминальных ганглиев крыс позволило сделать определенные выводы о связи химической структуры с биологической активностью в этом ряду и высказать предположение о различии механизмов влияния соединений на пиковую амплитуду тока и на десенсилизацию.

В сенсорных нейронах млекопитающих как в центральной нервной системе (ЦНС), так и на периферии, широко распространены протон-чувствительные ионные каналы ASICs (Acid-Sensing Ionic Channels), принадлежащие к семейству амилорид-чувствительных натриевых каналов/дегенеринов (NaC/DEG) [7]. Возникающие при активации рецепторов ASICs протон-активируемые токи представляют собой механизм реагирования нервных клеток, в частности (и организма в целом) на слабые изменения кислотности окружающих тканей. Физиологическая роль этих рецепторов до конца еще не ясна, однако предполагается их участие в широком спектре функций: в механорецепции, в восприятии боли, в синаптической пластичности, в процессах обучения и памяти [6].

Группа лигандов протон-чувствительных ионных каналов сравнительно немногочисленна. Наиболее известные среди них – эндогенный тетрапептид беспозвоночных FMRFa (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂), проявляющий свойства агониста ASIC's, и родственные ему нейропептиды [2, 3, 5]. Эти пептиды неустойчивы при физиологических значениях pH, что значительно затрудняет изучение роли этих каналов в опытах *in vivo*. Исключ-

ением является амилорид, неспецифический блокатор Na-зависимых ионных каналов, основным биологическим эффектом которого, к тому же, является диуретическое действие [4]. Поэтому поиск непептидных лигандов ASIC's является в настоящее время чрезвычайно актуальным как с теоретической, так и практической точек зрения.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Найти непептидные аналоги FMRFa, проявляющие, в отличие от него, ингибирующее влияние на ASIC's и устойчивые в физиологических условиях.

Анализ связи структура-активность в ряду аналогов FMRFa показывает, что все известные в настоящее время лиганды ASIC's содержат в молекуле гуанидиновую группу, замена которой на тетраалкиламмониевую группу приводит к исчезновению активности [10]. Второй особенностью лигандов ASIC's является запрет на наличие в молекуле свободной кислотной функции – карбоксильная функция на С-конце пептидных лигандов ASIC's заменена амидной группой. К исчезновению активности приводит также появление свободной карбоксильной группы и в других частях молекулы [3, 9].

Изучение строения молекулы FMRFa методами компьютерного конформационного анализа показало, что одна из наиболее энергетически выгодных конформаций может быть представлена в виде "пальца" (цепочка трех – CH₂-групп аргинина) с положительно заряженным "хвостом" (гуанидиновая группа), выступающего из липофильного облака, образованного двумя бензильными группами и метилтиоэтильным радикалом (рис. 1).

Поэтому нами был синтезирован ряд дизамещенных производных аргинина общей формулы (I–XIX) и проведена первичная оценка их биологических свойств на изолированных нейронах спинальных и тригеминальных ганглиев крыс (табл. 1).

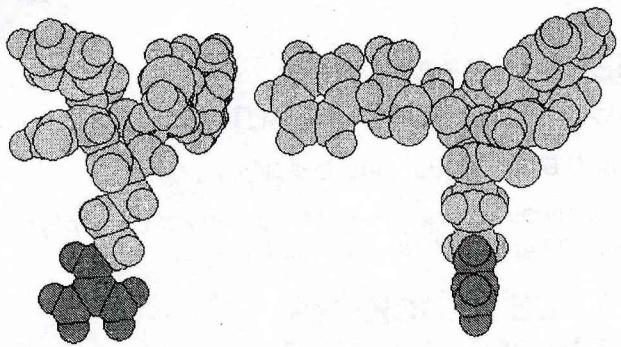


Рис. 1. Наиболее стабильная конформация пептида FMRFa (ортогональная проекция, темным отмечена гуанидиновая группа)

Таблица 1
Дизамещенные производные аргинина общей формулы (I-XIX)

№	R	R_1
I	H	PhCO
II	H	PhCH ₂ CO
III	H	Ph(CH ₂) ₂ CO
IV	H	PhCO(CH ₂) ₂ CO
V	H	t-BuOCONHCH ₂ CH(Ph)CH ₂ CO
VI	CH ₂ Ph	PhCO
VII	Ph	PhCH ₂ CO
VIII	Ph	PhCO(CH ₂) ₂ CO
IX	Ph	t-BuOCONHCH ₂ CH(Ph)CH ₂ CO
X	2-C ₁₀ H ₈	PhCO
XI	2-C ₁₀ H ₈	PhCH ₂ CO
XII	2-C ₁₀ H ₈	Ph(CH ₂) ₂ CO
XIII	2-C ₁₀ H ₈	PhCO(CH ₂) ₂ CO
XIV	2-C ₁₀ H ₈	PhCONH(CH ₂) ₂ CO
XV	2-C ₁₀ H ₈	PhCH ₂ OCONH(CH ₂) ₂ CO
XVI	2-C ₁₀ H ₈	Ph(CH ₂) ₂ CONH(CH ₂) ₂ CO
XVII	2-C ₁₀ H ₈	t-BuOCONHCH ₂ CH(Ph)CH ₂ CO
XVIII	PhCO	p-PhNO ₂
XIX	PhCO	p-PhNH ₂

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Теоретический конформационный анализ был проведен с использованием программ PCModel (поле MM2) и HyperChem (поле Amber), расчет зарядов по методу Хюкеля.

Синтез производных аргинина проводили по известным методикам исходя из триазициленного аргинина с последовательным введением заместителей в карбоксильную группу и к атому азота аминогруппы аргинина [1].

Биологическое тестирование проводили методом "patch-clamp" в конфигурации "целая клетка" и внутриклеточной перфузии на изолированных нейронах спинальных заднекорешковых и тригеминальных ганглиев крыс линии Вистар возраста 5–10 дней (виварий института физиологии человека им. А.А. Богомольца, Киев). Детальное описание методики приведено в работе [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как уже отмечалось выше, необходимым структурным элементом соединений, способных взаимодействовать с ASIC's, является высокоосновная гуанидиновая группа (pK_a 12.5). Можно предположить, что именно она обеспечивает взаимодействие молекулы с отрицательно заряженными аминокислотными остатками внутри ионного канала. Существенной ее особенностью является также то, что эта группа плоская, ее толщина практически равна диаметру атома углерода. Если при этом вспомнить, что подавляющее большинство известных каналоблокаторов имеют в молекуле объемную тетраалкиламмониевую группу сферической формы, то можно предположить, что структура протон-чувствительного ионного канала существенно отличается от большинства других ионных каналов, во всяком случае, в области связывания лигандов.

R. Waldmann с соавт. [11] была экспрессирована и выделена в клетках COS субъединица протон-чувствительного натриевого канала, характерная для сенсорных нейронов. В клетках COS она формирует натриевый канал, который отвечает на снижение внеклеточного pH как быстро инактивирующуюся, так и неактивирующуюся натриевой компонентой, поэтому общий ток, протекающий через ASICs, зависит от двух параметров – пиковой амплитуды и времени десенсилизации. Сам FMRFa увеличивает оба параметра более чем в два раза [8]. Поэтому оценка действия новых соединений проводилась нами по изменениям двух параметров – пиковой амплитуды (I/I_0) и времени десенсилизации (k/k_0) (табл. 2).

Все незамещенные амиды аргинина ($R = H$, соед. I–V) практически не оказывали влияния на протон-активируемые токи (табл. 2), что свидетельствует, в первую очередь, о важной роли липофильности молекулы. Из сравнения данных по биологической активности и рассчитанного коэффициента распределения октанол/вода ($clog P$) видно, что в рядах соединений, содержащих одинаковый заместитель при атome азота аминогруппы аргинина (R_1), увеличение липофильности заместителя при амидном атоме азота (R) приводит к снижению пиковой амплитуды тока (например, соединения II, VII, XI или IV, VIII, XII или V, IX, XVII).

Интересные изменения активности исследуемых соединений можно наблюдать, варьируя заместитель при атоме азота аминогруппы аргинина (R_1) в рядах различных его амидов. Как уже было отмечено, увеличение заместителя в амидной части молекулы, приводящее к общему увеличению липофильности молекулы, приводит к повышению активности. Поэтому неудивительно, что в наших экспериментах незамещенные ациламиды аргинина (соединения I–V) слабее всего влияют на протон-активируемые токи. В ряду замещенных анилидов (соединения VII–IX) происходит увеличение длины цепочки в заместителе, но при этом в молекуле появляется карбонильная группа, что снижает липофильность и, одновременно, активность соединений (VII–VIII).

Таблица 2

Действие на изолированные нейроны (I/I_0 -пиковая амплитуда, k/k_0 – время десенситизации) и рассчитанный коэффициент распределения ($clog P$) соединений (I–XIX)

№	ИЭМ	R	R_1	$I/I_0 \pm SD$	$K/K_0 \pm SD$	CLOG P
I	2052	-H	PhCO-	94,0±2,2	б.и.*	-0,15
II	2050	-H	PhCH ₂ CO-	96,5±6,2	б.и.	-0,22
III	2051	-H	PhCH ₂ CH ₂ CO-	93,4±2,1	б.и.	0,18
IV	2054	-H	PhCO(CH ₂) ₂ CO-	89,4±4,5	б.и.	-0,75
V	2060	-H	t-BuOCONHCH ₂ CH(Ph)CH ₂ CO-	99,4±5,8	б.и.	0,37
VI	2066	-CH ₂ -Ph	PhCO-	86,3±6,2	б.и.	1,87
VII	2080	Ph-	PhCH ₂ CO-	72,2±1,9	б.и.	1,71
VIII	2079	Ph-	PhCO(CH ₂) ₂ CO-	87,1±3,2	1,40±0,10	1,18
IX	2081	Ph-	t-BuOCONHCH ₂ CH(Ph)CH ₂ CO-	94,2±0,3	б.и.	2,30
X	2039	2-C ₁₀ H ₈ -	PhCO-	80,3±0,6	1,50±0,18	2,78
XI	2036	2-C ₁₀ H ₈ -	PhCH ₂ CO-	70,0±1,3	б.и.	2,71
XII	2037	2-C ₁₀ H ₈ -	Ph(CH ₂) ₂ CO-	77,1±0,8	б.и.	3,11
XIII	2047	2-C ₁₀ H ₈ -	PhCO(CH ₂) ₂ CO-	65,3±6,1	1,69±0,23	2,18
XIV	2048	2-C ₁₀ H ₈ -	PhCONH(CH ₂) ₂ CO-	94,9±7,0	б.и.	1,88
XV	2049	2-C ₁₀ H ₈ -	PhCH ₂ OCONH(CH ₂) ₂ CO-	70,3±9,5	1,66±0,10	2,37
XVI	2065	2-C ₁₀ H ₈ -	Ph(CH ₂) ₂ CONH(CH ₂) ₂ CO-	69,5±8,3	1,65±0,34	2,21
XVII	2061	2-C ₁₀ H ₈ -	t-BuOCONHCH ₂ CH(Ph)CH ₂ CO-	80,2±10,2	2,50±0,17	3,30
XVIII	2067	p-PhNO ₂ -	PhCO-	103,5±11,3	б.и.	1,73
XIX	2068	p-PhNH ₂ -	PhCO-	88,6±3,5	б.и.	0,99
FMRFa				224,0±21,8	2,76±1,11	

Примечание. *б.и. – без изменений.

Однако резкое увеличение объема заместителя (IX), несмотря на несомненное повышение липофильности молекулы, приводит к некоторому снижению активности, по-видимому, за счет стерических препятствий взаимодействию с ионным каналом. Аналогичная картина наблюдается и в ряду замещенных производных нафтиламида аргинина (соединения X–XVII), введение нафтильной группы приводит к увеличению величины $clog P$ и пропорциональному усилению активности исследуемых соединений. По данным [12] протон-активируемые ионные каналы имеют два трансмембранных домена и длинную внеклеточную петлю, которая, по-видимому, и является фактором, лимитирующим размер и степень липофильности подходящего к рецептору лиганда.

В ряду изученных нами веществ выраженное влияние на десенситизацию оказал лишь нафтиламид (3-*t*-бутилоксикарбониламино)-2-фенилбутирил аргинина (XVII), замедливший кинетику десенситизаций. Все остальные соединения незначительно влияли на десенситизацию (табл. 2).

При этом мы не наблюдали никакой корреляции $clog P$ с десенситизацией, в отличие от пикивой амплитуды тока. Можно предположить, что аналогично RFa-подобным пептидам, соединение (XVII) индуцирует недесенситизирующуюся компоненту протон-активируемого тока [3].

Возможно, выраженность блокирующего действия активных соединений на пикиовую проводимость протон-чувствительных ионных каналов определяют форма и ориентация липофильного фрагмента молекулы. Сравнение энергетически выгодных конформаций FMRFa с конформациями изученных нами активных и неактивных соединений дает некоторое представление о различии в ориентации липофильного облака по отношению к плоскости, в которой расположены атомы гуанидиновой группы. Так, если молекула FMRFa представляет собой как бы "двуухлестковое" облако (рис. 1), то липофильное облако соединений, ингибирующих протон-активируемый ток, располагается у активных соединений по одну сторону от этой плоскости (рис. 2).

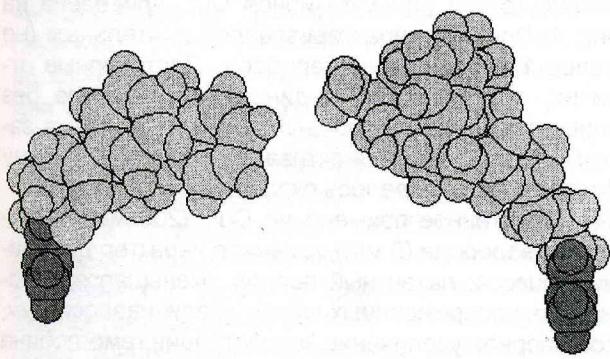


Рис. 2. Наиболее стабильные конформации соединений XII и XVII (темным отмечена гуанидиновая группа)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, среди соединений непептидной природы, представляющих собой достаточно липофильные молекулы, содержащие положительно заряженный гуанидиновый остаток, найдены вещества, ингибирующие проводимость протон-чувствительных ионных каналов нейронов спинальных и тригеминальных ганглиев крыс. Результаты тестирования этих соединений позволяют высказать предположение о различии механизмов влияния соединений на пикиовую амплитуду тока и на десенситизацию.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гершкович А.А., Кибиров В.К. Синтез пептидов. Реагенты и методы. – К.: Наукова думка, 1987. – 264 с.
2. Askwith C.C., Cheng C., Ikuta M., et al. // Neuron. 2000. – Vol. 26, № 1. – P. 133–141.
3. Cottrell G.A. // EXS. – 1993. – Vol. 63 – P. 279–285.
4. Cragoe E.J., Woltersdorf Jr O.W., Bickling J.B., et al. // J. Med. Chem. – 1976. – Vol. 10. – P. 66–75.
5. Greenberg M.J., Price D.A. // Prog. Brain Res. – 1992. – Vol. 92. – P. 25–37.
6. Krishtal O.A. // Trends Neurosci. – 2003 – Vol. 26. – № 9 – P. 477–483.
7. Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. // Neuroscience. – 1980. – Vol. 5. – P. 2325.
8. Ostrovskaya O.I., Moroz L.L., Krishtal O.A. // Journal of Neurochemistry. – 2004. – Vol. 91, № 1. – P. 252–255.
9. Price D.A., Greenberg M.J. // Science. – 1977. – Vol. 197. – № 4304. – P. 670–671.
10. Raffa R.B. // Peptides. – 1988. – Vol. 9, № 4. – P. 915–922.
11. Waldmann R., Bassilana F., de Weille J., et al. // J. Biol. Chem. – 1997. – Vol. 272, № 34. – P. 20975–20978.
12. Waldmann R., Champigny G., Bassilana F., et al. // Nature. – 1997. – Vol. 386, № 6621. – P. 173–177.
13. Yudin Y.K., Tamarova Z.A., Ostrovskaya O.I., et al. // European Journal of Neuroscience. – 2004. – Vol. 20. – P. 1419–1423.

УДК 577.352.38:615.014.425:615.244.188.221.3

ВЛИЯНИЕ ЦИКВАЛОНА И ДИБУНОЛА НА ГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ, ИНДУЦИРОВАННЫЙ ИОНАМИ МЕДИ И ГИДРОПЕРОКСИДОМ

Х. Диб, О.В. Островский, В.Г. Зайцев, В.Е. Веровский, А.В. Симонян

Кафедра теоретической и клинической биохимии ВолГМУ

INFLUENCE OF CYCVALOL AND DIBUNOL ON THE ERYTHROCYTE HAEMOLYSIS INDUCED BY COPPER IONS AND HYDROPEROXIDE

Kh. Dib, O.V. Ostrovsky, V.G. Zaitsev, V.E. Verovsky, A.V. Simonyan

Abstract. We compared effects of two phenolic antioxidants, cycvalonum and 2,6-di-tret-butyl-4-methylphenol using the model of haemolysis of erythrocytes induced by copper. It was found that cycvalonum has better protective effect than 2,6-di-tret-butyl-4-methylphenol.

Key words: erythrocyte haemolysis.

Исследование резистентности эритроцитарных мембран является стандартной диагностической процедурой при разнообразных патологических состояниях, связанных с эндогенной интоксикацией [3]. Было показано, что гемолиз эритроцитов под действием солей меди определяется перекисным повреждением мембран [1, 5]. Поэтому представлялось интересным исследовать влияние двух фенольных антиоксидантов – циквалона (2,6-бис[3-метокси-4-гилроксифенил]-циклогексанон) и дубунола (2,6-ди-трет-метилен-циклогексанон) и дубунола (2,6-ди-трет-бутил-4-метилфенол) (BHT) на гемолиз эритроцитов в присутствии ионов меди.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить влияние циквалона и дубунола на гемолиз эритроцитов, индуцированный ионами меди.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты выполнены на 36 белых нелинейных крысах самцах. Их декапитировали под эфирным наркозом, эритроциты отмывали физиологическим раствором.

В моделях *in vitro* гемолиз проводили хлоридом меди (конечная концентрация 200 мкМ) в присутствии и отсутствии пероксида водорода (конечная концентрация 5 мМ). Суспензию инкубировали на шейкер-термостате при постоянном перемешивании в течение 2 часов при температуре 37 °С.

Фенольные антиоксиданты, растворимые в этаноле, добавляли в опытные пробы в разных

концентрациях. А в контрольную пробу добавляли этанол в таком же объеме. Для определения степени гемолиза измеряли концентрацию гемоглобина, вышедшего в инкубационную среду при разрушении клеток, прямым спектрофотометрическим методом. Конечный гематокрит в образцах составлял 1 %, при полном гемолизе образца поглощение пробы было в диапазоне величин 1,5–2,0 о.е.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами было доказано, что инкубация образца в отсутствии индукторов вызывала гемолиз 6–14 % эритроцитов.

Динамика процесса гемолиза эритроцитов в присутствии 200 мкМ ионов Cu²⁺ приведена на рис. 1. Процесс характеризовался длительным (не менее 1 ч) латентным периодом. Достоверные отличия, по сравнению с динамикой гемолиза без инициаторов, отмечались только к 60-й мин, а затем следовала резкая активация процесса. К концу 2-го ч гемолизировалось около 50 % эритроцитов.

Сочетанное применение Cu²⁺ (200 мкМ) и перекиси водорода (5 мМ) изменяло характер динамики процесса: латентный период уменьшался, а количество поврежденных клеток увеличивалось. Так, достоверное увеличение концентрации гемоглобина в надосадочной жидкости наблюдалось уже к 30-й мин, а затем скорость гемолиза увеличивалась.