

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ОРДЕНА ТРУДОВОГО ЧЕРВОНОГО ПРАПОРА ІНСТИТУТ
ФІЗІОЛОГІЇ ім. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ

На правах рукопису

ВОЙТЕНКО Сергій Валентинович

МЕХАНІЗМ КОНКУРЕНТНОГО БЛОКУВАННЯ
НИКОТИНОВИХ ХОЛІНОРЕЦЕПТОРІВ НЕЙРОНІВ
ВЕРХНЬОГО ШИЙНОГО ГАНГЛІЯ ЦУРА.

03.00.05 - біофізика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття вченого ступеня
кандидата біологічних наук

КИЇВ - 1995



00761641 (P)

Дисертацією є рукопис
 Роботу виконано у відділі фізіології серцево-судинної системи (завідуючий - академік НАН України Володимир Іванович Скок) Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України

Науковий керівник: академік НАН України,
 доктор біологічних наук Володимир Іванович Скок

Офіційні опоненти: академік НАН України,
 доктор біологічних наук Михайло Федорович Шуба
 доктор біологічних наук Микола Сергійович Веселовський

Провідна установа: Науково-дослідний інститут фізіології Київського університету Тараса Шевченка

Захист відбудеться "28" листопада 1995 року на засіданні Спеціалізованої ради Д-01.13.01 при Інституті фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України (Київ, вул.Богомольця 4).

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України

Автореферат розіслано "26" жовтня 1995 року

Вчений секретар
 Спеціалізованої ради
 доктор біологічних наук

ЛННБ ім. В. Стефаніка
 АН України

З.О.Сорокіна-Марина

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Нікотинова холінергічна передача збудження являє собою одну з найбільш розповсюджених в організмі та досліджену найкраще за всі інші види хімічних передач.

При вивченні механізму дії різних блокаторів на нейрональні НХР було встановлено, що деякі речовини, раніше ідентифіковані як конкурентні (гекса- та пентаметоній), блокують йонний канал (Ascher et al., 1979, Selyanko et al., 1981b). Каналоблокуючий механізм дії був встановлений також для ряду нових моно-амонієвих сполук (Жоров, 1989; Zogov, 1991) і похідних пентаетонія (Гмиро и соавт., 1987). Детально були досліджені різні типи блокування йонного каналу, такі як блокування відкритого йонного каналу (Ascher et al., 1979; Selyanko et al., 1982; Rang, 1982; Skok et al., 1983, 1984), блокування закритого йонного каналу (Adams, 1977; Adams, Feltz, 1980a), блокування типу "пастки" (Lingle, 1983). На базі одержаного матеріалу виявилось можливим побудувати теорію блокування йонного каналу нейрональних НХР (Скок, 1987; Skok et al., 1989). В той же час, механізм конкурентного блокування нейрональних НХР був досліджений недостатньо. Чисто конкурентна блокуюча дія на нейрональні НХР встановлена лише для триметафану і суругатоксину (Ascher et al., 1979; Бобрышев, Скок 1987). Не досліджений і вплив різних факторів на блокування центру зв'язування ацетілхоліну (АХ).

Мета роботи. Виходячи з цього метою наявної роботи було електрофізіологічне вивчення механізмів дії гангліоблокаторів на центр зв'язування АХ НХР нейронів симпатичного ганглія ссавця.

Головні завдання. 1. Дослідити механізм дії класичних блокаторів конкурентного (триметафан) та канального (тубокурарин, гексаметоній) типів на НХР нейронів верхнього шийного ганглія (ВШГ) щура для подальшого використання їх як критерію порівняння при дослідженні інших блокаторів. 2. Дослідити механізм дії на НХР

речовин, можливо взаємодіючих з центром зв'язування АХ, таких як тетрагіламоній (ТЕА) (похідне холіномиметика тетраметіламонія) і пахикарпін (ПХ) (розміри молекули якого більші за розміри перерізу місця зв'язування блокаторів каналу). З.Дослідити ефективність та механізм дії на НХР похідних ПХ з різними розмірами молекул.

Наукова новизна. На нейронах ВШГ щура встановлено, що ТЕА, ПХ, а також його похідні ІЕМ1820, ІЕМ1821, ІЕМ1773 та ІЕМ1787 блокують центр зв'язування АХ нейрональних НХР. Для ПХ, ІЕМ1820 та ІЕМ1821 виявлено достовірне посилення блокуючої дії із збільшенням розмірів молекули блокатора. Вперше встановлено, що ефективність конкурентної блокуючої дії може залежати від мембранного потенціалу (МП). Робиться припущення, що із зміною МП відбуваються конформаційні зміни молекули НХР, що впливає на її спорідненість до блокатора. Для ТЕА і ПХ вперше визначені інгібіторні константи при різних рівнях МП.

Практичне значення роботи. Результати досліджень становлять інтерес для біофізиків, фізіологів та фармакологів, оскільки дають нову інформацію про будову і молекулярні механізми роботи нейрональних НХР, і можуть бути використані для пошуку нових фармакологічних препаратів, задіяних у лікуванні гіпертонічної хвороби.

Апробація роботи. Матеріали дисертації доповідалися та обговорювалися на семінарах відділу фізіології вегетативної нервової системи Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, загальноінститутських семінарах Інституту фізіології ім.О.О.Богомольця НАН України, та на XIV з'їзді українського фізіологічного товариства ім.І.П.Павлова (1994, Київ).

Об'єм та структура дисертації. Робота виконана на 114 сторінках машинописного тексту та складається з вступу, огляду літератури, опису методів, експериментальної частини, обговорення,

7 висновків та списку літератури з 118 найменувань. Робота ілюстрована 30 малюнками.

ОБ'ЄКТ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Дослідження проводили на нейронах ВШГ білих тригизневих щурів. Тварин наркотизували ефіром і вбивали уколом в серце. Зразу виділяли обидва ВШГ і клали їх у зовнішньоклітинний розчин. Потім механічно знімали оболонки і обробляли ганглії розчином, що містив 0,5% колагенази ("Сігма" США, тип 1А) і 0,1% протеази ("Боерингер Манхейм" ФРН). Час обробки - 30-40 хв. Після цього ганглії переносили в експериментальну камеру і фіксували вольфрамовими голочками (о 40 мкм) до дна, вкритого силгардом ("силгард 184" США). Робочий об'єм камери був 2 мл. Під час експерименту ганглії постійно омивався свіжим зовнішньоклітинним розчином. Експерименти проводились при кімнатній температурі. Досліджувані речовини в необхідних концентраціях додавались у зовнішньоклітинний розчин.

Зовнішньоклітинний розчин (розчин Кребса) містив (в ммоль/л): NaCl - 133; KCl - 5,9; CaCl₂ - 2,5; MgCl₂ - 1,2; трис-НСІ - 10; глюкозу - 11 (рН=7,4). Внутрішньоклітинний розчин, заповнюючий петч-піпетку, містив (в ммоль/л): KCl - 140; CaCl₂ - 1; EGTA-КОН - 11; NERES-КОН - 10 (рН=7,2). В деяких експериментах, коли було потрібно довго утримувати клітину в області МП, близьких до нуля, для усунення калісної провідності, йони калію, у внутрішньоклітинному розчині заміщували йонами цезію.

АХ апліцирували йонофоретично. Йонофоретичний мікроелектрод заповнювали розчином АХ-хлориду в концентрації 1,5 ммоль/л. Опір мікроелектрода складав біля 50 Мом.

Метод "patch-clamp", або метод локальної фіксації потенціалу, використовувався для реєстрації струмів цілої клітини (т.з. конфігурація "whole-cell"), викликаних йонофоретичною аплікацією АХ (Hamill et al., 1981). Петч-піпетки виготовляли з пірекса. Кінчик

піпетки оплавлювали, що покращувало наступний контакт з клітиною. Опір піпеток був від 2 до 5 МОм. Кінчик піпетки підводили до поверхні клітини за допомогою мікроманіпулятора (Карл Цейс, Йена, НДР) під візуальним контролем (інтерференційний мікроскоп "Біолар" ПНР). Піпетку притискували до поверхні клітини. Після створення у піпетці від'ємного тиску формувалася контакт з опором біля 1 ГОм. Повторним створенням від'ємного тиску клітину проривали, завдяки чому розчин, який заповнював піпетку проникав всередину клітини і з'являлась можливість фіксації потенціалу. Електрична схема виконана за Сігворсом (Сигворт, 1987).

Експерименти проводились на електрофізіологічній установці, зібраній на базі мікро-ЕОМ "Електроніка-85", в напівавтоматичному режимі по програмі розробленій к.б.н. Пурніним С.Л.

Викликані АХ трансмембранні струми (АХ-струми) підсилювали підсилювачем, сигнал з якого подавався на вхід аналогово-цифрового перетворювача УВВ-1 і оцифровувався з частотою 0,1-1 кГц. Оцифровані дані вводили в пам'ять ЕОМ "Електроніка-85" і записували на магнітні диски для наступного аналізу.

Механізм дії гангліоблокаторів визначали за допомогою стандартних методичних підходів: вплив дози агоніста ("доза-ефект"), попередньої активації НХР ("частотна залежність") та МП (аналіз вольт-амперної характеристики) на блокуючу дію досліджуваних речовин, а також їх вплив на "час життя" йонного каналу.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ.

Залежність величин АХ-струмів від дози АХ. Коефіцієнт Хіла.
Оскільки в якості агоністу ми використовували тільки АХ, була проведена серія експериментів по визначенню характеру його дії на НХР нейронів ВШГ щура.

Визначити число молекул речовини, які зв'язуються з одною молекулою рецептора, можна по нахилу графіка залежності "доза-ефект" в подвійних логарифмічних координатах. Величина тангенса кута нахилу буде відповідати кількості молекул. Ця величина називається коефіцієнтом (або числом) Хіла (Dixon, Webb, 1964).

Досліди по визначенню коефіцієнта Хіла проводились нами при достатньо довгих (біля 1 с) аплікаціях АХ, які викликали стаціонарні АХ-струми. Для визначення числа Хіла відбирались нейрони з стабільним плато АХ-струму, що вказувало на відсутність десенситизації.

У досліджених нейронах графіки добре апроксимувались прямими. Величина коефіцієнта Хіла дорівнювала $0,9 \pm 0,1$ ($n = 8$), тобто була близькою до 1. Таким чином було визначено, що в наших умовах для активації одного НХР нейронів ВШГ необхідна одна молекула АХ.

Дія класичних конкурентних і каналних блокаторів. Зміна залежності "доза-ефект" під впливом триметафану, тубокурарину і гексаметонію - класичних блокаторів НХР відповідно конкурентного і каналного типів, була досліджена в наших умовах з використанням методичних підходів, використаних для подальшого дослідження інших, раніше недосліджених, блокаторів.

Триметафан ($2 \cdot 10^{-6}$ М/л) ефективно і обернено блокував АХ-струми. Величина пригнічення $\lambda-1$ ($\lambda = I/I_0$, I_0 - амплітуда струму в контролі, I_0 - в присутності блокатора) при -50 мВ дорівнювала $1,63 \pm 0,47$ ($n = 4$). В усіх чотирьох випадках блокуючий ефект послаблювався із зростанням дози АХ, що вказувало на витискання триметафану АХ із місць зв'язування, тобто говорило про конкурентний тип дії.

Механізм блокування найкраще за все визначати за допомогою координат Лайнуївера-Берка. По-перше, найбільше значення, в разі використання цих координат, мають величини струмів, одержаних при достатньо великих концентраціях агоніста, при яких помилка визначення амплітуди струмів найменша. По-друге, критерій

конкурентного або канального типів блокування - перетин контрольного графіка і графіка, одержаного в присутності блокатора в районі нуля вісі абсцис або, відповідно, паралельність цих прямих, дозволяє чітко встановити тип блокування.

В усіх випадках аналіз залежності "доза-ефект" для триметафану вказував на конкурентний тип взаємодії блокатора з НХР. В координатах Лайнуівера-Берка точка перетину графіків завжди знаходилась в районі нуля вісі абсцис. Середнє значення дорівнювало $0,04 \pm 1,1$ мкА⁻¹ (n = 4). λ -тест теж вказував на конкурентність дії - блокуюча здатність триметафану зменшувалась із збільшенням дози АХ.

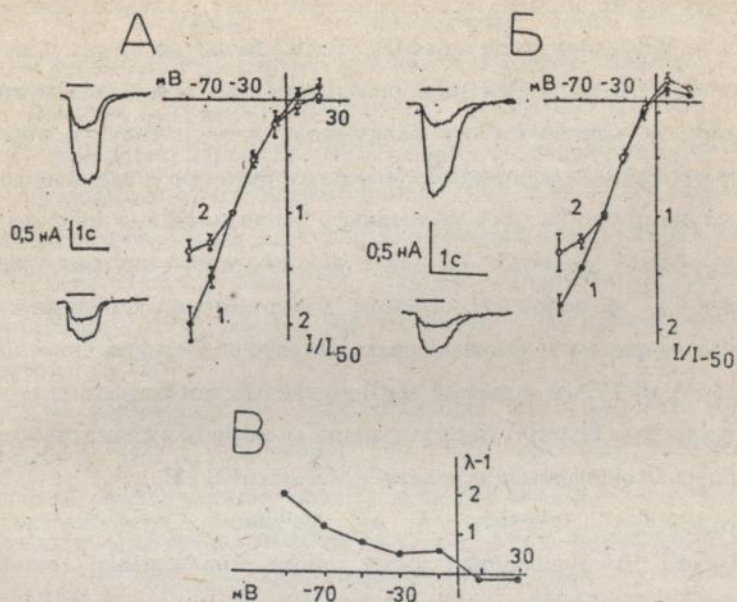
Підтверджувалась конкурентність блокуючої дії триметафану і іншими тестами, а саме впливом блокатора на вольт-амперну характеристику і залежністю блоку від попередньої активації НХР. Як і повинно було бути для блокаторів взаємодіючих з центром зв'язування АХ, блокуюча здатність триметафану не залежала від МП і не змінювалась при попередній активації НХР.

Протилежно поводити себе блокатори йонного каналу - тубокурарин і гексаметоній. Ефективно блокуючи нейрональні НХР (для тубокурарину, наприклад, $\lambda-1 = 1,26 \pm 0,30$ (n = 3)) вони, в обернених координатах, паралельно зміщували пряму "доза-ефект" відносно контрольної. Блокуюча дія посилювалась із збільшенням дози АХ.

Вплив МП на блокуючу дію гексаметонію (5 мкмоль/л) характеризувався посиленням блоку при гіперполяризації мембрани, що характерно для блокаторів йонного каналу.

Механізм дії ТЕА. ТЕА - класичний блокатор синаптичної передачі в вегетативних гангліях (див. Varlow, 1964). Але механізм його дії на НХР відносно детально вивчений лише на скелетних м'язах, де його дія була змішана (конкурентна і канальна) (Adler et al., 1979).

В наших експериментах ТЕА ($2 \cdot 10^{-5}$ М/л) при МП -50 мВ обернено пригнічував амплітуду АХ-струму на $57,0 \pm 8,2\%$ (n = 5).



Мал.1. Залежність викликаного ТЕА (20 мкмоль/л) пригнічення АХ-струму від мембранного потенціалу. А - зліва АХ-струми, зареєстровані в одному й тому ж нейроні в нормальному розчині та в присутності блокатора при -90 мВ (згори) і при -30 мВ (знизу). Правіше - залежність стандартизованої по відповіді при -50 мВ амплітуди АХ-струму (вісь ординат), від мембранного потенціалу (вісь абсцис) в нормальному розчині (1) і в присутності блокатора (2). Використовувався внутриклітинний розчин на основі КСl. Б - те ж, що і А, але використовувався внутриклітинний розчин на основі CsCl. В - залежність від мембранного потенціалу (вісь абсцис) величини пригнічення $\lambda-1$ (вісь ординат).

Блокуючий ефект розвивався впродовж 2 - 3 хв. і зникав через 5 - 8 хв. після початку відмиву, що в основному визначалось часом зміни розчину в камері.

Вплив МП на блокуючу здатність ТЕА був досліджений при двох різних внутриклітинних розчинах - один стандартний, на основі калію, а в іншому КСl було заміщено еквімолярною кількістю CsCl. При першому розчині блокуюча дія ТЕА в діапазоні МП від 0 до -50

мВ практично не змінювалась. Посилення блоку з гіперполяризацією мембрани з'являлось лише при МП -70 мВ і більш від'ємних (мал.1.А). Як уже відмічалось, вважається, що відсутність потенціалозалежності характеризує конкурентність блокування, а посилення блокуючого ефекту з гіперполяризацією мембрани говорить про появу каналоблокуючого компонента. Для можливості більш детально вивчити дію ТЕА в області додатніх МП був використаний внутриклітинний розчин з Cs^+ як основним катіоном. Вольт-амперна характеристика, яка була одержана в таких умовах, показує відсутність потенціалозалежності дії ТЕА в діапазоні від 0 до -50 мВ, потенціалозалежність блокування при більшій гіперполяризації мембрани і практично повну відсутність блокування при додатніх МП (мал.1.Б і В).

Критерієм наявності в дії речовини каналоблокуючого компонента є посилення блоку після попередньої активації рецептора, і поступове зменшення його при збільшенні інтервала між кондиціонуючою (першою) і тестуючою (другою) аплікаціями АХ в парі (Aischer et al., 1978). В наших умовах парні АХ-струми викликались короткими (20-100мс) йонофоретичними аплікаціями АХ з мінімальними інтервалами між імпульсами приблизно 0,5 с. Експерименти проводились лише на тих нейронах, у котрих була відсутня десенситизація НХР. Дослідження дії ТЕА ($1 \cdot 10^{-5}$ - $5 \cdot 10^{-5}$ М/л) проводились при різних МП (від +10 до -70 мВ), в жодному з досліджених нейронів ($n=7$) не було знайдено достовірної різниці в амплітудах між першим та другим імпульсами, що говорить на користь конкурентного механізму дії ТЕА.

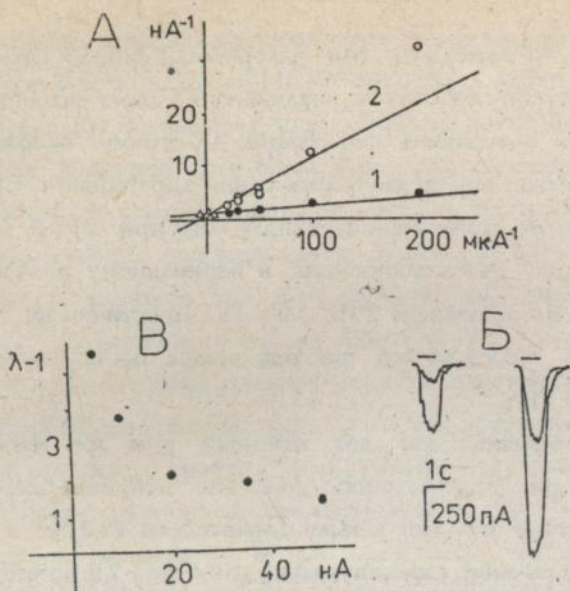
Ще однією різницею в дії конкурентних і каналоблокаторів є їх вплив на час життя відкритого стану йонного каналу - якщо перші ніяк не впливають на нього, то другі повинні скорочувати його (Skok et al., 1989). Визначити час життя відкритого стану йонного каналу

можна різними методами. Ми використали метод спектрального аналізу флуктуацій АХ-струму, викликаного довгою аплікацією АХ.

Спектри потужності флуктуацій АХ-струму, одержані від 4 клітин, задовільно апроксимувались одним лоренціаном. Середній час життя відкритого стану йонного каналу НХР при -70 мВ, визначений по частоті зрізу цього лоренціана, в нормальному розчині складав $10,0 \pm 2,0$ мс. В присутності $2 \cdot 10^{-5}$ М/л ТЕА практично не відбувалось ніякої зміни - $10,2 \pm 3,6$ мс, що теж вказує на конкурентний тип блокуючої дії ТЕА.

Для порівняння на двох нейронах цим же методом було досліджено дію гексаметонію. Для цих нейронів середні часи відкритого стану йонного каналу дорівнювали 23,3 мс і 11,8 мс в нормальному розчині, і зменшувались до 7,5 мс і 2,9 мс в присутності 20 мкмоль/л і 30 мкмоль/л гексаметонію відповідно.

Перевірка впливу ТЕА на АХ-струми при різних значеннях йонофоретичного струму проводилось при різних рівнях МП. Виявилось, що в усіх трьох областях МП, виділених при дослідженні потенціалозалежності дії ТЕА (область додатніх МП, область від 0 до -50 мВ та область більш від'ємних ніж -50 мВ), характер залежності "доза-ефект" говорив про конкурентний тип взаємодії блокатора з НХР, оскільки з 19 відведень, одержаних при різних концентраціях ТЕА (від 10 до 100 мкмоль/л), лише в трьох випадках (один при -70 мВ і два при -50 мВ) не було достовірного витискання блокатора агоністом (мал. 2). Треба особливо звернути увагу на поведінку залежності "доза-ефект" в області потенціалозалежного блокування. В координатах Лайнуівера-Берка розташування точки перетину контрольного графіка і графіка, одержаного в присутності ТЕА (МП -70 мВ), характерно для чисто конкурентного механізму блокування. Значення точки перетину по ОХ складає $1,55 \pm 1,8$ мкА⁻¹ (n = 6).



Мал.2. Залежність блокуючої дії TEA (20 мкмоль/л) від дози АХ при мембранному потенціалі -70 мВ. А - 1 - графік "доза-ефект" побудований для однієї клітини в контролі; 2 - те ж, але в присутності блокатора. По вісі абсцис - обернені величини струмів аплікації; по вісі ординат - обернені величини амплітуд АХ-струмів. Трикутниками позначені точки перетину графіків 1 і 2 для інших нейронів. Б - АХ-струми, одержані в контролі та в присутності блокатора для максимальних (зліва) і мінімальних (зправа) значень йонофоретичних струмів. В - залежність величини пригнічення λ^{-1} від величини йонофоретичного струму.

Таким чином, незважаючи на потенціалозалежність блокуючої дії, ця дія у всіх трьох досліджених областях МП, вірогідно, є конкурентною. Одним з можливих пояснень потенціалозалежного конкурентного блокування може бути збільшення спорідненості центру зв'язування АХ до TEA з гіперполяризацією мембрани. Найкращим способом визначення константи спорідненості (або інгібіторної константи - K_i) є графічний метод Діксона (Dixon, Webb, 1964), який дозволяє в один і той же час визначити і механізм

взаємодії блокатора з рецептором. На мал.3 показані приклади таких графіків, одержаних для різних нейронів при трьох різних МП (+10, -30, -70 мВ). Розташування точки перетину двох прямих відносно вісі абсцис, вказує на тип взаємодії. Якщо точка перетину лежить вище вісі абсцис, то це конкурентна, а якщо на вісі - то некокурентна взаємодія. K_i чисельно дорівнює значенню точки перетину по вісі абсцис, взятому із зворотнім знаком. Характер одержаних від 10 клітин залежностей вказує на конкурентний тип взаємодії ТЕА з НХР, оскільки в усіх випадках точка перетину двох ліній лежала вище вісі абсцис. Значення точок перетину по вісі ОУ при МП +10, -30 і -70 мВ склали $1,18 \pm 0,43 \text{ нА}^{-1}$ ($n=4$), $1,62 \pm 0,96 \text{ нА}^{-1}$ ($n=3$) і $0,61 \pm 0,37 \text{ нА}^{-1}$ ($n=3$) відповідно. Треба відзначити, що обернені величини цих значень відповідають максимальній АХ-відповіді і в данному випадку складають 0,85 нА, 0,62 нА і 1,64 нА відповідно, що дуже близько до реальних величин максимальних АХ-струмів. Величини K_i для МП +10, -30 і -70 мВ склали відповідно $65,8 \pm 12,6$ мкмоль/л ($n=4$), $26,3 \pm 5,8$ мкмоль/л ($n=3$) і $13,9 \pm 1,6$ мкмоль/л ($n=3$). Таким чином, на основі поведінки залежності "доза-ефект", одержаної різними способами, можна сказати, що механізм взаємодії ТЕА з НХР є конкурентним, але константа інгібірування залежить від МП.

Механізм дії ПХ. ПХ - відомий алкалоїд, широко використовуваний в медицині (Машковський, 1977). В наших умовах в концентрації $2 \cdot 10^{-6}$ М/л ПХ обернено зменшував амплітуду АХ-струму до $43 \pm 19\%$ ($n=7$) від контрольної при -50 мВ. Вплив МП на блокуючу здатність ПХ був дуже схожий на вплив ТЕА. Так само при МП від 0 до -50 мВ його блокуюча дія була потенціалонезалежна і лише при більшій гіперполяризації посилювалась із збільшенням МП. Амплітуда АХ-струму при МП -90 мВ складала лише 63% величини, очікуваної для потенціалонезалежного блокування. Аналіз вольт-амперної прово-

дився як при різних концентраціях ПХ (від 0,5 до 10 мкмоль/л), так і при різних дозах АХ, але принципової різниці при цьому не було.

Схожим на ТЕА був і вплив ПХ на час життя відкритого стану йонного каналу НХР. Для п'яти нейронів, при -90 мВ, були одержані спектри потужності викликаних АХ флукуацій струму в нормальному розчині і в присутності 2 мкмоль/л ПХ. Середній час життя відкритого стану йонного каналу в нормальному розчині становив $14,0 \pm 1,7$ мс, а в присутності ПХ він був $13,7 \pm 2,0$ мс ($n=5$).

Дослідження залежності блокуючої дії ПХ від попередньої активації НХР дало такий результат. В 6 дослідах із 12 величина пригнічення другого АХ-струму $(I_1 - I_2)/I_1$, (де I_1 - амплітуда першого, I_2 - амплітуда другого АХ-струму) в контролі перевищувала 0,1, і зменшувалась при збільшенні інтервала часу між аплікаціями АХ, що вказувало на десенситизацію рецепторів. Додавання 2 мкмоль/л ПХ викликало посилення пригнічення другого АХ-струму. Величини постійної часу відтворення другого АХ-струму в контролі і при ПХ в кожному досліді майже не відрізнялись між собою і в середньому становили відповідно $11,3 \pm 3,6$ с і $12,3 \pm 4,6$ с ($n=6$). В тих шести експериментах, де в контролі не було вираженої десенситизації, лише в двох дослідах додавання блокатора викликало значне зменшення другого АХ-струму. Величини пригнічення $(I_1 - I_2)/I_1$ склали 0,30 і 0,43 при інтервалі часу між імпульсами в 1 секунду і зменшувались при його збільшенні - постійні часу відновлення другого АХ-струму склали 19,7 с та 8,7 с, що схоже на постійні часу відновлення другого АХ-струму при десенситизації рецепторів. В решті експериментів додавання ПХ, при значному блокуючому ефекті, не викликало пригнічення другого АХ-струму в порівнянні з першим.

Визначення впливу різних доз АХ на блокуючу здатність ПХ ($2 \cdot 10^{-6}$ М/л) проводилось при МП -50 мВ (область потенціало-незалежного блокування) і при МП -90 мВ (область потенціало-

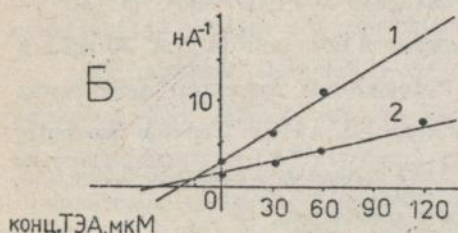
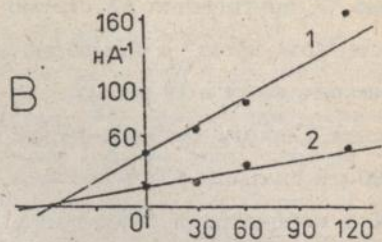
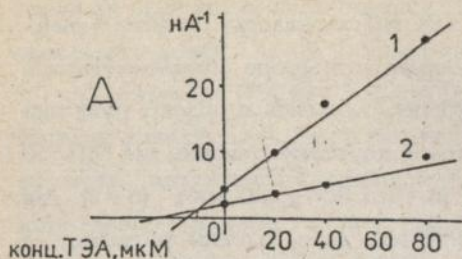
залежного блокування). І при -50 мВ, і при -90 мВ із збільшенням дози АХ пригнічення АХ-струмів ПХ зменшувалось. Графіки залежності "доза-ефект" в обернених координатах добре апроксимувались прямими, котрі в 12 випадках із 13 перетинались в області нуля вісі абсцис. Середні значення абсцис точок перетину графіків для МП -50 і -90 мВ склали $2,99 \pm 2,65 \text{ мкА}^{-1}$ ($n=8$) і $9,50 \pm 4,81 \text{ мкА}^{-1}$ ($n=5$). Дія ПХ в концентрації 5 мкмоль/л (-90 мВ) дало схожий результат, а значення абсциси точок перетину складало $0,03 \pm 1,77 \text{ мкА}^{-1}$ ($n=4$).

Методом Діксона було досліджено 9 нейронів (4 при -30 мВ і 5 при -90 мВ). У всіх випадках одержаний характер залежності вказував на конкурентний тип взаємодії ПХ з НХР. Середні значення K_d в мкмоль/л при МП -30 мВ и -90 мВ склали відповідно $0,62 \pm 0,15$ і $0,28 \pm 0,08$. Різниця була статистично достовірною.

Дія похідних та аналогів ПХ. В наявній літературі описано дію лише одного похідного ПХ - люпаніну (Yovo et al., 1984). В наших експериментах були використані похідні IEM1820 та IEM1821, які являють собою четвертинні аміни із збільшеними, порівняно з ПХ, розмірами молекул. IEM1820 являє собою N-метілпохідне, а у IEM-1821 один з азотів зв'язаний з шестиатомним вгледодневим кільцем.

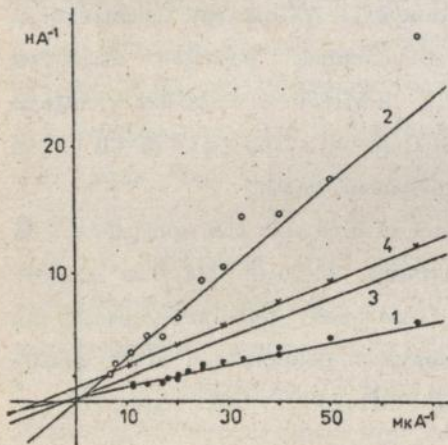
Обидві речовини обернено блокували АХ-струми. Ефективність блокування посилювалась із збільшенням розмірів молекули блокатора. Величини EC_{50} для ПХ, IEM1820 та IEM1821 склали відповідно $2,06 \pm 0,38$ ($n=3$), $1,64 \pm 0,41$ ($n=4$) і $0,65 \pm 0,17$ ($n=3$) (все в мкмоль/л). Підтримуваний МП дорівнював -50 мВ.

Перевірка механізму блокуючої дії похідних ПХ проводилась за допомогою вищезгадуваних методичних підходів. На базі аналізу частотної залежності і залежності "доза-ефект" було встановлено, що обидві речовини конкурентно блокують нейрональні НХР. Аналіз вольт-амперної показав схожість дії IEM1820 і IEM1821 з дією ПХ та



Мал.3. Вплив мембранного потенціалу на константу дисоціації в реакції взаємодії ТЕА з нікотинівим холінерецептором (координати Діксона). Підтримувані на

мембрані потенціали -70 мВ (А), -30 мВ (Б) и +10 мВ (В). По вісі абсцис - концентрація ТЕА, по вісі ординат - обернені величини амплітуд АХ-струмів. 1 - графіки, одержані при струмі аплікації, викликавшем мінімальні відповіді, 2 - при збільшенні струму аплікації в 3,5 рази.



Мал.4. Перевірка можливості маскування каналного компонента конкурентним при аналізі залежності "доза-ефект". 1 и 2 - графіки "доза-ефект", побудовані по реальним даним, одержаним від однієї клітини в контролі і в присутності пахікарпіна (2 мкмоль/л) при мембранному потенціалі -90 мВ. 3 - графік, зображуючий чисто конкурентний компонент блокування. 4 - графік зображуючий змішане блокування.

ТЕА - при МП більш від'ємних ніж -50 мВ блокуюча здатність посилювалась, хоча і не так значно як у ПХ чи ТЕА.

Окрім IEM1820 та IEM1821, були досліджені речовини, які лише за загальною структурою нагадували ПХ. Це IEM1788, IEM1787 та IEM1773. Два з них, IEM1787 (піролізидін) та IEM1773 (N-метілпіролізидін), в концентраціях 10^{-5} - 10^{-4} М/л в перші хвилини перфузії викликали в нейронах ВШГ щура струм. Оскільки цей струм не виникав якщо в розчині перебував тубокурарин ($5 \cdot 10^{-6}$ М/л), вірогідніше за все, що IEM1787 і IEM1773 активували НХР. Але через кілька хвилин після введення речовин в розчин, їх активуюча дія припинялась. При цьому АХ-струми ставали менші по амплітуді, ніж були до введення IEM1787 та IEM1773. Тобто, ці речовини з активаторів НХР перетворювались на блокатори, причому блокатори, виходячи з аналізу залежності "доза-ефект", центру зв'язування АХ. Всі ці факти також свідчать на користь того, що речовини ряду ПХ можуть ефективно взаємодіяти з центром зв'язування АХ.

ОБГОВОРЕННЯ.

В наших дослідях особливу увагу було приділено впливу триметафану, тубокурарину та гексаметонію на залежність "доза-ефект", як класичному тесту для визначення механізму блокування. Оскільки значення числа Хіла показувало, що для активування одного НХР нейронів ВШГ щура достатньо однієї молекули АХ, виявилось можливим використати для аналізу координати Лайнуївера-Берка. Графіки, побудовані для вищеназваних речовин, добре апроксимувалися прямими, що підтверджувало можливість використання цих координат для аналізу механізму дії блокаторів. Всі тести вказували, на те, що триметафан конкурентний, а тубокурарин і гексаметоній - каналні блокатори. Таким чином, у нас не було причини сумніватися

в можливості подальшого використання координат Лайнуівера-Берка для визначення механізму дії інших блокаторів.

Згідно класичних уявлень, конкурентне блокування не залежить від МП (Skok, 1987). Дослідження дії ТЕА (20 мкмоль/л) у області додатніх МП показало, що блокування НХР у цій області практично не було. В той же час блокуючий ефект при від'ємних МП був достатньо великим. Це могло б бути доказом чисто каналного механізму блокування. Але характер зміни кривих "доза-ефект" при від'ємних МП, вказує на конкурентний механізм дії ТЕА. Навіть якщо припустити, що блокування не чисто конкурентне, а змішане, все рівно, в області додатніх МП блокуючий ефект, з точки зору класичних уявлень, не повинен був повністю зникнути - конкурентний компонент повинен був залишитись. Повне ж зникнення блока свідчить про можливість потенціалозалежності конкурентного блокування.

Одним з можливих пояснень потенціалозалежності конкурентної дії ТЕА може бути зміна спорідненості рецептора до блокатора в залежності від МП, що і було підтверджено методом Діксона. Згідно цьому тесту, при МП +10, -30 и -70 мВ ТЕА конкурентно блокував нейрональні НХР. Величина константи інгібування сильно залежала від МП і зменшувалась з гіперполяризацією мембрани.

Таке припущення повністю підтвердилось і при дослідженні ПХ та його похідних. У ПХ також було знайдено потенціалозалежність конкурентної дії, яка відповідала зміні константи інгібування.

Однак, залишалось припущення, що каналоблокуючий компонент, який з'являється в дії ПХ і ТЕА при МП більш від'ємних ніж -50 мВ, і обумовлюючий потенціалозалежність дії блокатора, може маскуватися конкурентним і не проявлятися в тесті "доза-ефект". Для перевірки цієї гіпотези була змодельована наступна ситуація. Як приклад були взяті реальні данні, одержані для ПХ (2 мкмоль/л) при МП -90 мВ. В координатах Лайнуівера-Берка дані одержані в контро-

лі (мал.4.1.) і в присутності ПХ (мал.4.2) добре апроксимувалися прямими, котрі перетинались в районі нуля вісі абсцис. Як вже говорилось вище амплітуда АХ-струму, одержаного при максимальному значенні йонофоретичного струму, в присутності ПХ складала 63% від очікуваної для потенціалонезалежного (тобто чисто конкурентного) блокування. Із цього неважко розрахувати вірогідну величину АХ-струму конкурентного компонента для такого ж йонофоретичного струму. Пряма, яка зображує цей чисто конкурентний компонент блокування повинна пройти крізь розраховну точку і точку перетину контрольної прямої (мал.4.1) з віс'ю ординат (Уільямс, Уільямс, 1976). На малюнку ця пряма позначена цифрою 3. Тепер визначим як повинна пройти пряма яка описує змішане блокування, що включає в себе розрахований нами конкурентний компонент і каналний. Для останнього відомо, що при максимальному йонофоретичному струмі він додатково пригнічує амплітуду конкурентного компонента на 37% (100% - 63%). Вклад каналного компонента при інших йонофоретичних струмах буде змінюватись пропорційно кількості відкритих йонних каналів, тобто пропорційно амплітуді струму, розрахованої для чисто конкурентного блокування. Одержані таким чином величини АХ-струмів при різних струмах аплікації добре апроксимувалися прямою (мал.4.4). Якщо було б вірним припущення, що каналоблокуючий компонент в тесті "доза-ефект" може маскуватися конкурентним, то прямі 2 і 4 не повинні були б сильно відрізнятися одна від одної. Як бачимо (мал.4), різниця дуже значна. Точка перетину контрольної прямої і прямої розрахованої для змішаного блокування значно змістилася вліво і достовірно вказує на наявність в дії блокатора каналоблокуючого компонента.

Таким чином нами було встановлено, що ефективність блокування центру зв'язування АХ, або конкурентного блокування також, як і блокування йонного каналу, може залежати від величини МП.

Вищезгадувані факти і припущення підтверджують морфологічні дослідження по виявленню розташування і механізму активування НХР (Uplin, 1993, 1995). Центр зв'язування АХ нейронального НХР вірогідніше за все знаходиться не на поверхні, а в товщі рецептора, що витікає з потенціалозалежності взаємодії конкурентних блокаторів і залежності величини блокуючої дії речовин ІЕМ1821, ІЕМ1820 та ПХ від розмірів їх молекули. Відсутність потенціалозалежності блокуючої дії триметафану і сургутоксину може бути пояснена надто великими розмірами молекул цих речовин. Це ускладнює можливість їх занурення в товщу мембрани, однак не перешкоджає ефективно блокувати НХР заважаючи АХ підходити до центру його зв'язування.

ВИСНОВКИ.

1. За допомогою методу "петч-клемп" в конфігурації "ціла клітина" були досліджені механізми дії класичних гангліоблокаторів - тетраетіламонія (ТЕА), пахикарпіна (ПХ) та його похідних - на нікотинові холінорецептори (НХР) нейронів верхнього шийного симпатичного ганглія щура. Для визначення типу блокування, викликаного цими речовинами, його порівнювали по ряду показників (потенціалозалежність, вплив на залежність "доза-ефект" і т.і.) з блокуванням відомим конкурентним гангліоблокатором триметафаном, з однієї сторони, та відомими блокаторами йонного каналу нейрональних НХР - гексаметонієм і тубокурарином.

2. Завдяки визначенню коефіцієнта Хіла встановлено, що для активування одного НХР нейронів верхнього шийного ганглія щура в наших умовах достатньо однієї молекули ацетілхоліну (оскільки число Хіла дорівнювало $0,9 \pm 0,1$), що дозволило використати для визначення механізму блокуючої дії речовин аналіз залежності "доза-ефект" методом Лайнуївера-Берка.

3. На базі серії тестів (аналіз частотної залежності, залежності блокуючої дії від мембранного потенціалу (МП); порівняння часу життя відкритого стану йонного каналу в нормі та в присутності блокатора, а також аналіз залежності "доза-ефект" методами Лайнуівера-Берка, Діксона і λ -теста) встановлено, що ТЕА конкурентно блокує нейрональні НХР. Вперше виявлена залежність конкурентної блокуючої дії від МП. Методом Діксона показана залежність константи інгібування (K_i) від МП. Величини K_i при +10, -30 та -70 мВ становили відповідно $65,8 \pm 12,6$ мкмоль/л, $26,3 \pm 5,8$ мкмоль/л та $13, 9 \pm 1,6$ мкмоль/л, що вказує на зміну спорідненості рецептора до блокатора в залежності від величини МП.

4. За допомогою тих же тестів був досліджений механізм блокуючої дії на нейрональні НХР іншої речовини - ПХ. Встановлено, що ПХ, як і ТЕА, є конкурентним блокатором, крім того його блокуюча дія також залежить від МП. Середні значення K_i при МП -30 мВ та -90 мВ склали відповідно $0,62 \pm 0,15$ мкмоль/л та $0,28 \pm 0,08$ мкмоль/л. Показано, що ПХ може сприяти десенситизації рецепторів.

5. При дослідженні дії на нейрональні НХР похідних ПХ знайдена здатність деяких речовин (ІЕМ1773 та ІЕМ1787) здійснювати активуючу, і слідом за цим блокуючу, дію на НХР, що також підтверджує можливість речовин ряду ПХ ефективно зв'язуватись з центром зв'язування АХ у НХР. На речовинах ряду: ПХ, ІЕМ1820 та ІЕМ1821 знайдено ефект посилення блокуючої дії при збільшенні розмірів молекули блокатора.

6. Зроблено припущення, що центр зв'язування АХ нейронального НХР розташований в товщі рецептора і, таким чином, вплив МП на блокуючу дію конкурентних блокаторів може залежати від швидкості дисоціації молекули блокатора, котра при взаємодії з центром зв'язування АХ занурюється в товщу мембрани і таким чином підпадає під вплив електричного поля.

7. Всі досліджені речовини, що конкурентно блокували нейрональні НХР (триметафан, ТЕА, ПХ, ІЕМ1820, ІЕМ1821) мали мінімальні розміри молекули, перевищуючі розміри профіля йонного каналу в місці переважного зв'язування блокаторів йонного каналу (6,1*8,3 Å). Досліджені конкурентні блокатори могли бути як азотвміщуючими, так і сірковміщуючими і могли мати як повний так і неповний заряд.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ.

1. Пурнынъ С.Л., Войтенко С.В. Механизм действия пахикарпина на никотиновые холинорецепторы нейронов симпатического ганглия крысы// *Нейрофизиология*.- 1989.- 21, №5.- С.701-704.

2. Voitenko, S., Purnyn, S., Omeltchenko, I., Dyadyusha, G., Zorov, B., Brovtsina, N., and Skok V.I., Effect of (+)-sparteine on nicotinic acetylcholine receptors in the neurons of rat superior cervical ganglion// *Molecular Pharmacology*.- 1991.- 40, P.180-185.

3. Voitenko, S.V., Bobrishev, A.U., and Skok, V.I., Effect of tetraethylammonium on nicotinic acetylcholine receptors in rat sympathetic ganglion neurones// *Molecular Neuropharmacology*.- 1993.- 3, P.153-160.

4. Войтенко С.В., Пурнынъ С.Л., Скок В.И. Действие d-спартеина на никотиновые холинорецепторы нейронов верхнего шейного ганглия крысы// *Нейрофизиология/Neurophysiology*.- 1993.- 25, №4.- С.266-272.

5. Войтенко С.В., Гмиро В.Е., Артеменко М.И., Скок В.И. Блокирование нейрональных холинорецепторов производными d-спартеина// *Нейрофизиология/Neurophysiology*.- 1994.- 26, №4.- С.266-269.

6. Войтенко С.В. Потенциалозависимое действие тетраэтиламмония на никотиновые холинорецепторы нейронов верхнего шейного ганглия крысы// *Нейрофизиология/ Neurophysiology*.- 1995.- 27, №1.- С.63-66.

Войтенко С.В. "Механизм конкурентного блокирования никотиновых холинорецепторов нейронов верхнего шейного ганглия крысы".

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.05 - "биофизика", Институт физиологии им.А.А.Богомольца НАН Украины, Киев, 1995.

Защищается 6 научных работ. Методом "пэтч-клемп" установлен конкурентный механизм блокирования нейрональных никотиновых холинорецепторов тетраэтиламмонием, пахикарпином и его производными. Показано, что конкурентное блокирующее действие может зависеть от мембранного потенциала. Данный эффект вероятнее всего связан с изменением сродства рецептора к блокатору в зависимости от мембранного потенциала.

Voitenko S.V. "The mechanism of competitive blocking action on nicotinic acetylcholine receptors in rat cervical ganglion neurones".

Thesis on candidat degree (PhD), spetiality 03.00.05 - "biophysics", Bogomoletz Institute of Physiology NAN Ukraine, Kiev, 1995.

6 articles. Competitive action of tetraethylammonium, pachicarpine and its derivatives on nicotinic cholinoreceptors of rat cervical ganglion neurones were found using patch-clamp recording. It was shown that the competitive blocking action may be voltage-dependent. Perheps this effect is connected with the decrease in velocity of dissociation of blockator from receptor.

Ключові слова: нікотинний холінорецептор (НХР), конкурентне блокування, тетраетіламоній (ТЕА), пахикарпін (ПХ).



Заказ 616 Тир. 100 экз. 1995 г. Укрспецмонтажпроект

41000000

AB 33.444