

Національна Академія Наук України
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця

На правах рукопису

Панченко Віктор Анатолійович

**Електрофізіологічні та фармакологічні характеристики різних
типів кальцієвих каналів пірамідних нейронів гіпокампу та клітин
Пуркінє щурів.**

03.00.05 - Біофізика

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Київ - 1996

46 25,309
ЛННБ України ім.В.Стефаніка



00754249 (V)

Роботу виконано у відділі фізикохімічної біології клітинних мембран Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України.

Науковий керівник: член-кореспондент НАН України

Олег Олександрович Кришталь

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор

Валентин Леонідович Зима,

доктор фізико-математичних наук

Віктор Іванович Тесленко.

Провідна установа: Інститут біохімії ім. А.В. Паладіна.

Захист відбудеться «24» вересня 1996 р.

на засіданні Спеціалізованої вченої ради Д-01.13.01 при Інституті фізіології ім.

О.О.Богомольця НАН України за адресою м. Київ вул. Богомольця 4.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту фізіології ім.

О.О.Богомольця НАН України.

Автореферат розісланий «8» серпня 1996 р.

ЛНБ ім. В. Стефаніка
АН України

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради

Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця

доктор біологічних наук

Зоя Олександрівна Сорокіна-Маріна.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Кальцієві канали, що керуються потенціалом плазматичної мембрани збудливих клітин, утворюють один з основних шляхів надходження іонів кальцію із зовнішнього середовища у клітину. Відкриття цих каналів у відповідь на деполяризацію та генерація вхідного струму обумовлює регулювання мембранного потенціалу та у значній ступені визначає характеристики потенціалу дії, що генерується клітиною. Крім сигнальної функції, кальцієві канали грають важливу роль у сполученні електричної активності плазматичної мембрани із різними рецепторними механізмами та внутриклітинними процесами. Це обумовлюється участю іонів кальцію у багатьох біохімічних реакціях, які визначають специфічну клітинну активність. В останні роки з'явилися нові дані про роль взаємозв'язку надходження іонів кальцію у клітину та активації різних регуляторних каскадів, що керуються внутриклітинним АТФ та іншими нуклеотидами. Кальцієві канали є важливим елементом у сполученні електричного збудження із різноманітними процесами усередині клітини, вони контролюються не тільки потенціалом, але й цілим рядом мембранних рецепторів. Цей допоміжний контроль дозволяє більш тонко керувати надходженням кальцію у клітину за рахунок модулюючого або регулюючого впливу на канал певних гормонів або нейротрансмітерів через системи внутриклітинних посередників.

На сучасному етапі встановлено, що диаденозин-поліфосфати, що містяться поряд із АТФ у секреторних гранулах, а також їх спільний кальцій-залежний викід після стимулюючої дії, впливають на сигнальні процеси міжклітинної взаємодії. Більшість з цих питань до початку нашої роботи були явно недостатньо досліджені, саме через це застосування метода "patch clamp" дозволило отримати нові важливі результати, які здатні суттєво розсунути наші знання про функціонування кальцієвих каналів збудливих клітин.

Поряд із дослідженнями процесів модуляції кальцієвих каналів, важливим є пошук та дослідження нових блокаторів цих каналів. Відомо, що кальцій, який потрапляє у клітину із зовнішнього середовища через кальцієві канали, грає важливу роль у підтриманні та керуванні багатьох внутриклітинних процесів.

Іони кальція виконують регуляторну роль у таких процесах як іонна проникливість мембрани, виділення медіаторів у хімічних синапсах, м'язеве скорочення, у процесах клітинної диференціровки та інші.

Порушення регуляції, що відбувається завдяки надлишкового входу кальція у клітину, досить часто є причиною таких явищ, як ішемічне порушення та кальцієва смерть клітин. На рівні цілого організму у багатьох випадках це спричиняє різні захворювання нервової та серцево-судинної систем. Зараз існує ряд антагоністів кальцієвих каналів, що здатні селективно блокувати той чи інший тип каналів, таким чином впливаючи на певні внутриклітинні процеси. Застосування цих нейропротекторних засобів сприяє запобіганню перевантаження клітин зовнішнім кальцієм. Але властивості відомих антагоністів кальцієвих каналів не завжди задовольняють вимогам сучасної медицини, у зв'язку з чим пошук та вивчення нових антагоністів, що мають певні властивості, є актуальною задачею, яка розв'язується у межах електрофізіологічного дослідження мембран збудливих клітин.

Вивчення можливих ендогенних модуляторів кальцієвих каналів, таких як аденозин та диаденозин-поліфосфати, визначення взаємозв'язку між їх впливом на ізольовані нейрони та фізіологічними функціями ЦНС також становить безперечний науковий інтерес.

Мета та задачі дослідження. Основна мета роботи - провести комплексне дослідження властивостей кальцієвих каналів, що керуються потенціалом плазматичної мембрани декількох типів клітин ЦНС щура. Вивчити їх основні електрофізіологічні та фармакологічні характеристики, а також з'ясувати механізми регуляції цих каналів за допомогою модулюючого впливу диаденозин-поліфосфатів на аденозинові рецептори.

1. Застосувати метод фіксації потенціала у конфігурації "whole cell" для вивчення властивостей кальцієвих каналів пірамідних нейронів гіпокампа та нейронів Пуркінє щура.

2. Ідентифікувати типи потенціалзалежних каналів, що становлять основу кальцієвої провідності пірамідних клітин гіпокампа та клітин Пуркінє мозочка.

3. З'ясувати особливості потенціалзалежності, кінетики та фармакології іонних струмів крізь кальцієві канали високопорогових та низькопорогових типів.

4. Вивчити дію нового блокатора кальцієвих каналів R56865 у порівнянні із дією відомих блокаторів німодипіна та флунаризина на високопорогові та низькопорогові кальцієві струми.

5. Визначити вплив аденозина, диаденозин-поліфосфатів, аналогів АТФ, що не гідролізуються, на кальцієві струми та з'ясувати чи має місце прямий регуляторний вплив родини аденозинових рецепторів на кальцієві канали. У випадку виявлення такої дії оцінити її внесок у сумарний регуляторний ефект, що викликається природними агоністами через відповідні мембранні рецептори.

Наукова новина роботи.

1. Визначені загальні та відмінні властивості високо- та низькопорогових кальцієвих струмів у нейронах Пуркінє мозочка та у нейронах гіпокампа.

2. Проаналізовані електрофізіологічні та фармакологічні характеристики іонних струмів через кальцієві канали різних типів. Досліджено їх взаємозв'язок із аденозиновими рецепторами.

3. Виявлено характер впливу нового блокатора R56865 на основні електрофізіологічні характеристики високо- та низькопорогових струмів через кальцієві канали нейронів мозочка. Проведено порівняльний аналіз фармакологічної дії R56865 із дією німодипіна та флунаризина.

4. Вивчені особливості явища модуляції високопорогових струмів через кальцієві канали нейронів гіпокампа диаденозин-поліфосфатами. Проведено порівняння модулюючого ефекта аденозина, АТФ та диаденозин-поліфосфатів на кальцієві канали.

5. Проведено фармакологічний аналіз ефекта потенціації струмів крізь кальцієві канали диаденозин-поліфосфатами за допомогою сучасних селективних антагоністів аденозинових рецепторів. Виявлена участь рецепторів P₄ типу у модуляції кальцієвих каналів нейронів гіпокампа.

Теоретичне та практичне значення роботи.

Отримані результати мають, поперед всього, фундаментальний інтерес, оскільки дозволяють суттєво розвинути уяву про загальні та відмінні властивості кальцієвих потенціалзалежних каналів різних типів та пов'язаних із ними рецепторів у нейронах ЦНС ссавців. Стосовно цього питання нові дані є важливими при формуванні більш повної уяви про фізіологічну роль високопорогових кальцієвих каналів, а також при пошуках нових засобів скерованного фармакологічного впливу на них. Вивчення модуляції кальцієвих каналів відчиняє можливість об'єднання у рамках загального підходу даних по модуляції кальцієвих струмів та даних по регуляції рецепторних механізмів, що пов'язані із кальцієвими каналами.

Дослідження впливу ко-медіаторів на синаптичні процеси на сучасному етапі перебувають у початковому стані. Важливим кроком уперед є аналіз модуляції кальцієвих каналів за допомогою специфічних рецепторів диаденозинполіфосфатів у гіпокампі. Це дозволяє розсунути сучасні знання про родину аденозинових рецепторів у ЦНС ссавців.

Результати досліджень про прямий вплив R56865 на кальцієві струми та його відмінність від флунаризину дозволяють оцінювати доцільність застосування цього препарату у медицині поряд із традиційним використанням флунаризину. Знання впливу різних типів блокувальних кальцієвих каналів дозволяє розробляти оптимізовані з точки зору ефективності фармакологічні засоби захисту від перевантаження нервових та інших клітин позаклітинним кальцієм. Досліджений препарат R56865 представляє новий клас сполук, що запобігають ішемії та кальцієвій смерті. Зміна електрофізіологічних характеристик кальцієвих струмів під впливом R56865, німодипіна та флунаризину є одним з визначальних факторів, на який зважають при цілеспрямованому пошуку нових нейропротекторних препаратів.

Апробація роботи. Основні положення роботи були викладені на міжнародних симпозіумах Biophysical Society Annual Meeting (San-Francisco 1995), Physiological Society (Oxford, 1995), а також на семінарах секції біофізики і засіданні вченої ради Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця (Київ 1996).

Обсяг та структура дисертації. Дисертація складається з вступу, огляду літератури, опису методів досліджень та експериментальної частини, обговорення результатів, 7 висновків та списку літератури з 283 найменувань. Роботу викладено на 120 сторінках друкованого тексту та ілюстровано 16 рисунками. За тематикою роботи опубліковано 6 робіт.

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження проводилися на ізольованих нейронах гіпокампу та клітинах Пуркінє мозочка щура. Нейрони, що відносяться до різних зон гіпокампу морфологічно легко ідентифікувалися. Експерименти проводилися на щурах 12-14 денного віку. До цього періоду у них завершується диференціювання пірамідних нейронів [Гамбарян, Коваль, 1977], а розвиток елементів сполучної тканини ще не заважає ферментативній ізоляції нейронів. У випадку дослідження клітин Пуркінє вік щура був менший (8-12 діб). Після декапітації тварини гіпокампу швидко виділювали та переносили у розчин складу (у mM): NaCl 150, KCl 5, NaHCO₃ 26, глюкоза 20, KH₂PO₄ 1.25, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, pH 7.4 (розчин А), де тонким лезом під мікроскопічним контролем готували зрізи гіпокампу товщиною 300-400 μm. Зрізи переносили у розчин ферменту, що містить (у mM): NaCl 150, KCl 5, NaHCO₃ 26, CaCl₂ 0,5, EGTA 1, глюкозу 10 (розчин Б) та насичений карбогеном (95% O₂ і 5% CO₂), pH 7.4. Ферментативна обробка (*Aspergillus oryzae*, Sigma, США) проводилася при 33 °C на протязі 30 хвилин при постійному перепусканні крізь розчин карбогену. Потім проводили тривалу відмивку зрізів від ферменту, спочатку у розчині Б на протязі 20 хвилин, а потім у розчині А. Такі зрізи використовувалися для отримання ізольованих нейронів на протязі 8-10 годин. Таким чином отримували ізольовані пірамідні нейрони (зон CA1 та CA3), які ідентифікували за їх характерною формою. Ізольовані нейрони зберігали невелику частину апікальних та базальних дендритів, мали діаметр 15-20 μm та довжину тіла клітини 30-50 μm. Процедура виділення клітин Пуркінє мозочка та розчини для обробки були ті ж. Час обробки у розчині Б становив 20 хвилин.

Для реєстрації іонних струмів крізь мембрану дослідних нейронів був застосован метод внутриклітинної перфузії [Kostyuk et al., 1984] у модифікації із

використанням скляних мікропіпеток. Піпетки заповнювалися розчином, що містить (у mM) Трис- PO_4 70, Трис-Cl 20, EGTA 5, MgCl_2 5, Трис-Cl 20, АТФ 5, ГТФ 0.5 (рН=7.3), опір піпетки не був більш, ніж 5 МОм. Склад позаклітинного розчину (у mM): NaCl 150, CaCl_2 2, MgCl_2 2, HEPES-NaOH-20 (рН=7.4).

При дослідженні струмів крізь Ca^{2+} канали застосовували розчин, що містить (у mM): BaCl_2 20, холін-хлорид 70, ТЭА-Cl 40, Трис-Cl 20, рН=7.4. Експерименти проводилися при кімнатній температурі 20-23 $^{\circ}\text{C}$. Зміна позаклітинних розчинів проводилася за методом фіксації концентрації за допомогою установки "Jumping Table" (Chizhnikov et al. 1992, Parsons, Panchenko et al. 1996).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ

R56865 як блокатор Ca^{2+} каналів нейронів Пуркінє щура. Порівняння із німодипіном та флунаризином.

Практично всі дослідні нейрони демонстрували наявність низькопорогових Ca^{2+} струмів. Початок активації цих струмів при зсуві мембранного потенціалу на 200-300 мс від підтримуючого потенціалу (ПП) -100 mV реєструвався при тестовому потенціалі (ТП) від -60 до -50 mV. Час досягнення піку даного струму при ТП -10 mV становив 8-12 мс, стала часу падіння дорівнювала 40-50 мс. Реєстрацію низькопорогових Ca^{2+} струмів (НПС) у "чистому вигляді" проводили із використанням фтор-вмісного внутриклітинного розчину. Високопорогові Ca^{2+} канали (ВПК) інгібувалися за рахунок впливу іонів F^- на протязі 5-10-ти хвилин. Про повне інгібування свідчило поступове зникнення характерної сталої складової ("плато") реєстрованого струму. В експериментах на клітинах Пуркінє концентрація Ca^{2+} у позаклітинному середовищі була 10 mM, що дозволяло знизити струми витіку та збільшити амплітуду струму. Час природного половинного зменшення струму (природний run-down) становив 15-25 хвилин, а максимум вольт-амперної характеристики спостерігався на потенціалах від -30 до -10 mV.

У концентраційних границях від 0.01 до 10 μM R56865 блокував НПС при різних ТП. Досягнення стаціонарного рівня блокування спостерігалось після 2 хвилин прикладання антагоністу. Вольт-амперні характеристики (ВАХ), які були зафіксовані у контролі та під дією 0.1 μM R56865 демонструють відсутність потенціал-залежності ефекту блокування (Рис. 1). Враховуючи процес *g_{Ca}*-down, повне відновлення струму після прикладання 1-10 μM R56865 проходило через 4-7 хвилин (при стимулюючій частоті 1 раз на хвилину), тобто ефект блокування є зворотнім.

Вимірення стаціонарної інактивації (h_{∞}) НПС проводилося при попередньому 30-ти секундному зсуві мембранного потенціалу із наступним вимірюванням струму, який активується на максимумі ВАХ (Рис. 2). При ПП від -40 до -140 mV до та під час прикладання 0.1 μM R56865, амплітуди струмів нормувалися на амплітуду максимального струму, що реєструвався при -140 mV. Експериментальні дані достатньо добре апроксимувалися рівнянням Больцмана: $I/I_{\text{max}} = 1/(1 + \exp(V - V_0)/k)$.

Рис.1. Блокуюча дія R56865, флуваризину (Flu) та німодипіну (Nim) на НПС у нейронах Пуркіньє. Праворуч: ВАХ у контролі (•) та під дією антагоністу (○), ПП -100 mV, міжімпульсовий інтервал 30 с. Ліворуч: записи струмів у тих самих клітинах при ТП -20 mV. Час інкубації у розчинах, що містять антагоністи становив: 1 хв. для R56865, 2 хв. для флуваризину та 3 хв. для німодипіну.

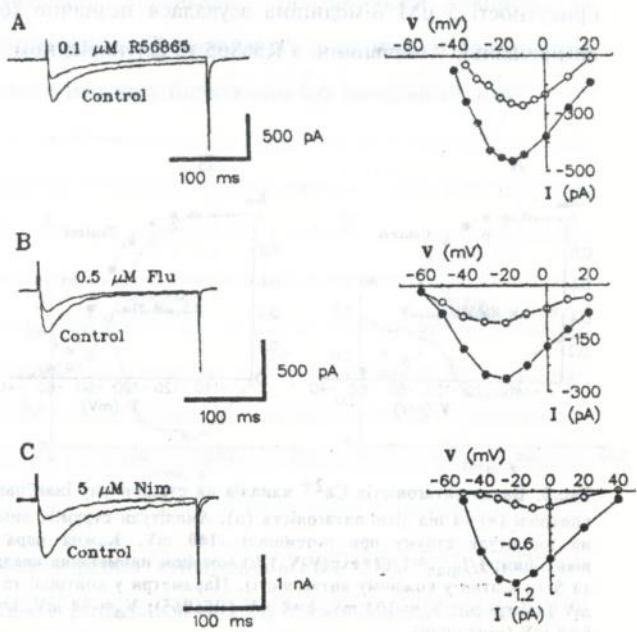


Рис. 2А демонструє, що під дією 0.1 μM R56865 відбувається зсув кривої стаціонарної інактивації на 20 ± 3 mV у бік більш від'ємних мембранних

потенціалів. Тут та далі величина зсуву кривої h_{∞} обчислювалася як різниця параметрів V_0 у контролі та під дією антагоністу \pm систематична похибка вимірювань.

Флунаризин блокував Ca^{2+} струми у більш високих концентраціях, ніж R56865. Його блокуюча здатність є також оборотною. Час повного відновлення струму, враховуючи run-down становив 4-9 хвилин та зростав за мірою збільшення прикладеної концентрації блокатора. Вимірена для 5-ти нейронів крива h_{∞} для НПС зсувалася на 10 ± 3 mV у бік більш від'ємних потенціалів під дією $0.5 \mu\text{M}$ флунаризину (Рис. 2В).

Німодипін практично повністю блокував НПС у нейронах Пуркінє мозочка у концентрації $10 \mu\text{M}$, а у концентрації $0.2 \mu\text{M}$ майже не впливав на їх амплітуду. ВАХ зсувалася під дією цього антагоністу на 10 ± 2 mV (середнє для чотирьох вимірювань) у бік більш позитивних потенціалів. Блокуюча дія підсилювалася при більш від'ємних потенціалах, що свідчило про потенціал-залежність ефекту блокування НПС (Рис. 1С). Стаціонарна інактивація, вимірена у контролі та в присутності $5 \mu\text{M}$ німодипіна зсувалася незначно (6 ± 2 mV, середнє для п'яти вимірювань), у порівнянні з R56865 та флунаризином, хоча дослідження h_{∞}

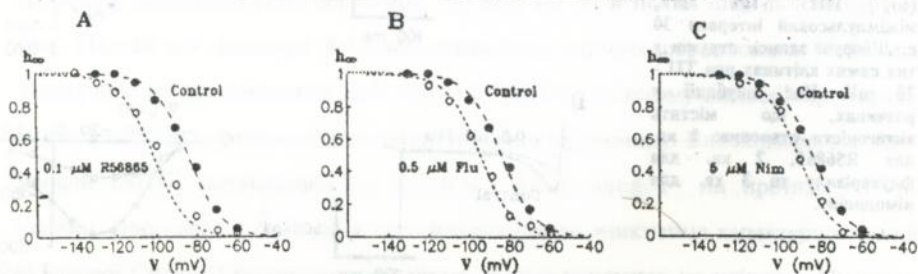
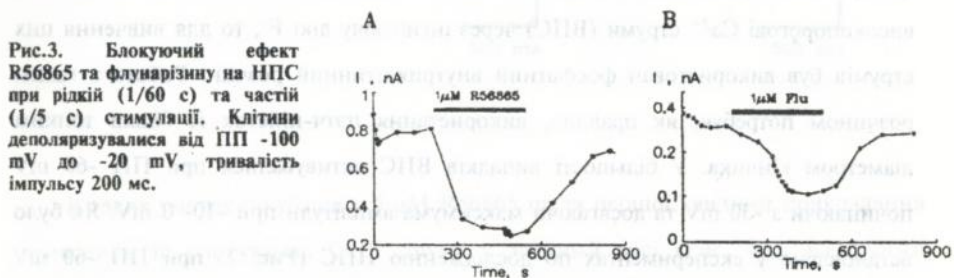


Рис.2. Вплив антагоністів Ca^{2+} каналів на стаціонарну інактивацію НПС у нейронах Пуркінє у контролі (●) та під дією антагоніста (○). Амплітуди струмів, вимірені при різних ПП нормувалися на амплітуду струму при потенціалі -140 mV. Кожна пара кривих є апроксимацією даних рівнянням: $1/1_{\max} = 1/(1 + \exp((V - V_0)/k))$ методом найменших квадратів (для 15-ти клітин у контролі та 5-ти клітин у кожному антагоністі). Параметри у контролі та під дією сполук: $V_0 = -84$ mV, $k = 8$ mV (контроль); $V_0 = -104$ mV, $k = 8$ mV (R56865); $V_0 = -94$ mV, $k = 8$ mV (флунаризин); $V_0 = -90$ mV, $k = 8$ mV (німодипін).

для німодипіну проводили при концентрації на порядок більшої, ніж для R56865 та флунаризину (Рис. 2С).

Крім ВАХ та стаціонарної інактивації важливим аспектом є визначення характеру блокування від частоти стимулюючого імпульсу (use-dependence). Ступінь блокування Ca^{2+} струмів флунаризином залежить від частоти та тривалості деполаризуючого імпульсу (ДІ). У наших експериментах ДІ подавався на клітини серією імпульсів. Зсув потенціала проводили від -100 mV до -20 mV , тривалість імпульсу становила 200 ms . Частота стимуляції у серіях імпульсів становила 1 імпульс на 5 секунд (часта стимуляція) та 1 імпульс на 60 секунд (рідка стимуляція). Аналіз характеру блокування проводили за допомогою реєстрації залежності амплітуди струму від часу (часового ходу), яка наведена на Рис.3. У контрольному розчині проводили записи амплітуд струмів при частій, а потім при рідкій стимуляції після чого клітину переносили у розчин, що містив флунаризин та повторювали вимірювання, продовжуючи стимулювати клітину із частотою 1 раз на хвилину. Коли минуло чотири хвилини частота стимуляції збільшувалася, потім флунаризин відмивали, продовжуючи записи та спостерігаючи відновлення амплітуди до її первинного значення. В розчині, що містив флунаризин після першого імпульсу блокуючий був несильний, але



розвивався по мірі продовження рідкої стимуляції (Рис. 3В). У розчині, що містив R56865, блокуючий ефект розвивався відразу після першого імпульсу та незначно зростав на протязі всього часу аплікації. Додаткова часта стимуляція в кінці прикладання R56865 не викликала додаткового блокування. У випадку з

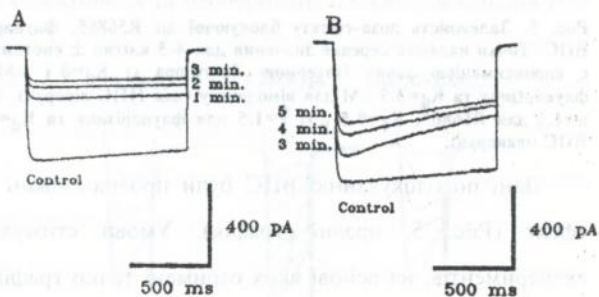
флунаризином часта стимуляція навпроти, приводила до розвитку додаткової блокуючої дії. Величина зростання ефекту блокування при частій стимуляції була порівняною з величиною ефекту при рідкій стимуляції. Порівнюючи часовий хід при дослідженні ефектів флунаризину та R56865 можна зробити висновок, що блокування НПС флунаризином йде, на відміну від R56865 із залучанням механізму use-dependence, а блокуючий ефект R56865 практично позбавлен цієї властивості.

Криві доза-ефект для блокуючої дії кожного антагоніста були отримані при вимірній амплітуді Ca^{2+} струмів при потенціалах, що відповідають максимуму ВАХ при ПП -100 mV та тривалості ДІ $200\text{-}300 \text{ ms}$. Блокуюча дія кожної сполуки вимірювалася після 3-х хвилин прикладання із частотою стимуляції 1 раз на 30 секунд. Теоретичні криві, побудовані за методом найменших квадратів, є апроксимацією експериментальних даних, що описуються рівнянням Хілла: $I/I_{\max} = ([K_d]^n / ([A]^n + [K_d]^n))$, де I_{\max} та I - амплітуди струмів, вимірені у контролі та під дією антагоніста; $[A]$ та $[K_d]$ - концентрація вільного антагоністу та рівноважна константа дисоціації (концентрація половинної дії), відповідно, n - коефіцієнт Хілла. Останні були однаковими для всіх сполук ($n=1$), досліджених на НПС, відповідні величини K_d становили $0.1 \text{ }\mu\text{M}$ для R56865, $0.9 \text{ }\mu\text{M}$ для флунаризину та $3.5 \text{ }\mu\text{M}$ для німодипіну (Рис. 5, лівий графік). Оскільки використання фтор-вмісного внутриклітинного розчину не дозволяло реєструвати високопорогові Ca^{2+} струми (ВПС) через інгібуючу дію F^- , то для вивчення цих струмів був використаний фосфатний внутриклітинний розчин. Робота з таким розчином потребує, як правило, використання п'єтч-піпеток із більш тонким діаметром кінчика. У більшості випадків ВПС активувалися при ПП -60 mV починаючи з -30 mV та досягаючи максимуму амплітуди при $-10\text{-}0 \text{ mV}$. Як було встановлено у експериментах по дослідженню НПС (Рис. 2) при ПП -60 mV НПС були повністю інактивовані, таким чином досліджувалися тільки ВПС. Час зростання струму збігався із часом до піку у випадку НПС, однак кінетика спаду була повільнішою. Струм лише частково інактивувався при деполяризації до -10 mV та тривалості імпульсу 1 s (Рис. 4). Час природного половиного run-down становив $35\text{-}45$ хвилин. Для отримання ВАХ ВПС реєструвалися із 30 s

міжімпульсовими інтервалами та тривалості деполяризуючого імпульсу 100-200 мс. Для усунення впливу НПС при потенціалі -60 мV, амплітуда ВПС вимірювалася в кінці імпульсу (усереднювалося значення по 10-ти останнім точкам). ВАХ, отримані для R56865, флунаризину та німодипіну не зсувалися під дією антагоністів.

Для дослідження характеру блокування застосовувалися два типи імпульсації: короткі імпульси (з тривалістю 200 мс) та довгі (з тривалістю 1 с). ПП був однаковим в обох випадках -60 мV, ДІ відповідав максимуму ВАХ. Експерименти з короткими імпульсами проводили із використанням протоколу аналогічному тому, який застосовувався для дослідження НПС. В даних умовах R56865 на відміну від флунаризину також не виявляв властивостей use-dependence. Для того щоб перевірити чи блокує флунаризин ВПК переважно у відкритому стані для ВПС був застосован протокол із стимуляцією довгими (1 с) імпульсами та міжімпульсовим інтервалом 60 с.

Рис.4. Порівняння блокуючої дії R56865 та підтвердження use-dependence для флунаризину на ВПС. Клітини деполаризувалися від ПП -60 мV до -10 мV, тривалість імпульсу 1 с, частота стимуляції $1/60$ с. Час інкубації для кожного запису вказан на рисунку.



В таких умовах інкубація у $5 \mu\text{M}$ R56865 після першої хвилини прикладання приводила до блокування Ca^{2+} струму у значний мірі (Рис. 4А), на протязі подальшого часу ступінь блокування зростала лише частково, досягаючи насичення під кінець третьої хвилини витримки в антагоністі. На відміну від R56865, флунаризин у тій ж самій концентрації навіть після 3 хвилин аплікації без стимулювання незначно зменшував пікове значення струму ($16 \pm 5\%$), але зміна кінетики спаду була досить вагома (Рис. 4В). Таким чином пролонгована

активація ВПС підтвердила відсутність властивості use-dependence для R56865 та наявність цієї властивості для флунаризину. За даних умова німодипін блокував ВПС значно менш ефективно, ніж флунаризин та R56865.

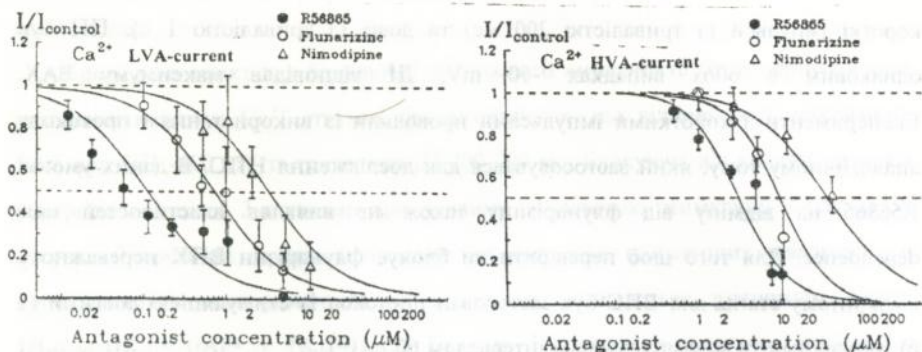


Рис. 5. Залежність доза-ефекту блокуючої дії R56865, флунаризину та німодипіну на НПС та ВПС. Точки надають середнє значення для 4-5 клітин \pm систематична похибка вимірювань. Криві є апроксимацією даних ізотермою Ленгмюра із $K_d=0.1 \mu\text{M}$ для R56865, $K_d=0.9 \mu\text{M}$ для флунаризину та $K_d=3.5 \mu\text{M}$ для німодипіну (для НПС ліворуч), та рівнянням Хілла із $K_d=3.1 \mu\text{M}$, $n=1.5$ для R56865, $K_d=9.5 \mu\text{M}$, $n=1.5$ для флунаризину та $K_d=38 \mu\text{M}$, $n=1$ для німодипіну (для ВПС праворуч).

Дані по блокуванню ВПС були проаналізовані та наведені у вигляді доза-ефект (Рис. 5, правий графік). Умови стимуляції клітин та протоколи експериментів, на основі яких отримані точки графіку доза-ефект були такими ж, як у випадку дослідження НПС. Величини K_d та коефіцієнти Хілла становили для R56865, флунаризину та німодипіну $3.1 \mu\text{M}$, $n=1.5$, $9.5 \mu\text{M}$, $n=1.5$ та $38 \mu\text{M}$, $n=1$, відповідно.

Вплив диаденозин-поліфосфатів на високопорогові кальцієві канали у нейронах гіпокампу.

Максимальний ВПС реєструвався після деполяризації мембрани перфузованого нейрону від ПП -100 mV до ТП $-10 - 0 \text{ mV}$. Час деполяризуючого зсуву становив 50 ms , інтервал між стимулюючими імпульсами $5 - 15 \text{ s}$. Ці параметри дозволяли проводити реєстрацію ВПС в оптимальних умовах,

уникаючи впливу повільної інактивації на вимірену амплітуду струмів. Типова амплітуда ВПС у цих умовах становила 500 - 1000 pA. Час зростання струму для ТП -10 mV становив 10-15мс, стала спаду струму 500- 600 мс. Час природного половиного зменшення струму на протязі експерименту (half rundown) становив 35-45 хвилин. Для отримання ВАХ рееструвалися струми, що викликаються ДІ різної амплітуди із міжімпульсовим інтервалом 15 с. Як правило ВАХ не зсувалися під дією прикладаних сполук. Прикладання 5 μM Ar_5A приводило до швидкого та оборотнього збільшення вхідного струму через Ca^{2+} канали. Таке зростання струму виявило властивості потенціал-залежності та було більш значним при більш від'ємних потенціалах (Рис. 6). З 52-х досліджених нейронів 37 демонстрували значне зростання струму через Ca^{2+} канали. Ефект вважався значним, коли він не перебільшував умовно прийнятий мінімальний рівень величиною 5% від вихідної величини струму.

Щоб ідентифікувати, який з типів Ca^{2+} каналів бере участь у зростанні вхідного Ca^{2+} струму, в ролі селективних та необоротних блокаторів каналів P- і

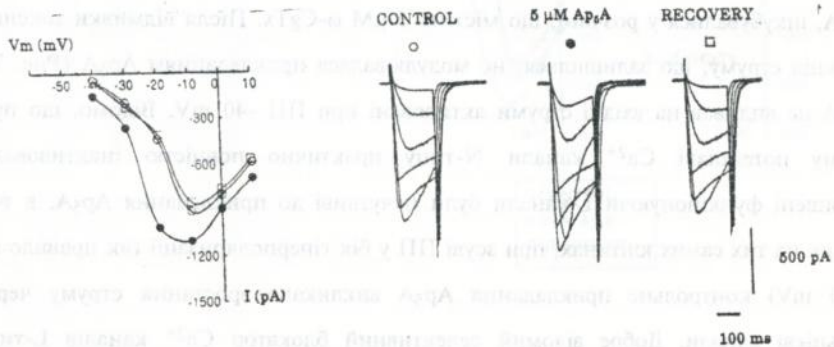


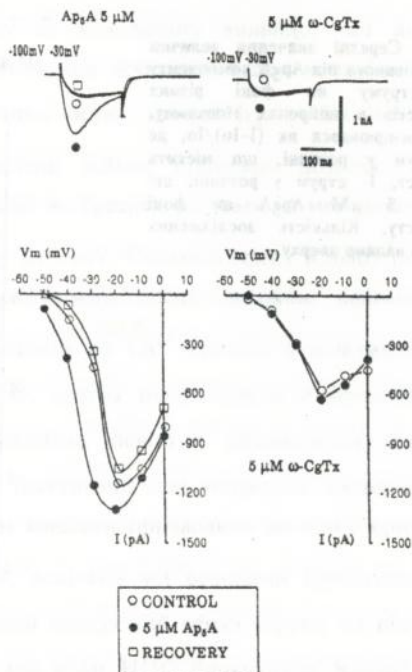
Рис. 6. Потенціація ВПС через Ca^{2+} канали, яка була викликана прикладанням Ar_5A у нейронах гіпокаму. ВАХ наведена для пікових значень струмів у контролі, після 1 хвилини інкубації у Ar_5A та після "відмивки" сполуки. ТП -100 mV, міжімпульсовий інтервал 15 с.

N- типу були обрані відповідно ω -Aga-IVA та ω -CgTx. У розвитку експеримента із даними блокаторами після 5 хвилин інкубації у розчині, який містить 200 nM ω -Aga-IVA, зростання Ca^{2+} струму зберігалось. У контрольних експериментах були перевірені необоротність та насиченість дії обох токсинів після 5-ти хвилинної інкубації клітин у кожному з них у концентрації 200 nM ω -Aga-IVA та 5 μM ω -

CgTx. Інкубація у цих умовах є достатньою для отримання необоротної та насиченої дії. Для проведення цих експериментів використовувався наступний експериментальний протокол. Після реєстрації ВАХ у контрольному розчині, вимірення повторювали у присутності $5 \mu\text{M}$ Ar_5A . Після відмивки Ar_5A ВАХ реєструвалася знову у контрольному розчині. Після чого клітину витримували в одному з токсинів на протязі 5-ти хвилин та, по виходу цього часу, знову знімали ВАХ, та переносили клітину у контрольній розчин. Завдяки необоротності дії токсинів реєстровані знову значення ВАХ співпадали або були трохи менше тих, що були отримані під дією токсину. Оброблену таким чином клітину знову переносили у розчин, що містить $5 \mu\text{M}$ Ar_5A . Потенціююча здібність останнього повністю зберігалася після інкубації у 200 nM $\omega\text{-Aga-IVA}$. В середньому для 6 клітин оброблених даним токсином наступне прикладання Ar_5A викликало збільшення пікового значення струму максимуму ВАХ на $14 \pm 5\%$. Селективний блокатор N-каналів $\omega\text{-CgTx}$, який був прикладаний на 5 хвилин у концентрації $5 \mu\text{M}$ блокував струми в середньому на $34 \pm 7\%$ від контрольного значення. Клітини, які спочатку демонстрували збільшення вхідного струму під дією $5 \mu\text{M}$ Ar_5A , інкубувалися у розчині, що містить $5 \mu\text{M}$ $\omega\text{-CgTx}$. Після відмивки токсину фракція струму, що залишилася, не модулювалася прикладанням Ar_5A (Рис. 7). Ar_5A не впливав на вхідні струми активовані при ПП -40 mV . Відомо, що при цьому потенціалі Ca^{2+} канали N-типу практично повністю інактивовані. Залишені функціонуючі L-канали були нечутливі до прикладання Ar_5A , в той час як на тих самих клітинах, при зсуві ПП у бік гіперполяризації (як правило до -100 mV) контрольне прикладання Ar_5A викликало зростання струму через кальцієві канали. Добре відомий селективний блокатор Ca^{2+} каналів L-типу ніфедипін не блокував ефекти збільшення Ca^{2+} струму під впливом Ar_5A . Прикладання $5 \mu\text{M}$ Ar_5A на фоні ніфедипіну у концентрації $50 \mu\text{M}$ викликало потенціацію струму по власним параметрам, яка була схожою із тою, яка спостерігалася на тих самих клітинах у відсутності ніфедипіну. З метою виявлення типу рецептору, що сполучений з каналами, які активуються Ar_5A , були досліджені антагоністи аденозинових рецепторів A_1 та A_2 типів 8-циклопентил-1,3-диметилксантін (CPT) та 3,7-диметил-пропаргілксантін

(DMPX) відповідно. Було знайдено, що у даних експериментальних умовах жоден з цих антагоністів не впливав на потенціацію струмів через Ca^{2+} канали. Умови проведення експериментів з СРТ та DMPX були тіж самі, що у випадку застосування ніфедипіну. Інкубація, як у 500 nM СРТ, так і в 5 μM DMPX (насичені концентрації для A_1 та A_2 рецепторів, відповідно) на протязі 2 хвилин не викликало будь-якої дії на збудливі Ca^{2+} струми.

Рис. 7. Дія Ar_5A на ВПС до та після інкубації пірамідного нейрону гіпокампу у $\omega\text{-CgTx}$. Потенціація викликана Ar_5A (ліворуч), повністю зникла після 5 хвилин інкубації у $\omega\text{-CgTx}$ (праворуч).



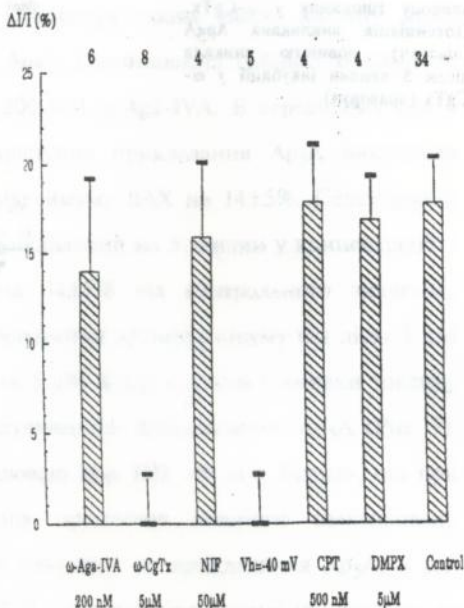
У той час прикладання на фоні цих антагоністів розчинів із 5 μM Ar_5A викликало потенціюючий ефект, близький до вихідного.

Дані що стосуються Ar_5A -індукованого збільшення сумарного струму через Ca^{2+} канали та впливу на це збільшення різних сполук надані на Рис. 8. Усі досліджені клітини були чутливі до аденозину ($n=51$), тобто прикладання цієї сполуки у концентрації 50 μM викликало часткове швидке та оборотне блокування струму крізь Ca^{2+} канали, але цей ефект не завжди корелював із чутливістю до Ar_5A . Так наприклад, коли аденозин блокував струми в усіх 52-х

клітинах, 15 з них виявилися не чутливі до Ar_5A (ефект потенціації був менший 5% або відсутній).

Ефекти впливу прикладання позаклітинного розчину, що містить 5 та 100 μM АТФ не були виявлені при дослідженні 14-ти нейронів, у яких спостерігалися, як ефекти блокування аденозином, так й ефекти потенціації під дією Ar_5A . Це дозволило виключити з розгляду декілька типів пурінергічних рецепторів при вивченні явища потенціації.

Рис. 8. Середні значення величин потенційованого під Ar_5A компоненту Ca^{2+} струму на фоні різних антагоністів в нейронах гіпокампу. Ефект вимірювався як $(I-1_0)/1_0$, де 1_0 - струм у розчині, що містить антагоніст, I - струм у розчині, що містить 5 μM Ar_5A на фоні антагоністу. Кількість досліджених нейронів надано зверху.



ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

В цьому дослідженні було встановлено, що, як R56865, так і флунаризин не зсували ВАХ при блокуванні НПС. Аналогічні дані для флунаризину були отримані раніш на клітинах нейробластоми [Wang et al. 1990]. Під дією німодипіну ВАХ зсувалася у бік позитивних потенціалів на $10 \pm 2\%$. Цей факт засвідчує про потенціал-незалежність дії R56865 та флунаризину на НПС та про

наявність залежності блокуючої дії німодипіну від мембранного потенціалу. Зсув ВАХ при аплікації німодипіну дозволяє припустити, що німодипін викликає перерозподіл заряду поверхні мембрани поблизу місць, де розташовані канали й таким чином впливає на функціонування цих каналів [Hodgkin, Keynes 1957]. Відомо, що флунарізин зсуває криву стаціонарної інактивації Ca^{2+} каналів у бік від'ємних потенціалів [Wang et al. 1990], в цьому дослідженні було отримано підтвердження цього явища в клітинах Пуркінє. Дослідження стаціонарної інактивації для R56865, флунарізину та німодипіну виявило, що всі три антагоністи зсувають криві h_{∞} , але величина зсуву різна для кожного з них. Встановлено, що для R56865 величина зсуву кривої h_{∞} у бік від'ємних потенціалів є максимальною, флунарізин займає проміжну позицію, а для німодипіна зсув h_{∞} є несуттєвим та може не братися до уваги за методикою, яка не вимагає точності фіксації потенціалу до 5 mV. Сильний ефект R56865 по зсуву h_{∞} може бути пояснений його припустимо більш високою афінністю у порівнянні з флунарізином та німодипіном до Ca^{2+} каналів в інактивованому стані. Більш того ця сполука, видимо, здатна підтримувати й продовжувати інактивованій стан каналу. Цей механізм, певно є аналогічним відомому механізму зсуву кривої стаціонарної інактивації для натрієвих каналів, коли зв'язування речовини з інактивованим каналом призводило до зсуву кривої h_{∞} [Khodorov et al. 1976]. Таким чином, оскільки усі речовини прикладалися у концентраціях, що викликали однаковий блокуючий ефект струму на піку ВАХ (див. Рис. 5), можливо припустити, що коли НПС блокуються R56865, то у мембрані клітини Пуркінє більша доля каналів знаходиться в інактивованому стані, ніж у випадку блокування струмів флунарізином та німодипіном. Але блокуючий ефект кожного з блокаторів не може бути пояснений тільки за рахунок зсуву h_{∞} .

Раніше було показано, що флунарізин блокує як ВПС так й НПС, показано також, що це блокування має властивість use-dependence в різних біологічних об'єктах [Akaike et al. 1989, Pauwels et al. 1991, Regan 1991]. У нашому дослідженні ми перевірили цю властивість флунарізину для клітин Пуркінє мозочка щура. На відмінність від флунарізину, при блокуванні ВПС речовиною

R56865 use-dependence дія цього антагоністу була відсутня. Відсутність use-dependence у випадку аплікації R56865 підтверджується фактом швидкого блокування Ca^{2+} струмів за відсутністю стимуляції. Якщо порівняти часовий хід блокування для R56865 та флунарізину на НПС та ВПС, можливо помітити, що при рідкій стимуляції флунарізин призводив до неповного блокування, яке ставало сильнішим при збільшенні частоти стимуляції. Дія R56865 не залежала від частоти стимуляції і ефект R56865 досягав насичення набагато скоріше, ніж ефект флунарізину. Зміна кінетики струму під дією флунарізину та відсутність будь-яких змін у випадку прикладання R56865 свідчать про те, що флунарізин взаємодіє переважно із відчиненими Ca^{2+} каналами, в той час як R56865 діє на закриті та відкриті канали у рівному ступені (Рис. 4).

Криві доза-ефект, отримані для флунарізину та німодипіну для НПС у клітинах Пуркінє виявилися аналогічними для дії цих антагоністів в ізольованих нейронах гіпоталамуса щура [Akaike et al. 1989]. Таким чином можливо припустити відсутність специфічності ефектів в різних регіонах мозоку для флунарізину та німодипіну. Із аналізу результатів, що приведені на Рис. 5 впливає такий порядок афінності досліджених антагоністів для канал-рецепторного комплексу НПК: R56865 > флунарізин > німодипін. Для ВПС афінність всіх антагоністів була нижче, ніж для НПС. Різні нахили кривих доза-ефект для R56865 та флунарізину у порівнянні із німодипіном дозволяють припустити різні механізми дії цих блокаторів на ВПС. Коефіцієнти Хілла для R56865 та флунарізину ($n=1.5$), відмінні від німодипіну ($n=1$), можливо, свідчать про більш ніж один центр зв'язування для молекул R56865 та флунарізину у комплексі рецептор-канал ВПК. Для німодипіну є лише один центр зв'язування з канал-утворюючим комплексом Ca^{2+} каналів обох типів.

Відомо, що дигідропіридини здатні частково блокувати ВПС у клітинах Пуркінє [Regan 1991]. В цьому дослідженні показано, що німодипін у концентрації 10 μM блокує ВПС клітин Пуркінє на 20%, в той час як R56865 та флунарізин у цій же концентрації блокує ВПС майже повністю (Рис. 5). Цей факт корелює із сучасним положенням про те, що ВПС в клітинах Пуркінє мозоку представлені в основному каналами Р-типу. Як відомо Р-канали не

чутливі до дигідропіридинів, тому блокування їх за допомогою R56865 та флунаризину дозволяє припустити можливість фармакологічного впливу на даний тип каналів. Вплив R56865 на P-канали за попередніми даними, що викладені в цій праці, є сильнішим ніж вплив флунаризину (Рис. 5), хоча докладне дослідження цього питання, вивчення вибірковості дії R56865 на той чи інший тип каналів потребує, безумовно, застосування ω -Aga-IVA та інших токсинів, для коректного фармакологічного підходу.

Представлені результати свідчать про те, що R56865 блокує Ca^{2+} струми в нейронах Пуркінє більш ефективно, ніж флунаризин та німодипін. Такі характеристики даного блокатору, як а) відсутність use-dependence при блокуванні Ca^{2+} струмів та б) зменшення необхідного рівню деполяризації для інактивації Ca^{2+} каналів дозволяє припустити використання R56865 як ефективний нейропротектор, що запобігає кальцієвому перевантаженню клітини.

В дослідженні модуляції Ca^{2+} струмів диаденозин-поліфосфатами було виявлено, що Ar_5A призводить до збільшення ω -CgTx -чутливого компоненту струму через ВПК на $18 \pm 5\%$. Висока специфічність ω -CgTx дозволяє стверджувати, що Ar_5A селективно потенціює N-тип Ca^{2+} каналів у нейронах гіпокампу. Ефект фасилітації Ca^{2+} струмів пірамідних нейронів гіпокампу добре корегує із збільшенням входу Ca^{2+} в синапсосомах середнього мозку [Panchenko et al. 1996].

Експерименти з ніфедипіном, як на ізольованих нейронах (Рис. 8), так й на синапсосомах, виключають участь дигідропіридин-чутливих Ca^{2+} каналів (L-тип) в процесі потенціації. Експерименти, у яких показана потенціал-залежність потенціації, її наявність при ПП -100 mV та відсутність при -40 mV, підтверджують участь Ca^{2+} каналів N-типу та відсутність участі Ca^{2+} каналів L-типу в цьому процесі.

В попередніх дослідженнях на зрізах гіпокампу [Klishin et al. 1994] було показано, що диаденозин-поліфосфати складним чином впливають на синаптичну передачу: під дією Ar_5A синаптична передача інгибується з наступним транзйентним овершотом постсинаптичного популяційного потенціалу після видалення розчину, що містить Ar_5A . Наші результати можуть частково

пояснити цей феномен. Транзійентно зростаюча ефективність синаптичної передачі, викликана дією Ar_5A може бути пов'язана із збільшенням рівню Ca^{2+} в пресинаптичних терміналях.

Наші дані показують, що різноманітність пурінергічних рецепторів, що регулюють синаптичну передачу в ЦНС дещо ширша, ніж вважалося до сих пір. Так, наприклад, постульоване раніше положення про наявність тільки A_1 і A_2 типу рецепторів в гіпокампі, не може пояснити описане явище потенціації Ca^{2+} струмів [Bruns et al. 1987]. Як показано на Рис. 8 специфічні антагоністи A_1 і A_2 рецепторів CPT та DMPX не впливали на здатність диаденозин-поліфосфатів збільшувати струм через Ca^{2+} канали. Блокуюча дія аденозину припустимо пов'язана з A_1 рецептором [Mogul et al. 1993] не коррегуювала з ефектами, викликаними Ar_5A . Що також дає змогу говорити про відсутність участі цього типу рецептору в процесі потенціації. Совокупність цих даних дозволяє припустити, що ефект фасилітації Ca^{2+} каналів забезпечується специфічними рецепторами [Pintor et al. 1995]. З іншого боку пригнічення синаптичної передачі під диаденозин-поліфосфатами у зрізах гіпокампу запобігалось антагоністом A_1 рецепторів CPT [Klishin et al. 1994]. Цю суперечність можуть пояснити дані, отримані рядом авторів [Scanziani et al. 1992, Scholz, Miller 1992], коли інгибування всіх типів Ca^{2+} каналів не було необхідним для інгибування мініатюрних збуджуючих постсинаптичних струмів аденозином в нейронах гіпокампу.

Різна дія АТФ на синапсосомах та ізольованих нейронах також є свідченням наявності різних типів рецептор-ефекторних механізмів для диаденозин-поліфосфатів та АТФ в різних ділянках мозоку [Panchenko et al. 1996]. Враховуючи те, що ніфедипін блокував ефекти збільшення входу Ca^{2+} в синапсосомах, припустима наявність пурінорецептору, що регулює Ca^{2+} канали L-типу, які керуються АТФ, як N-канали - диаденозин-поліфосфатами. В останній час було запропоновано класифікувати два типу даних рецепторів як P_{2d} і P_4 [Pintor et al. 1995].

Ca^{2+} канали N-типу модулюються багатьма основними нейротрансмітерами та нейромодуляторними речовинами: глутамат, ГАМК, аденозин и т.д. [Carbone et

al 1989, Swartz, Bean 1992]. Модулююча дія диаденозин-поліфосфатів на Ca^{2+} канали N-типу є ще одним підтвердженням важливості зв'язку цього типу каналів з широким спектром речовин, що приймають участь у функціонуванні ЦНС. Здатність диаденозин-поліфосфатів впливати на процеси в нейронах мозку є свідченням важливості подальшого вивчення даного класу речовин.

Дія фармакологічних речовин, досліджених в даній роботі на Ca^{2+} канали носить різнобічний характер, викликаючи або блокаду, або потенціювання різних компонентів Ca^{2+} провідності. Особливо важливими для фармакології є такі можливості: (а) потенціал-керований блок; (б) "use-dependent"-блок та (в) потенціація активності N-каналів, що приймають активну участь у синаптичній передачі.

ВИСНОВКИ

1. За допомогою методу фіксації потенціалу "patch-clamp" в конфігурації "whole-cell" визначені основні електрофізіологічні характеристики Ca^{2+} струмів пірамідних нейронів гіпокампі та нейронів Пуркін'є мозочка щура. В нейронах Пуркін'є ізольовані та вивчені ВПС та НПС. Визначені характерні параметри часу активації та інактивації, потенціалзалежності, стаціонарної інактивації для цих струмів.

2. Вивчено дію нового блокатору R56865 на Ca^{2+} струми нейронів Пуркін'є щура у порівнянні з флунарізином і німодипіном. Встановлена така послідовність здатності трьох антагоністів Ca^{2+} каналів блокувати Ca^{2+} струми в клітинах Пуркін'є: R56865 > флунарізин > німодипін. Відповідні концентрації половинної дії (K_d) становлять 0.1, 0.9, 3.5 μM для НПС і 3.1, 9.5, 38 μM для ВПС.

3. При дослідженні стаціонарної інактивації НПС прикладання R56865, флунарізину і німодипіна в концентраціях блокуючих 50-60% струму призводило до зсуву кривої h_{∞} в бік від'ємних мембранних потенціалів. Для R56865 такий зсув був максимальним та становив 20 ± 3 mV ($n=5$), однак блокуюча дія даної речовини не зводилась лише до зсуву h_{∞} : максимальна кальцієва провідність також зменшувалась.

4. При дослідженні пірамідних нейронів гіпокампа показано, що аденозин в концентрації 10 μM здатен блокувати ВПС, однак прикладання АТФ, негідролізованих аналогів АТФ і диаденозин-поліфосфатів на тих же клітинах не викликало блокування Ca^{2+} струмів.

5. Прикладання диаденозин-пентафосфата в концентрації 5 μM приводило до зворотнього збільшення ВПС в середньому на $18 \pm 3\%$ (при величині порогу певності реєстрації потенціалізації 5%) в більшості досліджених нейронів (36 із 51).

6. Високопороговий компонент Ca^{2+} струму потенційований прикладанням 5 μM Ar_5A неоворотньо блокувався селективним блокатором каналів N-типу $\omega\text{-CgTx}$ (5 μM) і не виявляв чутливості до $\omega\text{-Aga-IVA}$ (200 nM) і ніфедипіну (50 μM). Ефект потенціалізації оборотно усувався зміщенням ПП до -40 mV. Таким чином показано, що канали, які потенціюються під Ar_5A , є каналами N-типу.

7. Потенціалізація Ca^{2+} каналів N-типу під Ar_5A не усувалася при застосуванні селективних антагоністів аденозинових рецепторів A_1 та A_2 типу, СРТ (5 μM) і DMPX (500 nM). Рецептори, що, не відносяться до загальноприйнятих підтипів A_1 та A_2 , а є, напевно, новим підтипом рецепторів (нещодавно класифікованим як P_4), вивчення якого вимагає подальших досліджень.

Перелік робіт, опублікованих за матеріалами дисертації.

A) Статті в журналах та збірниках:

1.R56865 AS Ca^{++} -CHANNEL BLOCKER IN PURKINJE NEURONS OF RAT: COMPARISON WITH FLUNARIZINE AND NIMODIPINE.

V.A.Panchenko, O.A.Krishtal, F.Tegtmeier and A.Ya.Tsyndrenko *Neuroscience* Vol.54, No.3, pp.587-594, 1993

2.DIADENOSINE POLYPHOSPHATES SELECTIVELY POTENTIATE N-TYPE OF Ca^{++} CHANNELS IN THE RAT CENTRAL NEURONES.

V.A.Panchenko, J.Pintor, A.Ya.Tsyndrenko, M.T.Miras-Portugal and O.A.Krishtal. *Neuroscience*, Vol.70, No.2, pp.353-360, 1996

3.MODULATORY EFFECTS OF DIADENOSINE POLYPHOSPHATES ON DIFFERENT TYPES OF CALCIUM CHANNELS IN THE RAT CENTRAL NEURONES.

V.A.Panchenko, J.Pintor, A.Ya.Tsyndrenko, M.T.Miras-Portugal and O.A.Krishtal. *Neurophysiology*, 26 (6), 409-416, 1994.

4.COMPARATIVE PATCH CLAMP STUDIES WITH FRESHLY DISSOCIATED RAT HIPPOCAMPAL AND STRIATAL NEURONES ON THE NMDA RECEPTOR ANTAGONISTIC EFFECTS OF AMANTADINE AND MEMANTINE.

C.G. Parsons, V.A. Panchenko, V.O. Pinchenko, A.Y. Tsyndrenko and O.A. Krishtal. *European Journal of Neuroscience*: Vol.8, 446-454, 1996.

5. THE POTENTIATION OF N-TYPE Ca^{++} CHANNELS BY DIADENOSINE POLYPHOSPHATES IN THE RAT CENTRAL NEURONES.

V.A. Panchenko, J. Pintor, A. Ya. Tsyndrenko, M.T. Miras-Portugal and O.A. Krishtal. *J. Physiol.* 487, 199, 1995.

Б) Тези і реферати доповідей:

6. DIADENOSINE POLYPHOSPHATES SELECTIVELY POTENTIATE N-TYPE OF Ca^{++} CHANNELS IN THE RAT CENTRAL NEURONES.

V.A. Panchenko, J. Pintor, A. Ya. Tsyndrenko, M.T. Miras-Portugal and O.A. Krishtal. *Biophysical Society Annual Meeting (San-Francisco 1995)*.

Victor A. Panchenko. Electrophysiological and pharmacological characteristics of different types of calcium channels in the rat hippocampal pyramidal neurones and Purkinje cells.

The dissertation (manuscript) is presented in accordance with requirements for the degree of candidate (PhD) of biological sciences in the speciality 03.00.05 biophysics. A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, Ukrainian National Academy of Sciences, Kiev, 1996.

The blocking action of recently synthesized benzothiazolamine derivative R56865 was compared with that of dihydropyridine (nimodipine) and diphenylalkylamine (flunarizine) on low-voltage-activated and non-inactivating high-voltage-activated Ca^{++} currents. The experiments were carried out on freshly isolated Purkinje neurons of rat cerebellum using patch-clamp technique in the whole-cell configuration. Among the substances tested R56865 was found to be the most effective blocker of the Ca^{++} current. In the sequence R56865, flunarizine and nimodipine, apparent K_d values for LVA current are 0.1 μM , 0.9 μM and 3.5 μM , and for HVA current 3.1 μM , 9.5 μM , 38 μM , respectively. The current-voltage relationships for both types of currents displayed little or no shift under either flunarizine or R56865 but showed a 10 mV shift in the positive direction under the action of nimodipine. The steady-state inactivation curves for LVA calcium currents were shifted under the action of R56865, flunarizine and nimodipine (in concentrations which blocked 50-60% of the current) to more negative membrane potentials for 20 mV, 10 mV and 6 mV, respectively. In contrast to R56865, flunarizine blocked both types of Ca^{++} channels in a use-dependent manner. It is concluded that the order of potency of Ca^{++} antagonist for both types of channels studied is R56865 > flunarizine > nimodipine. Strong shift of steady-state inactivation relationship by R56865 can further facilitate its blocking action in vivo conditions. Calcium ions play a key role in the regulation of many cellular functions. Recent electrophysiological studies indicate the existence of at least three types of voltage-operated Ca^{++} channels. They have different electrophysiological characteristics and pharmacological properties. Numerous organic and inorganic Ca^{++} channel antagonists have been developed with specificities varying in respect to different calcium currents. The class of dihydropyridines is the most well studied among Ca^{++} channel blockers. One of them, nimodipine was taken as reference substance to compare its blocking action on Ca^{++} channels with action of two other drugs. According to classification of Ca^{++} antagonists by the World Health Organization, flunarizine is classified as a class IV Ca^{++} antagonist, non-selective for slow Ca^{++} channels. Flu protects the brain against functional and/or structural neuronal damage in various animal models of cerebral ischemia. In addition to its cerebrovascular effect, Flu has also direct

neuroprotective action. Flu blocks both low-voltage-activated (LVA) and non-inactivating high-voltage-activated (HVA) channels. Clinically, it has been used to treat a number of diseases: vertigo, migraine, epilepsy and some heart diseases. Recently synthesized substance N-[1-[(4-fluorophenoxy) butyl]-4-piperidinyl]-N-methyl-2-benzothiazolamine (R56865) is a prototype of a promising new class of substances that protect cells from the consequences of ischemia. R56865 is known to inhibit the cardiac glycoside-induced gain in sodium and calcium in myocytes and to prevent ouabain-induced Ca^{++} overload of cardiac muscle. These phenomena seem to correlate with the blockade of LVA and HVA currents in myocytes and cardiac muscles. But the action of R56865 on Ca^{++} channels in central neurons remains unknown. One of the aims of this study was to compare the blocking action of three antagonists, R56865, Flu and Nim on two types of Ca^{++} channels in the membrane of the Purkinje neurons of rat.

The action of diadenosine polyphosphates on high voltage activated Ca^{++} channels were studied in freshly isolated hippocampal neurones using whole-cell patch-clamp technique. Current-voltage relationships were measured in control and after incubation in 5 μ M Ap4A or Ap5A. The latter procedure led to the 15% \pm 3 of reversible increase of current through Ca^{++} channels when measured at the holding potential of -100 mV but not at -40 mV. Nifedipine failed to block this effect. In isolated neurones nifedipine-sensitive current trough L-type Ca^{++} channels didn't demonstrate the increase under diadenosine polyphosphates. The potentiation of current trough Ca^{++} channels in hippocampal neurones were irreversibly blocked by 5 μ M ω -Conotoxin, but not by 200 nM ω -Aga-IVA. These data indicate that diadenosine polyphosphates enhance activity of N-type Ca^{++} channels in the central neurones of rat.

В.А. Панченко Электрофизиологические и фармакологические характеристики различных типов кальциевых каналов пирамидных нейронов гиппокампа и клеток Пуркинье крысы.

Диссертация (рукопись) на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.05 - биофизика. Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев 1996.

Целью представленной работы было провести комплексное исследование свойств потенциалуправляемых кальциевых каналов плазматической мембраны нескольких типов клеток ЦНС крысы. Изучить их основные электрофизиологические и фармакологические характеристики, а также выяснить механизмы регуляции этих каналов с помощью модулирующего воздействия диаденозин-полифосфатов на аденозиновые рецепторы.

Изучено действие нового блокатора R56865 на кальциевые токи нейронов Пуркинье крысы в сравнении с флунаризином и нимодипином. Установлена следующая последовательность для способности трех антагонистов кальциевых каналов блокировать кальциевые токи в клетках Пуркинье: R56865 > флунаризин > нимодипин. Соответствующие концентрации половинного действия (K_d) равны 0.1, 0.9, 3.5 μ M для низкопороговых токов и 3.1, 9.5, 38 μ M для высокопороговых токов. При исследовании стационарной инактивации низкопороговых кальциевых токов приложение R56865, флунаризина и нимодипина в концентрациях блокирующих 50-60% тока приводило к сдвигу кривых h_{∞} в сторону более отрицательных мембранных потенциалов. Для R56865 такой сдвиг был максимальным и составлял 20 ± 3 mV ($n=5$), однако блокирующее действие данного вещества не сводилось только к сдвигу h_{∞} ; максимальная кальциевая проводимость также уменьшалась. При исследовании пирамидных нейронов гиппокампа показано, что аденозин в концентрации 10 μ M способен блокировать высокопороговые кальциевые токи, однако приложение АТФ, негидролизуемых аналогов АТФ и диаденозин-полифосфатов

на тех же клетках не вызывало блокирования кальциевых токов. Приложение диаденозин-пентафосфата в концентрации $5 \mu\text{M}$ приводило к обратимому увеличению высокопороговых кальциевых токов в среднем на $18 \pm 3\%$ (при величине порога достоверной регистрации потенциации 5%) в большинстве исследованных нейронов (36 из 51). Высокопороговый компонент кальциевого тока, потенцированный приложением $5 \mu\text{M}$ Ar_5A , необратимо блокировался селективным блокатором каналов N-типа $\omega\text{-CsGTx}$ ($5 \mu\text{M}$) и не проявлял чувствительности к $\omega\text{-Aga-IVA}$ (200 nM) и нифедипину ($50 \mu\text{M}$). Эффект потенциации обратимо устранялся смещением поддерживаемого мембранного потенциала до -40 mV . Таким образом, показано, что каналы, потенцируемые под Ar_5A , являются каналами N-типа. Потенциация кальциевых каналов N-типа под Ar_5A не устранялась при применении селективных антагонистов аденозиновых рецепторов A_1 и A_2 типа, CPT ($5 \mu\text{M}$) и DMPX (500 nM). Рецепторы, отвечающие за этот эффект, не относятся к общепринятым подтипам A_1 и A_2 рецепторов аденозина, а представляют собой, по-видимому, новый подтип рецепторов (недавно классифицированный как P_4), изучение которого требует дальнейших исследований.

Ключові слова: кальцієвий струм, кальцієві канали, R56865, флунаризин, диаденозин-поліфосфати, аденозинові рецептори.

Підписано в печать 10.07.96г. Формат 60x84/16
Усл.печ.л. 1,4 Учетно-изд.л. 1,5 Тираж 100
Бум.офс.№1 Зак. 68

Издательство "ЛОГОС"
г.Киев, ул. Б.Хмельницкого, 19

4292 15

AB 35.359