

УДК 577.352.53

МОДУЛЯЦИЯ КАЛЬЦИЙ-АКТИВИРУЕМЫХ ХЛОРНЫХ ТОКОВ В НЕЙРОНАХ КРЫС НОВЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ 2-АМИНОТИОФЕН-3-КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

© 2020 г. В. Л. Замойский^{1,*}, В. В. Григорьев¹, А. Ю. Аксиненко¹,
член-корреспондент РАН С. О. Бачурин¹

Поступило 10.03.2020 г.
После доработки 19.04.2020 г.
Принято к публикации 19.04.2020 г.

Методом patch-clamp в конфигурации whole cell показано, что новые конъюгаты 2-аминотиофен-3-карбоновой кислоты с производными адамантана в одиночных нейронах Пуркинье мозжечка крыс проявляют способность модулировать активность КАХК. Отмечено, что в зависимости от характера замещения в тиофеновом фрагменте характер влияния на КАХК меняется от эффектов ингибирования до способности потенцировать токи КАХК. Описанные соединения также являются блокаторами ифенпродильного сайта NMDA-рецептора, что может оказывать дополнительный нейропротекторный вклад в спектр биологической активности этих веществ.

Ключевые слова: метод patch-clamp, клетки Пуркинье мозжечка, кальций-активируемые хлорные каналы (КАХК), модуляция КАХК, производные 2-аминотиофен-3-карбоновой кислоты

DOI: 10.31857/S2686738920040265

Кальций-активируемые хлорные каналы (КАХК) играют важную роль в регуляции уровня мембранного потенциала нейронов, в том числе и регуляции когнитивных процессов [1]. Кроме того, существенна их роль в патогенезе ряда тяжелых заболеваний – астмы, боли, некоторых видов

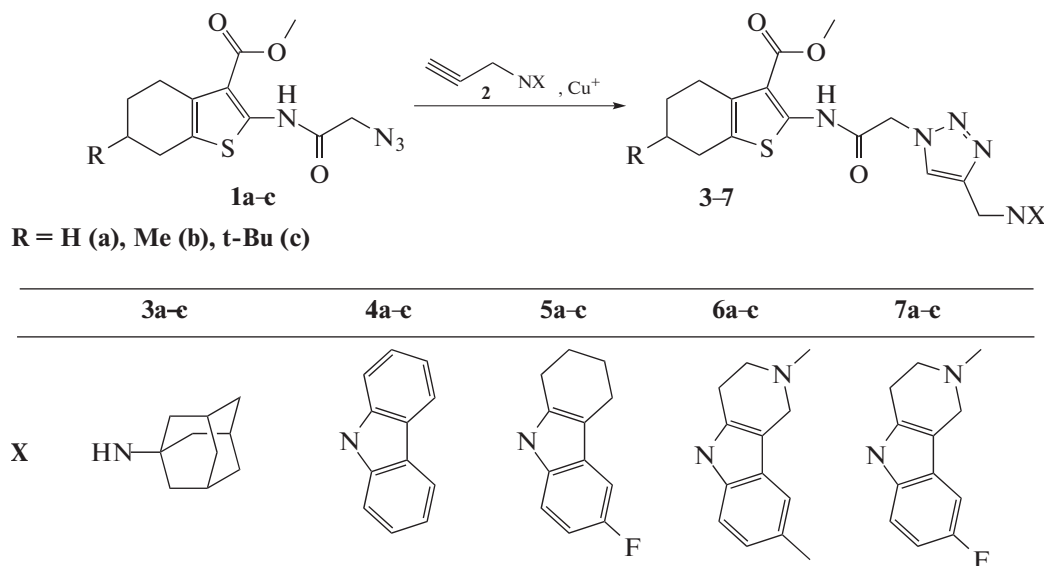


Рис. 1. Схема синтеза исследованных соединений.

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, г. Черноголовка, Московская область, Россия

*e-mail: vzam@yandex.ru

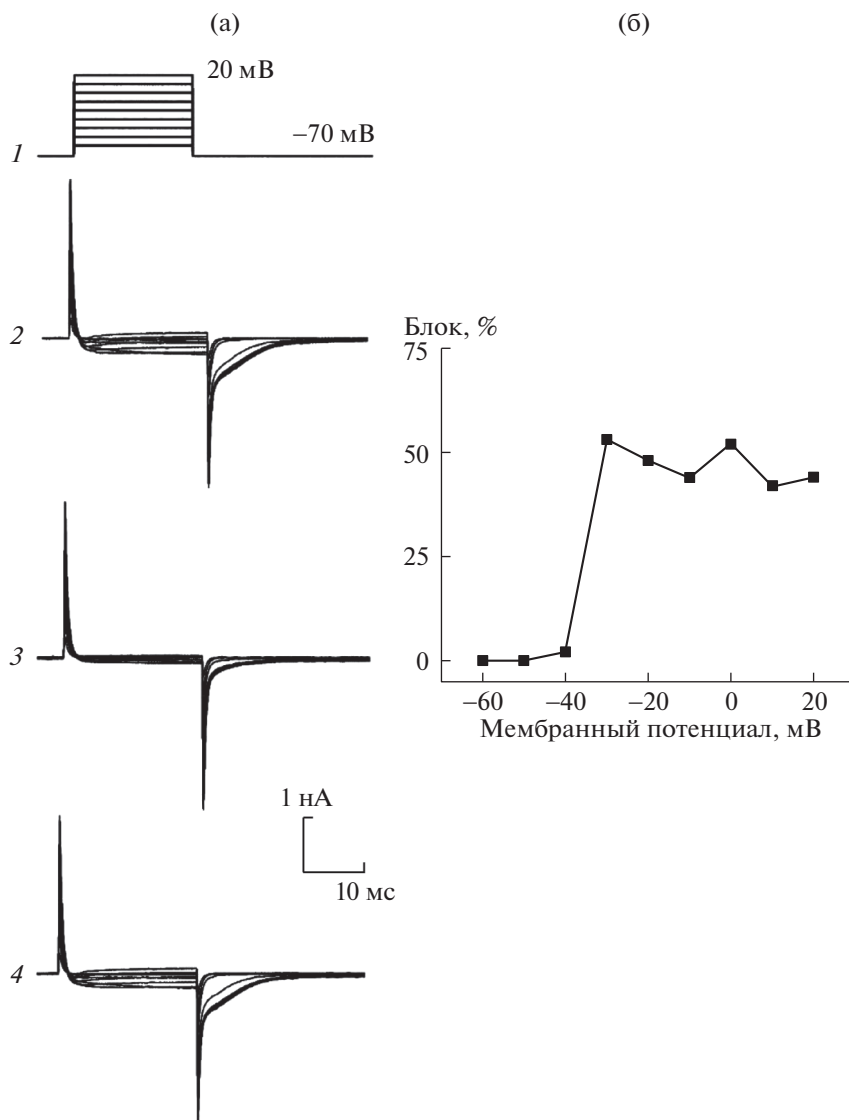


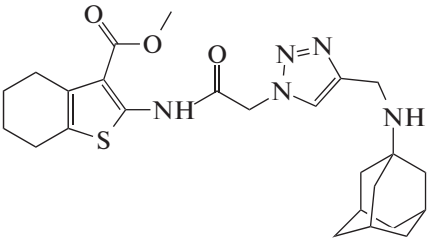
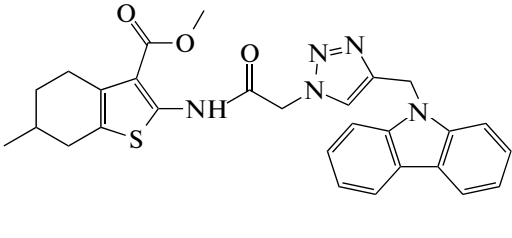
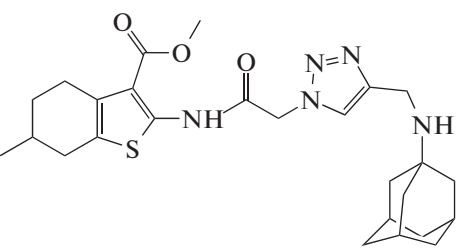
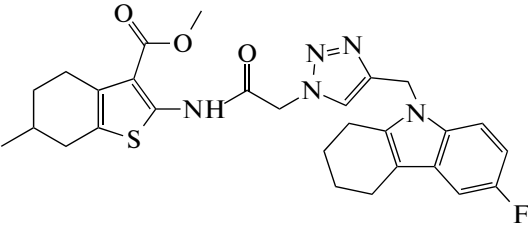
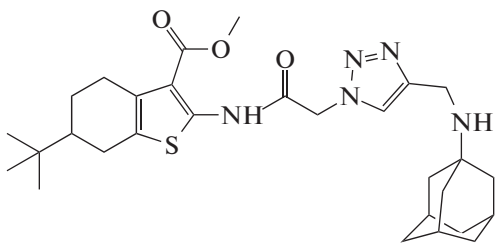
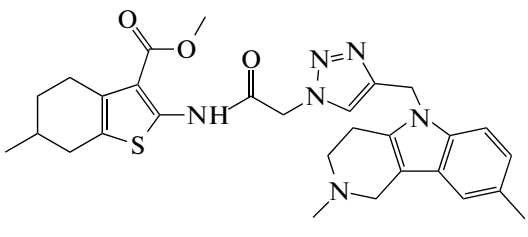
Рис. 2. Действие нового N-замещенного производного 2-аминотиофен-3-карбоновой кислоты **3a** на кальций активируемые хлорные токи в нейронах Пуркинье. (а) – токи КАХК: 1 – протокол подачи прямоугольных импульсов с шагом 10 мВ при потенциале фиксации -70 мВ до значения на мембране $+20$ мВ; 2 – ответы клетки в контроле; 3 – ответы клетки при действии соединения **3a** в концентрации 10^{-5} М (блокада КАХК); 4 – отмывка действия вещества. (б) – график величины блокады переноса заряда при действии соединения **3a** при различных значениях мембранного потенциала.

рака [2–5]. Эффективные модуляторы КАХК рассматриваются как перспективный класс новых терапевтических соединений для лечения этих заболеваний, а также создания новых подходов для регуляции когнитивных процессов [6]. Одним из наиболее активных блокаторов КАХК является производное 2-аминотиофенов – соединение $\text{CaCC}_{\text{inh}}\text{-A01}$ [7]. Как было показано нами ранее производные 2-аминотиофен-3-карбоновой кислоты, а именно, N-аллилтиомочевины и N-бромметилтиазолины, также способны блокировать или потенцировать токи КАХК в нейронах млекопитающих [8].

Целью данной работы явилось изучение действия на токи КАХК в нейронах Пуркинье мозжечка крыс ряда оригинальных полифармакофорных соединений, представляющих собой конъюгаты 2-аминотиофен-3-карбоновой кислоты с производными адамантана, карбазола и тетрагидро-гамма-карболина, конъюгаты которых с рядом других скаффолдов показали ранее хорошие нейропротекторные свойства [9].

В результате установлено, что вновь синтезированные соединения на основе конъюгатов 2-аминотиофен-3-карбоновой кислоты с производными адамантана проявляют способность мо-

Таблица 1. Влияние исследованных веществ на токи КАХК

Вещества	Эффект	Вещества	Эффект
Структура	Блокада (IC ₅₀ *) / потенцияция токов КАХК	Структура	Блокада (IC ₅₀ *) / потенцияция токов КАХК
 <p>Соединение 3a</p>	1.6 ± 0.4 мкМ (n = 7)	 <p>Соединение 4b</p>	Не действует
 <p>Соединение 3b</p>	5.4 ± 0.5 мкМ (n = 9)	 <p>Соединение 5b</p>	Не действует
 <p>Соединение 3c</p>	Потенцияция на 35% при 10 мкМ (n = 4)	 <p>Соединение 6b</p>	Не действует

* – значение концентрации соединения, вызывающего 50% эффект ингибирования (IC₅₀*).

дулировать активность КАХК. В частности, эффективность одного из новых производных превосходит активность модельного соединения CaCC_{inh}-A01. Отмечено, что в зависимости от структуры заместителя в тиофеновом фрагменте характер влияния на КАХК меняется от эффектов ингибирования до способности потенцировать токи КАХК. Важно, что выявленные модуляторы токов КАХК являются также блокаторами ифенпродильного сайта NMDA-рецептора, что может оказывать дополнительный нейропротекторный вклад в спектр биологической активности этих веществ.

Соединения 3a–c, 4–6 (рис. 1) получены медь-катализируемой алкин-азидной “click”-реакцией N-азидоацетамидов метиловых эфиров этих кис-

лот 1a–c с N-пропаргил-содержащими 2-аминоадамантаном, карбазолом, тетрагидрокарбазолом и гамма-карболином. Подробный синтез соединений 3a–c, 4b, 5b, 6b, влияющих на токи КАХК, а также других, представленных на схеме, описан в статье [10].

Электрофизиологические исследования осуществляли на свежeweделенных нейронах Пуркинье из мозжечка (12–15 дней) мозга крыс самцов линии Вистар (n = 20). Выделение единичных нейронов проводили ферментативно-механическим способом [11]. Трансмембранные токи отдельных нервных клеток регистрировали методом локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации на целой клетке (whole-cell) с помощью прибора ЕРС-9 (“НЕКА”, Герма-

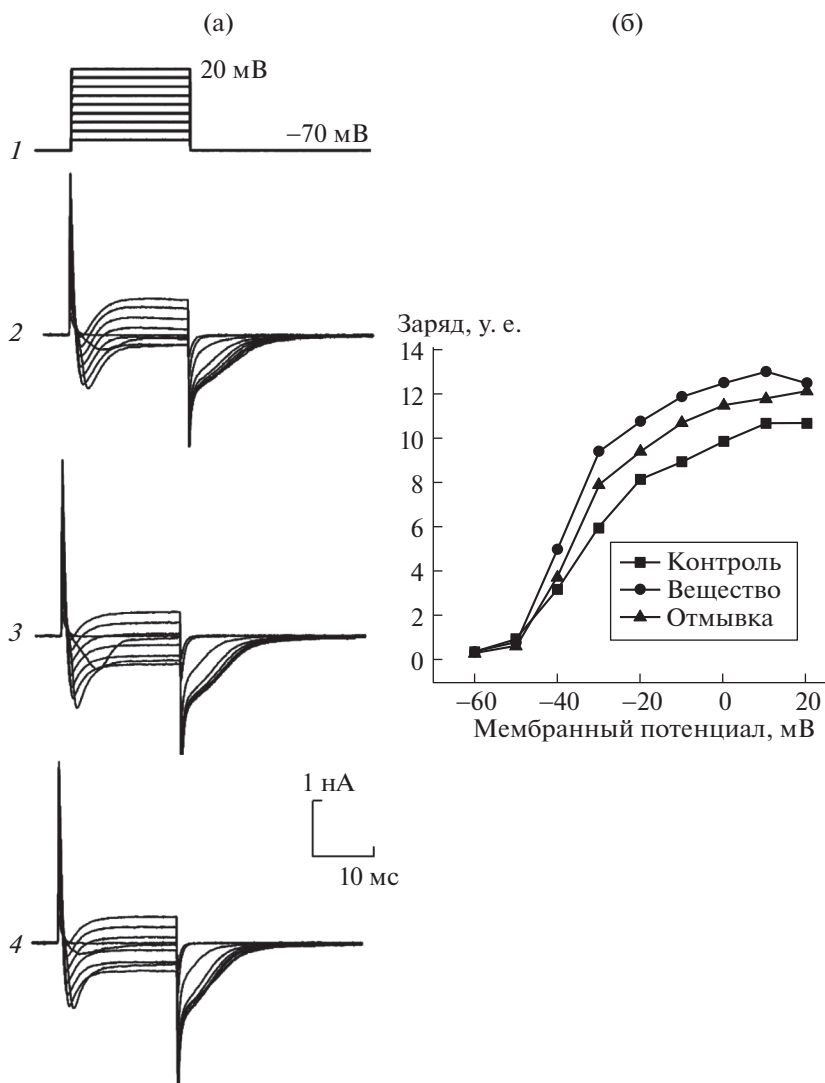


Рис. 3. Действие нового N-замещенного производного 2-аминотиофен-3-карбоновой кислоты **3c** на кальций активируемые хлорные токи в нейронах Пуркинье. (а) – интегральные токи нейрона Пуркинье в ответ на серию деполяризирующих импульсов: 1 – протокол подачи прямоугольных импульсов с шагом 10 мВ при потенциале фиксации –70 мВ до значения на мембране +20 мВ; 2 – ответ клетки в контроле; 3 – действие соединения **3c** в концентрации 10^{-5} М на ионные токи клетки (потенциация КАХК); 4 – отмывка действия вещества. (б) – график величины зарядов, переносимых КАХК, в контроле; при действии Соединения **3c** и после отмывки.

ния) [12]. Данные обрабатывали при помощи программы Pulsfit (“НЕКА”, Германия).

В экспериментах при потенциале фиксации на мембране клетки –70 мВ использовали физиологический раствор, содержащий 140 mM NaCl (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, HEPES 10 mM, pH 7.36, осмолярность 305 мОсм), в микропипетке – электроде – 120 mM CsCl (120 mM CsCl, 2 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, EGTA 11 mM, HEPES 10 mM, K₂ATP 5 mM, pH 7.2, осмолярность 285 мОсм). В ответ на нарастающие ступени деполяризирующих импульсов по +10 мВ регистрировались ионные токи от целой клетки, в конце которых располагались хлорные токи.

Электрофизиологическим методом было исследовано около 20 новых производных 2-аминотиофен-3-карбоновой кислоты. Было обнаружено, что три соединения (**3a**, **3b** и **3c**) проявляют способность модулировать активность КАХК. Два соединения блокировали токи КАХК (рис. 2), причем активность соединения **3a** превосходила действие модельного соединения CaCCinh-A01 (IC₅₀ 1.7 мкМ [7]), а блокирующее действие соединения **3b** было лишь немного слабее (табл. 1).

На рис. 2 видно, что амплитуда хлорных токов зависит от уровня мембранного потенциала нейрона. Активация хлорных токов наблюдается при уровнях МП от –40 мВ, а при дальнейшей деполяризации резко возрастает, приближаясь к на-

сыщению, в диапазоне МП от -10 мВ до $+20$ мВ. Соответственно, и блокирующее действие соединения **3a** проявляется от уровня МП -40 мВ и в диапазоне МП от -10 мВ $+20$ мВ величина блока мало изменяется, находясь у значения 50% от контроля ($n = 7$).

Соединение **3c**, напротив, обладало потенцирующим действием в отношении токов КАХК — (рис. 3).

Интересно, что эти три соединения одновременно блокировали сайт связывания ифенпродила NMDA-рецептора в микромолярных концентрациях, как нами ранее было показано [10]. Замена адамантильного фрагмента на карбазольный, тетрагидрокарбазольный или тетрагидрокарболиновый фрагменты (соединения **4b**, **5b**, **6b**) приводила к полной утрате способности влиять на КАХК-вызванные токи (табл. 1), а также на способность соединений блокировать ифенпродилый сайт связывания NMDA-рецептора [10].

Таким образом установлено, что вновь синтезированные соединения на основе конъюгатов 2-аминотиофен-3-карбоновой кислоты с производными адамантана проявляют способность модулировать активность КАХК. Отмечено, что в зависимости от структуры заместителя в тиофеновом фрагменте характер влияния на КАХК меняется от эффектов ингибирования до способности потенцировать токи КАХК. Важно, что выявленные модуляторы токов КАХК являются также блокаторами ифенпродилного сайта NMDA-рецептора, что может оказывать дополнительный нейропротекторный вклад в спектр биологической активности этих веществ.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-13-00378) и Государственного задания 2019–2020 годов (тема № 0090-2019-0005).

MODULATION OF CALCIUM-ACTIVATED CHLORIDE CURRENTS IN RAT NEURONS WITH NEW 2-AMINOTIOPHENE-3-CARBOXYLIC ACID DERIVATIVES

V. L. Zamoyski^{a, #}, V. V. Grigoriev^a, A. Yu. Aksinenko^a, and Correspondent member of RAS S. O. Bachurin^a

^a Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation

[#]e-mail: v zam@yandex.ru

Using the patch-clamp method in the whole cell configuration, it was shown that a new conjugates of 2-aminothiophene-3-carboxylic acid with adamantane derivatives in the single Purkinje neurons of rat cerebellum exhibit the ability to modulate CaCC activity. It was noted that, depending on the nature of substitution in the thiophene fragment, the nature of the effect on CaCC varies from the inhibition to the ability to potentiate CaCC currents. The described compounds are also blockers of the NMDA receptor ifenprodil site, which may have an additional neuroprotective contribution to the spectrum of biological activity of these substances.

Keywords: patch-clamp method, Purkinje cerebellar rat cells, calcium-activated chloride channel, modulation of CaCC, derivative of 2-aminothiophene-3-carboxylic acid

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Huang W.C., Xiao S., Huang F., Harfe B.D. et al. // *Neuron*. 2012. V. 12. № 74 (1). P. 179–192.
2. Sondo E., Caci E., Galletta L.J. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2014. V. 52. P. 73–76. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.03.022>
3. Kunzelmann K., Ousingsawat J., Cabrita I., Doušová T., Bähr A., Janda M., Schreiber R., Benedetto R. // *Front Pharmacol.* 2019. V. 10. P. 3. doi: . eCollection 2019. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00003>
4. Crottès D., Jan L.Y. // *Cell Calcium*. 2019. V. 82. P. 102050. Epub 2019 Jun 14. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.06.004>
5. Salzer I., Boehm S. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2019. V. 111. P. 37–41. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.04.006>
6. Yu Jiang, Bo Yu, Hong Yang, Tonghui Ma // *Frontiers in Pharmacology*. 2016. <https://doi.org/10.3389/fphar.2016.00270>
7. Bradley E., Fedigan S., Webb T., Hollywood M.A., Thornbury K.D., McHale N.G., Sergeant G.P. // *Channels*. Austin. 2014. V. № 4. P. 308–320.
8. Григорьев В.В., Замойский В.Л., Аксиненко А.В., Соколов В.Б., Бачурин С.О. // *ДАН*. 2018. Т. 483. № 1. С. 94–97.
9. Bachurin S.O., Shevtsova E.F., Makhaeva G.F., Grigoriev V.V., et al. // *Sci Rep*. 2017. V. 7. P. 45627. <https://doi.org/10.1038/srep45627>
10. Соколов В.Б., Аксиненко А.Ю., Горева Т.В., Енушина Т.А., Габрельян А.В., Григорьев В.В. // *Журнал общей химии*. 2020. Т. 90. № 1. С. 42–49.
11. Kaneda M., Nakamura H., Akaike N. // *Neurosci. Res.* 1988. V. 5. P. 299–315.
12. Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J. // *Pflugers Arch.* 1981. V. 391. P. 85–100.