

Поиск непептидных блокаторов протон-чувствительных ионных каналов.

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

Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

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

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

В сенсорных нейронах млекопитающих, как в ЦНС, так и на периферии, широко распространены протон-чувствительные ионные каналы ASICs (Acid-Sensing Ionic Channels), принадлежащие к семейству амилорид-чувствительных натриевых каналов/дегенеринов (NaC/DEG) [1]. Возникающие при активации рецепторов ASICs протон-активируемые токи представляют собой механизм реагирования нервных клеток в частности (и организма в целом) на слабые изменения кислотности окружающих тканей. Физиологическая роль этих рецепторов до конца еще не ясна, однако предполагается их участие в широком спектре функций: в механорецепции, в восприятии боли, в синаптической пластичности, в процессах обучения и памяти [2].

Группа лигандов протон-чувствительных ионных каналов сравнительно немногочисленна. Наиболее известные среди них – эндогенный тетрапептид беспозвоночных FMRFa (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂), проявляющий свойства агониста ASIC's, и родственные ему нейропептиды [3-5]. Эти пептиды неустойчивы при физиологических значениях pH, что значительно затрудняет изучение роли этих каналов в опытах *in vivo*. Исключением является амилорид, неспецифический блокатор Na-зависимых ионных каналов, основным биологическим эффектом которой к тому же является диуретическое действие [6]. Поэтому поиск непептидных лигандов ASIC's является в настоящее время чрезвычайно актуальным как с теоретической, так и практической точек зрения.

Целью данной работы является поиск непептидных аналогов FMRFa, проявляющих, в отличие от него, ингибирующее влияние на ASIC's и устойчивых в физиологических условиях.

Анализ связи структура-активность в ряду аналогов FMRFa показывает, что все известные в настоящее время лиганды ASIC's содержат в молекуле гуанидиновую группу,

замена которой на тетраалкиламмониевую группу приводит к исчезновению активности [7]. Второй особенностью лигандов ASIC's является запрет на наличие в молекуле свободной кислотной функции – карбоксильная функция на С-конце пептидных лигандов ASIC's заменена амидной группой. К исчезновению активности приводит также появление свободной карбоксильной группы и в других частях молекулы [4, 8].

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

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

ФОРМУЛА

где

I-XIX

№	R	R ₁
I	H	PhCO
II	H	PhCH ₂ CO
III	H	Ph(CH ₂) ₂ CO
IV	H	PhCO(CH ₂) ₂ CO
V	H	t-BuOCONHCH ₂ CH(Ph)CH ₂ CO
VI	CH ₂ Ph	PhCO
VII	Ph	PhCH ₂ CO
VIII	Ph	PhCO(CH ₂) ₂ CO
IX	Ph	t-BuOCONHCH ₂ CH(Ph)CH ₂ CO
X	2-C ₁₀ H ₈	PhCO

№	R	R ₂
XI	2-C ₁₀ H ₈	PhCH ₂ CO
XII	2-C ₁₀ H ₈	Ph(CH ₂) ₂ CO
XIII	2-C ₁₀ H ₈	PhCO(CH ₂) ₂ CO
XIV	2-C ₁₀ H ₈	PhCONH(CH ₂) ₂ CO
XV	2-C ₁₀ H ₈	PhCH ₂ OCONH(CH ₂) ₂ CO
XVI	2-C ₁₀ H ₈	Ph(CH ₂) ₂ CONH(CH ₂) ₂ CO
XVII	2-C ₁₀ H ₈	t-BuOCONHCH ₂ CH(Ph)CH ₂ CO
XVIII	PhCO	p-PhNO ₂
XIX	PhCO	p-PhNH ₂

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Синтез производных аргинина проводили по известным методикам исходя из тризащищенного аргинина с последовательным введением заместителей в карбоксильную группу и к атому азота аминогруппы аргинина [9].

Биологическое тестирование проводили методом "patch-clamp" в конфигурации «целая

клетка» и внутриклеточной перфузии на изолированных нейронах спинальных заднекорешковых и тригеминальных ганглиев крыс линии Вистар возраста 5-10 дней (виварий института физиологии человека им. Богомольца А.А. (Киев). Детальное описание методики приведено в работе [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

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

Waldmann R. и соавт. [11] была экспрессирована и выделена в клетках COS субъединица протон-чувствительного натриевого канала, характерная для сенсорных нейронов. В клетках COS она формирует натриевый канал, который отвечает на снижение внеклеточного pH как быстро инактивирующейся, так и неактивирующейся натриевой компонентой, поэтому общий ток, протекающий через ASICs, зависит от двух параметров – пиковой амплитуды и времени десенситизации. Сам FMRFa увеличивает оба параметра более чем в два раза [12]. Поэтому оценка действия новых соединений проводилась нами по изменениям двух параметров – пиковой амплитуды (Шо) и времени десенситизации (k/k_0) (см. табл.1)

Все незамещенные амиды аргинина ($R=H$, соед. I-V) практически не оказывали влияния на протон-активируемые токи (табл.1), что свидетельствует, в первую очередь, о важной роли липофильности молекулы. Из сравнения данных по биологической активности и рассчитанного коэффициента распределения октанол/вода ($clog P$) видно, что в рядах соединений, содержащих одинаковый заместитель при атоме азота аминогруппы аргинина (R_1), увеличение липофильности заместителя при амидном атоме азота (R) приводит к снижению пиковой амплитуды тока (например, соединения II, VII, XI или IV, VIII, XII или V, IX, XVII).

Интересные изменения активности исследуемых соединений можно наблюдать, варьируя заместитель при атоме азота аминогруппы аргинина (R_i) в рядах различных его

амидов. Как уже было отмечено, увеличение заместителя в амидной части молекулы, приводящее к общему увеличению липофильности молекулы, приводит к повышению активности. Поэтому неудивительно, что в наших экспериментах незамещенные ациламиды аргинина (соединения I-V) слабее всего влияют на протон-активируемые токи. В ряду замещенных анилидов (соединения VII-IX) происходит увеличение длины цепочки в заместителе, но при этом в молекуле появляется карбонильная группа, что снижает липофильность и, одновременно, активность соединений (VII-VIII). Однако резкое увеличение объема заместителя (IX), несмотря на несомненное повышение липофильности молекулы, приводит к некоторому снижению активности, по-видимому, за счет стерических препятствий взаимодействию с ионным каналом. Аналогичная картина наблюдается и в ряду замещенных производных нафтиламида аргинина (соединения X-XVII), введение нафтильной группы приводит к увеличению величины $\log P$ и пропорциональному усилению активности исследуемых соединений. По данным [13] протон-активируемые ионные каналы имеют два трансмембранных домена и длинную внеклеточную петлю, которая, по-видимому, и является фактором, лимитирующим размер и степень липофильности подходящего к рецептору лиганда.

В ряду изученных нами веществ выраженное влияние на десенситизацию оказал лишь нафтиламид (3-*m*-бутилоксикарбониламино)-2-фенилбутирил аргинина (XVII), замедлявший кинетику десенситизации. Все остальные соединения незначительно влияли на десенситизацию (табл.1). При этом мы не наблюдали никакой корреляции $\log P$ с десенситизацией, в отличие от пиковой амплитуды тока. Можно предположить, что аналогично RFa-подобным пептидам, соединение (XVII) индуцирует недесенситизирующуюся компоненту протон-активируемого тока [4].

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

Таким образом, среди соединений непептидной природы, представляющих собой достаточно липофильные молекулы, содержащие положительно заряженный гуанидиновый остаток, найдены вещества, ингибирующие проводимость протон-

чувствительных ионных каналов нейронов спинальных и тригеминальных ганглиев крыс. Результаты тестирования этих соединений позволяют высказать предположение о различии механизмов влияния соединений на пиковую амплитуду тока и на десенситизацию.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. A receptor for protons in the nerve cell membrane // Neuroscience. – 1980. – V. 5. – P. 2325.
- [2] Krishtal O.A. The ASICs: Signalling molecules? Modulators? // Trends Neurosci. – 2003 - V. 26. - №9- P. 477-483.
- [3] Askwith C.C., Cheng C., Ikuma M., Benson C., Price M.P., Welsh M.J. Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENAC channels // Neuron 2000.Apr.;26(1.):133.-41. – V. 26. – № 1. – P. 133-141.
- [4] Cottrell G.A. The wide range of actions of the FMRFamide-related peptides and the biological importance of peptidergic messengers // EXS. – 1993. – V.63 – P.279-285.
- [5] Greenberg M.J., Price D.A. Relationships among the FMRFamide-like peptides // Prog. Brain Res. – 1992. – V. 92 – P. 25-37.
- [6] Cragoe E.J., Woltersdorf Jr O.W., Bickling J.B., Kwon S.F., Jones S.H., Pyrazine diuretics. II. // J.Med.Chem. – 1976. - V. 10. - P. 66-75.
- [7] Raffa R.B. The action of FMRFamide (Phe-Met-Arg-Phe-NH₂) and related peptides on mammals. //Peptides. – 1988. – V. 9. – № 4. – P. 915-922.
- [8] Price D.A., Greenberg M.J. Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide // Science. – 1977. – V.197. – № 4304. – P.670-671.
- [9]. Гершкович А.А., Кибирев В.К. Синтез пептидов. Реагенты и методы // Научная думка. – Киев. – 1987. – 264 с.
- [10]. Yudin Y.K., Tamarova Z.A., Ostrovskaya O.I., Moroz L.L., Krishtal O.A. RF-related peptides are algogenic: evidence in vitro and in vivo // European Journal of Neuroscience - 2004.- V.20.-P.1419-1423.
- [11]. Waldmann R., Bassilana F., de Weille J., Champigny G., Heurteaux C., Lazdunski M. Molecular cloning of a non-inactivating proton-gated Na⁺ channel specific for sensory neurons // J.Biol.Chem. – 1997. – V.272. – № 34. – C. 20975-20978.
- [12]. Ostrovskaya O.I., Moroz L.L., Krishtal O.A. Modulatory action of RFamide-related peptides on acid-sensing ionic channels is pH dependent: the role of arginine // Journal of Neurochemistry – 2004. – V. 91(1). – P.252-255.
- [13]. Waldmann R., Champigny G., Bassilana F., Heurteaux C., Lazdunski M. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing // Nature. – 1997. – V. 386. – № 6621. - C. 173-177.

Таблица 1. Действие на изолированные нейроны (1/1₀ - пиковая амплитуда, k/k₀ – время десенситизации) и рассчитанный коэффициент распределения (clog.P) соединений (I-XIX)

№	ИЭМ	R	Ri	I/I ₀ ±SD	k/k ₀ ±SD	clog P
I	2052	-H	PhCO-	94.0±2.2	б.и.*	-0.15
II	2050	-H	PhCH ₂ CO-	96.5±6.2	б.и.	-0.22
III	2051	-H	PhCH ₂ CH ₂ CO-	93.4±2.1	б.и.	0.18
IV	2054	-H	PhCO(CH ₂) ₂ CO-	89.4±4.5	б.и.	-0.75
V	2060	-H	t-BuOCONHCH ₂ CH(Ph)CH ₂ CO-	99.4±5.8	б.и.	0.37
VI	2066	-CH ₂ Ph	PhCO-	86.3±6.2	б.и.	1.87
VII	2080	Ph-	PhCH ₂ CO-	72.2±1.9	б.и.	1.71
VIII	2079	Ph-	PhCO(CH ₂) ₂ CO-	87.1±3.2	1.40±0.10	1.18
IX	2081	Ph-	t-BuOCONHCH ₂ CH(Ph)CH ₂ CO-	94.2±0.3	б.и.	2.30
X	2039	2-C ₁₀ H ₈ -	PhCO-	80.3±0.6	1.50±0.18	2.78
XI	2036	2-C ₁₀ H ₈ -	PhCH ₂ CO-	70.0±1.3	б.и.	2.71
XII	2037	2-C ₁₀ H ₈ -	Ph(CH ₂) ₂ CO-	77.1±0.8	б.и.	3.11
XIII	2047	2-C ₁₀ H ₉ -	PhCO(CH ₂) ₂ CO-	65.3±6.1	1.69±0.23	2.18
XIV	2048	2-C ₁₀ H ₉ -	PhCONH(CH ₂) ₂ CO-	94.9±7.0	б.и.	1.88
XV	2049	2-C ₁₀ H ₉ -	PhCH ₂ OCONH(CH ₂) ₂ CO-	70.3±9.5	1.66±0.10	2.37
XVI	2065	2-C ₁₀ H ₈ -	Ph(CH ₂) ₂ CONH(CH ₂) ₂ CO-	69.5±8.3	1.65±0.34	2.21
XVII	2061	2-C ₁₀ H ₈ -	t-BuOCONHCH ₂ CH(Ph)CH ₂ CO-	80.2±10.2	2.50±0.17	3.30
XVIII	2067	p-PhNO ₂ -	PhCO-	103.5±11.3	б.и.	1.73
XIX	2068	p-PhNH ₂ -	PhCO-	88.6±3.5	б.и.	0.99
FMRFa				224.0±21.8	2.76±1.11	

б.и. – без изменений

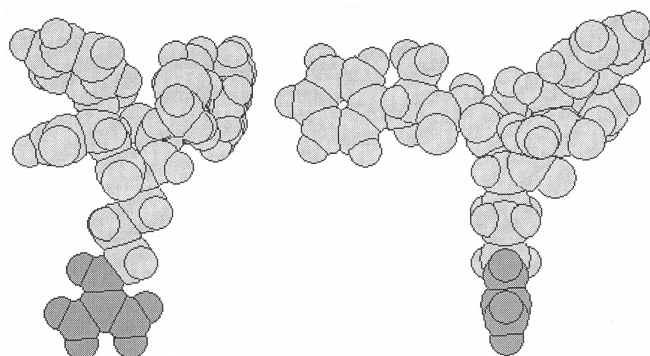


Рис. 1. Наиболее стабильная конформация пептида FMRFa (ортогональная проекция, темным отмечена гуанидиновая группа)

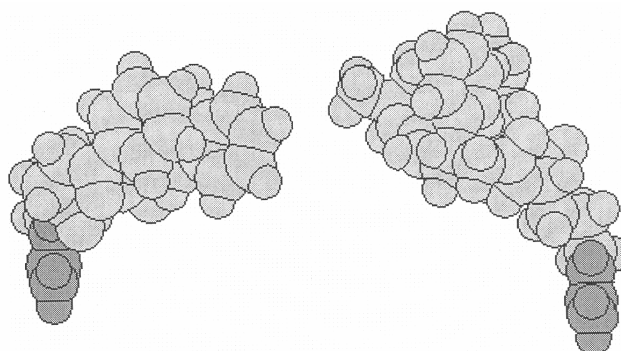


Рис. 2. Наиболее стабильные конформации соединений XII и XVII (темным отмечена гуанидиновая группа)