

На правах рукописи

Комарова Маргарита Сергеевна

**СРАВНЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ЛИГАНДОВ ИОННЫХ
КАНАЛОВ СЕМЕЙСТВ TRPV1 И ASIC**

03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2019

Работа выполнена в лаборатории биофизики синаптических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук.

Научный руководитель:

Тихонов Денис Борисович, член-корр. РАН, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биофизики синаптических процессов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук

Официальные оппоненты:

Зефиров Андрей Львович, член-корр. РАН, профессор, заслуженный деятель науки РФ и РТ, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой нормальной физиологии, декан лечебного факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет»

Остроумова Ольга Сергеевна, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, заместитель директора по научной работе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института цитологии Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии» (ФГБНУ НЦН), Москва

Защита состоится «21» мая 2019 года в 13 часов на заседании диссертационного совета Д 002.127.01 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д.44, тел. (812)552-79-01, электронная почта office@iephb.ru, сайт <http://www.iephb.ru>).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИЭФБ РАН (Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44), с авторефератом – на сайте ВАК РФ, с авторефератом и диссертацией – на сайте ИЭФБ РАН: <http://www.iephb.ru/sovet.htm>.

Автореферат разослан «__» ____ 2019 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук



Р.Г. Парнова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Поскольку лиганды ионных каналов играют значительную роль в экспериментальной и клинической фармакологии, разработка новых препаратов представляет собой важную научную проблему. Действие многих препаратов на ионные каналы носит комплексный характер и не может быть описано только мишенью и химическим сродством к ней. Более того, даже принципиальная модальность действия (потенцирование или ингибирование) может меняться в зависимости от ряда условий. Сложность механизмов взаимодействия лигандов с ионными каналами создает ряд проблем при разработке новых соединений, но, с другой стороны, при тщательном анализе, позволяет создавать соединения, не просто действующие на конкретный канал-мишень, а проявляющие наибольшее действие в определенных условиях. Это чрезвычайно важно для создания медицинских препаратов, которые были бы способны воздействовать именно на патологические процессы, минимально меняя нормальную функцию.

В данной работе рассмотрены рецепторы семейств TRP и ASIC. TRPV1-рецептор (ваниллоидный рецептор 1) представляет собой «клеточный сенсор», отвечающий на различные изменения внешней и внутренней среды (химические вещества, температура, давление/растяжение, изменение pH и т.д.). TRPV1-рецепторы преимущественно экспрессируются в сенсорных Аδ- и С- нервах малого диаметра (Fernandes et al., 2012).

С момента клонирования TRPV1-рецептора мыши (Caterina et al., 1997) начались полномасштабные исследования в области физиологии и фармакологии TRPV1-рецепторов. Однако по мере поиска лигандов и разработки новых кандидатов в лекарственные препараты, имеющих мишенью TRPV1-рецепторы, выяснилось, что их фармакология – чрезвычайно сложная и комплексная вещь. В основе сложности фармакологии TRPV1-рецепторов лежит его полимодальность. Оказалось, что антагонисты TRPV1-рецепторов отличаются по их способности противодействовать различным активирующем стимулам. Более того, поведение антагониста зависит не только от самого активирующего стимула, но и от специфической структуры рецептора (Wong & Gavva, 2009). Также, профиль действия определённого вещества на TRPV1-рецепторы может меняться от почти полного антагонизма до почти полного агонизма в зависимости от условий окружающей среды и элементов внутриклеточной сигнализации (Blumberg et al., 2011). Более того, вследствие широкого паттерна экспрессии и участия во многих физиологических процессах, активация или ингибирование TRP-каналов могут быть полезны в одном органе и в то же время вызывать неприемлемые неблагоприятные эффекты в других (Kaneko & Szalassi, 2014). За последние годы было изучено довольно много низкомолекулярных агонистов и антагонистов TRPV1-рецептора, однако, несмотря на

разработку более 1000 патентов более 50 фармакологическими компаниями, ни один из низкомолекулярных антагонистов TRPV1-рецепторов не прошёл успешно третью фазу клинических испытаний из-за наличия побочных эффектов – таких, как гипертермия и риск возникновения ожоговых травм из-за превышения теплового болевого порога (Tabrizi et al., 2016). Накоплено огромное количество экспериментальных данных, однако их интерпретация затруднена из-за отсутствия детальной структурной информации о взаимодействии канала с антагонистами (Diaz-Franulic et al., 2016). В связи с отсутствием детальной структурной информации, механизмы действия антагонистов TRPV1-рецепторов изучены довольно слабо. Таким образом, структурные исследования, а также исследования в области механизмов действия известных лигандов и поиск новых селективных и модально-специфичных антагонистов TRPV1-рецепторов являются актуальными задачами для выхода фармакологии TRPV1 на новый уровень и получения кандидатов в лекарственные препараты, способных пройти все этапы клинических испытаний.

Ещё одним типом ионных каналов, реагирующих на изменение кислотности среды, являются каналы семейства ASIC (acid-sensitive ion channels). ASIC-каналы экспрессируются преимущественно в нейронах центральной и периферической нервных систем. Эксперименты на нокаутных животных показали, что рецепторы этого семейства принимают участие в различных физиологических и патофизиологических функциях и состояниях: синаптическая пластичность, память, обучение, страх и тревожность, восприятие боли, эпилепсия и т.д. Однако ASIC-опосредованные токи очень малы. Новая ступень исследования рецепторов этого семейства также началась с момента их клонирования в 1997 году (Waldmann et al., 1997).

Лиганды ASIC-каналов, подобно лигандам TRPV1-рецепторов, чрезвычайно разнообразны по происхождению и химической структуре. Несмотря на огромное количество модуляторов ASIC-каналов, все их известные низкомолекулярные лиганды либо неселективны, либо слабо эффективны. Сайты связывания низкомолекулярных соединений в большинстве случаев неизвестны, что затрудняет изучение механизмов их действия. Наиболее селективные и эффективные лиганды ASIC-каналов на сегодняшний день – это полипептидные токсины. Некоторые ингибиторы ASIC-каналов проходят доклинические и клинические испытания, однако пока что ингибиторы ASIC-каналов не используются в клинике (за исключением амилорида, использующегося в качестве ингибитора ENaC каналов). Несмотря на большой массив накопленных данных об участии ASIC-каналов в различных процессах, они пока еще не рассматриваются серьезно как мишень при разработке новых фармакологических препаратов.

Цель и задачи работы. Сопоставление двух структурно различных семейств ионных каналов, TRPV1 и ASIC, показало наличие ряда сходных проблем, связанных с комплексным действием их лигандов. Представляется значимым установить, насколько сходны или различны

молекулярные механизмы, опосредующие комплексное действие лигандов этих каналов. Исходя из этого, целью данной работы было изучить и сопоставить молекулярные механизмы действия ряда лигандов TRPV1 и ASIC.

Для достижения этой цели в ходе работы решался ряд конкретных актуальных задач в области фармакологии TRPV1 и ASIC:

Задача 1: Исследование действия SB-366791 на внутримембранный сайт связывания TRPV1-рецепторов при активации протонами, связывающимися с внеклеточным сайтом;

Задача 2. Исследование действия пептидов APHC1-3 на внеклеточный сайт TRPV1 при активации рецепторов капсаицином, связывающимися с внутримембранным сайтом;

Задача 3. Исследование действия пептидов APHC1-3 на внеклеточный сайт TRPV1 при активации рецепторов агентами, также связывающимися с внеклеточным сайтом;

Задача 4. Исследование механизмов действия эндогенныхmonoаминов тирамина и триптамина на гомомерные ASIC1a и ASIC2a;

Задача 5. Исследование активностей и механизмов действия ряда антидепрессантов на гомомерные ASIC1a и ASIC2a.

Научная новизна. В данной работе с помощью использования модуляторов разных структурных классов впервые было показано, что действие лигандов TRPV1-рецепторов зависит не только от природы активирующего стимула, но и от концентрации активирующего агента. При использовании полипептидных токсинов APHC1-3 в качестве инструмента для исследования внеклеточного сайта связывания было выявлено, что при низкой концентрации активирующего агента пептиды главным образом потенцируют ответы TRPV1-рецепторов, тогда как при увеличении концентрации активирующего агента потенцирующий эффект пропадает или меняется на ингибирующий в случае активации капсаицином. При использовании низкомолекулярного SB-366791 в качестве инструмента для исследования внутримембранныго (капсаицинового) сайта связывания TRPV1-рецепторов было показано, что данное вещество ингибирует токи через рецепторы, вызванные закислением среды, неконкурентным способом, однако, эффект его действия зависит от концентрации активирующего агента: ингибирующий эффект наиболее выражен при большем значении активирующего рН, т.е. при меньшем закислении.

Объединяя полученные результаты относительно лигандов TRPV1-рецепторов двух структурных классов, взаимодействующих с различными сайтами рецептора, можно сделать вывод о том, что действие лиганда, связывающегося с одним сайтом, зависит от действия активатора, связывающегося с другим сайтом связывания.

Что касается лигандов ASIC-каналов, использование различных экспериментальных протоколов позволило нам выявить особенности механизмов действия аминов на гомомерные ASIC-каналы. Впервые было показано модулирующее действие эндогенных аминов тирамина и триптамина, а также ряда антидепрессантов на ASIC-каналы. Впервые было показано ингибирующее действие тианептина на гомомерные ASIC2a-каналы, при этом он оказался неэффективен на ASIC1a-каналах. Анализ механизмов действия этих лигандов показал, что суммарное действие является суммой нескольких независимых эффектов за счет связывания лигандов с несколькими сайтами рецептора. Направленность результирующего действия (потенцирование или ингибирирование) зависит как от соотношения сродства лигандов к этим сайтам, так и от условий активации канала и аппликации лиганда.

В целом, в работе выявлен значительный набор молекулярных механизмов, которые могут опосредовать разнонаправленное действие одного и того же лиганда на ионный канал, в зависимости от внешних условий.

Теоретическая и практическая значимость данной работы заключается в том, что с помощью изучения действия лигандов двух структурных классов было показано взаимовлияние структурных изменений, происходящих в двух различных сайтах связывания TRPV1-рецепторов. Действие каждого конкретного лиганда TRPV1-рецепторов зависит от модальности и концентрации активирующего агента, что связано с наличием двух активационных ворот в структуре канала. Сведения о механизмах действия изученных лигандов могут оказаться полезными при интерпретации других фармакологических данных и поиске новых модально-специфичных и более активных модуляторов TRPV1-рецепторов.

Действие изученных эндогенныхmonoаминов и антидепрессантов на ASIC-каналы было недостаточно сильным, чтобы говорить об их значительном вкладе в физиологическую модуляцию ASIC-каналов, однако факт того, что эндогенные амины способны взаимодействовать с ASIC-каналами, позволяет предположить, что в сумме несколько эндогенных модуляторов могут оказывать значительное влияние на ASIC-каналы. Было показано, что применяемые в клинике антидепрессанты могут иметь и другие мишени, отличные от общеизвестных.

Полученные результаты могут быть полезны при возможной оценке терапевтических эффектов соединений. Модуляторы с двойственными эффектами имеют некоторое преимущество на практике, так как работают только в определенном диапазоне концентраций активирующих стимулов.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Зависимость модальности действия (потенцирование или ингибирирование) лигандов TRPV1-рецепторов от типа и концентрации активирующего лиганда

связана с наличием в структуре канала двух активационных ворот, между которыми существуют аллостерические взаимодействия.

2. Зависимость модальности действия (потенцирование или ингибиование) аминных лигандов ASIC-каналов от концентрации активирующего лиганда и способа аппликации объясняется связыванием данных лигандов с несколькими сайтами в канале.

Личный вклад. Автор выполнял все эксперименты, представленные в данной работе, проводил статистическую обработку полученных результатов, участвовал в разработке экспериментальных подходов к решению задач, а также в написании тезисов и статей.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, 4 из которых – статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для размещения материалов кандидатских диссертаций, 8 тезисов докладов.

Апробация работы. Результаты исследования представлены на XVII Всероссийской медико-биологической конференции «Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 20 апреля 2014 года); IV съезде физиологов СНГ (Сочи, Россия, 8-12 октября 2014 года); XI международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым, Россия, 6-12 июня 2015 года); XII международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым, Россия, 5-11 июня 2016 года); V съезде физиологов СНГ (Сочи, Россия, 4-9 октября 2016 года); FENS Featured Regional Meeting (Венгрия, Печ, 20-23 сентября 2017), FENS Forum (Берлин, Германия, 7-11 июля 2018).

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа изложена на 168 страницах машинописного текста и состоит из глав: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список литературы, включающий 265 источник. Работа иллюстрирована 60 рисунками и 4 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ведение клеточных культур и трансфекция

Культура клеток линии CHO (Chinese hamster ovary cells – культура клеток эпителия яичника китайского хомячка) была предоставлена институтом цитологии РАН (Санкт-Петербург). Культура клеток линии CHO, стабильно экспрессирующих TRPV1-рецепторы крысы, была предоставлена Е.В. Гришиным (ИБХ РАН, Москва). Клетки культивировались в CO₂-инкубаторе при 37°C и 5% CO₂ и контроле относительной влажности. Среда для роста клеток состояла из раствора DMEM/F12 (Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium) с добавлением эмбриональной коровьей сыворотки (10%) и антибиотика. В случае TRPV1 использовали

стрептомицин / пенициллин (1%), в случае ASIC-каналов – гентамицин (5%). Клетки высевали на стёкла площадью не более 25 мм^2 , равномерно распределённые по дну чашки Петри диаметром 35 мм. Для экспрессии гомомерных ASIC-каналов проводили трансфекцию клеток линии CHO с совместным использованием плазмид крысы, несущих гены нужной субъединицы (предоставлены нашей лаборатории доктором А. Старущенко), и плазмиды, кодирующей зелёный флуоресцентный белок GFP (0.5 мкг). Количество плазмиды от трансфекции к трансфекции регулировалось в соответствии с желаемыми размерами клеточных ответов. Трансфекция проводилась с помощью реагента «Lipofectamine 2000» (Invitrogen, USA) согласно протоколу производителя. Электрофизиологические эксперименты проводились спустя 36-72 часа после трансфекции. Клетки идентифицировали с помощью микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon Corporation, Япония). Трансфицированные клетки идентифицировали по зелёному флуоресцентному свечению.

Регистрация трансмембранных ионных токов

Токи, вызванные аппликациями агонистов и антагонистов, регистрировали при помощи метода локальной фиксации потенциала (patch clamp) в конфигурации «щелая клетка» при потенциале -80 мВ. Для этого использовали усилитель EPC-10 (Heka electronics, Германия), сигнал фильтровали в полосе частот 0-5 кГц, оцифровывали с частотой дискретизации 1 кГц и записывали на персональный компьютер при помощи программного обеспечения Patchmaster (Heka electronics, Германия). Конфигурация «щелая клетка» в patch clamp исследованиях является наиболее распространённой, но менее физиологичной из-за эффекта диализа, при котором цитоплазма клетки фактически замещается пипеточным раствором. Тем не менее, конфигурация «щелая клетка» позволяет исследовать интегральную активность определенных популяций ионных каналов, есть возможность смены омывающих клетку растворов, поэтому она часто используется в скрининговых исследованиях, кинетических расчётах, определении конкурентных отношений, поиске сайтов связывания. Все эксперименты проводились при комнатной температуре (21-25°C).

Используемые растворы

При работе с TRPV1 внеклеточный раствор содержал (в мМ): NaCl 143, KCl 5, CaCl₂ 2.5, MgSO₄ 2, D-глюкоза 18, HEPES 10 (рН доводили до 7.35, добавляя HCl). При работе с ASIC-каналами во внеклеточный раствор добавляли также буфер MES (10 мМ), рН доводили до 7.35 с помощью NaOH. Пипеточный раствор содержал (в мМ): CsF 100, CsCl 40, NaCl 5, CaCl₂ 0.5, EGTA 5, HEPES 10 (рН доводили до 7.35, добавляя CsOH). Растворы фильтровались через мелкопоровые целлюлозные мембранны при помощи вакуумного стеклянного фильтра (Sartorius A.G., Германия). Несмотря на тот факт, что десенситизация TRPV1 в значительной степени является кальций-зависимым процессом, тем не менее, ионы кальция присутствовали в

используемых растворах для максимального приближения к естественным условиям. В связи с сильной десенситизацией TRPV1 с одного экспериментального стекла использовалось только одна клетка, далее отработанный омывающий внеклеточный раствор в экспериментальной камере заменялся на чистый и использовалось новое стекло. Также обязательным было постоянное использование системы общей перфузии в ходе эксперимента.

Растворы с низкими значениями pH, которые использовали для активации TRPV1 и ASIC-каналов, готовили из базового внеклеточного раствора, добавляя HCl. Рекомбинантные токсины APHC1-3 были получены и предоставлены лабораторией Е.В. Гришина (ИБХ РАН, Москва) в лиофилизированном виде. Для приготовления стоковых растворов токсинов их растворяли в деионизированной воде. Стоковые растворы капсаицина (Sigma-Aldrich, США), 2-АРВ (Tocris, Англия) и SB-366791 (Tocris, Англия) были сделаны в 100% DMSO (Sigma-Aldrich, США). Рабочие растворы получали из стоковых путём разбавления во внеклеточном растворе таким образом, чтобы при этом финальная концентрация DMSO составляла $\leq 1\%$. В данных условиях максимально возможная концентрация SB-366791 составляла 30 мкМ. При работе с SB-366791 во внеклеточный перфузационный раствор добавлялся DMSO до концентрации, равной максимальной концентрации DMSO в рабочих растворах. Все антидепрессанты и эндогенные вещества были приобретены в фирме Tocris и Sigma. Стоковые растворы антидепрессантов и эндогенных аминов приготавливались с использованием деионизированной воды. Все растворы доводились до требуемых значений pH с помощью концентрированных растворов NaOH и HCl.

Для аппликации веществ использовали систему быстрой смены растворов с электромагнитными клапанами RSC-200 (Biologic, Франция) и микроманифолдом на конце. Пэтч-пипетки (сопротивлением 2 – 5 МОм) изготавливались с помощью пуллера P-97 (Sutter Instruments, США).

Методы обработки и представления данных

Эффект исследуемого соединения оценивался как:

$$(Ia+ив / Ia) * 100\%,$$

где Ia+ив – значение амплитуды ответа в присутствии исследуемого соединения, Ia – контрольный ответ на агонист.

Значение эффекта соединения показывало направленность его эффекта: менее 100% свидетельствовало о блокирующем эффекте данного соединения (80% означало 20% блока), более 100% свидетельствовало о потенцирующем эффекте (200% означало потенциацию вдвое).

Все данные представлены в виде «значение \pm стандартное отклонение», определённом на основе, как минимум, пяти экспериментов. Данные обрабатывались при помощи программного обеспечения Clampfit (Molecular devices, США) и Origin 9.0 (OriginLab, США). При установлении достоверности различий парных данных использовали t-критерий Стьюдента

(значение амплитуды ответа в присутствии тестируемого соединения относительно контроля). При сопоставлении достоверности различий между 3 и более выборками использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Все параметры были вычислены с достоверностью $P=0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

TRPV1-рецепторы

1. Действие SB-366791 на TRPV1-рецепторы

SB-366791 представляет собой низкомолекулярное соединение, аналог амида коричной кислоты и выступает в роли конкурентного антагониста капсаициновой активации TRPV1-рецепторов, взаимодействуя с рецептором с внутренней стороны мембраны в капсаицин-связывающем кармане. Однако при активации рецепторов закислением среды SB-366791 может выступать в качестве ингибитора или потенциатора в зависимости от метода исследования. Расхождения связаны с тем, что действие этого соединения оценивалось разными методами и в разных условиях (Gunthorpe et al., 2004; Gavva et al., 2004; Gavva et al., 2005). Мы изучили действие SB-366791 на протон-вызванные токи в наших условиях.

Обычно для выявления природы антагонизма строят активационные кривые и используют регрессионный анализ по Шильду, однако в наших условиях это невозможно из-за сильной десенситизации TRPV1-рецепторов, в таких нестабильных условиях Шильд-анализ не применим, приходится прибегать к другим методикам, например, анализу кривых ингибирования и определению IC_{50} (Wyllie & Chen, 2007).

Для выяснения связи между активностью SB-366791 и уровнем закисления были использованы растворы с pH 6.5, pH 6.2 и pH 5.8, при использовании которых наблюдался выраженный эффект угнетения. Для каждого значения pH была оценена концентрационная зависимость угнетающего действия SB-366791 (0.1 – 30 мкМ) на рецепторы. При активации растворами с pH 6.5 и pH 6.2 кривые концентрация-действие полностью находились в данном диапазоне: пороговая концентрация SB-366791, вызывающая достоверный эффект, составила 3 мкМ, а максимальный эффект угнетения протон-вызванных токов достигался в присутствии 10 мкМ SB-366791 (Рис. 1). При активации рецепторов раствором с pH 5.8 угнетающее действие SB-366791 в диапазоне концентраций 0.1 – 30 мкМ было слабым, эффекты при 0.1 – 10 мкМ были недостоверны, а при 30 мкМ эффект составил $20 \pm 6\%$ ($n=5$).

Для каждого значения pH устанавливался свой уровень максимального эффекта SB-366791. При этом эффект снижался при увеличении закисления, то есть при более сильной активации каналов ($76\pm9\%$ (n=5) при pH=6.5, $41\pm10\%$ (n=5) при pH=6.2 и $20\pm6\%$ (n=5) при pH=5.8) (Рис. 1). Для оценки активности SB-366791 данные были аппроксимированы с помощью уравнения Хилла и определены величины ИК₅₀. Полученные значения ИК₅₀ не менялись в зависимости от закисления (1 ± 0.1 мкМ при pH=6.5; 1 ± 0.4 мкМ при pH=6.2). Следовательно, активность SB-366791, оцененная по величине ИК₅₀, не зависела от степени активации рецепторов.

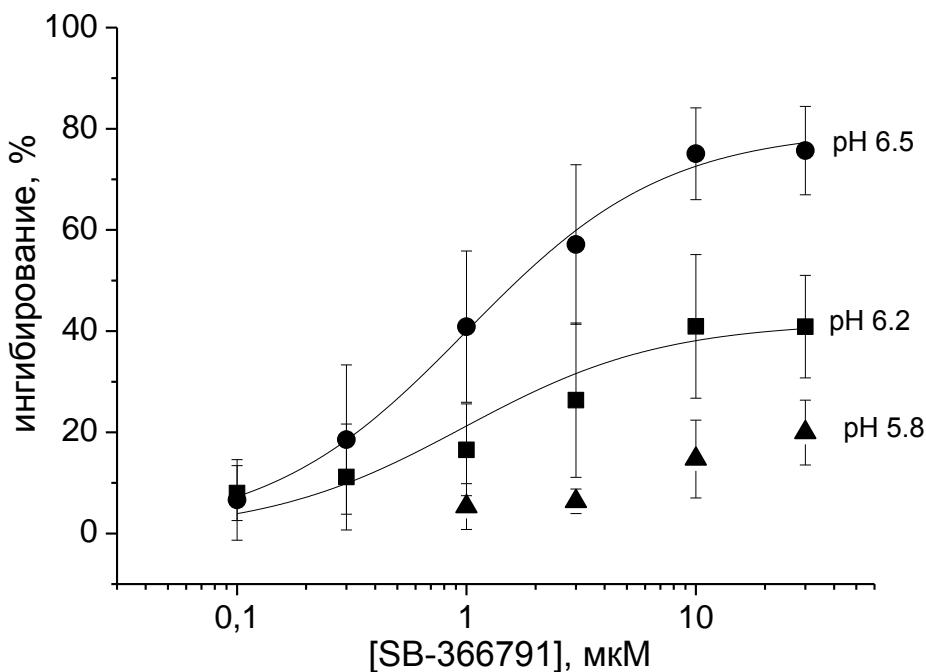


Рисунок 1. Концентрационные зависимости действия SB-366791 на TRPV1-рецепторы при активации внеклеточными растворами с pH 6.5, pH 6.2 и pH 5.8 (аппроксимация с помощью уравнения Хилла). Для закисления до pH 6.5 и pH 6.2 построены концентрационные кривые (ИК₅₀= 1 ± 0.1 мкМ при pH=6.5; 1 ± 0.4 мкМ при pH=6.2), при закислении до pH 5.8 кривую построить не удалось из-за слабых эффектов SB-366791 (n=5).

Таким образом, по совокупности двух признаков (pH-зависимости максимального угнетающего эффекта при неизменной величине ИК₅₀) из полученных данных можно сделать вывод о том, что действие SB-366791 имеет pH-зависимый, но неконкурентный характер.

2. Действие пептидных токсинов APHC1-3 морской анемоны на TRPV1-рецепторы

Для изучения внеклеточного сайта связывания TRPV1-рецепторов (где связываются также и протоны) необходимо было выбрать вещество, не проникающее через мембрану клетки. Рекомбинантные аналоги токсинов морской анемоны *Heteractis crispa* APHC1, APHC2, APHC3 были ранее описаны как селективные ингибиторы TRPV1 в нескольких экспрессионных

системах: ооцитах ксенопуса (Andreev et al., 2008), клетках линии НЕК-293 (Andreev et al., 2013), а также была показана их противоболевая активность в животных моделях (Kozlov et al., 2009), однако механизмы их действия изучены не были. Стоит отметить, что данные токсины представляют интерес с клинической точки зрения, так как вызывали лишь статистически не значимое повышение температуры тела на 0.3-0.5°C в животных моделях. Учитывая сложность и многокомпонентность действия лигандов TRPV1-рецепторов, необходимо было изучить действие токсинов более подробно.

На первом этапе работы были проведены эксперименты по выявлению действия APHC1 (100 нМ) на TRPV1-рецепторы с использованием капсаицина (связывающегося с внутренним сайтом связывания) в концентрации, вызывающей ~70% активации рецепторов (3 мкМ), и длительных аппликаций с последовательной непрерывной сменой растворов в следующем порядке: капсаицин (10 с) - капсаицин+APHC1 (10 с) - капсаицин (10 с). Интересно, что при общем ингибиторном тренде в некоторых случаях наблюдалась потенциация вызванных капсаицином ответов. Потенциация наблюдалась в 25% случаев (величина потенциации до 500%), ингибирование – в 75% случаев (величина ингибирования составила до 40%), (n=16). Также было проанализировано действие токсина APHC1 при концентрации капсаицина в 10 раз меньше первоначальной (0.3 мкМ), вызывающей ~7% активации рецепторов. При этом в 30% случаев наблюдалась потенциация ответов (величина потенциации до 300%), в 70% – ингибирование (величина ингибирования до 40%), (n=11). Примеры токов показаны на рисунке 2А,Б.

Так как при концентрациях капсаицина 0.3 и 3 мкМ мы наблюдали разнонаправленные эффекты APHC1, было решено исследовать действие токсина при более низкой (0.1 мкМ) и более высокой (5 мкМ) концентрациях капсаицина. При концентрации капсаицина 0.1 мкМ наблюдалась устойчивая потенциация ответов токсином APHC1, до 12 раз (n=10). При концентрации капсаицина 5 мкМ наблюдалось устойчивое ингибирование ответов (величина ингибирования до 40%) (n=12). Таким образом, на данном этапе работы мы сделали вывод о зависимости эффекта токсина от концентрации капсаицина (Рис. 2В).

При всех концентрациях капсаицина наблюдались значительные вариации амплитуд ответов, поэтому следующим этапом работы был анализ зависимости эффекта токсина от амплитуды ответа на капсаицин. Анализ выявил, что потенциация наблюдалась преимущественно при небольших по амплитуде ответах (<1 nA), блокада – при больших (>1 nA) (Рис. 2Г). При анализе данной зависимости следует учитывать, что сайт связывания капсаицина расположен с внутренней стороны мембранны. При проникновении через мембрану клетки капсаицин может диффундировать в пэтч-пипетку, так как в работе была использована конфигурация пэтч-кламп метода «целая клетка». Таким образом, действующая на самом деле

концентрация капсаицина плохо поддаётся контролю, чем и объясняется большой разброс направленности эффектов при средних по величине концентрациях капсаицина. При минимальной и максимальной концентрациях, видимо, в любом случае достигалась действующая концентрация, вызывающая однозначный эффект.

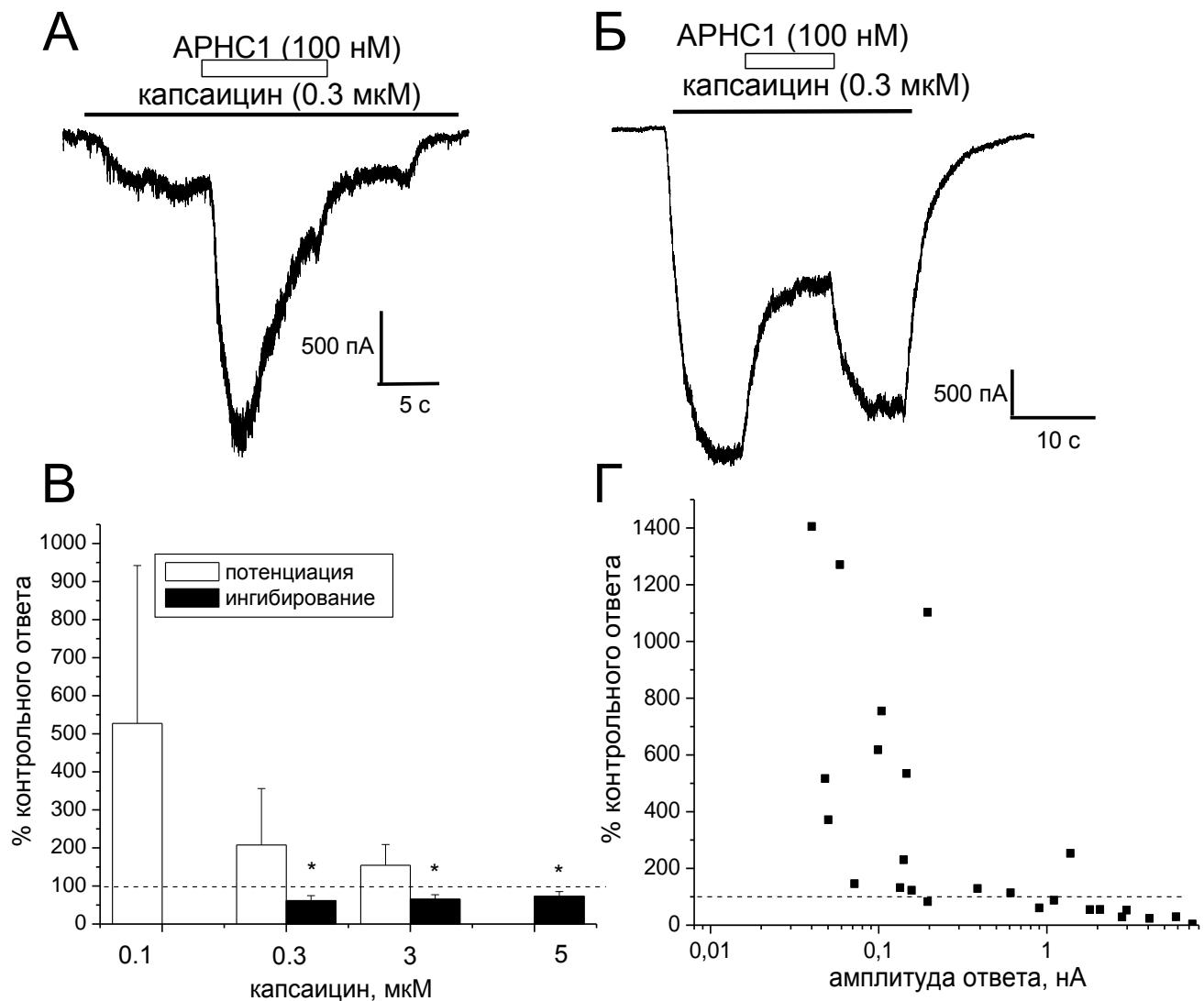


Рисунок 2. Действие токсина APHC1 (100 нМ) на капсаицин-вызванные токи через TRPV1-рецепторы. **А**, пример потенцирования токов, вызванных капсаицином (0.3 мкМ). **Б**, пример ингибиции токов, вызванных капсаицином (0.3 мкМ). **В**, суммарная диаграмма действия токсина при активации рецепторов разными концентрациями капсаицина ($n=10-16$). **Г**, зависимость эффекта токсина APHC1 от амплитуды ответа на капсаицин. Горизонтальная линия означает отсутствие эффекта токсина. Точки, расположенные выше этой линии, означают потенцирующий эффект токсина, ниже – ингибирующий.

В ходе данной работы был проведён анализ эффектов действия токсинов на капсаицин- вызванные токи в зависимости от их концентрации и выявлено, что увеличение концентрации токсинов до 3 мкМ не приводило к полному ингибиованию капсаицин-вызванных токов, что свидетельствует о том, что оно носит аллостерический характер. Действие токсинов APHC1, APHC2 и APHC3 при активации высокой концентрацией капсаицина достоверно не отличалось – они вызывали слабое ингибиование.

Также было проанализировано действие токсинов при активации рецепторов агонистами, действующими на внешний сайт связывания – протонами и синтетическим 2-АРВ. Мы использовали их в низкой и высокой концентрациях и выявили, что так же, как и при активации низкими концентрациями капсаицина, при низкой степени активации TRPV1-рецепторов протонами или 2-АРВ токсин оказывает потенцирующее действие, а при высокой степени активации эффект исчезает в отличие от ингибиования токов, вызываемых высокой концентрацией капсаицина.

Для выяснения деталей связывания токсинов мы изучили также потенциалзависимость их действия и выявили, что эффект токсина не зависит от потенциала, что является одним из признаков внеклеточного связывания. Далее мы изучили кинетику действия токсинов, и выявили, что потенциация и ингибиование обусловлены, вероятно, связыванием с одним и тем же внеклеточным сайтом рецептора.

Таким образом, действие токсинов морской анемоны APHC1-3 на токи через TRPV1-рецепторы зависело не столько от их концентрации, сколько от концентрации агониста. Ряд признаков свидетельствует об их внеклеточном связывании.

В целом, эффект лигандов TRPV1-каналов, связывающихся с одним сайтом, зависит от действия активатора, связывающегося с другим сайтом связывания. Эти взаимосвязи обусловлены наличием двух ворот в структуре TRPV1-канала и их аллостерическим взаимовлиянием.

Протон-активируемые каналы семейства ASIC

3. Оценка действия антидепрессантов на гомомерные ASIC-каналы

Ранее в нашей лаборатории был изучен ряд «гидрофобных моноаминов», оказывающих модулирующее влияние на ASIC-каналы (Tikhonova et al., 2015; Nagaeva et al., 2016a). Эти соединения имеют выраженное структурное сходство с некоторыми антидепрессантами, использующимися в медицинской практике. Был выбран ряд антидепрессантов и изучено его действие на гомомерные каналы ASIC1a и ASIC2a, которые наиболее широко представлены в ЦНС. ASIC-каналы как мишень действия антидепрессантов ранее не рассматривались, поэтому данное исследование имеет значение для фармакологии. Широкая экспрессия ASIC-каналов в

областях мозга, ответственных за эмоциональное состояние (например, амигдала), а также их косвенные роли в антидепрессантном действии предполагают их вовлечённость в развитие психиатрических заболеваний. По результатам структурно-функционального анализа, проведённого ранее в нашей лаборатории, была выдвинута гипотеза о существовании двух сайтов связывания и двух механизмах действия моноаминов на ASIC-каналы (Nagaeva et al., 2016a). Позже, исходя из этого, были разработаны три экспериментальных протокола:

- 1) одновременная подача тестируемого соединения и активирующего раствора для выявления взаимодействия соединения с открытым каналом
- 2) подача тестируемого соединения между аппликациями активирующих растворов для выявления взаимодействия соединения с закрытым каналом или каналом в десенситизированном состоянии
- 3) постоянное присутствие тестируемого соединения (одновременно с аппликациями активирующих растворов и между ними), что наиболее всего соответствует физиологическим условиям, однако не позволяет определить, взаимодействует ли соединение с открытым или закрытым каналом.

Запись токов на одной клетке с использованием трёх протоколов позволяет вычленить механизмы действия исследуемого соединения.

Действие антидепрессантов на гомомерные ASIC1a-каналы. Первоначальное тестирование антидепрессантов проводилось в концентрации 300 мкМ в протоколе одновременной подачи тестируемого и активирующего (рН 6.5) растворов, при рН внеклеточного раствора 7.4. При таких условиях соединения не проявляли значимого эффекта за исключением амитриптилина, который оказывал слабый, обратимый, но статистически значимый потенцирующий эффект ($30 \pm 13\%$, $n = 6$) (Рис. 3). Далее, для проверки влияния на равновесную десенситизацию рН внеклеточного раствора был снижен с 7.4 до 7.1. Такое слабое закисление, во-первых, может встречаться в различных патологиях, а во-вторых, вызывает steady-state десенситизацию этих каналов (50-70%). В этих условиях в протоколе одновременной подачи тестируемого и активирующего (рН 6.5) растворов антидепрессанты также не проявляли значимого эффекта за исключением амитриптилина, который оказывал статистически значимый потенцирующий эффект ($53 \pm 40\%$, $n = 6$) (Рис. 3). Однако в протоколе постоянного присутствия исследуемые соединения (кроме кетамина) оказывали значительные эффекты (3-6 кратное увеличение амплитуд токов через ASIC1a-каналы) (Рис. 3).

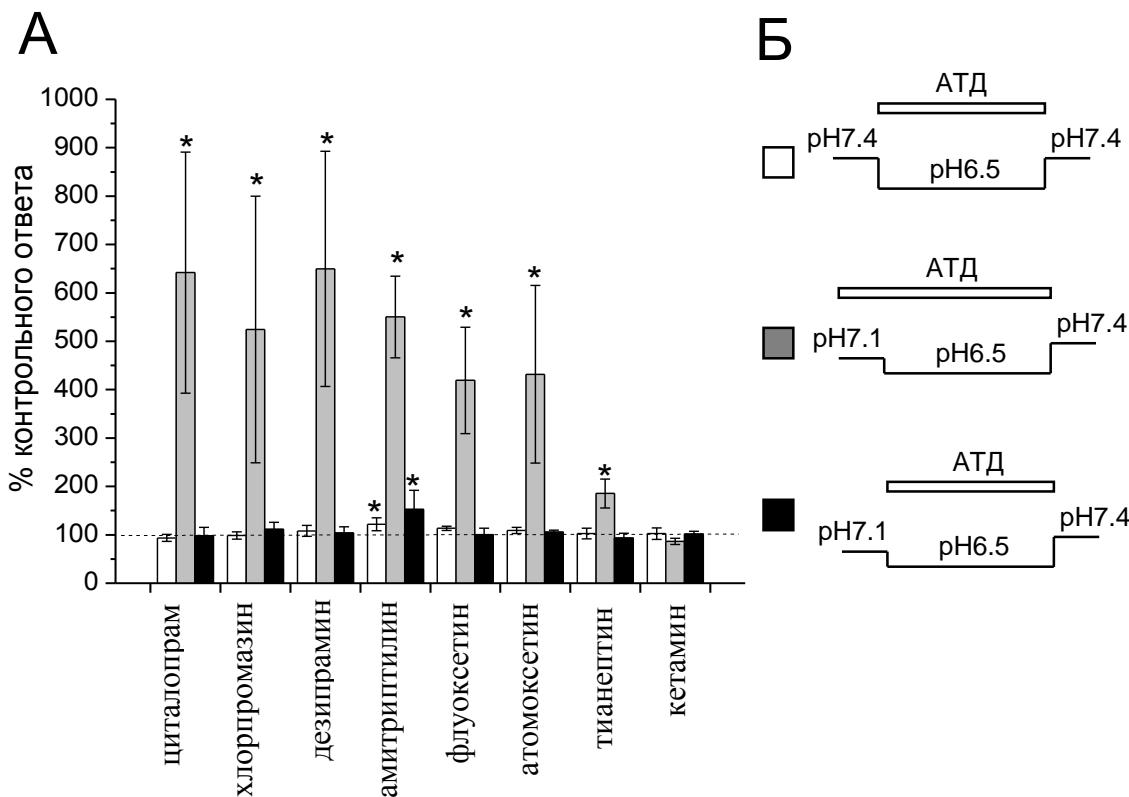


Рисунок 3. Действие антидепрессантов в различных экспериментальных протоколах на токи через гомомерные ASIC1a-каналы ($n=5-12$). **А**, суммарная диаграмма эффектов антидепрессантов. **Б**, используемые экспериментальные протоколы. Потенциал фиксации -80 мВ.

Таким образом, большинство антидепрессантов оказывало влияние на равновесную десенситизацию ASIC1a-каналов. Только амитриptyлин оказался активным и при нормальных физиологических условиях ($pH 7.4$), поэтому мы и изучили его далее детально.

Анализ действия амитриptyлина на гомомерные ASIC1a-каналы. Мы сравнили эффекты амитриptyлина (300 мкМ) в трёх ранее описанных протоколах аппликаций с использованием двух внеклеточных растворов ($pH 7.4$ и $pH 7.1$). Во всех случаях амитриptyлин оказывал потенцирующее действие, при этом эффект был наиболее выражен в условиях частичной десенситизации ASIC1a-рецепторов (pH внеклеточного раствора 7.1). Наименьший потенцирующий эффект наблюдался в протоколе одновременной подачи тестируемого соединения ($43 \pm 22\%$, $n = 6$). Значительно большая потенциация наблюдалась в протоколах подачи тестируемого соединения между аппликациями ($302 \pm 117\%$, $n = 6$) и в случае постоянного присутствия амитриptyлина ($450 \pm 84\%$, $n = 6$) (Рис. 4).

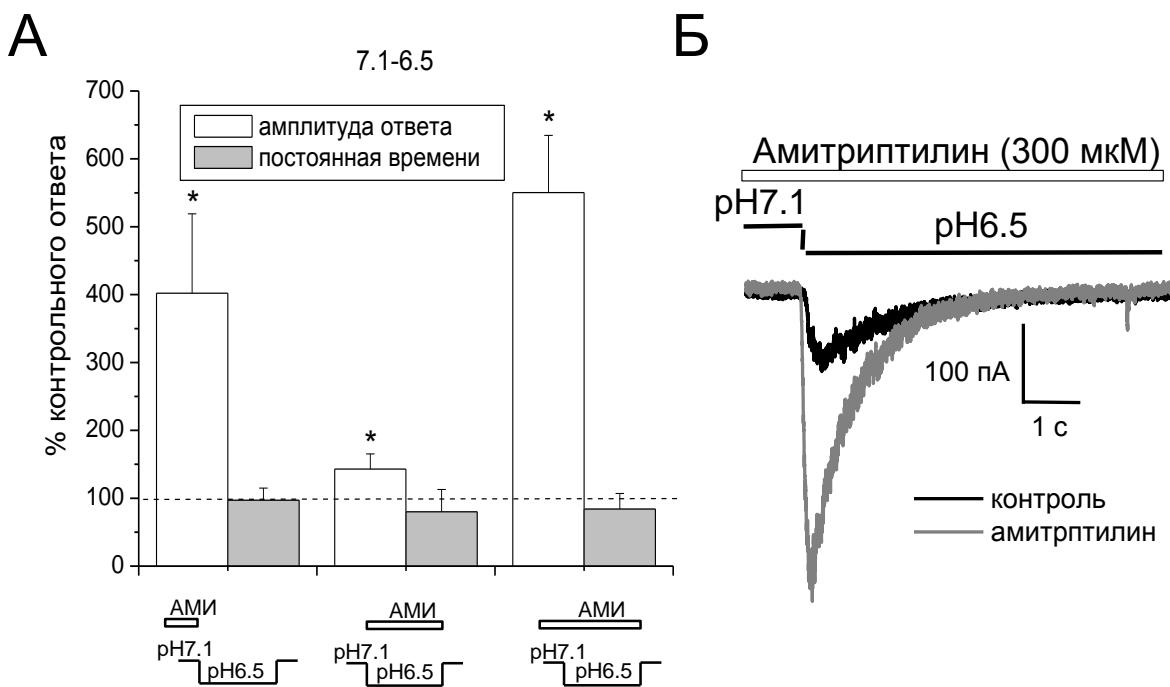


Рисунок 4. Действие амитриптилина (300 мкМ) на токи через гомомерные ASIC1a-каналы в различных экспериментальных протоколах при кондиционирующем pH 7.1 и активирующем pH 6.5. **А**, суммарная диаграмма эффектов (n=6; 3 протокола на каждой клетке). **Б**, пример действия амитриптилина в протоколе постоянного присутствия вещества. Потенциал фиксации -80 мВ.

Далее была оценена концентрационная зависимость действия амитриптилина в условиях, где он наиболее активен, при этом минимальная концентрация, вызывающая значительный эффект ($41 \pm 24\%$, $n = 6$, $P < 0.05$), составила 30 мкМ. При концентрации амитриптилина 300 мкМ эффект не был насыщающим, поэтому параметр EC_{50} было определить невозможно. Значительной разницы между действием амитриптилина в двух различных протоколах обнаружено не было (Рис. 5А).

Поскольку для некоторых лигандов ASIC-каналов выявлена зависимость эффекта от pH активирующего раствора, на следующем этапе мы оценивали pH-зависимость действия амитриптилина. Анализ pH зависимости активации ASIC1a показал параллельный сдвиг кривой активации рецепторов в присутствии амитриптилина (pH₅₀ сдвигается от 6.07 ± 0.02 в контроле до 6.54 ± 0.03) в протоколе постоянного присутствия вещества (300 мкМ) (Рис. 5Б). Параллельный сдвиг кривой может происходить вследствие аллостерической модуляции pH чувствительности или из-за связывания напрямую с одним из протон-связывающих сайтов. Анализ кривой равновесной десенсититации ASIC1a-рецепторов в присутствии амитриптилина (300 мкМ) выявил сдвиг к более кислым значениям (pH₅₀ сдвигается от 7.17 ± 0.04 в контроле до 7.08 ± 0.03 в присутствии амитриптилина, Рис. 5Б). Потенциация ответа при pH внеклеточного раствора 7.4 происходит вследствие сдвига кривой активации.

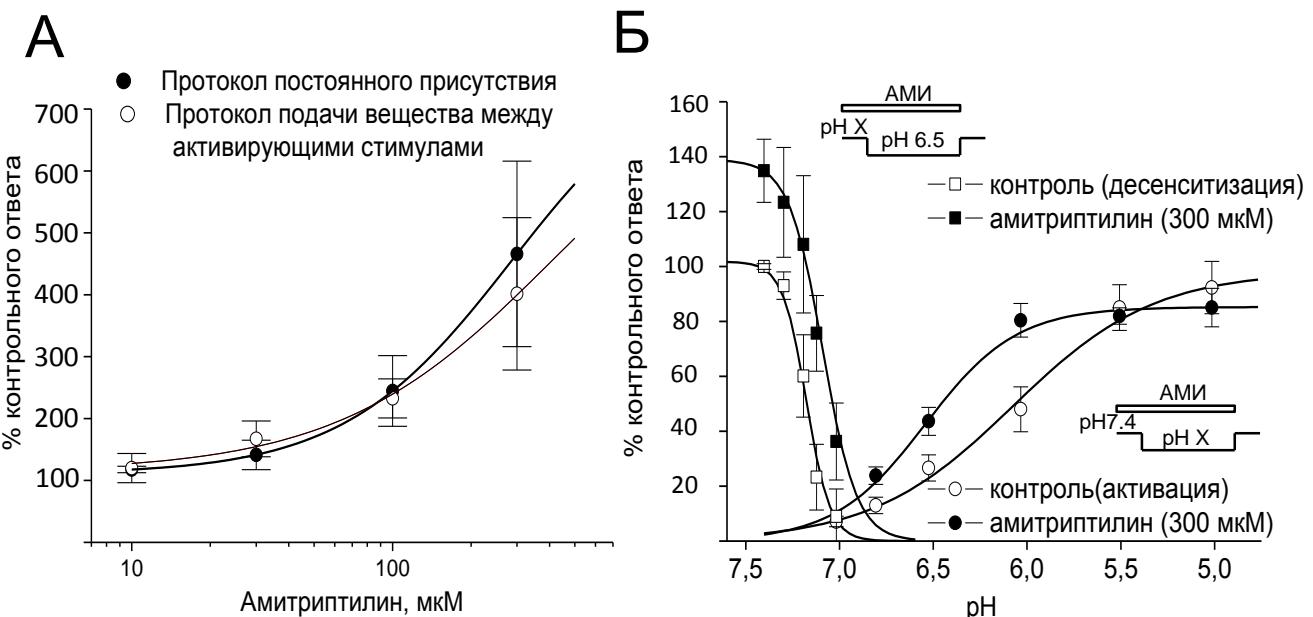


Рисунок 5. А. Концентрационные зависимости действия амитриптилина на ASIC1a-рецепторы в двух экспериментальных протоколах (рН внеклеточного раствора 7.1, рН активирующего раствора 6.5) ($n=5-7$; аппроксимация с помощью уравнения Хилла). **Б.** Смещение кривых активации (при кондиционирующем рН 7.4) и десенситизации (при активирующем рН 6.5) ASIC1a-рецепторов в присутствии амитриптилина (300 мкМ) в протоколе постоянного присутствия ($n=5-9$). Потенциал фиксации -80 мВ.

Анализ кинетики действия амитриптилина показал, что при кондиционирующем рН раствора 7.4 во всех экспериментальных протоколах постоянная времени спада ответов уменьшалась в присутствии амитриптилина. Так, для протокола постоянного присутствия вещества эффект составил $37 \pm 12\%$ ($n=6$), эффекты в других протоколах были похожими ($P > 0.05$, RM-ANOVA).

Таким образом, амитриптилин оказывал потенцирующий эффект на гомомерные ASIC1a-рецепторы. Потенциация обусловлена 1) сдвигом кривой рН зависимости активации ASIC1a в присутствии амитриптилина к менее кислым значениям рН и 2) сдвигом кривой рН зависимости равновесной десенситизации к более кислым значениям. Эти 2 эффекта могут складываться и давать сильную потенциацию (до 6 раз).

Оценка действия антидепрессантов на гомомерные ASIC2a-каналы. Действие антидепрессантов на гомомерные ASIC2a-каналы также оценивалось в различных экспериментальных протоколах при первоначальном рН 7.4 и при закислении до рН 5.45, что вызывает steady-state десенситизацию этих каналов (65-75%). Так же, как и для гомомеров ASIC1a, в большинстве случаев мы наблюдали потенциацию в условиях частичной десенситизации, однако действие на открытые каналы при нормальных физиологических условиях наблюдалось у большего ряда антидепрессантов. Стоит отметить, что в случае ASIC2a

мы обнаружили ещё и ингибирующий эффект, который наиболее был выражен у тианептина (Рис. 6А).

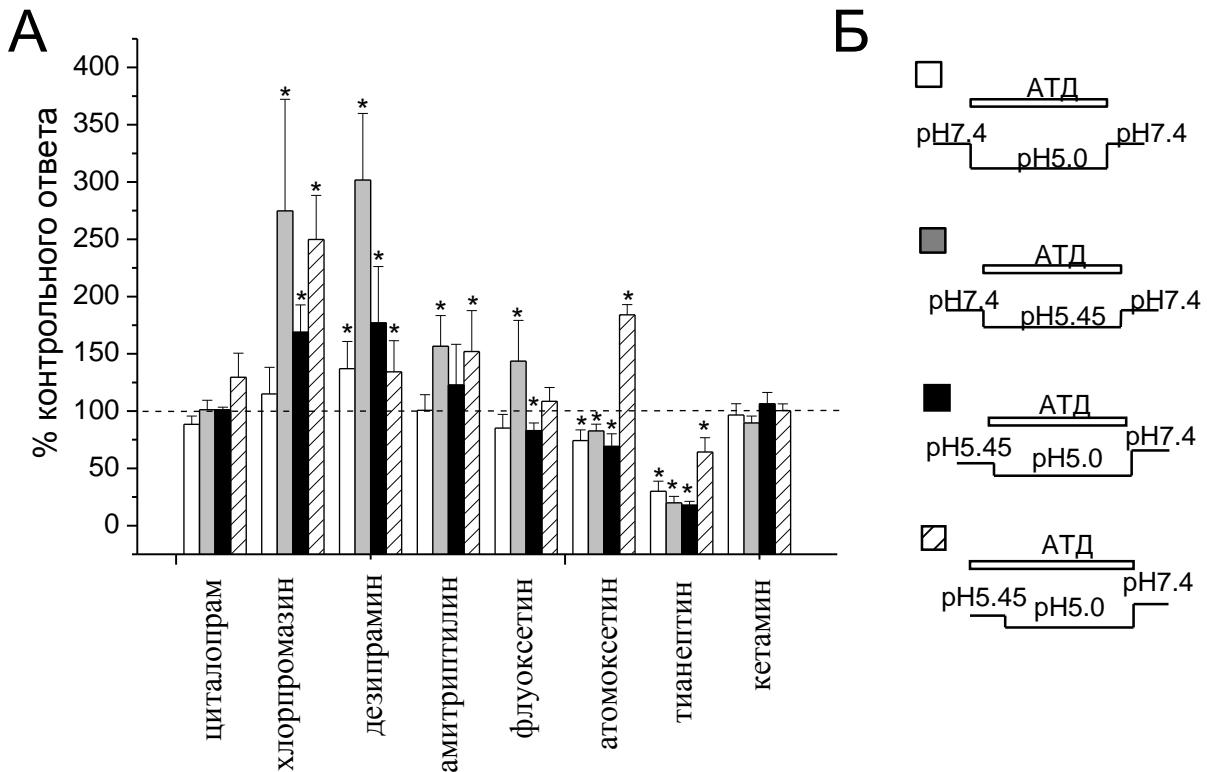


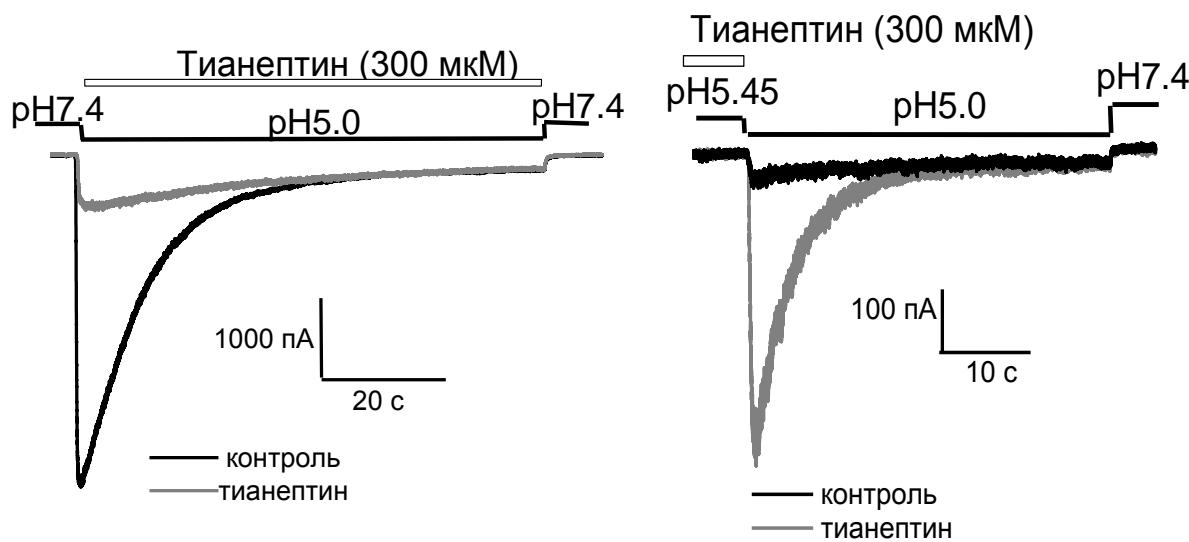
Рисунок 6. Действие антидепрессантов в различных экспериментальных протоколах на токи через гомомерные ASIC2a-каналы. А, суммарная диаграмма эффектов антидепрессантов на амплитуду токов (n=5-11). Б, используемые экспериментальные протоколы.

Анализ действия амитриптилина на гомомерные ASIC2a-каналы. Действие амитриптилина было проанализировано с помощью 9 экспериментальных протоколов в разных условиях. Как и в случае гомомерных ASIC1a-каналов, амитриптилин оказывал потенцирующий эффект на гомомерные ASIC2a-каналы за счёт двух механизмов: 1) сдвига кривой активации к менее кислым значениям pH и 2) сдвига кривой десенситизации к более кислым значениям pH. Действие на десенситизацию также проявлялось в сильном замедлении кинетики.

Анализ действия тианептина на гомомерные ASIC2a-каналы. Сильное ингибирование пика ASIC2a-опосредованных токов вызывал только тианептин, имеющий карбоксильную группу и не принадлежащий к классу гидрофобныхmonoаминов. Мы исследовали эффект тианептина с помощью 6 экспериментальных протоколов в разных условиях и выявили, что его действие характеризуется двумя независимыми эффектами: 1) потенцированием за счёт сдвига кривой десенситизации к более кислым значениям pH и 2) pH-независимым ингибированием, которое может быть обусловлено блоком канала. Суммарный эффект тианептина зависит от конкретных условий. Если канал исходно не десенситизирован, наблюдается ингибирование (рис. 7А), а в условиях десенситизации преобладает потенцирующий эффект (рис. 7Б). ИК₅₀ для

тианептина составила 44 ± 7 мкМ при использовании кондиционирующего раствора с pH 7.4 и активирующего раствора с pH 5.0 в протоколе одновременной подачи веществ.

Рис 7. Примеры действия тианептина (Б, 300 мкМ) на ASIC2a-опосредованные токи. А, ингибирующее действие тианептина в протоколе одновременной подачи при начальном pH 7.4 и



активирующим pH 5.0. Б, потенцирующее действие тианептина в протоколе подачи вещества между активирующими стимулами при начальном pH 5.45 и активирующим pH 5.0.

Таким образом, антидепрессанты могут быть лигандами ASIC-каналов, и при анализе фармакологического профиля действия новых антидепрессантов и изучении их побочных эффектов следует учесть их возможное влияние на ASIC-каналы.

4. Действие эндогенных соединений на ASIC-каналы

Помимо фармакологических агентов, интерес с точки зрения физиологии представляют собой эндогенные вещества как возможные модуляторы ASIC-каналов. Ранее в нашей лаборатории было обнаружено действие гистамина на гомомерные ASIC1a-каналы (Nagaeva et al., 2016b). Мы решили проверить, могут ли родственные емуmonoаминные эндогенные вещества влиять на ASIC-каналы. В качестве примера мы взяли эндогенные амины триптамин и тирамин.

Действие триптамина и тирамина на гомомерные ASIC1a-каналы. Для анализа действия эндогенных аминов были применены те же самые экспериментальные протоколы, как и для анализа антидепрессантов. Действие триптамина (1 мМ) на гомомеры ASIC1a было похоже на действие тианептина на гомомеры ASIC2a: 1) потенцирование вследствие сдвига десенситизации к более кислым значениям pH и 2) pH-независимое ингибирование открытых каналов, однако в данном случае наблюдалась и зависимость от потенциала, поскольку

тианептин является заряженной молекулой. Действие тирамина (1 мМ) на гомомеры ASIC1a было схожим, однако его эффекты были выражены слабее.

Действие триптамина и тирамина на гомомерные ASIC2a-каналы. Триптамин (1 мМ) не действовал на закрытые/десенситизированные ASIC2a при нормальных физиологических условиях и в случае частично десенситизированных рецепторов, однако вызывал слабое ингибирование открытых каналов в обоих случаях. Тирамин (1 мМ) оказался неэффективным по отношению к гомомерам ASIC2a независимо от экспериментальных протоколов и условий.

Таким образом, эндогенные амины тирамин и триптамин действовали на ASIC-каналы в высоких концентрациях, поэтому физиологического значения ожидать не стоит. Однако поиск более активных эндогенных модуляторов стоит продолжать.

В целом, разнонаправленное действие лигандов на ASIC-каналы определяется несколькими независимыми механизмами, такими как сдвиг кривой активации, кривой инактивации и воздействие на пору канала. В зависимости от конкретных условий эксперимента доминирует либо один механизм, либо другой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Помимо значения наших исследований для фундаментального понимания механизмов работы каналов семейств TRPV и ASIC, результаты могут представлять значение для физиологии ЦНС и ПНС и для фармакологии, в том числе клинической.

Данная работа вносит вклад в понимание того, чем обусловлена сложность и многокомпонентность действия лигандов TRPV1-рецепторов и почему в литературе имеется столько противоречий. Что касается практического применения рассмотренных в данной работе лигандов, то, несмотря на эффективность и статистически не значимое повышение температуры тела, показанные ранее в животных моделях, на данный момент нельзя сделать надёжного предсказания относительно *in vivo* эффектов токсинов морской анемоны APHC1-3 из-за сложности физиологических процессов, связанных с TRPV1, а также из-за сложности действия самих токсинов, что было показано в данной работе. Тем не менее, например, авторы статьи (Diaz-Franulic et al., 2016) считают токсины APHC1-3 не только прекрасными инструментами биофизических исследований для изучения механизмов гейтинга TRPV1, но и предполагают их важное значение в качестве шаблона для разработки новых противоболевых препаратов. Активность SB-366791 была показана разными авторами на нескольких животных моделях, однако требуются дальнейшие исследования для выявления возможных побочных эффектов.

Что касается ASIC-каналов, то, анализ механизмов действия их лигандов интересен с точки зрения неясного физиологического процесса их активации. Так, амплитуды ASIC-опосредованных токов очень малы по сравнению с ответами на другие классические медиаторы

(Du et al., 2014). Синаптическое закисление, вероятно, недостаточно для значительной активации ASIC-каналов. Другой проблемой является то, что длительное закисление среды вызывает равновесную десенситизацию, а не активацию этих каналов. В этом контексте изучение эндогенных лигандов представлялось очень интересным. Действие тирамина и триптомамина оказалось недостаточно сильным (учитывая высокую концентрацию веществ, используемых для тестирования в данной работе), чтобы говорить об их значительном вкладе в физиологическую модуляцию ASIC-каналов, однако факт того, что эндогенные амины способны взаимодействовать с ASIC-каналами, позволяет предположить, что в сумме несколько эндогенных модуляторов могут оказывать значительное влияние на ASIC-каналы. Это стимулирует поиск и изучение других эндогенных модуляторов ASIC-каналов. Возможно, дальнейший поиск модуляторов нужно вести среди эндогенных соединений, присутствующих в организме в более высоких концентрациях (аминокислоты и др.).

Полученные результаты в ходе изучения действия антидепрессантов на ASIC-каналы также интересны как в свете трактовки физиологических ролей ASIC-каналов, так и при изучении побочных эффектов антидепрессантов. Такие соединения как амитриптилин, смещающие активацию к менее кислым значениям и одновременно десенситизацию к более кислым значениям, представляют интерес, так как могут способствовать усилиению ответов ASIC-каналов в условиях слабой активации, включая длительное предварительное закисление. Общее слабое закисление может наблюдаться, например, при патологиях, а слабая активация может быть связана с тем, что синаптический выброс протонов недостаточен, чтобы полностью активировать ASIC-каналы.

Использующиеся в клинике антидепрессанты имеют множество побочных эффектов неизвестного генеза. ASIC-каналы в качестве мишени антидепрессантов ранее не рассматривались. В данной работе мы использовали достаточно высокие концентрации антидепрессантов (300 мкМ), однако наиболее активные вещества (амитриптилин и тианептин) вызывали значительные эффекты уже в диапазоне концентраций 10-30 мкМ. Известно, что терапевтическая концентрация амитриптилина в плазме крови обычно не превышает 1 мкМ (Baldessarini, 1996). Тем не менее, при рассмотрении других клинически использующихся антидепрессантов и разработке новых стоит учитывать их возможное влияние на ASIC-каналы. Вероятно, действие антидепрессантов может синергично усиливаться эндогенными соединениями.

В заключение можно еще раз подчеркнуть, что лиганда ионных каналов действуют сложным образом, что требует большой аккуратности при изучении и применении их в физиологии и фармакологии. С другой стороны, зависимость действия от условий дает возможность создавать лиганды, которые будут действовать только при определенных

условиях, например, при патологических состояниях. Разработка таких лигандов позволит сделать их более направленными и минимизировать побочные эффекты.

ВЫВОДЫ

1. Действие пептидных токиснов APHC1-3 из яда морской анемоны на TRPV1-рецепторы зависит не только от типа активирующего агента, но и от его концентрации. В случае активации TRPV1 капсаицином пептиды APHC1-3 оказывают двунаправленное действие: при низкой концентрации капсаицина пептиды потенцируют ответы TRPV1-рецепторов, тогда как при увеличении концентрации капсаицина потенцирующий эффект меняется на ингибирующий.
2. Ингибирующее действие конкретного антагониста капсаицинового сайта SB-366791 при активации закислением зависит от величины активирующего рН. Эффект наиболее выражен при более слабом закислении за счет большего уровня максимального эффекта. При этом параметр ИК₅₀ не изменяется.
3. Эндогенные амины триптамин и тирамин, а также антидепрессанты хлорпромазин, тианептин, дезипрамин, флуоксетин и амитриптилин могут оказывать разнонаправленное (потенцирующее или ингибирующее) действие на каналы семейства ASIC в зависимости от условий эксперимента. Основными механизмами являются блокада канала, модуляция активации и десенситизаций. Общий эффект определяется суммой независимых эффектов.
4. Влияние лигандов на активацию и десенситизацию ASIC-каналов может иметь значение для физиологической функции ASIC. Соединения, усиливающие активацию, способны обеспечивать физиологически значимый ответ ASIC-каналов при слабой активации рецепторов протонами в ходе синаптической передачи. Ослабление десенситизации способно сохранять функциональную роль ASIC-каналов в условиях закисления среды, наблюдаемого при ряде патологий ЦНС.
5. Действие лигандов TRPV1-каналов, связывающихся с одним сайтом, зависит от действия активатора, связывающегося с другим сайтом связывания. Эти взаимосвязи обусловлены наличием двух ворот в структуре TRPV1-канала и их аллостерическим взаимовлиянием. В случае ASIC-каналов разнонаправленность действия аминов определяется их связыванием с разными сайтами. Особенности механизмов действия лигандов этих каналов необходимо учитывать при разработке и использовании фармакологических препаратов в эксперименте и медицинской практике.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Nikolaev M.V., Dorofeeva N.A., Komarova M.S., Korolkova Y.V., Andreev Y.A.,

- Mosharova I.V., Grishin E.V., Tikhonov D.B., Kozlov S.A. TRPV1 activation power can switch an action mode for its polypeptide ligands // PLoS ONE. 2017. V. 12, e0177077. Published online May 5, 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0177077.
2. Barygin O. I., **Komarova M.S.**, Tikhonova T.B., Korosteleva A.S., Nikolaev M.V., Magazanik L.G., Tikhonov D.B. Complex action of tyramine, tryptamine and histamine on native and recombinant ASICs // Channels (Austin). 2017. V. 11. P. 648-659.
 3. Nikolaev M., **Komarova M.**, Tikhonova T., Korosteleva A., Potapjeva N., Tikhonov D.B. Modulation of ASIC1a and ASIC2a proton-gated channels by antidepressants // ACS Chem Neurosci. 2018. doi: 10.1021/acschemneuro.8b00560.
 4. **Комарова М.С.**, Потапьева Н.Н., Николаев М.В. Неконкурентное pH-зависимое действие SB-366791 на TRPV1-рецепторы // Биологические мембранны. 2018. Т.35. №3. С.192-199.

Тезисы докладов:

1. **Комарова М.С.** Потенцирующее и ингибирующее действие пептидного токсина APHC1 морской анемоны на TRPV1-рецепторы // XVII Всероссийская медико-биологическая конференция «Фундаментальная наука и клиническая медицина – Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, Россия, 2014)
2. **Комарова М.С.**, Дорофеева Н.А., Потапьева Н.Н., Тихонов Д.Б. Активационная зависимость действия пептидного токсина APHC1 морской анемоны на TRPV1-рецепторы // IV Съезд физиологов СНГ (Сочи-Дагомыс, Россия, 2014)
3. **Комарова М.С.**, Николаев М.В., Дорофеева Н.А., Потапьева Н.Н., Тихонов Д.Б. Новый класс пептидных лигандов TRPV1-рецепторов: зависимость эффекта действия от степени активации канала // XI Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Россия, 2015)
4. **Комарова М.С.**, Николаев М.В., Потапьева Н.Н., Тихонов Д.Б. Исследование механизма действия SB-366791 – эффективного антагониста TRPV1-рецепторов // XII Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Россия, 2016)
5. **Комарова М.С.**, Николаев М.В., Потапьева Н.Н., Тихонов Д.Б. Исследование механизмов действия лигандов TRPV1-рецепторов // V Съезд физиологов СНГ и V съезд биохимиков России (Сочи-Дагомыс, Россия, 2016)
6. **Komarova M.**, Nikolaev M., Dorofeeva N., Potapieva N., Tikhonov D. Complexity of mechanisms of action of TRPV1 receptor ligands // FENS Featured Regional Meeting (Венгрия, Печ, 2017)
7. **Komarova M.**, Korosteleva A., Nikolaev M., Potapieva N., Tikhonov D. Complex action of tyramine and tryptamine on recombinant homomeric ASIC1a and ASIC2a receptors // FENS Forum (Берлин, Германия, 2018)
8. Nikolaev M., **Komarova M.**, Potapieva N., Tikhonov D. Action of antidepressants on ASIC1a and ASIC2a // FENS Forum (Берлин, Германия, 2018).