

Субодинично-специфічна модуляція гліцинових рецепторів під дією гінкголевої кислоти

Г.В. Малєєва^{1,2}, С. І. Булдакова¹, П. Д. Брежестовський¹

¹Інститут системних нейронаук, Університет Екс-Марсель, Франція;

²Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: galina_maleeva@ukr.net

У дослідженні увага була зосереджена на особливостях впливу гінкголевої кислоти на гліцинові рецептори, що відносяться до гальмівної системи мозку. Використовуючи метод patch-clamp у конфігурації «ціла клітина» нами було проаналізовано дію гінкголевої кислоти на різні субодиниці гліцинового рецептора. Експерименти проводили на лінії клітин CHO (Chinese hamster ovary cells), що були трансфіковані κДНК (комплементарна ДНК) α1- та α2-субодиниць гліцинового рецептора. Іонні струми було індуковано швидкою аплікацією різних концентрацій гліцину. Гінкголева кислота викликала збільшення амплітуди струмів, опосередкованих α1-субодиницями, з 364±49 (n=34) до 846±134 пА (n=34) через 20-40 с після початку аплікації та змінювала напівефективну дозу для гліцину з 36±6 (у контролі) до 17±2 мкмоль/л. Однак у разі α2-гліцинових рецепторів потенціація, під дією гінкголевої кислоти, не спостерігалася. Наші результати демонструють, що гінкголева кислота є субодинично-специфічним модулятором α1-гліцинових рецепторів. Механізм її дії потребує подальшого дослідження.

Ключові слова: гліциновий рецептор; гінкголева кислота; іонні струми; patch-clamp.

ВСТУП

Аніонвибіркові гліцинові рецептори забезпечують передавання гальмівного сигналу у спинному мозку хребетних, стовбурі мозку, ретині та деяких інших частинах центральної нервової системи [1, 2]. Разом із катіонселективними нікотинним ацетилхоліновим, серотоніновим рецептором 3-го типу та аніонселективним γ-аміномасляним (ГАМК) рецепторами гліциновий рецептор належить до родини пентамерних лігандкерованих циспепельних каналів.

Родина гліцинових рецепторів відносно невелика. За допомогою молекулярного клонування було ідентифіковано чотири α-субодиниці та одну β-субодиницю, що мають кілька сплайс-варіантів [2, 3]. Функціональні гліцинові рецептори можуть бути гомомерними – сформованими лише одним типом α-субодиниць, чи гетеромерними – сформованими α- та β-субодиницями. Од-

нак стехіометрія гетеромерних рецепторів досі остаточно не визначена, розглядається декілька варіантів: 3α/2β [4, 5] та 2α/3β [6]. α-субодиниці високогомологічні між собою, їх амінокислотна послідовність збігається на 80-90% [2], проте рецептори, сформовані різними субодиницями, відрізняються за кінетичними характеристиками [7], темпоральним і регіональним розподіленням рівнів експресії [1, 8, 9], а також фізіологічними функціями [10].

Завдяки своєму широкому розповсюдженню та різноманітним функціям гліцинові рецептори є потенційними мішенями для таких груп фармакологічних препаратів, як м'язові релаксанти, знеболювальні та протизапальні ліки [11]. Однак нині відомо лише кілька речовин, що мають специфічну спорідненість до певних субодиниць гліцинового рецептора [10, 12].

Екстракт *Ginkgo biloba* містить три групи активних речовин: флаваноїди (кверцетин,

© Г.В. Малєєва, С. І. Булдакова, П. Д. Брежестовський

кампферол), терпени (гінкголіди А, В, С та білобалід) і гінкголеві кислоти [13]. Було продемонстровано, що гінкголідам властива здатність специфічно блокувати канал гліцинового рецептора [14, 15]. При цьому для гінкголіду В є характерною висока спорідненість до $\alpha 1$ - субодиниці гліцинового рецептора та гетеромерних рецепторів [16]. Решта терпенів, що входять до складу екстракту листя *Ginkgo biloba*: гінкголіди А, С та білобалід, також є блокаторами гліцинового рецептора, що проявляють слабку субодиничну специфічність [10, 15]. Гінкголеві кислоти переважно містяться у насінних покривах та листі *Ginkgo biloba* [17]. За хімічною будовою вони являють собою 2-гідрокси-6-алкілбензоїдні кислоти з насиченими чи ненасиченими алкільними залишками, кількість яких варіює від 13 до 19.

Метою нашої роботи було, використовуючи метод *patch-clamp*, встановити особливості дії ненасиченої гінкголевої кислоти (С15) на гомомерні $\alpha 1$ - та $\alpha 2$ -гліцинові рецептори, експресовані у лінії клітин *СНО*.

МЕТОДИ

Експерименти проведено на лінії клітин *СНО*, що були отримані з банку клітин та мікроорганізмів American Type Tissue Culture Collection («Molsheim», Франція). Усі маніпуляції із культурою виконували як описано раніше [18].

Для електрофізіологічного аналізу клітини *СНО* було трансфіковано кДНК різних субодиниць гліцинового рецептора. За добу до трансфекції клітини висаджували на покривні скельця (12-14 мм у діаметрі), розміщені всередині чашок Петрі (35 мм), з додаванням 2 мл середовища для культивування. *СНО*-клітини трансфікували кДНК $\alpha 1$ - (1 мкг/мкл) або $\alpha 2$ - (2 мкг/мкл) гліцинових рецепторів із застосуванням протоколу трансфекції для Lipofectamine 2000 («LifeTechnology», США). Для ідентифікації клітин, що експресували гліцинові рецептори, до трансфекційної сумі-

ші додавали кДНК зеленого флуоресцентного білка (GFP, 0,5 мкг/мкл). Заміну середовища культивування здійснювали через 3 год після початку трансфекції. Для запобігання спонтанній активації гліцинових рецепторів у середовище для культивування додавали стрихнін (1 мкмоль/л). Через 24 год після трансфекції флуоресцентні клітини відбирали для проведення електрофізіологічного дослідження. Використовували метод *patch-clamp* у конфігурації «ціла клітина» при 20-25°C, підсилювач ЕРС-9 («НЕКА Elektronik», Німеччина). Впродовж усього експерименту камеру, в якій містилися *СНО*-клітини, перфузували зовнішньоклітинним розчином, що містив (ммоль/л): NaCl – 140, CaCl₂ – 2, KCl – 2,8, MgCl₂ – 4, НЕРЕС – 20, глюкозу – 10; рН 7,4; 320-330 мосм/л. Внутрішньоклітинний розчин, яким була заповнена *patch*-піпетка, містив (ммоль/л): CsCl – 140, CaCl₂ – 6, MgCl₂ – 2, MgATP – 2, NaGTP – 0,4, НЕРЕС Cs/ОН – 10, ВАРТА/КОН – 20; рН 7,3; 290 мосм/л. Відповідно до композиції внутрішньо- та зовнішньоклітинного розчинів фіксований потенціал становив –30 мВ. Піпетки були виготовлені із боросилікатних скляних капілярів («Harvard Apparatus Ltd», США) та мали опір 5-10 МОм.

Для зміни розчинів використовували систему швидкої аплікації. Розчини подавали двома паралельними прямокутними трубками, розміром 100 мкм, що розташовувалися на відстані 40-50 мкм від досліджуваної клітини. Переміщення системи аплікації контролювали комп'ютеризованою системою зміни розчинів (SF 77A perfusion Fast-Step, «Warner», США). Тривалість аплікації варіювала від 2 до 180 с. Клітини із низьким вхідним опором (понад 150 МОм) та швидким зниженням амплітуди струму (більше ніж 30% під час повторюваних аплікацій) не враховували при аналізі результатів. Гінкголеву кислоту (С15, «HWI Analitic GmbH») спочатку розчиняли у чистому ДМСО, а потім у зовнішньоклітинному розчині до кінцевої концентрації ДМСО 0,016%.

Всі результати електрофізіологічних досліджень аналізували з використанням програмного забезпечення НЕКА Elektronik (Німеччина). ED_{50} була визначена побудовою кривих залежності амплітуди струму від концентрації агоніста (Origin 7.5, «OriginLabs», США). Для статистичного аналізу було використано тест ANOVA. Результати виражені у середніх значеннях та їх стандартних похибках середнього.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вплив гінголевої кислоти на $\alpha 1$ -гліцинові рецептори

Іонні струми, опосередковані $\alpha 1$ гомомерними гліциновими рецепторами, було індуковано аплікацією різних концентрацій агоніста

гліцинового рецептора – гліцину. Згідно з розробленим протоколом, 2-секундна аплікація гліцину проводилася до, під час та після аплікації гінголевої кислоти .

Аплікація гінголевої кислоти (25 мкмоль/л) викликала підвищення амплітуди струмів, індукованих низькими (10 мкмоль/л) концентраціями гліцину (рис. 1, а, зліва). Амплітуда струмів, індукованих 10 мкмоль/л гліцину, в контролі становила 364 ± 49 пА та збільшувалася після аплікації гінголевої кислоти до 846 ± 134 пА ($n=34$; $P<0,01$; див. рис. 1, г). Після повернення до нормального зовнішньоклітинного розчину амплітуда гліциніндукованих струмів знижувалася (532 ± 63 пА; $n=34$), однак це значення статистично вірогідно відрізнялося від контрольного. Неповне

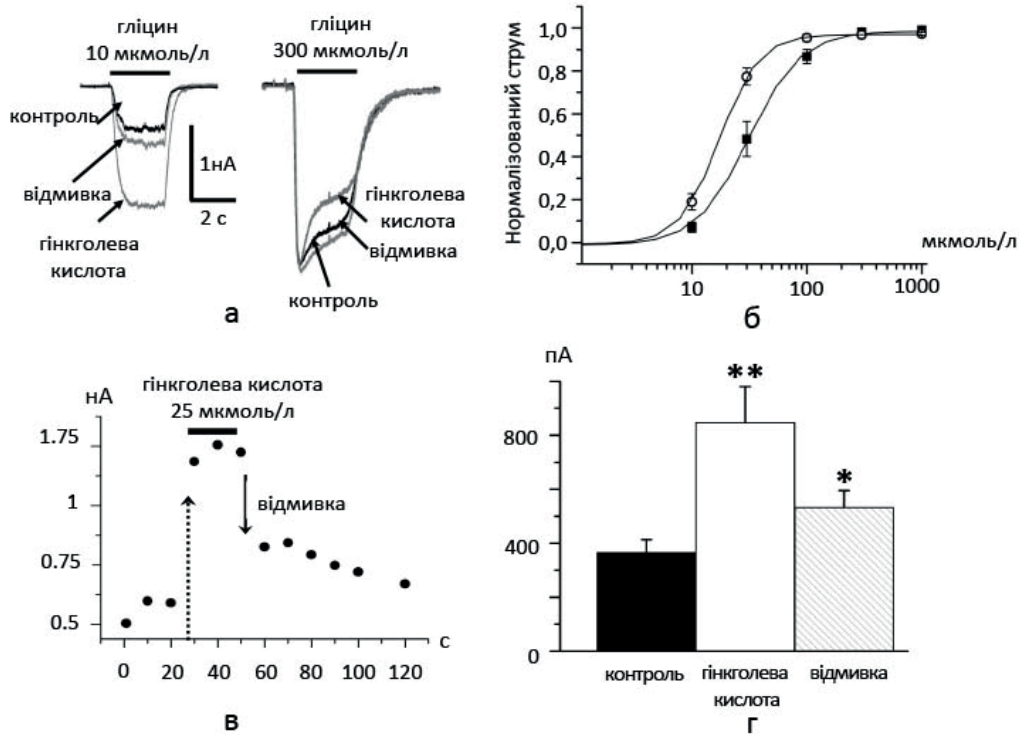


Рис. 1. Модуляція $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів під дією гінголевої кислоти: а, зліва – струми індуковані аплікацією 10 мкмоль/л гліцину в контролі, після аплікації гінголевої кислоти (25 мкмоль/л) та після відмивки (відповідні реєстрації позначено стрілками); справа – струми викликані аплікацією 300 мкмоль/л гліцину (фіксований потенціал -30мВ); б, криві залежності амплітуди струму від концентрації гліцину в контролі (чорні квадрати) та після аплікації гінголевої кислоти (25 мкмоль/л) (пусті кружечки); в, послідовні реєстрації гліциніндукованих струмів до, під час та після аплікації гінголевої кислоти (25 мкмоль/л), що за тривалістю відповідає довжині чорної смужки вгорі; г, середні значення струмів опосередкованих $\alpha 1$ -гліциновими рецепторами (10 мкмоль/л гліцину), (пА) \pm стандартна похибка середнього в контролі (чорний стовпчик), після аплікації гінголевої кислоти (білий) та після відмивки (заштрихований). * $P<0,05$; ** $P<0,01$

відмивання гінголевої кислоти, ймовірно, пов'язане із її накопиченням у центрі зв'язування з рецептором. Варто зазначити, що гінголева кислота не підвищувала амплітуду струмів, індукованих насичуючими концентраціями гліцину ($n=9$; $P>0,1$), викликаючи лише прискорення кінетики десенситизації (див. рис. 1, а, справа).

Під час детального дослідження кривих концентраційних залежностей виявлено, що гінголева кислота змінює ED_{50} для гліцину, спричинюючи зсув кривих концентраційної залежності вліво. Середня ED_{50} змінилася з 36 ± 6 мкмоль/л ($n=9$; див. рис. 1, б) у контролі до 17 ± 2 мкмоль/л ($n=9$) за наявності 25 мкмоль/л гінголевої кислоти ($P<0,01$).

На рис. 1,б продемонстровано криву розвитку дії гінголевої кислоти на амплітуду струмів, індукованих повторюваною аплікацією (кожні 10 с) 10 мкмоль/л гліцину. Ефект гінголевої кислоти сягав свого максимуму через 5–10 с після початку аплікації і залишався стабільним протягом 0,5–1 хв. Для кінетики відмивання характерною була наявність двох фаз: швидкого зниження амплітуди більше як на 50% протягом перших 10 с і наступного повільного відновлення, майже до першопочаткового рівня, протягом 3–10 хв. Варто відмітити, що при довготривалих аплікаціях (понад 3–5 хв), гінголева

кислота викликає незворотне зниження вхідного опору мембрани.

Вплив гінголевої кислоти на $\alpha 2$ -гліцинові рецептори

Перш ніж аналізувати дію гінголевої кислоти на $\alpha 2$ -гліцинові рецептори, нами було визначено ED_{50} для гліцину, що становила 42 ± 1 мкмоль/л ($n=10$; рис. 2, а). Таким чином, значення ED_{50} для $\alpha 2$ -гліцинових рецепторів є дещо вищим, ніж для $\alpha 1$ -гліцинових рецепторів.

На противагу $\alpha 1$ -гліциновим рецепторам, рецептори, сформовані $\alpha 2$ - субодинами, не зазнавали потенціації під дією гінголевої кислоти (25 мкмоль/л). Більше того, через 20–40 с після початку аплікації гінголевої кислоти амплітуди струмів, індукованих ненасичуючими концентраціями гліцину (30 мкмоль/л), демонстрували тенденцію до зменшення з 238 ± 48 до 185 ± 36 пА ($n=11$; $P>0,1$; див. рис. 2, б).

ОБГОВОРЕННЯ

У цьому дослідженні нами вперше було показано, що гінголева кислота є субодиночно-специфічним модулятором гліцинових рецепторів. Під її впливом амплітуда іонних струмів, опосередкованих $\alpha 1$ -гліциновими

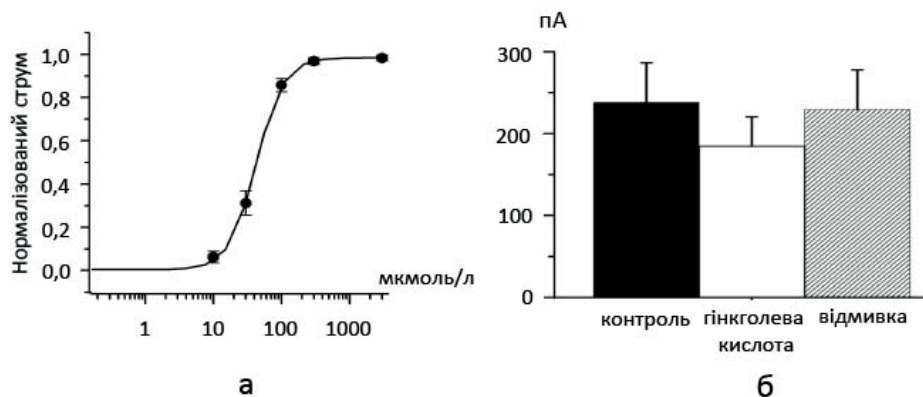


Рис. 2. Зміна амплітуди струмів, опосередкованих $\alpha 2$ -гліциновими рецепторами під дією гінголевої кислоти: а – крива залежності амплітуди струму від концентрації гліцину; б – середнє значення струмів, опосередкованих $\alpha 2$ -гліциновими рецепторами (30 мкмоль/л гліцину), (пА) \pm стандартна похибка середнього в контролі (чорний стовпчик), після аплікації гінголевої кислоти (білий) та після відмивки (заштрихований)

рецепторами, підвищувалася, а $\alpha 2$ -гліциновими рецепторами – знижувалася. Окрім того, у разі $\alpha 1$ -рецепторів під дією гінкголевої кислоти знижувалась ED_{50} для гліцину.

Гліциновий рецептор є важливим компонентом системи швидкої гальмівної нейропередачі. Рецептори $\alpha 1$, що локалізовані в спинному мозку, відповідають за контроль моторної діяльності, $\alpha 2$ - задіяні в процесах ембріонального розвитку мозку [19] та зорового сприйняття [1], $\alpha 3$ - беруть участь у формуванні больових відчуттів [20].

Переважає місцем локалізації гліцинових рецепторів є спинний мозок, однак, останнім часом, значна увага дослідників приділена рецепторам, розміщеним у різних зонах головного мозку, зокрема в гіпокампі [21]. Було показано, що гліцинові рецептори, локалізуючись переважно екстрацілітарно, відіграють важливу роль у контролі збудливості нейрональних мереж гіпокампа. Їх активація, що здійснюється за рахунок гліцину, розчиненого у позаклітинному середовищі, змінює внутрішньоклітинну концентрацію хлору, впливаючи на генерацію потенціалів дії нейронами гіпокампа [22]. Окрім того, гліцинові рецептори можуть брати участь у розвитку епілепсії [23]. Таким чином, актуальним є пошук нових фармакологічних агентів, здатних модулювати їх роботу, особливо за умов патології. При цьому важливого значення набувають субодиночно- специфічні модулятори, оскільки різні субодиночні рецептори відрізняються за своїми функціями та локалізацією.

Отже, нами було показано, що гінкголева кислота є нейроактивною речовиною, що здатна субодиночно-специфічно модулювати роботу гліцинових рецепторів, а саме спричинювати потенціацію струмів, опосередкованих рецепторами, сформованими $\alpha 1$ -субодиночними. Механізми, що лежать в основі такої реакції гліцинових рецепторів на аплікацію гінкголевої кислоти, потребують подальшого вивчення.

**Г.В. Малеева, С.И. Булдакова,
П.Д. Брежестовский**

СУБЪДИНИЧНО-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ МОДУЛЯЦИЯ ГЛИЦИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ГИНКГОЛЕВОЙ КИСЛОТЫ

Используя метод *patch-clamp* в конфигурации «целая клетка» нами было проанализировано действие гинкголевой кислоты на различные субъединицы глицинового рецептора. Эксперименты проводили на клетках линии *CHO* (*Chinese hamster ovary cells*), трансфицированных кДНК $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -субъединиц глицинового рецептора. Ионные токи были индуцированы быстрой аппликацией глицина различных концентраций. Гинкголевая кислота вызывала увеличение амплитуды токов, опосредованных $\alpha 1$ -субъединицами глицинового рецептора, с 364 ± 49 (n=34) до 846 ± 134 пА (n=34) через 20-40 с после начала аппликации и изменяла эффективную дозу для глицина с 36 ± 6 (в контроле) до 17 ± 2 мкмоль/л. Однако в случае $\alpha 2$ -глициновых рецепторов потенцияция под действием гинкголевой кислоты не наблюдалась. Наши результаты демонстрируют, что гинкголевая кислота является субъединично-избирательным модулятором $\alpha 1$ -глициновых рецепторов. Механизм действия гинкголевой кислоты требует дополнительного изучения.

Ключевые слова: глициновый рецептор; гинкголевая кислота; ионные токи; *patch-clamp*.

G. Maleeva^{1,2}, S. Buldakova¹, P. Bregestovski¹

SUBUNIT SPECIFIC MODULATION OF GLYCINE RECEPTORS BY GINKGOLIC ACID

Ginkgo biloba extract is a multicomponent pharmacological agent widely used in neurological disorders therapy. It was shown that ginkgolic acid, a constituent of lipophylic *Ginkgo biloba* extract, has numerous biological activities. In the present study we have focused on the features of ginkgolic acid action on $\alpha 1$ and $\alpha 2$ glycine receptors that make part of the inhibitory system of the brain. Using whole-cell configuration of patch-clamp recording we analysed effects of ginkgolic acid on different subunits of glycine receptors. Experiments were performed on cultured Chinese hamster ovary cells (*CHO* cells), transfected with $\alpha 1$ and $\alpha 2$ glycine receptor subunits. Ionic currents were induced by the fast application of different glycine concentrations. After 20-40 sec of pre-treatment with ginkgolic acid (25 μ M) currents mediated by $\alpha 1$ glycine receptors reversibly increased from 364 ± 49 pA, (n=34) to 846 ± 134 pA, (n=34). EC_{50} for glycine has changed from 36 ± 6 μ M (control) to 17 ± 2 μ M. In contrast, the application of ginkgolic acid on glycine receptors formed by $\alpha 2$ subunits did not provoke potentiation. Our results demonstrate that ginkgolic acid is a subunit specific modulator of glycine receptors. The mechanisms of the ginkgolic acid action on glycine receptors require further investigation.

Key words: glycine receptor; ginkgolic acid; ionic currents; patch-clamp.

REFERENCES

1. Betz H, Laube B. Glycine receptors: recent insights into their structural organization and functional diversity. *J Neurochem*. 2006;97:1600–10.
2. Lynch JW. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiol Rev*. 2004;84:1051–95.
3. Laube B, Maksay G, Schemm R, Betz H. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends Pharmacol Sci*. 2002;23:519–27.
4. Burzomato V, Groot-Kormelink P, Sivilotti LG, Beato M. Stoichiometry of recombinant heteromeric glycine receptors revealed by a pore-lining region point mutation. *Recept Channels*. 2003;9:353–61.
5. Durisic N, Godin AG, Wever CM, Heyes CD, Lakadamyali M, Dent J. Stoichiometry of the human glycine receptor revealed by direct subunit counting. *J Neurosci*. 2012;32:12915–20.
6. Yang Z, Taran E, Webb TI, Lynch JW. Stoichiometry and subunit arrangement of $\alpha 1\beta$ glycine receptors as determined by atomic force microscopy. *Biochemistry*. 2012;51:5229–31.
7. Takahashi T, Momiyama A, Hirai K, Hishinuma F, Akagi H. Functional correlation of fetal and adult forms of glycine receptors with developmental changes in inhibitory synaptic receptor channels. *Neuron*. 1992;9:1155–61.
8. Malosio M, Marqueze B, Pouey A, Kuhse J, Betz H. Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *EMBO J* 1991;10:2401–09.
9. Heinze L, Harvey RJ, Haverkamp S. Diversity of Glycine Receptors in the Mouse Retina : Localization of the alpha 4 Subunit. *J Comp Neurol*. 2007;500:693–707.
10. Lynch JW. Native glycine receptor subtypes and their physiological roles. *Neuropharmacology*. 2009;56:303–9.
11. Webb TI, Lynch JW. Molecular pharmacology of the glycine receptor chloride channel. *Curr Pharm Des*. 2007;13(23):2350–67.
12. Balansa W, Islam R, Gilbert DF, Fontaine F, Xiao X, Zhang H, Piggott AM, Lynch JW, Capon RJ. Australian marine sponge alkaloids as a new class of glycine-gated chloride channel receptor modulator. *Bioorg Med Chem* 2013;21:4420–25.
13. Ude C., Schubert-Zsilavec M., Wurglics M. Ginkgo biloba extracts: a review of the pharmacokinetics of the active ingredients. *Clin Pharmacokinet*. 2013; 52:727–49.
14. Kondratskaya EL, Lishko PV, Chatterjee SS, Krishtal OA. BN52021, a platelet activating factor antagonist, is a selective blocker of glycine-gated chloride channel. *Neurochem Int*. 2002;40:647–53.
15. Hawthorne R, Cromer B, Ng H, Parker MW, Lynch JW. Molecular determinants of ginkgolide binding in the glycine receptor pore. *J Neurochem*. 2006;98:395–407.
16. Kondratskaya EL, Betz H, Krishtal OA, Laube B. The b subunit increases the ginkgolide B sensitivity of inhibitory glycine receptors. *Neuropharmacology*. 2005;49:945–51.
17. Fuzzati N, Pace R, Villa F. A simple HPLC-UV method for the assay of ginkgolic acids in Ginkgo biloba extracts. *Fitoterapia*. 2003;74:247–56.
18. Waseem T, Mukhtarov M, Buldakova S, Medina I, Bregestovski P. Genetically encoded Cl-Sensor as a tool for monitoring of Cl-dependent processes in small neuronal compartments. *J Neurosci Methods*. 2010;193:14–23.
19. Avila A, Vidal PM, Dear TN, Harvey RJ, Rigo JM, Nguyen L. Glycine receptor $\alpha 2$ subunit activation promotes cortical interneuron migration. *Cell Rep*. 2013;4:738–50.
20. Harvey RJ, Depner UB, Wässle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schütz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Müller U. GlyR $\alpha 3$: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science*. 2004;304(5672):884–7.
21. Brackmann M, Zhao C, Schmieden V, Braunevel K. Cellular and subcellular localization of the inhibitory glycine receptor in hippocampal neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004;324:1137–42.
22. Chattipakorn S, McMahon L. Strychnine-sensitive glycine receptors depress hyperexcitability in rat dentate gyrus. *J Neurophysiol*. 2003;89:1339–42.
23. Eichler S, Kirischuk S, Jüttner R, Schafermeier P, Legendre P, Lehmann TN, Gloveli T, Grantyn R, Meier J. Glycinergic tonic inhibition of hippocampal neurons with depolarizing GABAergic transmission elicits histopathological signs of temporal lobe epilepsy. *J. Cell. Mol. Med*. 2008;12:2848–66.

*Матеріал надійшов
до редакції 03.08.2015*