

Санкт-Петербургский Государственный Университет

Бухарев Андрей Русланович

Действие гидрофобных моноаминов на гетеромерные протон-активируемые ионные каналы ASIC1a/2a

Выпускная квалификационная работа

по направлению подготовки «Биология»

основная образовательная программа бакалавриата 06.03.01

Работа выполнена в лаборатории

Биофизики синаптических процессов

Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова, РАН

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук Зыкин Павел Александрович

Научный консультант:

вед. науч. сотр., канд. биол. наук Николаев Максим Владимирович

Санкт-Петербург

2019

## Оглавление

<b>Список сокращений</b> .....	3
<b>Введение</b> .....	4
<b>Глава 1. Обзор литературы</b> .....	7
1.1. Зачем нужны сенсоры рН в нервной системе? .....	7
1.2. Гены, субъединичный состав и основные характеристики .....	8
1.3. Структура и топология .....	10
1.3.1. Доменная организация ASICs .....	10
1.3.2. Механизм активации канала .....	12
1.4. Локализация, участие в физиологических и паталогических процессах .....	13
1.4.1. ASICs в головном мозге .....	13
1.4.2. ASICs в периферической нервной системе .....	15
1.4.3. Физиологическая роль .....	15
1.4.4. ASICs в паталогических состояниях .....	19
1.5. Фармакология .....	20
1.5.1. Основные синтетические вещества .....	20
1.5.2. Токсины .....	22
1.5.3. Эндогенные вещества .....	23
1.5.4. Гидрофобные моноамины .....	24
<b>Глава 2. Материалы и методы</b> .....	28
Экспрессия гетеромерных протон-активируемых ионных каналов .....	28
Регистрация протон-вызванных трансмембранных токов .....	29
Используемые растворы .....	29
Обработка и представление данных .....	30
<b>Глава 3. Результаты и обсуждение</b> .....	32
3.1. Характеристика ответов ASIC1a/2a каналов .....	32
3.2. Подбор экспериментальных протоколов и их параметров .....	33
3.2.1. Протоколы для изучений действия amitriptилина .....	35
3.2.2. Протоколы для изучений действия ИЭМ-2044, мемантина, гистамина .....	36
3.3. Действие amitriptилина на гетеромерные ASIC1a/2a каналы .....	38
3.4. Сравнение действия amitriptилина на разные ASICs .....	40
3.5. Действие мемантина, ИЭМ-2044 и гистамина на гетеромерные ASIC1a/2a каналы .....	41
<b>Обсуждение</b> .....	43
<b>Выводы</b> .....	45
<b>Список использованной литературы</b> .....	46

### Список сокращений

ASIC(s) – acid-sensing ion channel(s) – протон-активируемый(е) ионный(е) канал(ы)	$\tau$ – постоянная времени
cASIC1 – chicken ASIC1 – куриный ASIC1	ЭКД – экстраклеточный домен
DEG/ENaC – degenerin/epithelial Na <sup>+</sup> channels – дегенерины/эпителиальные натриевые каналы	ТМ – трансмембранный домен
ЦНС – центральная нервная система	GAS – (Gly-Ala-Ser) – последовательность из трёх аминокислот: глицин-аланин-серин
ПНС – периферическая нервная система	PSD95 – postsynaptic density protein 95 – белок постсинаптического уплотнения 95
ВПСП – возбуждающий постсинаптический потенциал	AKAP150 – A-Kinase Anchoring Protein 150 – якорный белок А-киназы
ДП – долговременная потенция	GluR2/3 – субъединицы 2/3 рецептора к глутамату
СНО – Chinese hamster ovary – линия клеток яичника китайского хомячка	НПВС – нестероидные противовоспалительные средства
ИЭМ – институт экспериментальной медицины	NMDA – N-methyl-D-aspartic acid – N-метил-D-аспартат
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота	ГАМК – гамма-аминомасляная кислота
EC <sub>50</sub> – концентрация лиганда, вызывающая 50% потенцирования ответа	PcTx1 – psalmotoxin-1 – псалмотоксин-1 – токсин из яда тарантула <i>Psalmopoeus cambridgei</i>
pH – водородный показатель	
pH <sub>e</sub> – extracellular pH – внеклеточное значение pH	MitTx – токсин из яда змеи <i>Micrurus tender tender</i>
pH <sub>50</sub> – pH раствора, вызывающего 50% активации канала	APETx2 – токсин из яда актинии <i>Anthopleura elegantissima</i>
IC <sub>50</sub> – концентрация лиганда, вызывающая 50% ингибирования ответа	GMQ – 2-гуанидин-4-метилкуиназолин
9AA – 9-aminoacridine – 9-аминоакридин	ASCF – artificial cerebrospinal fluid – искусственная спинномозговая жидкость

## Введение

**Актуальность проблемы.** Протон-активируемые ионные каналы – это семейство нейрональных потенциал-независимых каналов, в основном проницаемых для  $\text{Na}^+$ . Они активируются в ответ на быстрое закисление внеклеточной среды, но, кроме того, некоторые из них чувствительны и к устойчивому ацидозу. Они экспрессируются как в центральной, так и в периферической нервной системе, где представлены гомо- или гетеротримерами. При этом биофизические и фармакологические характеристики канала сильно меняются в зависимости от его субъединичного состава. Наиболее характерными субъединицами для ПНС являются ASIC3 и ASIC1b, и они практически не встречаются за её пределами. Для ЦНС основными являются субъединицы ASIC1a, ASIC2a и ASIC2b, но они встречаются и в других отделах нервной системы [Wemmie, Taugher, Kreple, 2013]. Большинство протон-вызванных токов в головном мозге опосредованы гомомерными ASIC1a и гетеромерными ASIC1a/2a каналами [Wu и др., 2016], а в некоторых областях мозга, например, в интернейронах гиппокампа, популяция гетеромеров ASIC1a/2a значительна [Weng, Lin, Lien, 2010].

Столь широкая распространённость этих каналов во всех отделах нервной системы млекопитающих сопряжена с их значительным вкладом в целый ряд как физиологических, так и паталогических состояний. Говоря о физиологической роли протон-активируемых ионных каналов, показана их вовлеченность в процессы синаптической пластичности, обучения и памяти [Wemmie и др., 2002], в процесс формирования страха [Coryell и др., 2007; Wemmie и др., 2003], и в несколько других процессов. При паталогических состояниях, сопровождающихся повышением кислотности внеклеточной среды (ишемия головного мозга, травмы, воспаление) роль ASICs также значительна [Li и др., 2010a; Sherwood и др., 2011]. Кроме того, свой вклад они вносят в патогенез таких нейродегенеративных заболеваний, как болезнь Паркинсона [Arias и др., 2008] и болезнь Хантингтона [Wong и др., 2008].

С момента первой регистрации протон-вызванных токов в нервной системе [Krishtal, Pidoplichko, 1980] прошло уже практически 40 лет, в то время как активное изучение протон-активируемых ионных каналов идёт лишь с 1997-ого года, когда они впервые были клонированы и выделены в отдельное семейство [Waldmann и др., 1997].

Основными инструментами, позволяющими изучать функции протон-активируемых каналов, являются нокаут генов, кодирующих отдельные субъединицы, а также

селективные фармакологические агенты, избирательно влияющие на каналы различного субъединичного состава, объем которых на сегодняшний день достаточно ограничен. Поиск и изучение лигандов протон-активируемых каналов представляет интерес сразу по двум причинам: с одной стороны – исследования такого рода позволят изучать биофизические характеристики каналов и их физиологические функции, с другой, что не менее важно – позволят находить селективные агонисты и антагонисты, которые могут быть использованы в клинической практике в качестве точечных инструментов модуляции различных ASICs.

**Цель и задачи работы.** Большая часть предыдущих фармакологических работ проводилась на рекомбинантных гомомерных ASICs, а также на изолированных нейронах, экспрессирующих как гомомерные, так и гетеромерные варианты. Исследования на гомомерных каналах позволяют находить вещества, обладающие селективным действием, а также определять механизм их действия и сайты связывания с каналом. Изучение нативных ASICs в нейронах позволяют описывать влияние этих веществ в более физиологических, приближенных к реальным, условиях, а также делать предположения о возможном применении отдельных веществ медицинской практике.

Ранее в лаборатории биофизики синаптических процессов ИЭФБ РАН было охарактеризовано действие достаточно большого количества небольших амин-содержащих веществ, обладающих тем или иным действием в отношении гомомерных ASIC1a и ASIC2a каналов, некоторые из которых оказались активными и на нативных ASICs нейронов [Nagaeva и др., 2016a; Nagaeva и др., 2016b; Nikolaev и др., 2019; Tikhonova и др., 2015]. Тем не менее, действие нескольких веществ на нативных каналах не совпадало с таковым на гомомерных каналах, из чего было сделано предположение о том, что нейроны экспрессируют гетеромерные варианты. Соответственно, чтобы охарактеризовать действие веществ именно на гетеромеры, было принято решение использовать гетерологическую экспрессию ASIC1a/2a каналов в клеточной линии CHO, которая является более простой моделью, чем изолированные нейроны.

Таким образом, **целью** данной работы является оценка воздействия гидрофобных моноаминов, активных в отношении ASIC1a и ASIC2a гомомеров, на гетеромерные ASIC1a/2a каналы, экспрессируемые в клеточной линии CHO.

Опираясь на поставленную цель, были сформулированы следующие **задачи**:

1. Освоить методику экспрессии гетеромерных каналов в клетках CHO и регистрацию протон-вызванных трансмембранных токов с помощью метода пэтч-кламп (конфигурация «целая клетка», режим фиксации потенциала);
2. Определить основные функциональные параметры ответов гетеромерных каналов при их экспрессии в системе CHO, а именно характер активации и десенситизации;
3. Подобрать набор экспериментальных протоколов и адаптировать их параметры для работы с гетеромерами ASIC1a/2a;
4. С использованием этих протоколов изучить воздействие известных лигандов гомомерных каналов на параметры ответов гетеромеров ASIC1a/2a, а также сравнить действие этих соединений на разные ASICs.

## Глава 1. Обзор литературы

### 1.1. Зачем нужны сенсоры рН в нервной системе?

Обеспечение постоянства концентрации протонов внутри и снаружи клетки является обязательным для нормального протекания процессов во всех системах организма, и в особенности – в нервной системе. Как и большинство других клеток, нейроны поддерживают внутри- и экстраклеточную концентрацию протонов при помощи механизмов транспортировки  $H^+$  через мембрану, посредством, например,  $Na^+/H^+$  и  $Cl^-/HCO_3^-$  насосов. Физиологическое значение внеклеточного рН в головном мозге составляет ~7.3, в то время как внутриклеточный рН в норме равен ~7.0 [Nedergaard и др., 1991]. При этом многие паталогические состояния, такие как воспаление, ишемический инсульт, черепно-мозговые травмы, а также эпилепсия, сопровождаются повышением концентрации протонов в головном мозге, или иначе – ацидозом ткани [Li и др., 2010a; Siesjö и др., 1996; Sutherland, Cook, McCleskey, 2000].

Достаточно долго оставался открытым вопрос о наличии локальных изменений рН в мозге в ходе его нормального функционирования в силу отсутствия методов неинвазивного измерения этого параметра с высоким пространственным и временным разрешением. Исследование 2012-ого года [Magnotta и др., 2012], в котором использовался метод магнитной резонансной томографии, позволило проследить быстрый локальный ацидоз в головном мозге человека в ходе нейрональной активности. Авторы статьи отмечают, что в процесс понижения рН, вероятно, вовлечены сразу несколько механизмов. Один из основных – экскреция содержимого синаптических везикул, содержащих свободные протоны, а также протонированные нейромедиаторы, также участвующие в повышении концентрации  $H^+$  в межклеточном пространстве [Palmer и др., 2003].

Таким образом, наличие в нервной системе механизма отслеживания внеклеточного рН оказывается важным не только для паталогических состояний, но и для обычных физиологических процессов.

Изменения рН<sub>e</sub> модулируют активность ряда разнообразных мембранных рецепторов и ионных каналов. В целом, снижение рН ингибирует активность большинства потенциал-зависимых и лиганд-управляемых ионных каналов. Например, NMDA рецепторы достаточно сильно ингибируются при понижении рН<sub>e</sub>. Более того, примерно половина из них оказываются неактивными при физиологических значениях рН [Traynelis, Cull-Candy, 1990]. В противовес ингибирующей активности в отношении большинства

других каналов, протоны могут выступать в качестве лиганда для семейства протон-активируемых ионных каналов (ASICs), удовлетворяя при этом всем основным критериям нейромедиатора [Du и др., 2014]. Открытие этих каналов в конце прошлого века позволило по-новому взглянуть на процессы изменения кислотности в нервной ткани, а также предоставило исследователям новое поле для поиска терапевтических стратегий в лечении целого ряда расстройств.

### 1.2. Гены, субъединичный состав и основные характеристики

На настоящий момент у млекопитающих известно 4 гена *acsn1-4*, которые кодируют как минимум 6 различных субъединиц, представленных в нервной системе: ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a, ASIC2b, ASIC3 и ASIC4. Субъединицы ASIC2a и ASIC2b, а также субъединицы ASIC1a и ASIC1b являются вариантами альтернативного сплайсинга генов *acsn1* и *acsn2*, соответственно.

Только 4 из 6 субъединиц, а именно ASIC1a, ASIC1b, ASIC2a и ASIC3, способны формировать функциональный гомомерный канал, состоящий из 3 одинаковых субъединиц. Эти 4 субъединицы, а также ASIC2b, способны собираться в самые разнообразные гетеромерные варианты [Bassilana и др., 1997; Hesselager, Timmermann, Ahring, 2004]. Тем не менее, в нейронах экспрессируются только несколько из многих возможных вариантов. В нейронах ЦНС ASICs в основном представлены гомомерами ASIC1a и гетеромерами ASIC1a/2a [Baron и др., 2008] или ASIC1a/2b [Sherwood и др., 2011], в то время как в нейронах ПНС наиболее важную роль играют ASIC3-содержащие каналы [Benson и др., 2002; Deval и др., 2008]. У человека субъединица ASIC3, в отличие от грызунов, представлена тремя вариантами (ASIC3a, -3b, -3c), и вариант ASIC3a встречается не только в ПНС, но и в ЦНС [Delaunay и др., 2012]. Разнообразие вариантов повышается еще и за счет гибкости стехиометрии гетеромеров ASIC1a/2a: такие каналы могут содержать как две субъединицы ASIC1a и одну ASIC2a, так и наоборот [Bartoi и др., 2014].

Несмотря на такое большое разнообразие, некоторые базовые характеристики ASICs схожи. Так, можно отметить, что все варианты этих каналов являются быстроактивирующимися: максимальная амплитуда их ответа достигается за единицы или десятки миллисекунд. При этом довольно сильно различается их чувствительность к протонам, кинетика десенситизации и скорость восстановления после десенситизации, а также их пропускная способность для разных ионов.

Самыми чувствительными к закислению оказываются гомомеры ASIC1a и ASIC3: они способны активироваться в ответ на быстрое снижение pH до ~6.9. При применении функции Хилла к активации этих каналов, половина максимальной активации приходится на pH ~6.5, со значением коэффициента Хилла равным 3-4. Коэффициент Хилла  $>1$  для всех ASICs, что предполагает кооперативное связывание больше чем одного протона во время активации. После активации в присутствии повышенной концентрации протонов ASICs быстро десенситизируются, то есть становятся нечувствительны к своему лиганду, но после в течение нескольких секунд восстанавливают изначальную чувствительность. Скорость восстановления после десенситизации также довольно сильно различна у разных каналов [Gründer, Pusch, 2015]. Сводная таблица по всем главным параметрам для основных функциональных вариантов ASICs в нервной системе представлена ниже (Табл. 1.1).

Наличие субъединицы ASIC1a в составе гетеромерных каналов играет важную роль в определении кинетики протон-опосредованных токов в ЦНС. Исследование 2014-ого года говорит о том, что коэкспрессия субъединиц ASIC1a и ASIC2a в ооците *Xenopus* приводит к тому, что в ней сосуществуют сразу четыре варианта каналов: гомомеры ASIC1a и ASIC2a, а также два возможных варианта гетеромеров ASIC1a/2a со стехиометрией 2:1 или 1:2. При этом не наблюдается какого-либо предпочтения одного из вариантов гетеромеров [Bartoi и др., 2014]. На сегодняшний день не известны домены, участвующие в сборке конкретных субъединиц ASIC друг с другом. Тем не менее, например, для NMDA рецепторов показано наличие специфических участков на индивидуальной субъединице, вовлеченных в их агрегацию друг с другом, из чего можно предположить, что стехиометрия ионного канала не зависит от экспрессионной системы. Однако в нейронах могут работать шапероны, смещающие случайную сборку ASIC1a и ASIC2a в сторону определенного состава субъединиц. В пользу того, что стехиометрия нативных каналов может быть и не случайной, говорит факт того, что с возрастом в кортикальных нейронах мыши меняется соотношение мРНК, кодирующих субъединицы ASIC1a и -2a: во взрослых нейронах возрастает количество мРНК ASIC2a, и, соответственно, количество этой субъединицы, что изменяет электрофизиологические и фармакологические характеристики нативных ASICs [Li и др., 2010b]. Вероятно, изменение субъединичного состава может происходить как в ГАМК-ергических, так и в глутамат-ергических нейронах, что может влиять и на функциональные параметры нейронов, и на характер протекания паталогических процессов.

	ASIC1a	ASIC3	ASIC1a/2a	ASIC1a/2b
pH <sub>50</sub> activation (pH, вызывающий 50% активации канала)	6.4-6.6	6.5-6.7	4.8-5.4	6.4
pH <sub>50</sub> desensitization (pH, вызывающий 50% десенситизации канала)	7.2-7.3	7.1	--	7.3
$\tau_{\text{activation}}$ (мсек) при pH=6.0 (постоянная времени активации)	6-13	<5	--	--
$\tau_{\text{desensitization}}$ (сек) (постоянная времени десенситизации)	1.2-3.5	0.3	0.6-0.9	2.6
$\tau_{\text{recovery}}$ (сек) при pH=7.4 (постоянная времени восстановления)	5-13	0.4-0.6	0.6	--

**Таблица 1.1.** *Функциональные характеристики основных ASICs.* Характеристики могут немного варьировать у разных видов. Таблица составлена на основе данных, полученных на экспрессионных системах, таких как ооциты *Xenopus*, а также на клеточных линиях, например, *CHO*, *HEK* или *COS7* (из обзора *Gründer, Pusch, 2015*, на основании нескольких статей).

### 1.3. Структура и топология

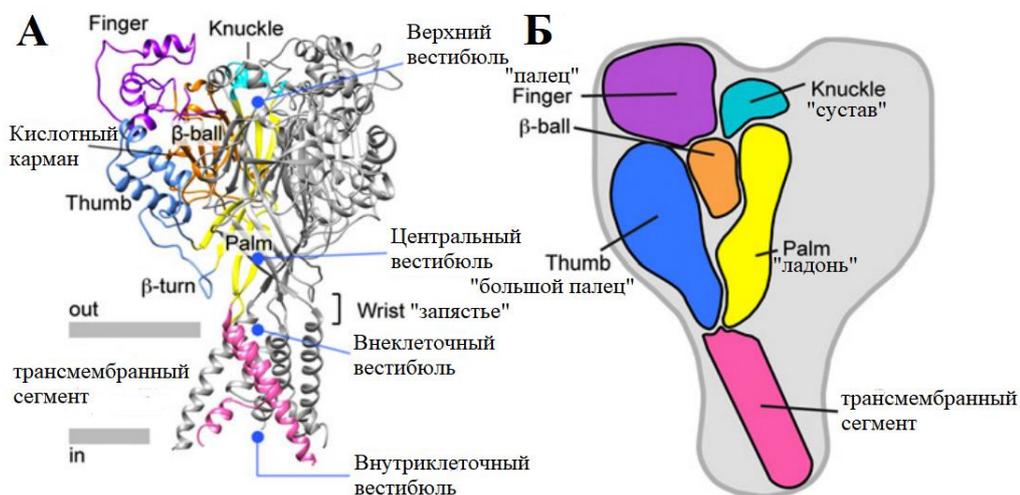
Все представители суперсемейства DEG/ENaC обладают сходным набором характеристик, касающихся их первичной и вторичной структуры. Они включают в себя два трансмембранных домена (TM1 и TM2), короткие цитоплазматические N- и C-концы (~10кДа), а также огромную внеклеточную цистеин-богатую петлю (экстраклеточный домен, ЭКД), составляющую более половины массы всего белка (~50кДа), которая несёт как минимум один сайт N-гликозилирования [Canessa, Merillat, Rossier, 1994]. Такая мембранная топология для протон-активируемых ионных каналов была подтверждена трёхмерной структурой куриного ASIC1a (сASIC1), рентген кристалла которого впервые был получен в 2007-ом году [Jasti и др., 2007]. Тогда же было окончательно установлено, что функциональный канал является тримером.

#### *1.3.1. Доменная организация ASICs*

Расположение доменов субъединиц ASIC имеет некоторое сходство с человеческим предплечьем и кистью, сжимающей мячик в кулаке. Так, предплечье формирует трансмембранный сегмент, а кисть соответствует экстраклеточному домену, который соединен с предплечьем посредством подвижного «запястья» – wrist. ЭКД подразделяют на

5 субдоменов: palm домен – «ладонь», knuckle домен – «сустав», finger домен – «палец»,  $\beta$ -ball домен – «би-болл, или бетта-болл», и thumb домен – «большой палец» (Рис 1.2. Б).

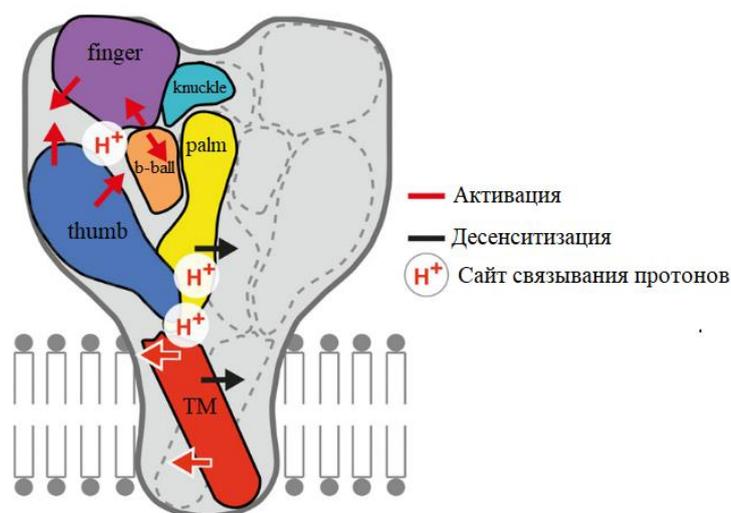
Трансмембранные  $\alpha$ -спирали переходят в  $\beta$ -листы, формирующие palm домен, который расположен вдоль вертикальной оси канала и является коровым элементом ЭКД. Knuckle и  $\beta$ -ball домены расположены близко к центральной оси у верхнего конца palm домена, в то время как finger и thumb домены ориентированы кнаружи. Finger домен образует верхний внешний край, а thumb домен, являясь жесткой структурой, образованной двумя  $\alpha$ -спиральными участками и стабилизированный несколькими дисульфидными связями, расположен ниже finger домена и через два петлевых участка соединён с нижней частью palm домена. Одна из этих петель взаимодействует с верхним концом первого трансмембранного сегмента (TM1) посредством структурного элемента, названного  $\beta$ -turn («бета-поворот») (Рис.1.2. А). В канале также выделяют 4 вестибюля, которые все располагаются вдоль вертикальной оси: верхний (upper vestibule), центральный (central vestibule), который располагается у нижней части palm домена, внеклеточный (extracellular vestibule), расположенный сразу над внеклеточной порой канала, и, наконец, внутриклеточный (intracellular vestibule). Поверхности центрального и экстраклеточного вестибюлей заряжены отрицательно, и притягивают катионы к воротам, которые далее открываются в селективный фильтр [Gonzales, Kawate, Gouaux, 2009; Jasti и др., 2007].



**Рисунок 1.2.** А – изображение субъединицы ASIC1a курицы в виде альфа-спиралей и бета-листов, с указанием расположения кислотного кармана и вестибюлей. Б – взаимное расположение субдоменов одной субъединицы в терминах человеческой руки (из Kellenberger, Schild, 2015, модифицировано).

### 1.3.2. Механизм активации канала

В ЭКД выделяют особую структуру – «кислотный карман» (acidic pocket). Кислотный карман, расположенный между thumb доменом, finger доменом и  $\beta$ -ball доменом, содержит несколько пар аминокислот с кислыми радикалами и имеет большой отрицательный заряд. Мутации по этим аминокислотным остаткам приводят к тому, что канал начинает активироваться при более кислых значениях pH. Основываясь на этих данных, было сделано предположение о функционировании кислотного кармана в качестве сенсора pH, контролирующего активность ASIC. Кроме того, мутационный анализ кислых аминокислот и гистидина, лежащих вне кислотного кармана, показал, что в активации канала также участвуют и другие аминокислотные остатки, находящиеся в finger домене, в экстраклеточном вестибюле, а также в palm домене и в районе запястья [Kellenberger, Schild, 2015]. Соответственно, в пределах одной субъединицы существует несколько протон-чувствительных участков, ответственных за связывание агонистов и дальнейшее открытие канала. В ходе повышения внеклеточной кислотности, протонируются сразу несколько аминокислотных остатков в разных доменах: в finger домене, в нижней части palm домена, в wrist домене, а также в кислотном кармане. Результатом этих событий является изменение конформации всего экстраклеточного домена (Рис.1.3). Вслед за ЭКД свою конформацию изменяет и трансмембранный сегмент: гибкая  $\alpha$ -спираль TM2 домена распрямляется, и в результате формируется селективный фильтр для ионов в просвете канала. Этот фильтр образован тремя консервативными остатками аминокислот: серином, аргинином и глицином (GAS-мотив). После изменения конформации TM2, отрицательно заряженный карбонильный кислород остатка глицина поворачивается в просвет канала, и именно он служит местом селективного пропускания катионов [Bacconguis и др., 2014].



**Рисунок 1.3.** Модель активации и десенситизации ASIC. Основные сайты связывания протонов отмечены как «H<sup>+</sup>». Красные стрелки указывают предполагаемое направление конформационных изменений во время активации ASIC, черные – во время десенситизации (из Kellenberger, Schild, 2015, модифицировано).

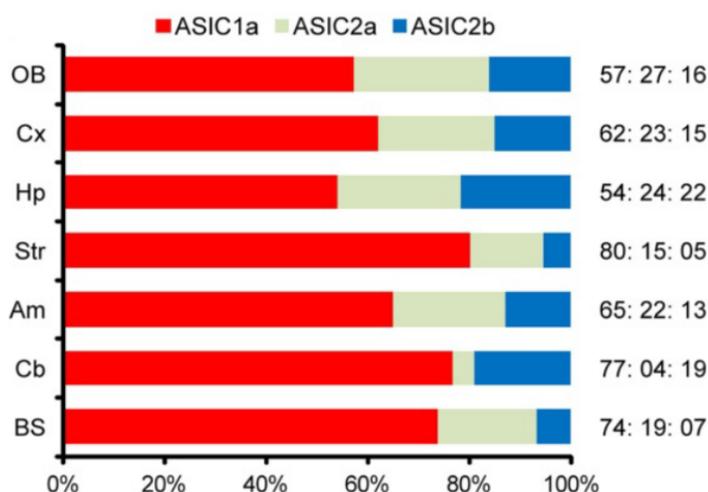
#### 1.4. Локализация, участие в физиологических и паталогических процессах

##### 1.4.1. ASICs в головном мозге

ASICs широко представлены в нейронах ЦНС. Протон-вызванные токи в культивируемых нейронах, а также нейронах, изолированных из гиппокампа или коры грызунов, регистрируются в 93-100% случаях [Gao и др., 2004; Wemmie и др., 2002]. Самой широкоэкспрессируемой субъединицей и вносящей основной вклад в способность нейронов генерировать протон-опосредованные токи оказывается субъединица ASIC1a. Высокий уровень экспрессии данной субъединицы характерен для регионов мозга с высокой плотностью синаптических контактов (поясная извилина, прилежащее ядро, миндалина, кора мозжечка) [Wemmie и др., 2003], а нейроны, нокаутированные по ASIC1a, становятся нечувствительными к понижению экстраклеточного pH до 5.0 [Wemmie и др., 2002]. В то же время, в культивируемых нейронах мыши PcTx1 приводил к значительному ингибированию пикового компонента тока, вызванного понижением pH до значения 6.0. Учитывая, что PcTx1 является селективным ингибитором гомомерных ASIC1a, а трансмембранные токи в нейронах после обработки этим токсином всё еще регистрируются, авторы статьи заключают, что значительная часть протон-вызванных токов генерируется гетеромерными каналами, состоящими из субъединиц ASIC1a и -2a [Coryell и др., 2007]. На основании этих данных делается вывод о том, что большинство протон-вызванных токов в головном мозге опосредованы ASIC1a гомомерами и ASIC1a-

содержащими гетеромерами. Субъединица ASIC1a составляет примерно 2/3 от общего числа всех субъединиц [Wu и др., 2016].

При этом, количество тех или иных субъединиц отличается в разных структурах головного мозга. Кора, стриатум и амигдала демонстрируют относительно высокий уровень экспрессии ASIC1a, в то время как в гиппокампе и обонятельной луковице эта субъединица представлена меньше. Гиппокамп, кора, обонятельная луковица и амигдала демонстрируют наиболее сбалансированную экспрессию всех трёх субъединиц. В мозжечке относительно широко ASIC2b субъединица, а в стриатуме и стволе мозга представлены её значительно меньше [Wu и др., 2016]. Ниже представлена наглядная демонстрация соотношения этих субъединиц в разных регионах головного мозга (Рис. 1.4).



**Рисунок 1.4.** Относительное процентное соотношение субъединиц ASIC1a, -2a и -2b в разных отделах мозга. OB – olfactory bulb (обонятельная луковица); Cx – cerebral cortex (кора больших полушарий); Hp – hippocampus (гиппокамп); Str – striatum (стриатум); Am – amygdala (амигдала); Cb – мозжечок (cerebellum); BS – brain stem (ствол мозга) (из Wu и др., 2016).

В мозге протон-активируемые каналы локализуются в основном на дендритах и телах нервных клеток. В пользу этого говорят иммуногистохимические данные, полученные как на культивируемых нейронах [Wemmie и др., 2002], так и на переживающих срезах гиппокампа [Zha и др., 2009]. Кроме того, показана колокализация ASICs с белками постсинаптической плотности PSD95 и AKAP150, а также с субъединицами глутаматных рецепторов GluR2/3, которые также расположены на постсинаптическом окончании. Совокупность этих данных, а также факт наличия субъединиц ASIC непосредственно в дендритных шипиках говорит о том, что ASICs входят в состав синапсом, и, по-

видимому, вносят значительный вклад в модуляцию проведения нервного импульса. При этом субъединица ASIC2a является в большей степени организующей: именно она отвечает за взаимодействие с белками постсинаптической плотности и агрегацию субъединиц ASIC1a непосредственно в дендритных шипиках. ASIC1a, в свою очередь, отвечает за кинетику ответа, так как значения рН, вызывающие активацию ASIC1a-содержащих каналов, находятся ближе к физиологическим условиям [Wemmie и др., 2002; Zha и др., 2009].

#### *1.4.2. ASICs в периферической нервной системе*

Если ASIC1a, -2a, -2b встречаются во всех отделах нервной системы, то ASIC3 и ASIC1b субъединицы экспрессируются только на периферии, за исключением человеческой ASIC3, небольшой уровень экспрессии которой показан в ЦНС [Delaunay и др., 2012]. При этом, в отличие от соматодендритной локализации в головном мозге, ASICs в периферической нервной системе обнаруживаются преимущественно в аксонах и на телах чувствительных нейронов. В ПНС субъединицы ASIC встречаются в нейронах, иннервирующих кожу, мышцы, кишечник, а также встречаются таких сенсорных органах, как глаза, уши и вкусовые сосочки. ASIC2 и ASIC3 экспрессируются в специализированных нервных окончаниях кожи, таких как тельце Мейснера, тельце Руффини, а также в свободных нервных окончаниях кожи [Wemmie, Price, Welsh, 2006].

В отличие от ЦНС, в нейронах спинального ганглия экспрессируются и ASIC1, и ASIC2, и ASIC3 субъединицы. Субъединица ASIC1 представлена во всех типах нейронов спинального ганглия: в маленьких, средних и больших. ASIC2 и ASIC3 экспрессируются преимущественно в нейронах среднего и большого диаметра, и эти субъединицы в основном формируют гетеромерные каналы [Alvarez de la Rosa и др., 2002].

#### *1.4.3. Физиологическая роль*

##### Протон в качестве нейромедиатора

Как говорилось ранее, нейрональная активность может сопровождаться быстрыми и локальными изменениями рН. Например, увеличение кислотности может происходить в момент выброса содержимого синаптических везикул в синаптическую щель. рН синаптических везикул находится в диапазоне ~5.2-5.7 благодаря работе протонной помпы, которая создаёт электрохимический градиент, по которому внутрь везикулы закачивается нейромедиатор [Liu and, Edwards, 1997]. В момент синаптической передачи рН внутри

синапса может снижаться до 0.6 единиц [Palmer и др., 2003], и этого значения должно быть достаточно для активации ASIC1 и ASIC3 субъединиц.

Функционирование протона в качестве простейшего нейротрансмиттера было подтверждено в работе 2014-ого года [Du и др., 2014].  $H^+$  удовлетворяет всем критериям нейромедиатора: он присутствует внутри синаптических везикул; выделяется в синаптическую щель при стимуляции; имеет свой специфический рецептор на постсинаптической мембране – ASICs; экзогенная аппликация протонов повторяет их эндогенный эффект; существуют механизмы удаления протонов из синаптической щели; блокирование рецептора блокирует активность протонов [Du и др., 2014].

Тем не менее, в экспериментальных условиях достаточно сложно добиться регистрации возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП) при пресинаптической стимуляции, и амплитуда этих ВПСП достаточно низкая по сравнению с глутамат-опосредованными ВПСП. Поэтому предполагается, что при нормальных условиях ASICs вносят лишь небольшой, модулирующий вклад в процесс передачи сигнала. Однако, роль этой системы может возрасти при высокочастотной пресинаптической стимуляции, при которой pH снижается до более кислых значений. При этом амплитуда ВПСП будет становиться больше, и в дополнение к этому будет ингибироваться достаточно большая фракция NMDA-рецепторов. В таком случае ASICs могут оказывать более значимый эффект на синаптическую передачу. Также остаётся открытым вопрос о независимом действии протона, ведь в момент синаптической передачи всегда происходит выброс и других нейромедиаторов.

#### Роль ASICs в синаптической пластичности

Wemmie и соавторами было показано, что активация субъединицы ASIC1a вовлечена в процессы синаптической пластичности [Wemmie и др., 2002]. Высокочастотная стимуляция приводит к долговременной потенциации (ДП) возбуждающих постсинаптических потенциалов в срезах гиппокампа мыши дикого типа. При этом, эффект потенцирования ВПСП быстро пропадал в срезах мозга гиппокампа мыши, нокаутированной по ASIC1a. Если в этих экспериментах экстраклеточная концентрация  $Mg^{2+}$  поддерживалась на низком уровне, ДП развивалась нормально в нокаутированных по ASIC1a мышцах, из чего предполагается, что небольшая деполяризация, вызванная ASICs, может снимать магниевый блок NMDA-рецепторов и тем самым повышать их активность. В другом, более новом исследовании [Wu и др., 2013] было показано, что ДП формируется

нормально и после фармакологической блокады ASIC1a псалмотоксином-1, и при специфическом нокауте ASIC1a только в нервной системе. Мыши с отсутствием ASIC1a только в нервной системе не испытывали трудностей в тестах на пространственное обучение, в отличие от мышей, полностью нокаутированных по ASIC1a [Wemmie и др., 2002]. Противоположные результаты этих двух исследований могут быть объяснены, в числе прочего, использованием разных стратегий нокаутирования: отсутствие ASIC1a в самом начале развития [Wemmie и др., 2002] или делеция в течение эмбрионального развития, примерно на десятый день [Wu и др., 2013]. По-видимому, роль ASIC1a оказывается значительной на ранних этапах развития.

В то же время, в других регионах мозга, например, в амигдале, всё же показано, что наличие субъединицы ASIC1a может влиять на ДП. После высокочастотной пресинаптической стимуляции амплитуда ВПСП амигдаларных нейронов возрастала как в срезах мозга мышей дикого типа, так и в срезах мозга ASIC1a<sup>-/-</sup> мышей. Однако, в ASIC1a<sup>-/-</sup> срезах ДП быстро пропадала и амплитуда ВПСП возвращалась к базовым значениям через 15 минут после высокочастотной стимуляции [Du и др., 2014].

Более того, у грызунов в прилежащем ядре ASIC1a предотвращает изменения, вызванные кокаином, и снижает обусловленное кокаином поведение. В специализированном тесте ASIC1a<sup>-/-</sup> мыши демонстрируют большее предпочтение к кокаин-опосредованному контексту, чем контрольные мыши дикого типа. С другой стороны, грызуны, у которых оверэкспрессированна ASIC1a в прилежащем ядре после локальной инъекции вирусной конструкции, демонстрируют менее зависимое поведение, чем контрольные. В этой работе также было показано, что утрата ASIC1a ассоциирована с повышением плотности дендритных шипиков и частотой миниатюрных ВПСП в прилежащем ядре [Kerple и др., 2014].

Вместе эти исследования показывают, что ASICs вовлечены в процессы синаптической пластичности, и в зависимости от области мозга, они либо способствуют ей, либо ингибируют.

### Роль ASICs в формировании страха и тревожных состояний

Миндалевидное тело отвечает за реализацию поведения связанного со страхом, и демонстрирует особенно высокий уровень экспрессии ASIC1a. Wemmie с соавторами исследовали возможность взаимосвязи субъединицы ASIC1a и поведения, обусловленного

страхом [Wemmie и др., 2003]. Они обнаружили, что ASIC1a<sup>-/-</sup> мыши не отличаются по уровню активности и базовому уровню страха от контрольных мышей, но ASIC1a<sup>-/-</sup> мыши демонстрировали худшую способность к выработке реакции условно-рефлекторного замирания. В другом исследовании [Coryell и др., 2007] было показано, что ASIC1a-нокаутные мыши испытывают меньшую тревожность, находясь на открытом пространстве. Такого же результата можно добиться и у контрольных мышей, путём внутрицеребрального введения PcTx1 – ингибитора гомомерных ASIC1a. Таким образом, ASICs вовлечены в процессы и условного, и безусловного страха, а также в процессы обучения, связанные со страхом.

Было также установлено, что миндалевидное тело выступает в качестве хемосенсора, отслеживающего уровень экстраклеточного pH. Известно, что вдыхание углекислого газа провоцирует повышение тревожности у людей и такой же эффект оказывает на мышей. Вдыхание CO<sub>2</sub> ведет к понижению pH в головном мозге, в результате чего мыши демонстрируют реакции страха. При этом фармакологическое ингибирование или нокаутирование гена ASIC1a значительно снижают такую реакцию. При повышении буферной емкости мозга тревожное состояние смягчается, в то время как понижение pH при помощи микроинъекции в миндалевидное тело воспроизводит эффект углекислого газа. Так, исследования протон-активируемых каналов в разных отделах мозга позволили определить ключевых участников и механизмы возникновения панических реакций, вызванных вдыханием CO<sub>2</sub>.

### ASICs и боль

Ряд состояний, связанных с болью, такие как ишемия и воспаление, сопровождаются понижением тканевого pH. Это наблюдение намекает на наличие pH-чувствительных рецепторов на ноцицептивных нейронах и предполагается, что их активация вызывает боль.

Роль периферических ASICs в формировании боли была изучена с использованием агонистов, таких как GMQ и MitTx, и антагониста – мамбалгина-1. При введении в лапку мыши синтетического вещества GMQ, активирующего ASIC3, мышь демонстрировала болевое поведение, которого не наблюдалось у ASIC3<sup>-/-</sup> мыши. Другое вещество – агматин, являясь эндогенным полиамином, связывается с тем же сайтом на ASIC3 и запускает болевое поведение. Эти данные демонстрируют наличие активаторов ASIC3, отличных от протонов, и предполагается, что эндогенные молекулы могут активировать ASICs и вызывать боль. Компонент яда Техасской коралловой змеи – MitTx, вызывал болевую

реакцию, посредством активации ASIC1a и, в больших концентрациях, ASIC3. Интересно, что MitTx не активирует ASIC2a при нейтральных значениях pH, но в то же время повышает его чувствительность к протонам более чем в 100 раз, что позволяет предположить существование эндогенных соединений, способных модулировать активность ASIC2a так, чтобы эти каналы реагировали на физиологические изменения pH. Введение MitTx в лапку мыши вызывало болевые ощущения, которые в значительной степени были снижены у животного, нокаутированного по ASIC1a. Выключение гена, кодирующего ASIC3, также снижало болевую реакцию, если вводились более высокие концентрации MitTx. Мамбалгин-1, токсин из яда чёрной мамбы, блокирует ASIC1a и -1b гомомеры, а также гетеромерные варианты из этих субъединиц. При его введении в лапку мыши наблюдалась сниженная реакция на предъявление болевых стимулов.

Интересно, что мамбаглин-1 обладал анальгезирующим действием и при внутрицеребральном введении. При этом эффект центральной анальгезии зависел от субъединиц ASIC1a и ASIC2a, в то время как в ПНС самой важной оказалась субъединица ASIC1b. PcTx1 – пептид из яда тарантула *Psalmopoeus cambridgei*, ингибирует гомомеры ASIC1a. При внутрицеребральном введении он купировал многие виды боли у грызунов. Все эти данные были суммированы и рассмотрены в обзоре 2013-ого года, опубликованного в журнале «Nature Reviews Neuroscience» [Wemmie, Taugher, Kreple, 2013].

Таким образом, оказывается, что в ощущении и обработке болевых стимулов в ЦНС и ПНС используются разные сочетания субъединиц ASICs. Важно отметить, что эти исследования идентифицируют ASICs в качестве потенциальных целей для новых обезболивающих препаратов.

#### 1.4.4. ASICs в паталогических состояниях

Повышение внутриклеточной концентрации кальция считается наиболее важной причиной повреждения нейронов после ишемического инсульта. Так как ишемический инсульт вызывает повышение pH в нервной ткани, а гомомерные ASIC1a каналы участвуют в повышении внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  [Samways, Harkins, Egan, 2009], вероятно, эти каналы являются одним из компонентов, обеспечивающих нейротоксичность. Выключение ASIC1a или блокирование ASIC1a гомомеров псалмотоксином-1 уменьшало объем инфаркта в экспериментальной модели инсульта на 60%, что демонстрирует важную роль ASIC1a в развитии нейродегенерации, вызванной ишемическим инсультом. Протектное действие, оказываемое фармакологическим выключением или генетическим

нокаутом ASICs, было показано и в ряде других нейродегенеративных заболеваний, таких как рассеянный склероз, болезнь Хантингтона и болезнь Паркинсона. Амилорид – неспецифический блокатор ASICs, обладал нейропротекторным действием в исследованиях на животных моделях и пациентах с рассеянным склерозом, а выключение гена ASIC1a снижало дегенерацию аксонов при экспериментальном аутоиммунном энцефалите (из обзора [Kellenberger, Schild, 2015]).

Показана также роль протон-активируемых каналов в эпилептических процессах. Отключение гена ASIC1a усиливает тяжесть судорог, а оверэкспрессия ASIC1a, наоборот, купирует судороги во время приступа. Тормозные интернейроны гиппокампа демонстрируют более высокие по амплитуде ASIC-вызванные токи, чем пирамидные нейроны, и предполагается, что именно интернейроны ответственны за прекращение судорог. Тем не менее, роль ASIC1a в терминации судорог остается противоречивой, так как высокие концентрации амилорида (неселективного ингибитора ASICs) также способны купировать приступы эпилепсии. При этом амилорид в силу своей молекулярной структуры не должен пропадать в мозг из крови, соответственно, остаётся непонятным механизм его противозэпилептической активности. Недавно была выявлена ассоциация между однонуклеотидным полиморфизмом ASIC1 и эпилепсией височной доли (из обзора [Kellenberger, Schild, 2015]).

Роль ASICs в паталогических состояниях гораздо шире, чем было представлено в этом разделе. Тем не менее, избирательные агонисты и антагонисты как гомомерных, так и гетеромерных протон-активируемых ионных каналов позволяют купировать многие из синдромов ряда расстройств нервной системы.

### 1.5. Фармакология

Последние два десятилетия исследованию протон-активируемых посвящают всё больше внимания, и арсенал фармакологических агентов, разнонаправленно модулирующих работу этих каналов, стал довольно значителен. В отношении ASICs оказались активными пептидные компоненты ядов некоторых животных. Также найдены как синтетические, так и эндогенные модуляторы разной химической природы.

#### *1.5.1. Основные синтетические вещества*

##### Амилорид

Амилорид – первый найденный модулятор протон-активируемых каналов – ингибирует токи через ASICs, имея достаточно небольшое сродство к своему связывающему сайту ( $IC_{50} = 10-100 \mu M$ ) [Waldmann и др., 1997]. Чувствительность к амилориду немного варьирует у каналов разного субъединичного состава. Амилорид далёк от идеального блокатора ASICs, так как в микромолярных концентрациях, необходимых для ингибирования ASICs, также ингибирует ENaC, кальциевые каналы Т-типа и  $Na^+/H^+$ -обменник [Kleuman, Cragoe, 1988].

Парадоксально, но более высокие концентрации ( $\sim 560 \mu M$ ) амилорида способны вызывать активацию ASIC3 гомомеров и ASIC3/1b гетеромеров при нейтральных значениях pH, а более низкие концентрации ( $\sim 1 \mu M$ ) потенцируют токи при небольших значениях pH (7.2-6.8) ([Li и др., 2011]. Предполагается, что активирующее или ингибирующее действия амилорида зависит от степени активации канала. Так, именно на закрытый или активированный небольшим закислением каналы амилорид оказывает потенцирующий эффект, в то время как при совместной аппликации с более кислым раствором ( $pH < 6.5$ ) преобладает ингибирующий эффект.

#### 2-гуанидин-4-метилкуиназолин (GMQ)

Открытие действия амилорида повлекло за собой поиск и синтез новых веществ, структурно похожих на амилорид, которые также были бы активны в отношении ASICs. Было синтезировано вещество GMQ, которое оказалось первым активатором протон-активируемых каналов, отличных от  $H^+$ . GMQ способен вызывать стационарный, не подверженный десенситизации ток через ASIC3 каналы, и способен индуцировать болевое поведение у мышей дикого типа, но не у  $ASIC3^{-/-}$  мышей [Yu и др., 2010]. Действие GMQ зависит от уровня pH и концентрации  $Ca^{2+}$ . При физиологических концентрациях кальция  $EC_{50}$  GMQ находится в диапазоне  $\sim 1$  мМ, а снижение концентрации кальция и небольшое закисление приводят к усилению GMQ-вызванных токов. Сайт связывания GMQ отличен от сайта, связывающего протоны, и, вероятно, находится в одном месте с сайтом связывания амилорида, который был назван nonproton ligand sensing domain – «непротонный лиганд-связывающий домен».

GMQ сдвигает pH-зависимость активации (активационную кривую) в более кислые значения pH для субъединиц ASIC1a и -1b, в то время как для ASIC3 сдвиг происходит в противоположном направлении. GMQ также сдвигает кривую инактивации ASIC1a, -1b, -2a и -3 в более кислые значения. Получается, что кривые активации и инактивации

перекрываются для ASIC3, но не для других ASICs в присутствии GMQ при pH 7.4, тем самым создавая возможность для так называемого window current – «оконного тока», а место перекрывания кривых называется активационным окном.

### Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) и местные анестетики

Воспалительные процессы вызывают значительное повышение мРНК ASICs в спинномозговых ганглиях, что может быть предотвращено введением нестероидных противовоспалительных лекарств, таких как аспирин, диклофен и ибупрофен в терапевтических дозах [Voilley и др., 2001]. Кроме того, ASIC-опосредованные токи ингибируются НПВП со значениями IC<sub>50</sub> в диапазоне от сотен микромолей до нескольких миллимолей. Механизм действия этих веществ основан на аллостерическом ингибировании, результатом чего является увеличение времени, необходимого для восстановления функционального состояния канала после его десенситизации [Dorofeeva и др., 2008].

Многие местные анестетики также модулируют активность ASICs. Тетракаин ингибирует пиковый, и частично стационарный компонент тока в ASIC3 со значением IC<sub>50</sub> ~ 10 мМ. Кроме того, тетракаин оказался активным и в отношении ASIC1a и -1b каналов, а в культуре чувствительных нейронов мышцы в концентрациях 1-3 мМ снижал амплитуду обоих компонентов протон-вызванных токов [Leng и др., 2013]. Лидокаин значительно ингибирует ASIC-вызванные токи в культивируемых кортикальных нейронах. Он также, как и тетракаин, эффективно работает в довольно высоких концентрациях (IC<sub>50</sub> ~ 12 мМ), а хоть какой-то эффект детектируется при концентрации 0.3 мМ. Кроме того, исследование на рекомбинантных ASICs позволило выяснить, что лидокаин действует на ASIC1a, но не ASIC2a каналы [Lin и др., 2011].

Эти исследования позволяют уточнять механизмы работы уже используемых в клинической практике препаратов, а также открывают возможности нового применения этих веществ.

### *1.5.2. Токсины*

Токсины из яда животных, действующих на ASICs, внесли значимый вклад в понимание физиологической и паталогической роли этих каналов. Наиболее важными токсинами, мишенью которых являются протон-активируемые ионные каналы, являются псалмотоксин-1 (PsTx1, из яда тарантула *Psalmopoeus cambridgei*), APETx2 (из яда актинии

*Anthopleura elegantissima*), мамбалгин-1, -2, -3 (первый и второй – из яда черной мамбы *Dendroaspis polylepis polylepis*, третий – из яда зеленой мамбы *Dendroaspis viridis*) и MitTx (из яда тexasской коралловой змеи *Micrurus tender tender*).

PcTx1 ингибирует гомомерные ASIC1a [Escoubas и др., 2000] и гетеромерные ASIC1a/2b [Sherwood и др., 2011] в наномолярных концентрациях, но также способен потенцировать ASIC1b при небольшом закислении [Chen, Kalbacher, Gründer, 2006]. Действует он и на гетеромеры ASIC1a/2a, обладая двойным действием на эти каналы, активируя их, или ингибируя, в зависимости от условий, причём эффект наблюдался как в рекомбинантных экспрессионных системах, так и в нейронах. MitTx активирует ASIC1a, ASIC1b, ASIC3 гомомеры, и потенцирует ASIC2a каналы [Bohlen и др., 2011]. Кроме того, он оказался особенно важным в изучении структуры селективного фильтра куриного ASIC1, так как при совместной их кристаллизации удалось получить канал в открытой конформации [Baconguis и др., 2014]. APETx2 ингибирует ASIC3 гомомеры и ASIC3-содержащие гетеромеры, но действует и на некоторые другие потенциал-независимые каналы [Kellenberger, Schild, 2015]. Мамбаглины ингибируют гомомерные ASIC1a, -1b, а также ASIC1a-содержащие и ASIC1b-содержащие гетеромеры. Ингибируя большинство вариантов ASICs в головном мозге, эти токсины более эффективно, по сравнению с псалмотоксином-1, снижают процент протон-вызванных токов в культуре нейронов гиппокампа и спинного мозга [Varon и др., 2013].

Пептиды, выделенные из ядов животных, которые специфически блокируют протон-активируемые ионные каналы, являются не только фармакологическими инструментами для исследования их функции, но также являются веществами с большой потенциальной терапевтической ценностью.

### 1.5.3. Эндогенные вещества

Некоторые эндогенные полиамины, являющиеся метаболитами или промежуточными продуктами синтеза других веществ, оказываются активными в отношении протон-активируемых ионных каналов. Например, агматин, аркаин, спермин и спермидин имеют положительный заряд в нейтральной среде и могут вступать в качестве донора протонов в том числе для ионных каналов. Агматин, являясь структурно схожим с GMQ, способен активировать ASIC3 ( $EC_{50} \sim 10$  мМ) и ASIC3/1b ( $EC_{50} \sim 1$  мМ) каналы при нейтральных значениях pH [Li и др., 2010c]. Интересно, что концентрация многих полиаминов в тканях организма возрастает во время воспалительных и раковых процессов,

но скорее всего не достигает значений, необходимых для активации ASICs. Тем не менее, в сочетании с другими провоспалительными агентами ( $H^+$ , сниженная концентрация внеклеточного  $Ca^{2+}$ , арахидоновая и молочная кислота) действие агматина усиливается. Агматин в сочетании с этими факторами способен вызывать болевое поведение у крыс дикого типа, но не у нокаутированных по ASIC3 [Li и др., 2010c].

Некоторые нейропептиды способны потенцировать ASIC-вызванные токи. Родственные с FMRF-амидами белки в нервной системе млекопитающих способны потенцировать токи через ASIC1a и ASIC3 каналы, а динорфин А и большой динорфин активны только в отношении ASIC1a [Sherwood, Askwith, 2008; Sherwood, Askwith, 2009].

Уровень арахидоновой кислоты также значительно возрастает во время воспалительных процессов. В концентрациях от 1 до 10  $\mu M$  она потенцировала как токи через рекомбинантные ASIC1a, -2 и -3 каналы, так и токи в культивируемых нейронах спинномозгового ганглия [Deval и др., 2008].

Наличие этих эндогенных лигандов позволяет предполагать существование и других, ещё не идентифицированных веществ, положительно модулирующих активность ASICs.

#### *1.5.4. Гидрофобные моноамины*

Гидрофобные моноамины – сборная группа веществ, обладающих общими структурными особенностями. Они состоят из (гетеро-)циклической гидрофобной группировки, а также содержат терминальную аминогруппу, располагающуюся либо вблизи гидрофобной части молекулы, либо на конце небольшой отстоящей алифатической части.

#### Блокаторы NMDA рецепторов

Четыре ингибитора NMDA рецепторов – 9-аминоакридин (9AA), мемантин, ИЭМ-2117, ИЭМ-1921 – были проанализированы на возможность воздействовать на протон-активируемые ионные каналы, как нативные, так и рекомбинантные. Воздействие на нативные каналы исследовалось на изолированных интернейронах гиппокампа зоны CA1 ( $pH_{50} \sim 5.7$ ) [Tikhonova и др., 2015].

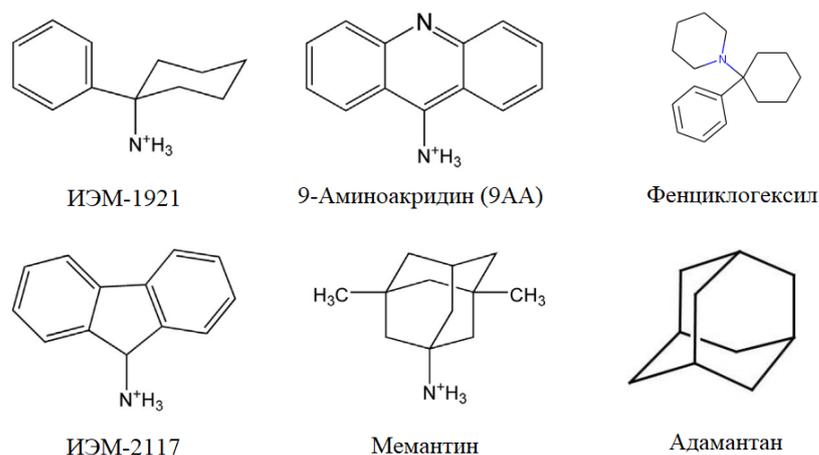
ИЭМ-1921 и ИЭМ-2117 примерно в два раза потенцировали пиковый компонент тока через нативные ASICs в концентрации 1 мМ при их совместной аппликации с кислым раствором (рН = 6.5). Мемантин и 9АА, в свою очередь, ингибировали нативные каналы в тех же условиях, причем 9-аминоакридин оказался значительно активнее. Эффект 9АА становился значительным уже при концентрации 0.1 мМ, а в концентрации 1 мМ ингибировал ~95% пикового компонента ответа, в то время как мемантин при той же концентрации вызывал всего ~45% ингибирования. 9АА не влиял на кинетику ответа, а мемантин оказывал значительное влияние на скорость спада тока, то есть канал десенситизировался более быстро. Этот эффект был концентрационно-зависимый, и усиливался с увеличением концентрации. ИЭМ-1921 и 9АА действовали рН-зависимо, снижая своё воздействие при понижении кислотности активирующего рН.

Ответ рекомбинантных ASIC1a каналов ингибировался мемантином, 9-аминоакридином и ИЭМ-2117. Наиболее сильно эффект был выражен у 9АА ( $IC_{50} \sim 0.4$  мМ). ИЭМ-2117 и 9АА оказывали небольшое воздействие на кинетику спада ответа, в то время как мемантин значительно увеличивал скорость спада ответа, что согласуется с его действием на нативных ASICs. 9АА, как и на нативных каналах, обладал рН-зависимым действием, снижая свой эффект при повышении кислотности.

Совместная аппликация ИЭМ-1921 и ИЭМ-2117 с кислым раствором (рН = 5) приводила к сильному потенцированию как стационарного, так и пикового компонента ответов ASIC2a. Интересно, что мемантин также потенцировал ASIC2a-опосредованные токи, при этом уменьшая скорость спада ответа. Таким же, но менее выраженным действием обладал и ИЭМ-1921. Кроме того, ИЭМ-1921 в несколько раз потенцировал стационарный компонент ответа при активации ASIC2a каналов менее кислым раствором (рН = 6.0), который является пороговым для активации этих каналов.

Все четыре вещества также потенцировали стационарный компонент тока через ASIC3 каналы, и ИЭМ-2117 обладал самой высокой эффективностью. Неожиданным оказалось разное действие этих веществ на пиковый компонент. ИЭМ-2117 потенцировал пиковый компонент, но гораздо слабее, чем стационарный, в то время как мемантин не оказывал на него практически никакого воздействия. ИЭМ-1921 и 9АА, в свою очередь, ингибировали пиковый компонент. Ни одно из веществ не влияло на кинетику ответа. ИЭМ-2117 также вызывал небольшие стационарные токи при нейтральном значении рН.

Гидрофобные моноамины, активные в отношении ASICs, можно подразделить на три группы: производные фенциклогексила (ИЭМ-1921), производные адамантана (мемантин), и содержащие трициклический гидрофобный фрагмент (9-аминоакридин, ИЭМ-2117) (Рис. 1.5). Был проведён анализ производных адамантана, фенциклогексила и 9-аминоакридина с целью выяснить основные детерминанты действия амин-содержащих веществ на рекомбинантные ASIC1a и ASIC2a гомомеры [Nagaeva и др., 2016a]. Самыми активными оказались монокатионы с протонируемой аминогруппой (моноамины). Предполагается, что донор протонов в терминальной аминогруппе возле гидрофобной/ароматической части являются необходимыми как для потенцирования, так и ингибирования ASIC1a и -2a каналов. При этом, чем дальше аминогруппа располагается от гидрофобной части, тем менее выраженное ингибирующее воздействие оказывает вещество. Такая тенденция наблюдается и при действии этих веществ на ASIC2a. Плоская ароматическая структура обеспечивала ингибирование ASIC1a, в то время как «V-образная» форма гидрофобной части молекулы отвечала за потенцирование ASIC2a. Была замечена интересная особенность: чем слабее вещество ингибирует ASIC1a, тем сильнее оно потенцирует ASIC2a. Все тестируемые вещества, потенцирующие ASIC2a, также снижали скорость их десенситизации. Эти результаты предполагают наличие сложного механизма действия у гидрофобных моноаминов, который может быть объяснён сосуществованием двух независимых эффектов, ингибирующего и потенцирующего.



**Рисунок 1.5.** Гидрофобные моноамины и вещества, производными которых они являются.

### Заключение по главе

В этой главе было описано широкое распространение протон-активируемых ионных каналов во многих отделах центральной и периферической нервной системы, а также показано, что биофизические и фармакологические характеристики каналов сильно

зависят от их субъединичного состава, который отличается в разных отделах нервной системы.

Широкая вовлеченность во многие процессы в нервной системе, показанная как с использованием нокаутных животных, так и с использованием разнообразных фармакологических модуляторов, не очень согласуется с небольшими по амплитуде ответами ASICs, регистрируемыми во время синаптической передачи. По-видимому, закисление синаптической щели во время экскрецией синаптических везикул оказывается недостаточным для физиологически значимых ответов протон-активируемых ионных каналов. Другая проблема заключается в том, что длительное закисление среды вызывает скорее десенситизацию, чем активацию этих каналов. Эндогенные соединения, которые смещают активацию до менее кислого pH и одновременно смещают десенситизацию к более кислому pH, могут обеспечивать более значительную активацию ASICs в случае небольшой активации и частичной десенситизации.

## Глава 2. Материалы и методы

### Экспрессия гетеромерных протон-активируемых ионных каналов

Гетеромерные протон-активируемые каналы ASIC1a/2a экспрессировались в клеточной линии CHO (Chinese hamster ovary). Линия клеток яичника китайского хомячка хорошо подходит для электрофизиологического исследования рекомбинантных ионных каналов, так как обладает высокой эффективностью экспрессии, низким уровнем эндогенных трансмембранных токов и её клетки легко формируют плотный контакт с патч-электродом [Gamper, Stockand, Shapiro, 2005].

Клетки культивировались и инкубаторе при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>. Ростовая среда состояла из раствора DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) с добавлением 12% эмбриональной коровьей сыворотки и 5% гентамицина. Для дальнейшей трансфекции клетки высевались на стёкла площадью ~25 мм<sup>2</sup>, равномерно распределённые по дну чашки Петри диаметром 35 мм. Трансфекция клеток проводилась при помощи реагента «Lipofectamine 2000» (Invitrogen, USA), в соответствии с протоколом производителя. Для экспрессии гетеромерных ASIC1a/2a каналов использовалось по 0.5 мкг плазмид, кодирующих крысиные субъединицы ASIC1a и ASIC2a (плазмиды одинаковые, отличаются только кодирующие ASIC фрагменты), совместно с 0.5 мкг плазмиды, кодирующей зелёный флуоресцентный белок GFP. Количество плазмид ASIC1a и ASIC2a регулировалась от трансфекции к трансфекции в соответствии с желаемыми размерами клеточных ответов. Дальнейшая идентификация успешно трансфецированных клеток проводилась по наличию зеленого свечения, детектируемого с использованием флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse Ti (Nikon Corporation, Japan). Клетки, экспрессирующие GFP, в 95% случаев демонстрировали протон-вызванные токи.

В трансфецированных клетках сосуществовали четыре популяции каналов: гомомеры ASIC1a, ASIC2a, и два варианта гетеромеров ASIC1a/2a с одной, или двумя субъединицами ASIC1a в своём составе. Для дальнейших экспериментов отбирались только те клетки, активационная кривая которых была близка к промежуточному положению между кривыми для ASIC1a и ASIC2a гомомеров. Каждая клетка активировалась несколькими реперными растворами с различной кислотностью, и отбирались только те, чьи ответы соответствовали нашим требованиям. Эти клетки по функциональному характеру их ответов идентифицировались нами как «экспрессирующие ASIC1a/2a гетеромеры».

### Регистрация протон-вызванных трансмембранных токов

Вызванные закислением токи регистрировались при помощи метода локальной фиксации потенциала (patch clamp) в конфигурации «целая клетка», при потенциале фиксации -80 мВ. Для этого использовался усилитель ЕРС-10 (НЕКА electronics, Germany). Сигнал, предварительно отфильтрованный в полосе частот 0-5 кГц и оцифрованный с частотой дискретизации 1 кГц, записывался на персональный компьютер при помощи программного обеспечения Patchmaster (НЕКА electronics, Germany). Патч-электроды с сопротивлением 2-5 МОм изготавливались при помощи пуллера Р-97 (Sutter Instruments, USA). Эксперименты проводились при комнатной температуре (21-25°C) через 24-72 часа после трансфекции.

Конфигурация «целая клетка» позволяет описывать интегральный ток через все ионные каналы, представленные в мембране клетки. Активация рецепторов производилась путём быстрого закисления внеклеточного раствора. Детектируемые в таком случае трансмембранные токи наблюдались только у трансфецированных клеток и блокировались амилоридом – антагонистом ионных каналов семейства ENaC. Внеклеточное закисление не вызывало появления каких-либо трансмембранных токов у нетрансфецированных клеток, следовательно, нативные рецепторы клеток СНО в наших условиях не активировались. Таким образом, изучение токов через рекомбинантные ASIC1a/2a каналы, экспрессированные в клеточной линии СНО, позволит хорошо описать как базовые характеристики ответов, так и отчетливо увидеть действие веществ на ответы этих каналов.

Протоколы аппликации растворов, используемые для оценки воздействия тестируемых веществ, описаны в соответствующих пунктах раздела «Результаты и обсуждение». Последовательность проведения экспериментов выбиралась случайно.

### Используемые растворы

В качестве внеклеточного раствора использовался приготовленный нами ASCF (artificial cerebrospinal fluid), содержащий (в мМ): NaCl 143, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2.5, MgSO<sub>4</sub> 2, D-глюкоза 10, HEPES 10, MES 10, (рН доводился до 7.4 добавлением NaOH). Раствор фильтровался через мелкопоровую целлюлозную мембрану, при помощи вакуумного стеклянного фильтра (Sartorius AG, Germany). Пипеточный раствор, которым заправлялись стеклянные патч-электроды, содержал (в мМ): CsF 100, CsCl 40, NaCl 5, CaCl<sub>2</sub> 0.5, EGTA 5, HEPES 10 (рН доводился до 7.35 добавлением CsOH).

Растворы с низкими значениями pH, используемые для активации ASIC-каналов, готовились из базового внеклеточного раствора путём добавления HCl. Концентрация протонов в рабочих растворах контролировалась при помощи pH-метра. ИЭМ-2044, используемый в этой работе, был синтезирован по нашему заказу В.Е. Гмиро в НИИ Экспериментальной Медицины (г. Санкт-Петербург). Мемантин, гистамин и амитриптилин были приобретены в фирме Sigma (Sigma-Aldrich, USA). Навески веществ растворялись в бидистиллированной воде для получения стокового раствора соединения с концентрацией  $5 \cdot 10^{-2}$  М. Нужный объем стокового раствора добавлялся к рабочим растворам с разными значениями pH для достижения необходимой концентрации. Для каждого из приготовленных растворов соединений проверялся pH. В нашем случае ни одно из используемых веществ не сдвигало pH конечного рабочего раствора.

Для аппликации веществ использовалась система быстрой перфузии RSC-200 (Biologic, France) с микроманифолдом на конце. Смена растворов, подаваемых на клетку, происходила примерно за 200 мс. Система трубок, а также микроманифолд для локальной подачи растворов на клетку были собраны мной в нашей лаборатории.

#### Обработка и представление данных

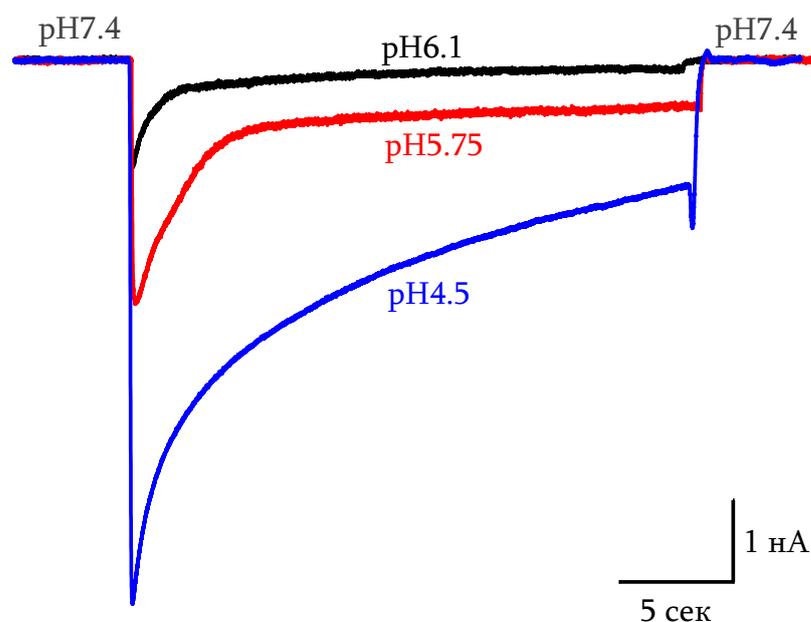
Эффективность исследуемого соединения оценивалась как:  $(I_{\text{акт+}}/I_{\text{акт}}) \cdot 100\%$ , где  $I_{\text{акт}}$  – амплитуда ответа при предъявлении на клетку раствора с определенным значением pH,  $I_{\text{акт+}}$  – амплитуда ответа при том же pH в присутствии исследуемого соединения. Значение эффекта вещества говорило о направленности его действия: менее 100% свидетельствовало о ингибирующем эффекте (например, 70% соответствовало 30% блока), более 100% свидетельствовало о потенцирующем эффекте (например, 50% соответствовало потенциации в полтора раза). Данные представлены в виде «значение  $\pm$  стандартное отклонение». Для дальнейшего использования параметрических методов анализа все выборки были проанализированы на нормальность распределения при помощи теста Шапиро-Уилкса. При анализе достоверности различий для парных значений использовался парный t-критерий Стьюдента (значение амплитуды ответа в присутствии тестируемого вещества относительно контроля). Для указания достоверности различий между двумя выборками использовался непарный t-критерий Стьюдента. Различия принимались как статистически значимые при  $P < 0.05$ . Анализ формы ответа проводился путём измерения постоянной времени спада ответа, при помощи моноэкспоненциальной аппроксимации по методу наименьших квадратов. Для наглядности оценки изменения кинетики ответа под

действием изучаемых соединений применялся метод нормализации токов по амплитуде: вычислялось отношение тока в присутствии исследуемого соединения к контрольному току, после чего меньший по амплитуде ток перемножался на полученное соотношение и, в результате, мы получали ответы, равные по амплитуде. Статистический анализ данных проводился в программе Microcal Origin 8.0 (OriginLab, USA).

## Глава 3. Результаты и обсуждение

### 3.1. Характеристика ответов ASIC1a/2a каналов

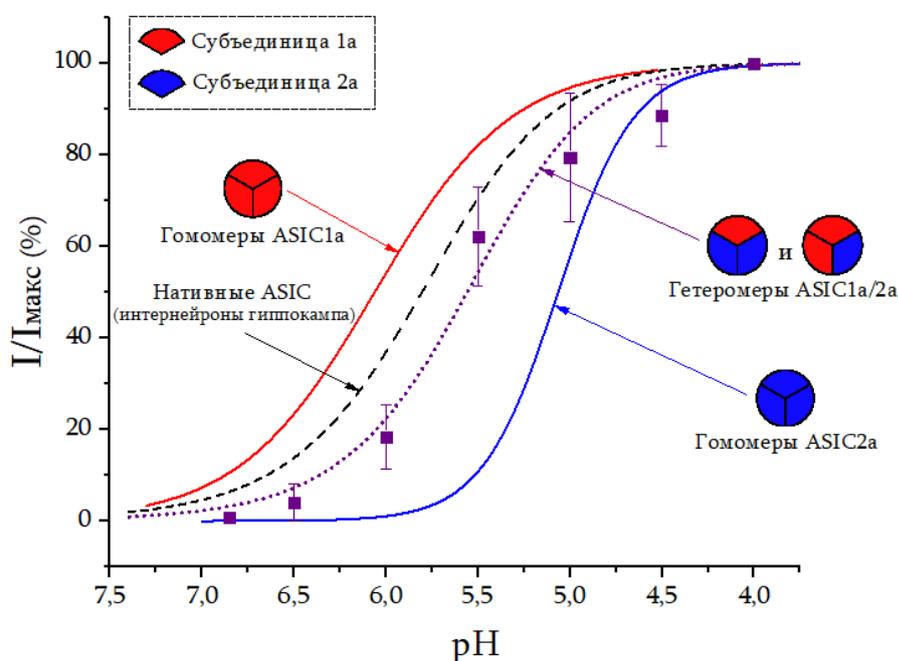
Понижение кислотности внеклеточного раствора ниже исходного уровня (pH = 7.4) приводило к возникновению транзистентных токов через клетки линии СНО, несущие ASIC плазмиды. Амплитуда ответов возрастала с увеличением pH активирующего раствора (Рис 3.1), и достигала максимальных значений при pH = 4.0. Значения амплитуд ответов варьировали в диапазоне от десятков пикоампер до нескольких наноампер в зависимости от условий эксперимента и трансфекции. Кинетика ответов клеток, экспрессирующих ASIC1a/2a гетеромеры, характеризовалась быстрым нарастанием амплитуды до максимальной (менее чем за 20 мс, данные не показаны), и более плавным спадом в ходе десенситизации до стационарного тока. Ответы клеток характеризовались наличием двух компонентов тока – пикового и стационарного (плато).



**Рисунок 3.1.** Ответы ASIC1a/2a гетеромеров в ответ на предъявление активирующего раствора с различным pH.

Для этих каналов была построена активационная кривая – зависимость амплитуды ответа от pH активирующего раствора (Рис. 3.2). При использовании одинакового количества плазмид, кодирующих ASIC1a и ASIC2a субъединицы, активационная кривая занимала промежуточное положение между такими кривыми для гомомеров ASIC1a и ASIC2a, и по своим характеристикам отличалась от этих двух кривых. Кроме того, она была схожа с кривой нативных ASICs в интернейронах гиппокампа. Первые ответы, значимо

отличимые от шума, регистрировались при предъявлении активирующего раствора с рН = 6.5 ( $3.6 \pm 3.3\%$  от максимальной амплитуды,  $n = 7$ ). Значение рН<sub>50</sub> для ASIC1a/2a гетеромеров составило  $5.6 \pm 0.1$ , что совпадает с ранее опубликованными данными [Bartoi и др., 2014].



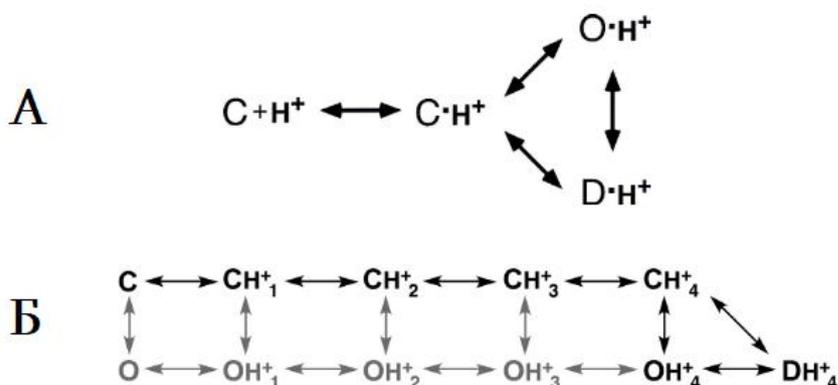
**Рисунок 3.2.** Зависимость амплитуды ответа от рН активирующего раствора для ASIC1a/2a гетеромеров.

### 3.2. Подбор экспериментальных протоколов и их параметров

Протон-активируемые каналы могут существовать в трёх состояниях: открытом, закрытом и десенситизированном. Согласно основной кинетической схеме ASICs связывают  $H^+$  в закрытом состоянии (C), и из этого состояния они достигают либо открытого состояния (O), либо десенситизированного (D). При этом, все состояния канала со связанным протоном могут переходить друг в друга (Рис. 3.3. А). Тем не менее, такая схема не позволяет описывать действие многих модуляторов ASICs. Кроме того, как было описано в обзоре литературы, для полного открытия канала необходимо более одного протона, соответственно, предложенная схема должна быть расширена.

В другом варианте такой схемы существуют пять вариантов закрытого и открытого канала с разным количеством связанных  $H^+$  (Рис. 3.3. Б). Связывание протона при этом кооперативное, и переход от закрытых состояний с неполным насыщением лигандом к открытым или десенситизированным состояниям будет очень редким событием. Таким

образом, обычно каналы открываются только при связывании максимального количества протонов, и более сложная схема «Б» может быть сведена к более простой «А» [Chen, Kalbacher, Gründer, 2006], .



**Рисунок 3.3.** А – классическая схема смены состояний ASICs. Б – развернутая, более реальная схема активации и десенситизации. Черными стрелками показаны наиболее вероятные события. «С» – закрытое состояние; «О» – открытое состояние; «D» – десенситизированное состояние (из Chen, Kalbacher, Gründer, 2006).

Множественность вариантов состояний ASICs стоит учитывать при разработке экспериментальных протоколов для изучения действия различных веществ на эти каналы. Соединения, активные в отношении ASICs, могут связываться с каналами во всех трёх состояниях, при этом по-разному модулируя их активность. Основная задача состояла в том, чтобы из всех возможных вариантов протоколов выбрать такое их минимальное количество, которое позволит описать основные механизмы действия исследуемых веществ.

Несмотря на то, что все используемые в этой работе конфигурации экспериментов уже использовались как в нашей, так и в других лабораториях, необходимо было адаптировать их для работы с гетеромерными ASIC1a/2a каналами, подобрав адекватные параметры времени активации, десенситизации, а также значения активирующего и десенситизирующего рН.

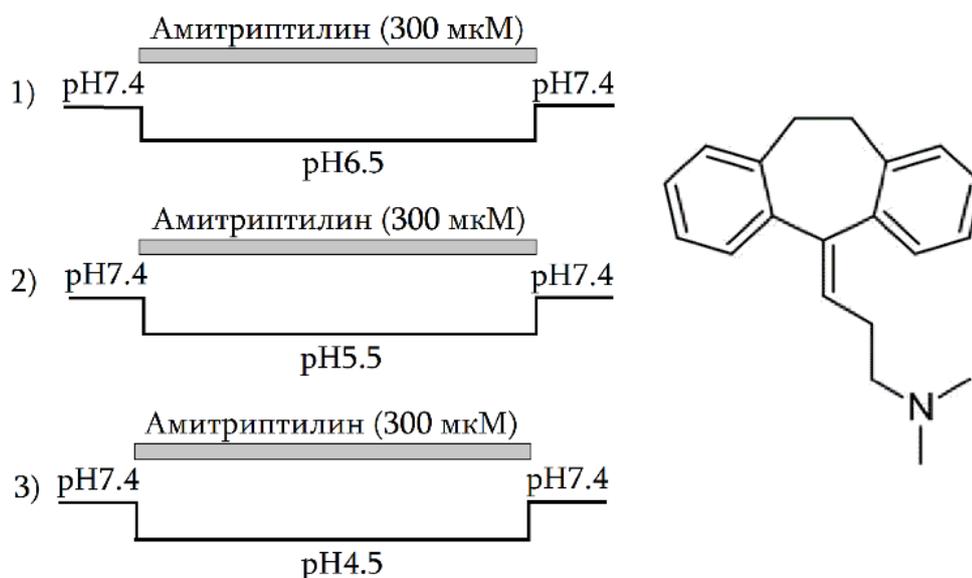
Во всех экспериментах перед началом тестирования исследуемых веществ на клетку подавалось несколько контрольных активирующих растворов (не менее двух), пока уровень ответа не стабилизировался (*контроль*). Аппликации с присутствием веществ также проводились два и более раз для стабилизации уровня ответов (*опыт*). После достижения воспроизводимого ответа в опытной части эксперимента вновь записывались контрольные

ответы (отмыв) для оценки обратимости эффектов соединений. За уровень контрольного ответа принималось среднее значение амплитуды ответа на раствор с активирующим рН до и после применения любого экспериментального протокола. Интервал между всеми аппликациями составлял не менее 30 с, чего достаточно для полного восстановления каналов с любым субъединичным составом после десенситизации.

### *3.2.1. Протоколы для изучения действия amitriptilina*

Некоторые антидепрессанты, используемые в медицинской практике, обладают выраженным структурным сходством с гидрофобными моноаминами, активными в отношении ASICs. Недавно было показано [Nikolaev и др., 2019], что многие из этих антидепрессантов модулируют активность как рекомбинантных гомомерных протон-активируемых каналов, так и нативных каналов в интернейронах гиппокампа. Для изучения на рекомбинантных гетеромерных ASIC1a/2a каналов был выбран amitriptilin, так как только он из всех исследуемых соединений оказывал хоть и небольшое, но значимое потенцирующее действие и на ASIC1a, и на ASIC2a, и на нативные ASIC каналы при совместной его аппликации с активирующим раствором.

Тестирование amitriptilina проводилась в концентрации 300 мкМ в протоколах одновременной его подачи совместно с активирующими растворами различной кислотности при рН кондиционирующего раствора 7.4 (Рис. 3.4). Для активации ASIC1a/2a использовались внеклеточные растворы с рН = 6.5, рН = 5.5 и рН = 4.5. Время предъявления кислого раствора составляло 15 или 25 секунд. При активирующем рН = 6.5 каналы лишь слегка активировались, в то время как при рН = 4.5 все каналы, представленные на мембране, были активированы практически максимально. При аппликации соединения совместно с активирующим раствором оно главным образом взаимодействует с открытым каналом, а различные значения активирующего рН позволяют оценить его действие на каналы, активированные в разной степени.



**Рисунок 3.4.** Структура амитриптилина (справа) и экспериментальные протоколы (слева) для оценки его воздействия на активированные в разной степени ASIC1a/2a каналы.

### 3.2.2. Протоколы для изучения действия ИЭМ-2044, мемантина, гистамина

Три этих вещества были выбраны ввиду неоднозначного их действия на рекомбинантных гомомерных и нативных протон-активируемых каналах в интернейронах гиппокампа (Табл. 3.1).

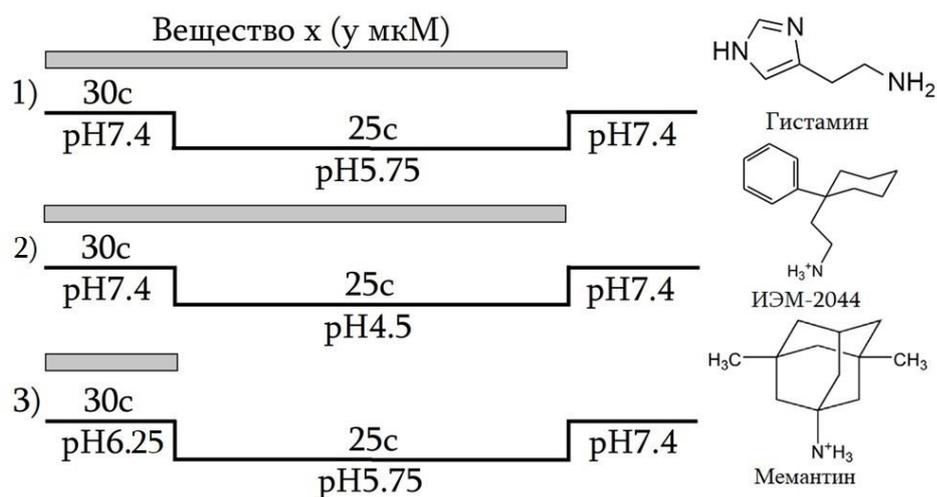
	ASIC1a	ASIC2a	Нативные ASICs
ИЭМ-2044	↑	↑↑	(данные отсутствуют)
Гистамин	↑↑	–	↓
Мемантин	↓	↑	↓

**Таблица 3.1.** Сравнение эффекта действия ИЭМ-2044, гистамина и мемантина на гомомерные и нативные ASIC каналы. «↑» – вещество увеличивает амплитуду; «↑↑» – вещество сильно увеличивает амплитуду ответа; «↓» – вещество снижает амплитуду ответа; «←» – вещество не влияет на амплитуду ответа.

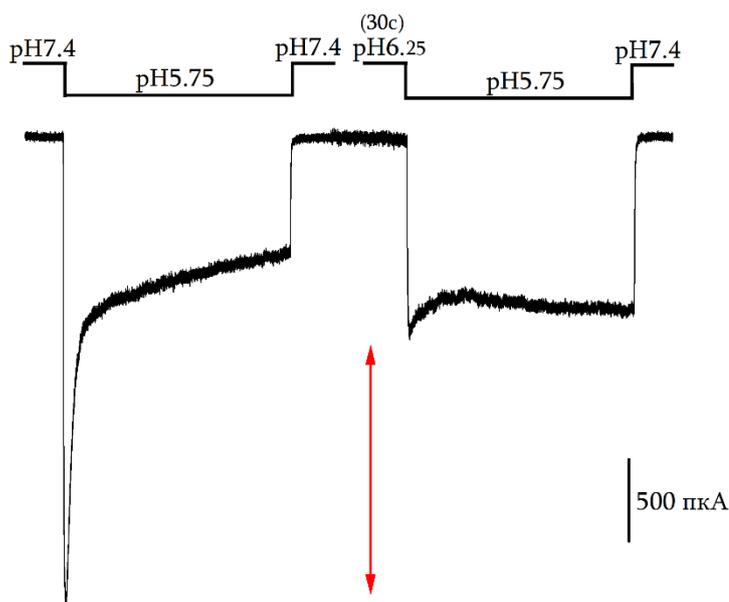
Тестирование веществ проводилось в достаточно высокой концентрации (1000 мкМ), так как перед нами стояла задача увидеть ярко выраженный эффект, или его отсутствие, чтобы продолжить дальнейшее исследование только активных веществ. Каждое вещество было исследовано с использованием трёх протоколов (Рис. 3.5). В каждом из них время подачи активирующего раствора составляло 25 с. За это время кривая ответа практически полностью выходит на плато при всех используемых активирующих рН. Это

необходимо учитывать при оценке воздействия тестируемого соединения на кинетику ответа. В первом и втором протоколе вещество подавалось как до активации рецепторов (в течение 30 с), так и совместно с активирующим рН. Различались эти два протокола по величине активирующего рН. В первом каналы активировались подачей раствора с рН = 5.75, и это значение было выбрано ввиду его близости к рН<sub>50</sub> ( $5.6 \pm 0,1$ ), вызывающего ~50% активации ASIC1a/2a каналов. Во втором протоколе каналы активировались подачей раствора с рН = 4.5, и это вызывало почти максимальную активацию ASIC1a/2a каналов ( $89 \pm 7\%$ ,  $n = 4$ ). Эффект, наблюдаемый в протоколах постоянного присутствия вещества представляет собой сумму двух независимых типов действия: на закрытые каналы (когда вещество подаётся до активирующего раствора), и на открытые каналы (когда вещество подаётся совместно с активирующим раствором). Такие протоколы, кроме прочего, наиболее близки к физиологическим условиям, когда вещество постоянно присутствует в среде.

В третьем протоколе рецепторы активировались рН = 5.75 из слабо закисленного кондиционирующего раствора, в котором присутствовало исследуемое соединение (рН = 6.25 в течение 30 с.). При закислении раствором с рН = 6.25 рецепторы активируются слабо и не наблюдается больших трансмембранных токов. Однако при этом часть рецепторов переходит в десенситизированное состояние. Поэтому ответ на рН = 5.75 в таких условиях значительно меньше (примерно на 80%), чем контрольный, полученный при нейтральном рН кондиционирующего раствора (Рис. 3.6). При использовании такого протокола исследуемое вещество способно связываться только с закрытыми и десенситизированными каналами. Если амплитуда ответа при использовании такого протокола выше по сравнению с контрольной десенситизацией, значит соединение вызывает сдвиг кривой десенситизации в более кислые значения. Данных, необходимых для описания статистически значимого эффекта веществ с использованием этого протокола, оказалось недостаточно. Тем не менее, эта работа в настоящий момент ведётся в нашей лаборатории.



**Рисунок 3.5.** Структура гистамина, ИЭМ-2044, мемантина (справа) и экспериментальные протоколы (слева) для оценки различного их воздействия на ASIC1a/2a каналы.



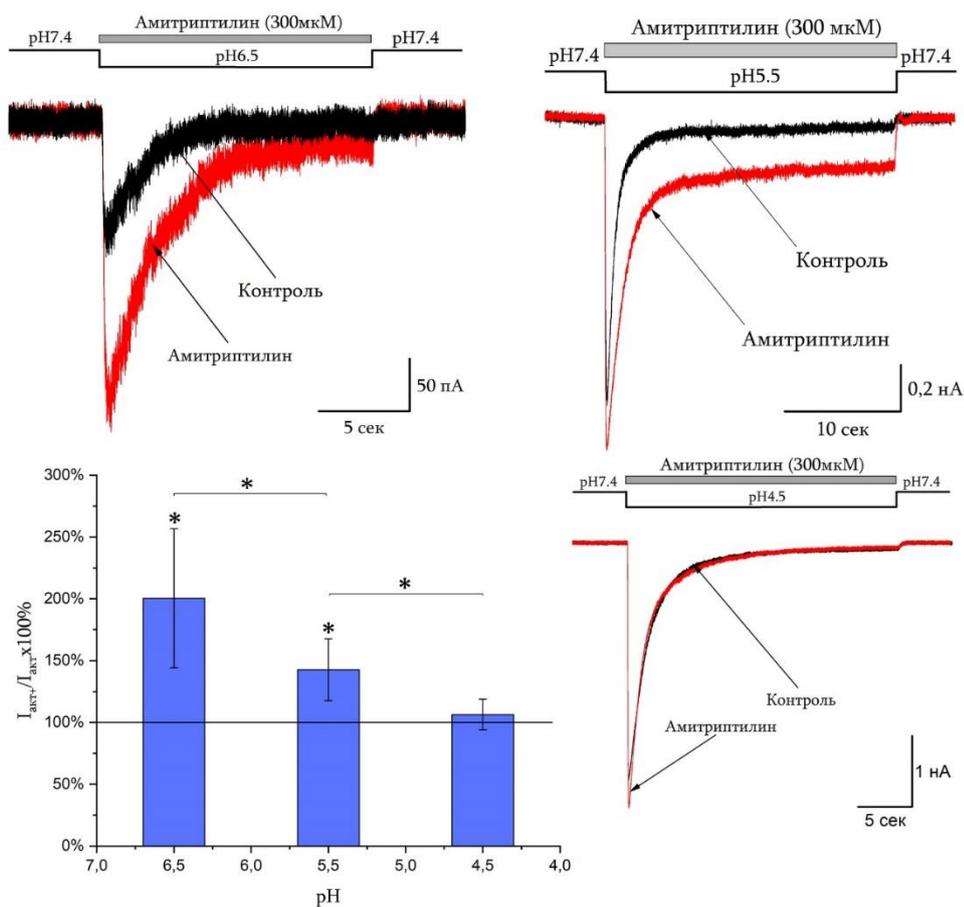
**Рисунок 3.6.** Пример снижения амплитуды пикового компонента тока ASIC1a/2a каналов после десенситизации.

### 3.3. Действие amitriptилина на гетеромерные ASIC1a/2a каналы

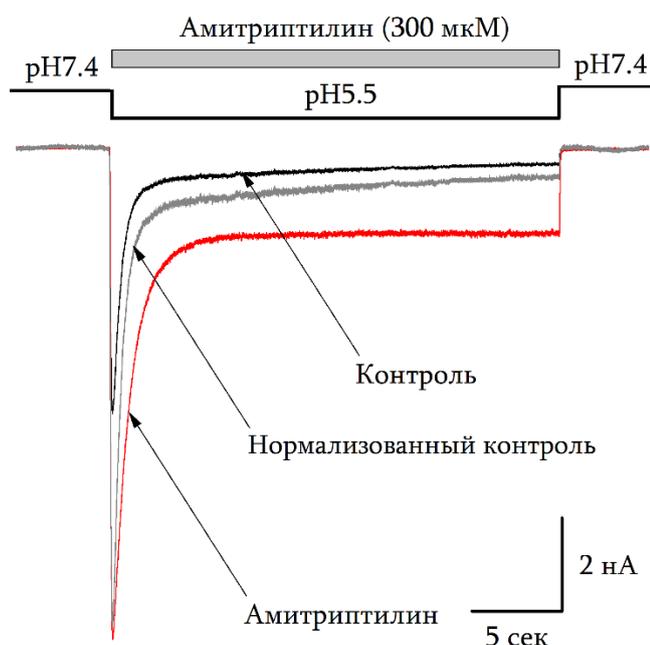
При аппликации совместно с активирующим раствором amitriptилин в концентрации 300 мкМ потенцировал токи через гетеромерные ASIC1a/2a каналы. Потенцирующий эффект был по-разному выражен при разных значениях активирующего pH. При pH = 6.5 наблюдалось потенцирование пикового компонента тока примерно в два

раза ( $200 \pm 56\%$ ,  $n = 10$ ,  $P < 0.05$ ), а при  $pH = 5.5$  – примерно в полтора раза ( $143 \pm 25\%$ ,  $n = 7$ ,  $P < 0.05$ ). Кроме того, наблюдалось потенцирование и стационарного компонента. При значении  $pH = 4.5$  никакого эффекта не наблюдалось ( $106 \pm 12\%$ ,  $n = 6$ ,  $P > 0.05$ ) (Рис. 3.7).

Кроме амплитуды ответа, в одном из протоколов amitriptyline влиял и на его кинетику, замедляя её при совместной подаче с активирующим раствором ( $pH = 5.5$ , Рисунок 3.8). Amitriptyline замедлял скорость десенситизации ASIC1a/2a каналов примерно в полтора-два раза ( $170 \pm 26\%$ ,  $n = 4$ ,  $P < 0.05$ ). Влияния на кинетику при активирующих  $pH$  6.5 и 4.5 не обнаружено (данные не показаны).



**Рисунок 3.7.** Примеры потенцирующего эффекта amitriptyline на ASIC1a/2a каналы и суммарная диаграмма эффекта при различных активирующих  $pH$ .



**Рисунок 3.8.** Пример влияния амитриптилина на кинетику ответов ASIC1a/2a при значении активирующего pH 5.5.

#### 3.4. Сравнение действия амитриптилина на разные ASICs

Действие амитриптилина ранее было изучено на гомомерных ASIC1a, ASIC2a, и нативных каналах в интернейронах гиппокампа [Nikolaev и др., 2019]. При совместной его аппликации с активирующим раствором (300 мкМ, pH = 6.5) он оказывал небольшой ( $130 \pm 13\%$ ,  $n = 6$ ) потенцирующий эффект на рекомбинантные гомомерные ASIC1a. Наиболее активен амитриптилин был в другом протоколе, при подаче между и во время активирующих стимулов в условиях частичной десенситизации (pH внеклеточного раствора 7.1,  $550 \pm 84\%$ ,  $n = 6$ ), из чего предполагается, что амитриптилин связывается преимущественно с закрытыми и десенситизированными ASIC1a каналами. Ответы рекомбинантных гомомерных ASIC2a также потенцировались амитриптилином при совместной аппликации с кислым раствором (300 мкМ, pH = 5.45,  $157 \pm 27\%$ ,  $n = 8$ ), но наиболее выраженным эффект был в условиях сильной десенситизации при постоянном присутствии соединения (pH внеклеточного раствора 5.45,  $1309 \pm 321\%$ ,  $n = 7$ ). Кроме того, характерным действием амитриптилина на ASIC2a является сильное замедление ответов (в протоколах совместной аппликации и постоянного присутствия соединения). В обоих случаях амитриптилин вызывает сдвиг активации к более щелочным значениям pH и сдвиг кривой десенситизации к более кислым значениям pH. В наших экспериментах в сравнении с ASIC1a каналами потенцирующий эффект амитриптилина на гетеромеры ASIC1a/2a

оказался более выраженным при том же активирующем рН = 6.5, а при рН = 5.5 потенцирующий эффект был сравним с таковым, оказываемым на гомомеры ASIC2a. С другой стороны, действие амитриптилина на кинетику ответов было схоже и на ASIC2a гомомерах, и на ASIC1a/2a гетеромерах.

Интернейроны гиппокампа зоны CA1, как говорилось ранее, экспрессируют значительную популяцию гетеромеров ASIC1a/2a, и, таким образом, являются неплохой моделью для изучения свойств этих нативных каналов. Тем не менее, наша модель по характеристикам ответов немного отличалась. Так, при значении активирующего рН = 6.5 нативные ASICs генерировали  $22 \pm 6\%$  ( $n = 31$ ) от максимального ответа, в то время как рекомбинантные ASIC1a/2a только начинали активироваться при таком рН. Активирующий раствор, рН которого составлял 6.5, если подавался вместе с амитриптилином (300 мкМ), вызывал  $159 \pm 43$  ( $n=9$ ) потенциалы ответов, в то время как в наших экспериментах в тех же условиях мы получили  $200 \pm 56\%$  потенциалы ( $n = 10$ ,  $P < 0.05$ ). Интересно, что в таких условиях амитриптилин не оказывал воздействия на кинетику ответов нативных ASICs, влияя на неё только в случае, если каналы были предварительно десенситизированы ( $206 \pm 52\%$ ,  $n = 10$ , рН внеклеточного раствора 6.85). В наших экспериментах скорость спада ответа уменьшалась при взаимодействии вещества с открытыми каналами.

### 3.5. Действие гистамина на гетеромерные ASIC1a/2a каналы

Гистамин, являясь интересным кандидатом на роль модулятора гетеромеров ASIC1a/2a, при постоянном присутствии селективно потенцирует ASIC1a каналы [Nagaeva и др., 2016b]. Гистамин был исследован ввиду его структурного сходства с ИЭМ-2044, аналогом ИЭМ-1921, которые оба активны в отношении ASICs. Нами было изучено его воздействие на гетеромерные ASIC1a/2a каналы при постоянном его присутствии в различных условиях. Если гистамин присутствовал и в кондиционирующем (рН = 7.4), и в активирующем растворах, то он не оказывал эффекта ни при рН = 4.5, ни при рН = 5.75 ( $101 \pm 2\%$  и  $117 \pm 19\%$ , соответственно,  $n = 4$  в обоих случаях,  $P > 0.05$ ).

При исследовании действия гистамина на рекомбинантных гомомерных ASIC1a каналах [Nagaeva и др., 2016b] было установлено, что потенцирующий эффект сильно зависит от величины активирующего рН: он максимален при низком закислении –  $390 \pm 50\%$  (рН = 7.0,  $n = 7$ ), и незначителен при сильном закислении –  $114 \pm 13\%$  (рН = 5.0,  $n = 6$ ) в протоколе постоянного присутствия гистамина. Гистамин также обладал сильным

потенцирующим действием при его предъявлении совместно с активирующим раствором (рН = 6.5), и при предъявлении до подачи активирующего раствора [Barygin и др., 2017]. Интересным оказалось его действие на нативные ASICs в интернейронах гиппокампа: здесь он обладал небольшим ингибирующим действием, снижая амплитуду ответа на ~20% при подаче как совместно с активирующим раствором. Эксперименты на рекомбинантных гомомерных ASIC1a каналах с использованием разных значений фиксации потенциала позволили выяснить, что гистамин обладает двумя типами действия: потенцирующим, и ингибирующим. При этом на ASIC1a каналах сильное потенцирующее действие перекрывает более слабое ингибирующее, а при действии на нативные ASICs ингибирование выходит на первый план. Присутствие субъединицы ASIC2a в составе гетеромерного канала снимает потенцирующий эффект гистамина, но не ингибирующий, и таким образом, гистамин оказывает ингибирующее воздействие на протон-активируемые каналы в интернейронах гиппокампа. Этот эффект наблюдается только при действии на открытые каналы. Наши эксперименты не позволили выявить ингибирующего воздействия гистамина на рекомбинантные ASIC1a/2a каналы, несмотря на то, что они были активированы даже в большей степени, чем в описанном исследовании.

## Обсуждение

В данной работе было частично охарактеризовано действие двух веществ на гетеромерные протон-активируемые каналы ASIC1a/2a: amitriptilina – трициклического антидепрессанта, и гистамина – эндогенного амина, являющегося важным нейромедиатором в головном и спинном мозге. Оба этих вещества относятся к гидрофобным моноаминам, имея циклическую гидрофобную часть и протонируемую аминогруппу, удалённую от гидрофобной части молекулы. В лаборатории биофизики синаптических процессов уже несколько лет ведутся исследования, посвященные действию этого класса веществ на ASIC каналы, но все предыдущие исследования проводились либо на рекомбинантных гомомерных каналах, либо на нативных ASICs. Проведённый ранее структурно-функциональный анализ выявил, что вещества из класса гидрофобных моноаминов способны как ингибировать, так и потенцировать токи через нативные и рекомбинантные ASICs, а эффект соединения зависит от его пространственной структуры и субъединичного состава канала (см. раздел 1.5.4). Соответственно, эта работа стала логичным продолжением деятельности нашей лаборатории.

Ожидалось, что действие веществ на ASIC1a/2a будет схоже с таковым на интернейронах гиппокампа, так как несколько исследований говорят в пользу того, что протон-вызванные токи в этих клетках преимущественно опосредованы ASIC1a/2a гетеромерами [Nikolaev и др., 2019; Tikhonova и др., 2015; Weng, Lin, Lien, 2010; Wu и др., 2016]. Тем не менее, некоторые эффекты оказались схожи, а некоторые различны. Amitriptilin потенцировал как нативные, так и рекомбинантные ASIC1a/2a при небольшом закислении, но при умеренном закислении влиял ещё и на кинетику ответов, подобно его действию на ASIC2a каналах. Гистамин оказался неактивным в отношении рекомбинантных ASIC1a/2a, но ингибировал нативные каналы, хоть и в небольшой степени.

Изучение именно гетеромерных протон-активируемых каналов является довольно трудоёмкой задачей по нескольким причинам. Основная из них – сложность выделения популяции гетеромеров их всех представленных на мембране каналов. Другая сложность заключается в том, что в зависимости от количества субъединиц ASIC1a в составе гетеромера должны меняться его свойства, а с использованием электрофизиологических методов невозможно отделить одни варианты от других.

Разные группы исследователей решают этот вопрос по-разному. В исследовании 2016-ого года, например, две популяции гетеромеров ASIC1a/2a были отделены друг от друга и охарактеризованы отдельно [Joeres и др., 2016]. Субъединицы ASIC1a и ASIC2a были ковалентно сшиты между собой в разной последовательности: 1a-2a-1a и 1a-2a-2a. Как и ожидалось, их характеристики в некоторой степени различались, и 1a:2a:1a гетеромеры были более чувствительны к протонам. Предполагается также, что общая чувствительность протонов зависит не просто от чувствительности каждой из его субъединиц, но скорее от сложного взаимодействия между всеми тремя субъединицами. В другой работе при совместной экспрессии субъединиц ASIC1a и ASIC2a активация гомомеров ASIC2a избегалась ограничением активирующего pH (не ниже 5.7), а гомомеры ASIC1a либо полностью десенситизировались (кондиционирующий pH 7.0, почти не влияет на десенситизацию ASIC1a/2a), либо блокировались PcTx1 [Liu, Hagan, Schoellerman, 2018].

В данной работе мы отбирали необходимые варианты каналов оценивая функциональные параметрам ответов, и этот способ вполне применим для решения поставленных задач. Применение этого подхода позволило нам сопоставить действие amitriptилина и гистамина на разных ASIC каналах.

## Выводы

1. Характеристики рекомбинантных ASIC1a/2a, экспрессированных в клеточной линии CHO, отличаются от гомомерных ASIC1a и ASIC2a каналов и имеют сходство с нативными ASICs в интернейронах гиппокампа.
2. Удалось подобрать параметры для нескольких экспериментальных протоколов, с использованием которых возможно адекватно работать с гетеромерами ASIC1a/2a.
3. Амитриптилин оказывает значимый потенцирующий эффект на гетеромерные ASIC1a/2a при совместной его подаче с умеренно кислым раствором. Гистамин не оказывает воздействия на эти каналы в протоколах постоянного присутствия вещества ни при сильном, ни при умеренном закислении.
4. Амитриптилин, подобно его действию на ASIC2a гомомерах, замедляет кинетику спада ответов ASIC1a/2a гетеромеров, чего не наблюдается на нативных ASICs. Потенцирующий эффект в протоколе совместной аппликации со слабокислым активирующим раствором был более выражен, чем на гомомерных или нативных каналах. Гистамин не оказывал воздействия на активированные ASIC1a/2a каналы несмотря на то, что слегка ингибировал токи активированных нативных ASICs.

### Список использованной литературы

1. Baconguis I. и др. X-Ray Structure of Acid-Sensing Ion Channel 1–Snake Toxin Complex Reveals Open State of a Na<sup>+</sup>-Selective Channel // *Cell*. 2014. Т. 156. № 4. С. 717–729.
2. Chen X., Kalbacher H., Gründer S. Interaction of acid-sensing ion channel (ASIC) 1 with the tarantula toxin psalmotoxin 1 is state dependent. // *J. Gen. Physiol.* 2006. Т. 127. № 3. С. 267–76.
3. Alvarez de la Rosa D. и др. Functional implications of the localization and activity of acid-sensitive channels in rat peripheral nervous system // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002. Т. 99. № 4. С. 2326–2331.
4. Arias R.L. и др. Amiloride is neuroprotective in an MPTP model of Parkinson's disease // *Neurobiol. Dis.* 2008. Т. 31. № 3. С. 334–341.
5. Baron A. и др. Acid sensing ion channels in dorsal spinal cord neurons. // *J. Neurosci.* 2008. Т. 28. № 6. С. 1498–508.
6. Baron A. и др. Venom toxins in the exploration of molecular, physiological and pathophysiological functions of acid-sensing ion channels // *Toxicon*. 2013. Т. 75. С. 187–204.
7. Bartoi T. и др. Acid-sensing ion channel (ASIC) 1a/2a heteromers have a flexible 2:1/1:2 stoichiometry // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014. Т. 111. № 22. С. 8281–8286.
8. Barygin O.I. и др. Complex action of tyramine, tryptamine and histamine on native and recombinant ASICs // *Channels*. 2017. Т. 11. № 6. С. 648–659.
9. Bassilana F. и др. The acid-sensitive ionic channel subunit ASIC and the mammalian degenerin MDEG form a heteromultimeric H<sup>+</sup>-gated Na<sup>+</sup> channel with novel properties. // *J. Biol. Chem.* 1997. Т. 272. № 46. С. 28819–22.
10. Benson C.J. и др. Heteromultimers of DEG/ENaC subunits form H<sup>+</sup>-gated channels in mouse sensory neurons. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. Т. 99. № 4. С. 2338–43.
11. Bohlen C.J. и др. A heteromeric Texas coral snake toxin targets acid-sensing ion channels to produce pain // *Nature*. 2011. Т. 479. № 7373. С. 410–414.
12. Canessa C.M., Merillat A.M., Rossier B.C. Membrane topology of the epithelial sodium channel in intact cells. // *Am. J. Physiol.* 1994. Т. 267. № 6 Pt 1. С. C1682-90.
13. Coryell M.W. и др. Targeting ASIC1a Reduces Innate Fear and Alters Neuronal Activity in the Fear Circuit // *Biol. Psychiatry*. 2007. Т. 62. № 10. С. 1140–1148.
14. Delaunay A. и др. Human ASIC3 channel dynamically adapts its activity to sense the

- extracellular pH in both acidic and alkaline directions // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. T. 109. № 32. С. 13124–13129.
15. Deval E. и др. ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain // *EMBO J.* 2008. T. 27. № 22. С. 3047–3055.
16. Dorofeeva N.A. и др. Mechanisms of non-steroid anti-inflammatory drugs action on ASICs expressed in hippocampal interneurons // *J. Neurochem.* 2008. T. 106. № 1. С. 429–441.
17. Du J. и др. Protons are a neurotransmitter that regulates synaptic plasticity in the lateral amygdala. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2014. T. 111. № 24. С. 8961–6.
18. Escoubas P. и др. Isolation of a tarantula toxin specific for a class of proton-gated Na<sup>+</sup> channels. // *J. Biol. Chem.* 2000. T. 275. № 33. С. 25116–21.
19. Gamper N., Stockand J.D., Shapiro M.S. The use of Chinese hamster ovary (CHO) cells in the study of ion channels // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 2005. T. 51. № 3. С. 177–185.
20. Gao J. и др. Properties of the proton-evoked currents and their modulation by Ca<sup>2+</sup> and Zn<sup>2+</sup> in the acutely dissociated hippocampus CA1 neurons // *Brain Res.* 2004. T. 1017. № 1–2. С. 197–207.
21. Gonzales E.B., Kawate T., Gouaux E. Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors // *Nature.* 2009. T. 460. № 7255. С. 599–604.
22. Gründer S., Pusch M. Biophysical properties of acid-sensing ion channels (ASICs) // *Neuropharmacology.* 2015. T. 94. С. 9–18.
23. Hesselager M., Timmermann D.B., Ahring P.K. pH Dependency and desensitization kinetics of heterologously expressed combinations of acid-sensing ion channel subunits. // *J. Biol. Chem.* 2004. T. 279. № 12. С. 11006–15.
24. Jasti J. и др. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 Å resolution and low pH // *Nature.* 2007. T. 449. № 7160. С. 316–323.
25. Joeres N. и др. Functional and pharmacological characterization of two different ASIC1a/2a heteromers reveals their sensitivity to the spider toxin PcTx1 // *Sci. Rep.* 2016. T. 6. № 1. С. 27647.
26. Kellenberger S., Schild L. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCI. structure, function, and pharmacology of acid-sensing ion channels and the epithelial Na<sup>+</sup> channel. // *Pharmacol. Rev.* 2015. T. 67. № 1. С. 1–35.
27. Kleyman T.R., Cragoe E.J. The mechanism of action of amiloride. // *Semin. Nephrol.* 1988. T. 8. № 3. С. 242–8.

28. Kreple C.J. и др. Acid-sensing ion channels contribute to synaptic transmission and inhibit cocaine-evoked plasticity // *Nat. Neurosci.* 2014. Т. 17. № 8. С. 1083–1091.
29. Krishtal O.A., Pidoplichko V.I. A receptor for protons in the nerve cell membrane // *Neuroscience.* 1980. Т. 5. № 12. С. 2325–2327.
30. la Rosa D.A. de и др. Distribution, subcellular localization and ontogeny of ASIC1 in the mammalian central nervous system // *J. Physiol.* 2003. Т. 546. № 1. С. 77–87.
31. Leng T. и др. Subunit and Frequency-Dependent Inhibition of Acid Sensing Ion Channels by Local Anesthetic Tetracaine // *Mol. Pain.* 2013. Т. 9. № 1. С. 1744-8069-9–27.
32. Li M. и др. Acid-Sensing Ion Channels in Acidosis-Induced Injury of Human Brain Neurons // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2010a. Т. 30. № 6. С. 1247–1260.
33. Li M. и др. Developmental change in the electrophysiological and pharmacological properties of acid-sensing ion channels in CNS neurons. // *J. Physiol.* 2010b. Т. 588. № Pt 20. С. 3883–900.
34. Li W.-G. и др. ASIC3 Channels Integrate Agmatine and Multiple Inflammatory Signals through the Nonproton Ligand Sensing Domain // *Mol. Pain.* 2010c. Т. 6. № 1. С. 1744-8069-6–88.
35. Li W.-G. и др. Nonproton ligand sensing domain is required for paradoxical stimulation of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) channels by amiloride. // *J. Biol. Chem.* 2011. Т. 286. № 49. С. 42635–46.
36. Lin J. и др. Inhibition of acid sensing ion channel currents by lidocaine in cultured mouse cortical neurons. // *Anesth. Analg.* 2011. Т. 112. № 4. С. 977–81.
37. Liu and Y., Edwards R.H. THE ROLE OF VESICULAR TRANSPORT PROTEINS IN SYNAPTIC TRANSMISSION AND NEURAL DEGENERATION // *Annu. Rev. Neurosci.* 1997. Т. 20. № 1. С. 125–156.
38. Liu Y., Hagan R., Schoellerman J. Dual actions of Psalmotoxin at ASIC1a and ASIC2a heteromeric channels (ASIC1a/2a) // *Sci. Rep.* 2018. Т. 8. № 1. С. 7179.
39. Magnotta V.A. и др. Detecting activity-evoked pH changes in human brain // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2012. Т. 109. № 21. С. 8270–8273.
40. Nagaeva E.I. и др. Determinants of action of hydrophobic amines on ASIC1a and ASIC2a // *Eur. J. Pharmacol.* 2016a. Т. 788. С. 75–83.
41. Nagaeva E.I. и др. Histamine selectively potentiates acid-sensing ion channel 1a // *Neurosci. Lett.* 2016b. Т. 632. С. 136–140.

42. Nedergaard M. и др. Dynamics of interstitial and intracellular pH in evolving brain infarct. // *Am. J. Physiol.* 1991. Т. 260. № 3 Pt 2. С. R581-8.
43. Nikolaev M. V. и др. Modulation of Proton-Gated Channels by Antidepressants // *ACS Chem. Neurosci.* 2019. Т. 10. № 3. С. 1636–1648.
44. Palmer M.J. и др. Synaptic cleft acidification and modulation of short-term depression by exocytosed protons in retinal bipolar cells. // *J. Neurosci.* 2003. Т. 23. № 36. С. 11332–41.
45. Samways D.S.K., Harkins A.B., Egan T.M. Native and recombinant ASIC1a receptors conduct negligible Ca<sup>2+</sup> entry // *Cell Calcium.* 2009. Т. 45. № 4. С. 319–325.
46. Sherwood T.W. и др. Heteromeric acid-sensing ion channels (ASICs) composed of ASIC2b and ASIC1a display novel channel properties and contribute to acidosis-induced neuronal death. // *J. Neurosci.* 2011. Т. 31. № 26. С. 9723–34.
47. Sherwood T.W., Askwith C.C. Endogenous arginine-phenylalanine-amide-related peptides alter steady-state desensitization of ASIC1a. // *J. Biol. Chem.* 2008. Т. 283. № 4. С. 1818–30.
48. Sherwood T.W., Askwith C.C. Dynorphin Opioid Peptides Enhance Acid-Sensing Ion Channel 1a Activity and Acidosis-Induced Neuronal Death // *J. Neurosci.* 2009. Т. 29. № 45. С. 14371–14380.
49. Siesjö B.K. и др. *Molecular Mechanisms of Acidosis-Mediated Damage // Mechanisms of Secondary Brain Damage in Cerebral Ischemia and Trauma.* Vienna: Springer Vienna, 1996. С. 8–14.
50. Sutherland S.P., Cook S.P., McCleskey E.W. Chemical mediators of pain due to tissue damage and ischemia // *Prog. Brain Res.* 2000. Т. 129. С. 21–38.
51. Tikhonova T.B. и др. Monoamine NMDA receptor channel blockers inhibit and potentiate native and recombinant proton-gated ion channels // *Neuropharmacology.* 2015. Т. 89. С. 1–10.
52. Traynelis S.F., Cull-Candy S.G. Proton inhibition of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar neurons // *Nature.* 1990. Т. 345. № 6273. С. 347–350.
53. Voilley N. и др. Nonsteroid anti-inflammatory drugs inhibit both the activity and the inflammation-induced expression of acid-sensing ion channels in nociceptors. // *J. Neurosci.* 2001. Т. 21. № 20. С. 8026–33.
54. Waldmann R. и др. A proton-gated cation channel involved in acid-sensing // *Nature.* 1997. Т. 386. № 6621. С. 173–177.
55. Wemmie J.A. и др. The Acid-Activated Ion Channel ASIC Contributes to Synaptic Plasticity, Learning, and Memory // *Neuron.* 2002. Т. 34. № 3. С. 463–477.

56. Wemmie J.A. и др. Acid-sensing ion channel 1 is localized in brain regions with high synaptic density and contributes to fear conditioning. // *J. Neurosci.* 2003. Т. 23. № 13. С. 5496–502.
57. Wemmie J.A., Price M.P., Welsh M.J. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities // *Trends Neurosci.* 2006. Т. 29. № 10. С. 578–586.
58. Wemmie J.A., Taugher R.J., Kreple C.J. Acid-sensing ion channels in pain and disease // *Nat. Rev. Neurosci.* 2013. Т. 14. № 7. С. 461–471.
59. Weng J.-Y., Lin Y.-C., Lien C.-C. Cell type-specific expression of acid-sensing ion channels in hippocampal interneurons. // *J. Neurosci.* 2010. Т. 30. № 19. С. 6548–58.
60. Wong H.K. и др. Blocking acid-sensing ion channel 1 alleviates Huntington’s disease pathology via an ubiquitin-proteasome system-dependent mechanism // *Hum. Mol. Genet.* 2008. Т. 17. № 20. С. 3223–3235.
61. Wu J. и др. ASIC subunit ratio and differential surface trafficking in the brain // *Mol. Brain.* 2016. Т. 9. № 1. С. 4.
62. Wu P.-Y. и др. Acid-sensing ion channel-1a is not required for normal hippocampal LTP and spatial memory. // *J. Neurosci.* 2013. Т. 33. № 5. С. 1828–32.
63. Yu Y. и др. A Nonproton Ligand Sensor in the Acid-Sensing Ion Channel // *Neuron.* 2010. Т. 68. № 1. С. 61–72.
64. Zha X. и др. ASIC2 subunits target acid-sensing ion channels to the synapse via an association with PSD-95. // *J. Neurosci.* 2009. Т. 29. № 26. С. 8438–46.