



Здоров'я нації - добробут держави

ф раціональна армакоТерапія

научно-практический журнал для врачей

1 (14) 2010

Тема номера:

Актуальные вопросы фармакотерапии в неврологии

Молекулярные механизмы
модуляции кальциевых каналов
Т-типа липоевой кислотой при
проведении болевого импульса

Молекулярные механизмы модуляции кальциевых каналов Т-типа липоевой кислотой при проведении болевого импульса

По материалам W.Y. Lee, P. Orestes, J. Latham, A.K. Naik, M.T. Nelson, I. Vitko, E. Perez-Reyes, V. Jevtovic-Todorovic, S.M. Todorovic
«Molecular mechanisms of lipoic acid modulation of T-type calcium channels in pain pathway»
(The Journal of Neuroscience 2009; 29 (30): 9500-9509)

Частота случаев острой и хронической боли, требующей терапевтического вмешательства, составляет около 10% среди жителей США; приблизительно 30% нетрудоспособных лиц страдают хронической болью. Доступные сегодня анальгезирующие лекарственные препараты имеют ограниченную эффективность или приводят к серьезным побочным реакциям. Вместе с тем неврологические аспекты механизма боли и молекулярные мишени фармакотерапии изучены недостаточно.

α -Липоевая кислота (ЛК) (тиоктовая кислота, окисленная форма) и дигидролипоевая кислота (дигидротиоктовая кислота, восстановленная форма) являются эндогенными жирорастворимыми серосодержащими митохондриальными факторами, представленными во всех клетках организма, включая нейроны. ЛК и дигидролипоевая кислота играют важную роль в реакциях цикла трикарбоновых кислот, процессах энергетического метаболизма. Кроме того, они функционируют как акцепторы («уборщики», или сквенджер) свободных радикалов, а также участвуют в редокс-реакциях, модулирующих сульфгидрильные (тиоловые) группы различных белков.

Результаты исследований последних лет продемонстрировали, что ЛК является эффективным анальгезирующим средством при ее применении у людей и различных животных. При этом молекулярные механизмы наблюдаемого обезболивающего эффекта мало изучены.

Биофизические свойства кальциевых каналов Т-типа были впервые описаны в чувствительных нейронах еще в 1984 г., однако их функция в ноцицепции была установлена недавно. Согласно молекулярным и генетическим исследованиям, кальциевые каналы Т-типа в ноцицепторах ганглиев задних корешков (ГЗК) выступают усилителями сигнала как острой, так и хронической боли, возможно, благодаря их сильному воздействию на возбудимость этих клеток. Однако точные молекулярные механизмы, регулирующие функционирование этих каналов при возникновении боли, остаются мало ясны. Известно, что функционирование кальциевых каналов Т-типа в нейронах ГЗК *in vitro* и *in vivo* поддается модулированию разнообразными редокс-агентами.

Цель исследования группы авторов под руководством S.M. Todorovic (W.Y. Lee et al., отделение анестезиологии и проблем боли, Университет InJe, больница SanggyePaik, Сеул, Южная Корея; отделения анестезиологии, нейронаук (в т.ч. исследования в рамках программы для выпускников),

фармакологии, медицинский факультет Университета Вирджинии, Шарлотесвилль, США) заключалась в изучении следующей гипотезы: ЛК может модулировать ток в кальциевых каналах Т-типа в изолированных клетках ГЗК, а анальгезирующие свойства ЛК *in vivo* связаны с такой модуляцией.

Моделью для исследования *in vitro* послужили изолированные (диссоциированные) нейроны ГЗК взрослых крыс. Для создания рекомбинатных $Ca_v3.2$ -каналов (с мутациями по тем или иным аминокислотным остаткам) были использованы эмбриональные клетки почки человека линии 293. Электрофизиологические исследования проводились с применением соответствующих оборудования и растворов для фиксации потенциала. Для исследований *in vivo* были взяты мыши $Ca_v3.2$ $-/-$ (с супрессированными генами белков $Ca_v3.2$ -канала) и мыши дикого типа в качестве контроля. У мышей определяли чувствительность к механическим и термическим стимулам. Для изучения влияния ЛК мышам проводили внутривенные инъекции препарата (1-2 мкг) в правую заднюю лапу. Полученные результаты поддавались статистической обработке.

Основной результат исследования W. Y. Lee et al. заключается в том, что ЛК ингибирует ток в нативных и рекомбинантных кальциевых каналах Т-типа путем окисления специфических сульфгидрильных остатков на внеклеточном участке канала. Ингибирование $Ca_v3.2$ канала и последующее снижение возбудимости ноцицептивных клеток ГЗК под влиянием ЛК может объяснить доказанные *in vivo* свойства упомянутой молекулы. В пользу этого утверждения свидетельствуют данные, согласно которым инъекции ЛК в подошву лап мышей приводили к выраженному снижению ответа на термические и механические стимулы у особей дикого типа, в то время как у мышей с инaktivированными генами $Ca_v3.2$ не оказывали какого-либо эффекта. Таким образом, авторы идентифицировали новый регуляторный сайт на кальциевых каналах Т-типа в периферических чувствительных нейронах, что может помочь в развитии фармакологических стратегий лечения боли.

ЛК – убиквитарная молекула, являющаяся митохондриальным кофактором, который может проявлять свойства как антиоксиданта, так и прооксиданта, а также действовать как хелатор переходных металлов. В предыдущих работах

группа исследователей под руководством S.M. Todorovic идентифицировали уникальный остаток гистидина (H191) домена I Ca_v3.2-канала. Этот остаток формирует молекулярную основу для специфической по субтипу редокс-модуляции кальциевого канала T-типа L-цистеином. Помимо этого было показано, что L-цистеин увеличивает амплитуду тока в T-каналах клеток ГЗК и усиливает возбудимость нейронов *in vitro*, а также индуцирует температурную гиперчувствительность *in vivo* путем хелатирования таких ионов металлов, как Zn²⁺. Кроме того, гистидиновый остаток H191 Ca_v3.2-канала может подвергнуться катализируемому металлами окислению аскорбатом в присутствии таких металлических микроэлементов, как Cu²⁺, что, в свою очередь, приводит к снижению амплитуды тока в кальциевых каналах T-типа и возбудимости нейронов. Авторы W.Y. Lee et al. продемонстрировали, что еще одна **эндогенная редокс-реактивная составляющая – ЛК – обладает не только выраженным ингибирующим эффектом на ток в кальциевых каналах T-типа *in vitro*, но и, что важно, значительно снижает чувствительность к вредным термическим и механическим стимулам *in vivo*. Однако в отличие от L-цистеина и аскорбиновой кислоты ЛК одинаково влияет на токи в Ca_v3.1 и Ca_v3.2 – это свидетельствует о том, что H191 не является необходимым для ингибирования тока в кальциевых каналах T-типа липоевой кислотой. Основные эффекты ЛК на ток в кальциевых каналах T-типа реализуются через окисление специфических внеклеточных сульфгидрильных групп в доменах I и II каналов.** Упомянутое окисление может приводить к конформационным изменениям структуры каналов, что, в свою очередь, может ингибировать открытие канала и в результате уменьшать интенсивность входа ионов в клетку, снижать возбудимость ноцицепторов и передачу болевого импульса. Интересен тот факт, что **ЛК только частично, до 40%, ингибирует ток в кальциевых каналах T-типа.** Возможно, что полная блокировка доменов I и II под влиянием ЛК отображается как частичная блокировка всего канала. В предыдущих исследованиях было показано способность некоторых других веществ (аскорбиновая кислота, 5 α -восстановленные нейроактивные стероиды, α -метил- α -фенил-сукцинимид, закись азота) частично ингибировать ток в нейронах ГЗК. Несмотря на неизученность точного механизма такой частичной блокады тока в T-каналах клеток ГЗК при влиянии какого-либо компонента, результаты упомянутых исследований свидетельствуют в пользу того, что **даже частичное ингибирование тока в кальциевых каналах T-типа нейронов ГЗК является достаточным для снижения клеточной возбудимости.**

В работе W.Y. Lee et al. также представлен ряд результатов, согласно которым **ЛК реализует свою функцию посредством окисления внеклеточных цистеинов на нативных и рекомбинантных кальциевых каналах T-типа.** Во-первых, эффект ЛК на ток в нативных каналах клеток ГЗК уменьшается под воздействием тиол-специфического алкилирующего агента N-этилмалеимида (NEM). Во-вторых, влияние ЛК на ток в кальциевых каналах T-типа нейронов ГЗК не нарушалось при внутриклеточном внедрении таких сильных непроницающих через мембрану веществ, как DTNB (5,5'-дителиобис-2-нитробензойная кислота) и MTSET (метантиосульфонат-этилтриметиламмоний), которые в определенных экспериментальных условиях имитируют эффекты ЛК. В-третьих, сайт-направленная мутация в 4 критическом цистеиновом остатке рекомбинантного Ca_v3.2-канала полностью устраняла ингибирующий эффект ЛК на ток в кальциевых

каналах T-типа. Следует подчеркнуть, что эта мутация не нарушает способность ингибировать ток других блокаторов T-каналов: изофлурана, а также молекул, взаимодействующих с критичным гистидиновым остатком (H191) Ca_v3.2 – дитиотрентола (ДТТ) и Zn²⁺. Эти результаты говорят в пользу того, что **мутации в критическом цистеиновом остатке не влияют на действие ЛК путем изменения функции открытия/закрытия каналов.** Небольшая потенциация тока ЛК, наблюдаемая в рекомбинантных кальциевых каналах, скорее всего является следствием хелатирования металлических микроэлементов, которые вызывают тоническое ингибирование Ca_v3.2. Это подтверждается предположением, что ЛК является хелатором ионов металлов, а также установленном в представленном исследовании фактом, что **ЛК ускоряет макроскопическую кинетику тока в Ca_v3-каналах с мутациями в 4 цистеиновом остатке.** Аналогичные данные были получены и для других хелатирующих веществ при изучении их влияния на ток в рекомбинантных и нативных Ca_v3.2-каналах нейронов ГЗК.

Интересен тот факт, что **мутации в цистеиновых остатках только частично ингибировали влияние DTNB – традиционного агента, окисляющего сульфгидрильные группы.** Это свидетельствует о том, что DTNB и ЛК несколько отличаются по молекулярному механизму ингибирования кальциевых каналов T-типа. DTNB более полно ингибирует ток в рекомбинантных и нативных T-каналах и индуцирует потенциалозависимую модуляцию инактивации канала. В отличие от DTNB, что **ЛК только частично ингибирует кальциевые каналы T-типа, оказывая при этом минимальный эффект на потенциалозависимую инактивацию, но значительно влияя на механизм открытия/закрытия каналов.** С целью выявления в T-каналах других критических цистеиновых остатков, модулирующихся различными агентами, окисляющими сульфгидрильные группы, необходимы дальнейшие исследования.

В описываемой работе отмечено, что **ингибирующий эффект ЛК на ток в кальциевых каналах T-типа нейронов ГЗК обычно спонтанно обратим при кратковременном применении препарата.** Кроме того, **показано, что влияние ЛК на периферическое рецептивное поле сенсорных нейронов *in vivo* приводит к временному снижению температурной чувствительности.** Поскольку окисление сульфгидрильных групп происходит с участием относительно стабильных дисульфидных связей, обратимость эффекта убедительно говорит о том, что с кальциевыми каналами T-типа может быть ассоциирован неизвестный восстанавливающий фактор. Однако на данный момент предполагаемого протеина, ассоциированного с субъединицей α , которая формирует пору канала, не выявлено.

В исследованиях других авторов также сообщалось об обратимой модификации сульфгидрильных групп прочих белков при влиянии ЛК. Предполагают, что такие обратимые редокс-реакции являются основой гомеостатических или физиологических реакций организма на стресс, в то время как необратимые редокс-модификации цистеина могут в конечном счете приводить к хроническому повреждению ткани. Таким образом, кажется маловероятным, что индуцированная ЛК модуляция кальциевых каналов T-типа в периферических ноцицепторах может оказывать повреждающее действие на ткань. Хорошо известно, что T-каналы экспрессированы во многих участках нервной ткани, а молекулы критических остатков цистеина, которые

могут окисляться ЛК, являются высоко консервативными последовательностями во всех изоформах у разных видов. Поэтому возможно ли, что ингибирование ЛК кальциевых каналов Т-типа в ЦНС играет роль в центральной модуляции передачи болевого импульса и других физиологических функций? Ответ, очевидно, будет основываться на том, что пиковая концентрация ЛК в плазме после системного применения у людей колеблется в диапазоне 5-50 мкмоль и, как показано в исследовании W.Y. Lee et al., в таких концентрациях ЛК ингибирует приблизительно на 25-35% ток в кальциевых каналах Т-типа нейронов ГЗК. Помимо этого, имеется достаточно данных, согласно которым применение ЛК при лечении боли является безопасным подходом. Использование ЛК в терапевтических концентрациях ассоциируется с развитием малого количества побочных реакций по сравнению с другими обезболивающими средствами.

По данным проведенных ранее исследований *in vitro* ЛК в миллимолярных концентрациях может модулировать ток в NMDA-каналах (рецепторах, селективно связывающих N-метил-D-аспартат) культивированных нейронов коры головного мозга. Кажется маловероятным, что упомянутый эффект имеет отношение к описанному выше влиянию ЛК *in vivo* на восприятия боли, поскольку NMDA-каналы в физиологических условиях не вносят значительного вклада в периферическую ноцицепцию. Однако возможно, что купирование нейропатической боли происходит вследствие ингибирующего эффекта ЛК как на ток в NMDA-каналах в ЦНС, так и на ток в Т-каналах нейронов ГЗК. Согласно полученным W.Y. Lee et al. данным, ЛК существенно угнетала рефлекс отдергивания лапы (хотя эффект и был временным) в ответ на вредные термические и механические стимулы — тест, по которому обычно определяют анальгезирующий эффект периферического генеза. У людей более продолжительное обезболивающее влияние можно достичь при использовании препаратов замедленного высвобождения в виде кремов — такой подход может эффективно применяться в лечении состояний, сопровождающихся термической гипералгезией (например, солнечные ожоги). Более периферические ноцицепторы являются полимодальными, и у мышей с супрессированными генами белков $Ca_v3.2$ -канала заметно снижалась интенсивность ответа на резкие термические, механические и химические (формалин, капсаицин) стимулы. Кроме того, периферические кальциевые каналы Т-типа вовлечены в явление хронической нейропатической боли при таких патологиях, как механическое повреждение нерва или диабетическая нейропатия. Соответственно, местное применение ЛК и подобных эндогенных окисляющих агентов, которые влияют на $Ca_v3.2$ -каналы в периферических ноцицепторах, может снижать периферическую повышенную чувствительность, приводящую к развитию хронической нейропатической боли.

Таким образом, результаты исследования W.Y. Lee et al. уточняют редокс-механизмы посттрансляционной модификации кальциевых каналов Т-типа, имеющей важную роль в подавлении периферических болевых сигналов. Влияние на редокс-состояние периферических ноцицепторов с помощью таких естественных для организма субстанций, как липоевая кислота, может быть использовано для развития новых подходов к лечению боли.

Реферативный обзор подготовила Наталья Ткаченко



www.esparma.com.ua

α-Липоева кислота
еспа-ліпон
 ЖИТИ. ВІДЧУВАТИ. МРІЯТИ. ЛІТАТИ.

Найкращий вибір
 для лікування нейропатій
 різного генезу:

- діабетичної
- алкогольної
- токсичної





еспа-ліпон ін'єкц. 600
 Для лікування полінейропатій різного генезу
 Діючі речовини: альфа-ліпоева кислота

Мікрий розчин для в/в ін'єкцій після попереднього розведення ізотонічним розчином хлориду натрію

Зберігати в захищеному місці

- Нейропротектор
- Антиоксидант
- Зменшує больові відчуття
- Забезпечує нервові клітини енергією