

УДК.539.193:615.78

Т.Б.Тихонова (6 курс, каф. ЭФ), Н.А.Дорофеева, к.б.н., н.с. ИЭФБ им. И.М.Сеченова

ОСОБЕННОСТИ БЛОКАДЫ ПОДТИПОВ ГЛУТАМАТНЫХ ИОНОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ОРГАНИЧЕСКИМИ КАТИОНАМИ

Глутамат является самым представительным медиатором центральной нервной системы позвоночных. Глутаматные ионотропные рецепторы подразделяются на три основных подтипа: НМДА, АМПА и каинатные. Избыточная активация различных типов глутаматных рецепторов играет существенную роль при таких заболеваниях, как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, а также в судорожных состояниях. Ранее было показано, что соединение ИЭМ-1925 (дикатионное производное фенилциклогексила $\text{PhCh-N}^+\text{H}_2\text{-(CH}_2\text{)}_5\text{-N}^+\text{H}_3$) является эффективным антиконвульсантом при НМДА и каинатных судорогах у мышей [1]. В связи с этим представляется интересным исследование механизма действия ИЭМ-1925 на различные подтипы глутаматных рецепторов.

По современным представлениям, НМДА и АМПА подтипы глутаматных ионотропных рецепторов считаются очень близкими по строению каналами. Известно, что ИЭМ-1925 является блокатором открытого канала с признаками существования комплекса блокатор-канал после перехода канала в закрытое состояние (феномен “ловушки”). Этот эффект наблюдается как в случае НМДА [2,3], так и в случае АМПА-рецепторов [2,4]. ИЭМ-1925 является удобным инструментом для сравнения механизмов блокады этих рецепторов, так как он способен блокировать оба подтипа каналов в близких концентрациях, и кинетика взаимодействия этого соединения на этих двух каналах также отличается не сильно. Задачей данной работы был подробный анализ механизма взаимодействия ИЭМ-1925 с ионными каналами АМПА- и НМДА-рецепторов.

Молодых крыс (10-15 дней) декапитировали, выделяли срезы мозга и инкубировали в специальной среде. Клетки, экспрессирующие определенный вид глутаматных рецепторов, выделяли методом вибродиссоциации. Для исследования АМПА-каналов выбирались интернейроны стриатума, для исследования НМДА-каналов – пирамидные нейроны гиппокампа. Рецепторы активировали аппликацией соответствующих агонистов глутамата: НМДА-рецепторы – НМДА (30 мкМ) в присутствии глицина (10 мкМ); АМПА-рецепторы – каинатом (100 мкМ). Регистрация трансмембранных токов проводилась с помощью метода локальной фиксации потенциала в конфигурации “целая клетка”.

Потенциалозависимость блокады определялась путем построения кривых концентрация-действие при потенциалах -40 мВ и -80 мВ. Также анализировалась кинетика отмыва блокатора в присутствии и отсутствие агониста. Кинетика отмыва в присутствии агониста аппроксимировалась двухэкспоненциальной функцией. Сравнивались постоянные времени скоростей быстрых компонент. Отмыв в отсутствие агониста, характеризующий эффект «ловушки», измерялся при двух временных интервалах: 25 с. и 2.5 мин. Результаты измерений приведены в таблице. Все величины представлены как среднее \pm стандартное отклонение по результатам как минимум 5-и экспериментов.

Параметр	АМПА-канал	НМДА-канал
Постоянная времени отмыва (-80мВ)	1.1 ±0.3 с	0.5±0.2 с
IC ₅₀ (-80 мВ)	1.4±0.6 мкМ	1.2±0.8 мкМ
IC ₅₀ (-40 мВ)	4.4±1.6 мкМ	10.8±3 мкМ
Отмыв в отсутствие агониста		
25 с.	26±9%	45±6 %
2.5 мин.	69±5%	51±8%

Значения IC₅₀ при стандартном потенциале (-80мВ) для АМПА- и НМДА-каналов практически одинаковы, однако зависимость этой величины от потенциала значительно отличается, что говорит о различиях взаимодействия блокатора с разными подтипами каналов. Существенные отличия выявляются и при исследовании “ловушки”. ИЭМ-1925 способен оставаться в канале в отсутствие агониста как в случае НМДА, так и в случае АМПА подтипов глутаматных рецепторов, поскольку скорость отмыва в отсутствие агониста гораздо ниже скорости отмыва в присутствии агониста. Отмыв в отсутствие агониста при малых временных интервалах меньше в АМПА-каналах, чем в НМДА-каналах, что свидетельствует о большей степени «ловушки» в АМПА подтипе рецепторов. При больших временах наблюдается обратная картина. С течением времени из закрытых АМПА-каналов происходит постепенное вымывание блокатора, в то время как вымывания из закрытых НМДА-каналов практически не наблюдается.

Молекулярная природа обнаруженных различий требует дополнительного исследования, которое проводится в настоящее время.

Выводы:

1. Механизм взаимодействия блокатора открытого канала ИЭМ-1925 с НМДА и АМПА подтипами глутаматных ионотропных рецепторов не является идентичным.

2. Выявленные особенности механизма блокады могут определять действие препарата в экспериментальных моделях судорожных состояний.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Лукомская, Н.Я., Рукояткина, Н.И., Горбунова, Л.В., Гмиро, В.Е., Большаков, К.В., Магазаник, Л.Г. Сопоставление противосудорожной активности органических моно- и дикатионов с их способностью ингибировать NMDA и AMPA глутаматные рецепторы. *Росс. Физиол. Ж.* 88(9), 2002, 1161-1171.
2. Bolshakov, K.V., Tikhonov, D.B., Gmiro, V.E., Magazanik, L.G. Different arrangement of hydrophobic and nucleophilic components of channel binding sites in NMDA and AMPA receptor is revealed by channel blockade. *Neuroscience Letters* 291(2), 2000, 101-104.
3. Bolshakov, K.V., Gmiro, V.E., Tikhonov, D.B., Magazanik, L.G. Determinants of trapping block of N-methyl-d-aspartate receptor channels. *J Neurochem.* 87(1), 2003, 56-65.
4. Tikhonov, D.B., Samoilova, M.V., Buldakova, S.L., Gmiro, V.E., Magazanik, L.G. Voltage dependent block of native AMPA receptor channels by dicationic compounds. *Br. J. Pharmacol.* 129, 2000, 265-274.