

УДК 612.822

М.В.Николаев (4 курс, каф. ФХОМ), К.Х.Ким, к.б.н (лаб. синаптических процессов,
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. Сеченова РАН)

ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ БЛОКАДЫ ГЛУТАМАТНЫХ ИОНОТРОПНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Глутамат является самым представительным (по числу синапсов, в которых он задействован) возбуждающим медиатором в центральной нервной системе позвоночных и беспозвоночных животных. Быстрый компонент возбуждающих постсинаптических токов опосредуется путем активации глутаматных постсинаптических рецепторов ионотропного типа, т.е. рецепторов, представляющих собой лиганд-управляемые ионные каналы. Взаимодействие глутамата с узнающим участком на внеклеточной стороне рецептора переводит канал на короткое время в открытое состояние, что лежит в основе генерации возбуждающего постсинаптического потенциала.

Как правило, рецепторы гетеромерны, т.е. представляют собой комбинации разных субъединиц, что создает многообразие подтипов и определяет их физиологические и фармакологические характеристики. В пределах типа характеристики узнающего участка варьируются сравнительно мало, а различия между подтипами проявляются главным образом в особенностях ионных каналов. Эти различия могут иметь важное функциональное значение.

Блокаторы с известной трехмерной структурой могут быть использованы для выявления некоторых топологических особенностей блокируемых ими рецепторов. В качестве таких блокаторов могут быть использованы гомологичные ряды соединений, имеющих относительно простую, но в то же время жесткую структуру.

Задачей настоящей работы было сравнение блокирующей активности и избирательности каналоблокаторов фенилциклогексильного ряда на AMPA и NMDA рецепторах.

Метод фиксации потенциала является адекватной методикой для выполнения поставленной задачи. Он позволяет поддерживать мембранный потенциал на определенном уровне и регистрировать трансмембранный ток. Как правило, интерес представляет не величина тока, а мембранная проводимость, поскольку она напрямую связана с активностью ионных каналов. Но в связи с тем, что прямого способа измерения проводимости не существует, в экспериментах измеряют величину тока. При постоянном потенциале емкостная составляющая трансмембранного тока равна нулю, поэтому весь ток, проходящий через мембрану, переносится через ионные каналы. Апплицируя растворы агонистов глутаматных рецепторов и поддерживая потенциал на заданном уровне, мы получаем возможность регистрировать токи через каналы ионотропных рецепторов и исследовать влияние на них каналоблокаторов.

Исследования проводились на крысах линии Вистар (возраст 10-20 дней). После декапитирования, мозг быстро извлекается и погружается в охлажденный раствор (2-4° С) следующего состава (в мМ):

NaCl 124, KCl 5, CaCl₂ 1.3, MgCl₂ 2.0, NaHCO₃ 26, NaH₂PO₄ 1.24, D-глюкоза 10.

Раствор предварительно аэрировался карбогеном (95 % O₂, 5 % CO₂) и имел pH 7.4-7.5. С помощью вибротома (Campden Instruments) приготавливались поперечные срезы

гиппокампа и стриатума толщиной около 250 мкм. Приготовленные срезы переносились в раствор того же состава и инкубировались при температуре 24-26 °С при постоянной аэрации карбогеном.

Поскольку после приготовления срезов наступает депрессия синаптической передачи, дальнейшие манипуляции с препаратами проводились спустя не менее 2 часов с момента их приготовления. Нейроны изолировались из срезов методом вибродиссоциации (Vorobjev, 1991) без предварительной ферментативной обработки, что позволяло сохранить интактными глутаматные рецепторы.

Эксперименты проводились на пирамидных нейронах, выделенных из поля CA1 гиппокампа, и на гигантских интернейронах стриатума. Для идентификации нейронов использовался в основном морфологический критерий. В работе использован метод точечной фиксации потенциала в конфигурации «целая летка». Токи, вызываемые аппликацией агонистов глутаматных рецепторов, регистрировали с помощью усилителя ЕРС 8. Для заполнения микропипеток использовали раствор следующего состава (мМ):

CsF – 100, CsCl – 40, NaCl – 5, CaCl₂ – 0.5, EGTA – 5, NEPES-CsOH – 10 (pH=7.2).

После заполнения микропипетки имели сопротивление 3–5 МОм. Регистрируемый сигнал фильтровался в полосе частот 0–5 кГц и оцифровывался с частотой 2 кГц для дальнейшего анализа. Вещества апплицировали с помощью системы быстрой перфузии.

Для построения кривых концентрация-действие оценивалась степень угнетения стационарного тока при действии различных концентраций блокатора. Кривые аппроксимировались с помощью уравнения Хилла:

$$(I_0 - I) / I_0 = 1 / (1 + IC_{50} / [B]^k),$$

где I и I₀ – токи, вызванные аппликацией агониста в присутствии и в отсутствии блокатора, соответственно; B - концентрация блокатора, а IC₅₀ - концентрация блокатора, вызывающая 50% угнетение, k - коэффициент Хилла. Данные приведены как средние значения ± стандартная ошибка, (n=число опытов).

Исследовано каналоблокирующее действие веществ фенилциклогексилового ряда: ИЭМ-2063 и ИЭМ-2046. Вещества различаются количеством метиленовых групп между положительно заряженными атомами азота (ИЭМ-2063 - три метиленовые группы, 2046 – пять метиленовых групп):

ИЭМ-2063: PhCh-CH₂-CH₂-NH-(CH₂)₃-NH₂

ИЭМ-2046: PhCh-CH₂-CH₂-NH-(CH₂)₅-NH₂

В таблице приведены значения блокирующей активности указанных соединений.

	NMDA, мкМ	AMPA, мкМ
ИЭМ-2063	2,02±0,26	6,09±1,91
ИЭМ-2046	4,71±1,97	41,2±16,5

Величины IC₅₀ для ИЭМ-2046 и ИЭМ-2063 достоверно не различаются на NMDA рецепторах. В то же время ИЭМ-2063 по блокирующей активности в несколько раз превосходит ИЭМ-2046 на AMPA рецепторах. Следствием различия блокирующей активности изученных соединений является большая селективность ИЭМ-2046 по отношению к NMDA рецепторам. Таким образом, строение каналов AMPA и NMDA рецепторов различается. Для блокады NMDA рецепторов расстояние между атомами азота оказывается не критичным, в то время как оно сильно влияет на связывание блокатора в канале AMPA рецептора. Полученные данные хорошо согласуются с результатами работ лаборатории, что позволяет построить топографические модели связывания блокаторов и выявить различия строения каналов ионотропных рецепторов разных типов. Эти данные

могут быть использованы для направленного синтеза новых избирательных каналоблокаторов глутаматных рецепторов, что имеет важное практическое значение для предотвращения последствий нарушений глутаматергической передачи.