

УДК 612.822.3

СИНЕРГИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ИОНОВ МАГНИЯ И АМИДА ЛАМБЕРТИАНОВОЙ КИСЛОТЫ В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ НМДА ТИПА ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА

© 2014 г. Т.А. Запара¹, С.О. Вечкапова^{1,2}, А.Л. Проскура¹, А.С. Ратушняк¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Конструкторско-технологический институт вычислительной техники
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия;

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,
e-mail: zapara_t@mail.ru

Поступила в редакцию 8 октября 2014 г. Принята к публикации 10 ноября 2014 г.

Наиболее распространенные нейродегенеративные заболевания, такие как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, рассеянный склероз, эпилепсия, ишемические поражения мозга, хотя и вызваны различными механизмами, но могут использовать общий путь – нарушения ионотропных глутаматных рецепторов, особенно НМДА подтипа. В настоящее время активно разрабатываются препараты с глутаматергическим механизмом действия для лечения когнитивных расстройств и нейродегенеративных процессов. Цель работы заключалась в исследовании эффектов амида ламбертиановой кислоты на глутаматергическую синаптическую передачу. Проведен анализ функциональной интеграции глутаматных и немедиаторных рецепторов пирамидных нейронов гиппокампа. Доминирующим типом функционирования рецепторов плазматической мембраны является интеграция воздействий медиаторов многочисленных внешних и внутренних факторов и совместное использование сигнальных путей. На срезах гиппокампа мыши показано, что амид ламбертиановой кислоты не препятствует развитию НМДА рецептор-зависимой синаптической потенциации, проявляет нейропротекторное свойство, нормализуя эпилептиформную активность, вызванную отсутствием эндогенного лиганда (ионов магния) ионного канала НМДА-рецепторов. Возможно, ламбертиановая кислота, выделяемая из хвои и живицы сибирского кедра (*Pinus sibirica* R. Maур), и ее производные могут стать источником доступных препаратов с глутаматергическим механизмом действия для лечения когнитивных расстройств и нейродегенеративных заболеваний.

Ключевые слова: синаптическая пластичность, долговременная потенция, глутаматные рецепторы, блокаторы ионных каналов, амид ламбертиановой кислоты.

ВВЕДЕНИЕ

Клеточные рецепторы – это молекулы, расположенные на поверхности плазматической мембраны нейронов. Клеточные рецепторы специфически реагируют изменением своей пространственной конфигурации на присоединение к ним молекул определенного химического вещества, нейромедиаторов, гормонов, нейропептидов, экзогенных веществ и передают этот сигнал внутрь клетки, обычно при помо-

щи механизма так называемых вторичных посредников или с помощью трансмембранных ионных токов (Зинченко, Долгачева, 2003; Сидоров, 2008).

Химические вещества, специфически взаимодействующие с рецепторами, называются лигандами этих рецепторов. Как правило, рецепторы способны связываться не только с основными эндогенными лигандами, но и с другими структурно сходными молекулами. Этот факт позволяет использовать экзогенные

вещества, связывающиеся с рецепторами и меняющие их состояние, в качестве лекарств. Рецептор, как правило, имеет несколько участков или «сайтов» связывания со специфичными для этого рецептора лигандами (например нейромедиаторами). Кроме того, рецепторный комплекс может иметь и дополнительные аллостерические регуляторные участки, с которыми взаимодействуют другие химические вещества (Зинченко, Долгачева, 2003; Сидоров, 2008).

Вещества, посредством которых осуществляется передача электрического импульса через синаптическое пространство между нейронами, называются медиаторами (нейротрансмиттерами). Медиаторы накапливаются в пресинаптических окончаниях в везикулах. Нервный импульс, поступающий в пресинаптическое окончание, вызывает освобождение медиатора из пресинаптических везикул в синаптическую щель. Молекулы медиаторов реагируют со специфическими рецепторными молекулами клеточной мембраны постсинаптического нейрона. Ионотропные рецепторы медиаторов являются рецепторно-канальными белковыми комплексами. Молекулы медиаторов, взаимодействуя со специфическими сайтами ионотропных рецепторов, вызывают изменение трансмембранного тока ионов. В случае трансмембранного тока ионов натрия или кальция (вторичного посредника) происходят деполяризация мембраны и возникновение потенциала действия постсинаптического нейрона (Зинченко, Долгачева, 2003; Сидоров, 2008).

Гиппокамп принимает участие в процессах обучения, формирования памяти у человека и животных, является центральной структурой лимбической системы мозга и мишенью факторов, которые оказывают влияние как на поведение, так и на висцеральные реакции (Виноградова, 1975).

Основные структуры гиппокампа включают зубчатую извилину и Аммонов рог, также называемый *Cornus Ammonis* (CA), **содержащий поля CA 1, 2 и 3**. Все подполя гиппокампа демонстрируют явление, известное как синаптическое долгосрочное потенцирование (ДП), которое является основой обучения и консолидации памяти (Malenka, 2003). В глутаматергических синапсах CA3-CA1 пирамидных нейронов ДП возникает после интенсивного и непродолжи-

тельного выброса медиатора глутамата, например, в результате высокочастотной стимуляции афферентных входов пирамидных нейронов гиппокампа поля CA1 (Sweatt, 1999).

ОРГАНИЗАЦИЯ ДЕНДРИТНЫХ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКИХ СИНАПСОВ

Большинство возбуждающих синапсов ЦНС млекопитающих являются глутаматергическими. Постсинаптическая мембрана синапса – это первое место, где обрабатывается и сохраняется информация (Kennedy, 2000). Дендритные шипики представляют собой наименьший функционально независимый химический отсек, обеспечивающий субстрат для реализации локальных правил обучения, которые могут быть ограничены отдельными активированными синапсами (Koch, Segev, 2000).

Основными ионотропными рецепторами глутамата синапсов являются НМДА и АМПА рецепторы (НМДАР и АМПАР), названные по агонистам (N-метил-D-аспарагиновая кислота и α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовая кислота соответственно). В зрелых гиппокампальных нейронах АМПАР представлены тремя типами субъединиц (GluR1-3). В состав рецептора входят четыре субъединицы, объединенные в два димера. В шипиках обнаруживаются три типа АМПАР: 1/2 (GluR1/GluR2); 2/3 (GluR2/GluR3) и 1/1 (GluR1/GluR1) (Shi, 2001). До индукции ДП в зоне синаптической мембраны присутствуют АМПАР типа 2/3, проницаемые для Na^+ . АМПАР типа 1/2 (проницаемые для Na^+) встраиваются в активную зону синапса при развитии ДП.

Взаимодействие глутамата с этими рецепторами в миллисекундном интервале времени изменяет мембранный потенциал, что в конечном счете индуцирует распространение сигнала (Lai, Jan, 2006). Активация АМПАР глутаматом инициирует вход Na^+ , что приводит к достаточной для срабатывания НМДАР деполяризации синаптической мембраны и входу Ca^{2+} в шипик (Nowak *et al.*, 1984).

НМДАР обладают рядом особенностей: одновременно хемо- и потенциал-чувствительностью, медленной динамикой запуска и длительностью эффекта, способностью к временной суммации и усилению вызванного потенциала.

Ионы магния селективно блокируют активность рецепторов при потенциале покоя, высокой гиперполяризации или деполяризации. Наибольшие ионные токи при активации агонистами возникают при деполяризации мембраны в узком диапазоне от -30 до -20 мВ (в этом проявляется потенциал-зависимость НМДАР) (Nowak *et al.*, 1984). НМДАР является рецепторно-канальным комплексом, включающим: сайт специфического связывания медиатора (L-глутаминовой кислоты), регуляторный, или коактивирующий, сайт связывания глицина, полиаминовый аллостерический модуляторный сайт, сайты связывания фенциклидина, цинка и потенциал-зависимый Mg^{2+} связывающий участок в ионном канале (Racca *et al.*, 2000). Для нормальной работы рецепторно-канального комплекса кроме медиатора необходимо присутствие вышеперечисленных факторов.

Таким образом, ионы магния функционируют в качестве переключателя. Внеклеточные Mg^{2+} держат ионный канал НМДАР заблокированным при нормальном потенциале покоя, но позволяют Ca^{2+} проходить через этот трансмембранный канал, когда активация рецептора имеет черты, необходимые для процессов обучения. То есть на уровне специфической белковой молекулы реализуется временная и пространственная конвергенция (суммация) внешних воздействий и собственного состояния клетки (Dingledine *et al.*, 1999). Деполяризационное смещение потенциала покоя нейрона, вызванное, например, недостаточным снабжением кислородом, приводит к аберрантному проникновению сигнальных молекул (Ca^{2+}) в нейрон. Приток Ca^{2+} через НМДАР, индуцируемый синаптической активностью, необходим для многих типов синаптической пластичности и лежит в основе некоторых форм обучения и памяти. Однако чрезмерный приток Ca^{2+} может привести к эксайтотоксической гибели клеток. Предполагают, что опосредованные НМДАР процессы вносят определенный вклад в нейродегенеративные и психоневрологические расстройства (Dingledine *et al.*, 1999; Krystal *et al.*, 2003; Moghaddam, Jackson, 2003).

Перемещению АМПАР в плоскости мембраны, их встраиванию (эндо/экзоцитоз) в зону синаптической мембраны придается решающее

значение в долгосрочной синаптической пластичности (Kessels, Malinow, 2009). Полагают, что этот процесс лежит в основе обучения и памяти. Количество и субъединичный состав постсинаптических АМПАР способны определить зависимые от активности изменения, отвечающие за ДП (Bredt, Nicoll, 2003).

Анализ данных о работе гиппокампа позволяет прийти к выводу, что на клеточном уровне доминирующим типом функционирования является интеграция воздействий селективных сигнальных молекул (медиаторов) с многочисленными внешними и внутренними факторами.

При таком типе функционирования нейрональных клеток нарушения, вызванные отдельными видами рецепторов, приводят к патологическим изменениям, связанным с нейродегенеративными заболеваниями, которые часто сопровождаются когнитивными расстройствами и деменциями. Наиболее распространенные нейродегенеративные заболевания, такие как болезни Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона, рассеянный склероз, эпилепсия, ишемические поражения мозга, хотя и вызваны различными механизмами, но могут совместно использовать общий путь – нарушения ионотропных глутаматных рецепторов, особенно НМДАР (Mehta *et al.*, 2012). При расстройствах, ассоциированных с нейродегенеративными заболеваниями, предполагается, что хронические воздействия умеренно повышенных концентраций глутамата или гиперактивность глутаматных рецепторов на более длительные периоды времени, чем это имеет место при нормальной нейротрансмиссии, запускают клеточные процессы в нейронах, которые в конечном итоге приводят к апоптозоподобной гибели клеток. Такая ситуация, как правило, возникает при деполяризационном смещении потенциала покоя нейронов, что может быть вызвано недостаточным энергообеспечением, возрастными изменениями, различными повреждениями нейронов. В этих условиях снимается нормальный Mg^{2+} блок ионного канала и, таким образом, аномально увеличиваются продолжительность активности НМДАР и поступление Ca^{2+} в нейрон (Zeevalk, Nicklas, 1992). Сложность снижения поступления Ca^{2+} через НМДАР состоит в том, что те же процес-

сы, которые при высоких уровнях приводят к эксайтотоксичной гибели клеток, являются при физиологических уровнях абсолютно необходимыми для нормального функционирования нейронов.

Для клинического применения разрешен только один препарат с глутаматергическим механизмом действия – мемантин. Он способен блокировать эксайтотоксическую гибель клеток и не нарушать физиологические процессы (Chen *et al.*, 1992). Препараты с действующим веществом мемантином (Акатинол, Канон) рекомендованы для лечения деменции, склероза, снижения памяти у взрослых и детей, начальных стадий болезни Альцгеймера.

Для ламбертиановой кислоты и ее производных в настоящее время выявлен широкий спектр биологической активности: она стимулирует исследовательское поведение животных в тесте «открытого поля»; в модели висцеральной боли выявлено ее обезболивающее и антиоксидантное действие. Для азотсодержащих производных показано ее ноотропное и нейротропное действие (Толстикова и др., 2000, 2001, 2004; Tolstikova *et al.*, 2004). Амид ламбертиановой кислоты (АмЛК) в условиях социального дискомфорта оказывает выраженный стресс-протекторный эффект: повышает коммуникативность, двигательную активность животных, уменьшает гипертрофию надпочечников (Августинович и др., 2014). Ламбертиановую кислоту получают из кедрового шишкового конуса сибирского (Pinus sibirica R. Maug). Она является легкодоступным растительным метаболитом (Толстиков и др., 2002).

Однако, несмотря на выявленный широкий спектр биологической активности ламбертиановой кислоты, и в частности амида ламбертиановой кислоты (АмЛК), механизмы их действия на структуры мозга и отдельные медиаторные системы остаются неисследованными. Анализ принципов и механизмов функционирования глутаматергических нейронов, а также широкий спектр биологической активности амида ламбертиановой кислоты и ее производных позволили сделать предположение, что это вещество может обладать глутаматергическим механизмом действия. Целью экспериментальной части этой работы была проверка такого предположения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на срезах гиппокампа двухмесячных самцов мышей линии ICR с соблюдением «Правил работ с использованием экспериментальных животных» (приложение к приказу Министерства здравоохранения № 755 от 12.08.1977). Использовали животных, полученных из вивария Института цитологии и генетики СО РАН.

Приготовление срезов выполнялось по стандартной методике. Извлеченный после декапитации мозг переносили в охлажденный до 0–4 °С аэрированный (95 % O_2 , 5 % CO_2) физиологический раствор. Поперечные срезы гиппокампа (толщиной 300–350 μm) помещали в проточную (1,5 мл/мин, 30–31 °С) камеру, физиологический раствор насыщался карбогеном и содержали (в мМ): NaCl – 129; KCl – 2,25; $CaCl_2$ – 2,4; $MgSO_4$ – 2,5; $NaHCO_3$ – 26; KH_2PO_4 – 1,2; глюкоза – 10; pH 7,6–7,8.

Перед началом основного эксперимента для каждого среза определяли пороговую силу стимула и зависимость амплитуды ответа от величины стимула. В ходе основного эксперимента использовали интенсивность тестирующего стимула, при которой амплитуда ответов не превышала 50 % от максимально возможной амплитуды. Организованная таким образом электрическая стимуляция и внеклеточная запись активности нейронов отражают синхронную реакцию – популяционный спайк (п-спайк) пирамидных нейронов, расположенных под регистрирующим микроэлектродом.

Стимуляция коллатералей Шаффера и регистрация вызванных п-спайков пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа производились через внеклеточные микроэлектроды, заполненные физиологическим раствором.

Для устранения магниевого блока с ионотропных глутаматных НМДАР использовали физиологический раствор, не содержащий ионов магния. На коллатерали Шаффера подавали стимул, при этом в нормальном растворе регистрировали одиночный п-спайк максимальной амплитуды. В безмагниевого растворе после 5–20 мин инкубации при стимуле тех же параметров регистрировали серию п-спайков.

Тетанизация коллатералей Шаффера осуществлялась с помощью электрической стиму-

ляции в течение 1 с с частотой 100 Гц стимулом, при котором амплитуда п-спайков не превышала 50 % от максимальной. Стимул такой же амплитуды использовался для тестирования ответов после потенциации.

АмЛК (синтезирован в лаборатории медицинской химии НИОХ СО РАН) растворяли в 50 μ л этанола, затем по каплям, постоянно перемешивая, добавляли к физиологическому раствору. Эквивалентное количество этанола добавлялось в физиологический раствор в группах сравнения. Используемая концентрация АмЛК составляла 170 μ М.

Мемантин, МК-801 (Sigma) использовали в концентрациях 100 μ М и 10 μ М соответственно.

Внеклеточные сигналы усиливались с помощью усилителя (Nihon Kohden.mez-8201, Япония). Регистрацию данных проводили с использованием аналого-цифрового преобразователя (L-CARD, Россия).

Полученные данные представлены как средняя величина \pm стандартная ошибка среднего. Для оценки достоверности отличий между группами использовали U-критерий Манна-Уитни для каждой временной точки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для того чтобы определить, может ли АмЛК нормализовать функционирование НМДА-рецептор-канального комплекса при отсутствии эндогенного лиганда, взаимодействующего с сайтом связывания, находящимся в канальной части рецепторной молекулы, срезы гиппокампа в течение 20 мин перфузировали физиологическим раствором, не содержащим ионов магния. Отсутствие ионов магния в среде приводило к снятию магниевого блока с НМДА-рецепторов и развитию эпилептиформной активности пирамидных нейронов поля СА1, которая проявлялась в том, что в ответе на тестирующий стимул кроме основного п-спайка (рис. 1, а, 1) возникало несколько дополнительных п-спайков (рис. 1, а, 2).

После развития эпилептиформной активности пирамидных нейронов поля СА1 в раствор, перфузирующий срезы экспериментальной группы ($n = 16$), добавляли АмЛК. Срезы контрольной группы ($n = 9$) инкубировали в

безмагниевого раствора в течение такого же времени, как и срезы экспериментальной группы (150 мин).

Действие АмЛК проявлялось в уменьшении амплитуды, а затем и подавлении дополнительных п-спайков (рис. 1, а, 3). Основной ответ уменьшался на $27,34 \pm 7,41$ % от начальной величины за все время перфузии в АмЛК (150 мин). При этом не менялась амплитуда волоконного ответа, что свидетельствует о том, что АмЛК не влияет на потенциал-зависимые каналы, обеспечивающие проведение импульса. В контрольной группе срезов, которые такое же время перфузировались в безмагниевого физиологическом растворе, не наблюдалось уменьшения числа и амплитуды дополнительных п-спайков в вызванных ответах.

После отмывки АмЛК в течение часа безмагниевого раствором дополнительные спайки вновь не появлялись. Это свидетельствует о стабильности взаимодействия АмЛК с молекулами-мишенями.

Для проверки возможного превентивного действия АмЛК срезы ($n = 9$) перфузировали физиологическим раствором с добавлением АмЛК (60 мин), а затем перфузировали физиологическим раствором, не содержащим ионов магния (60 мин) (рис. 1, б, 1–3). Несмотря на то что эндогенный блокатор был удален из среды, эпилептиформная активность пирамидных нейронов в поле СА1 не развивалась (рис. 1, б, 3).

В связи с выраженным эффектом АмЛК в условиях нарушения магниевого блока вторая серия экспериментов была посвящена изучению влияния АмЛК на НМДАР-зависимую синаптическую потенциацию в физиологических условиях.

Перед тетанизацией срезы перфузировали нормальным физиологическим раствором, содержащим АмЛК, в течение 60 мин, при этом наблюдали незначительное уменьшение амплитуды основного спайка. После такой обработки срезов АмЛК проводили тетанизацию (100 Гц/1с) коллатералей Шаффера. Контрольную группу перфузировали 60 мин в нормальном растворе. Достоверного различия экспериментальной ($n = 8$) и контрольной ($n = 5$) групп не обнаружилось (рис. 2).

В случае обработки срезов высокоаффинным экзогенным лигандом МК-801, который взаимо-

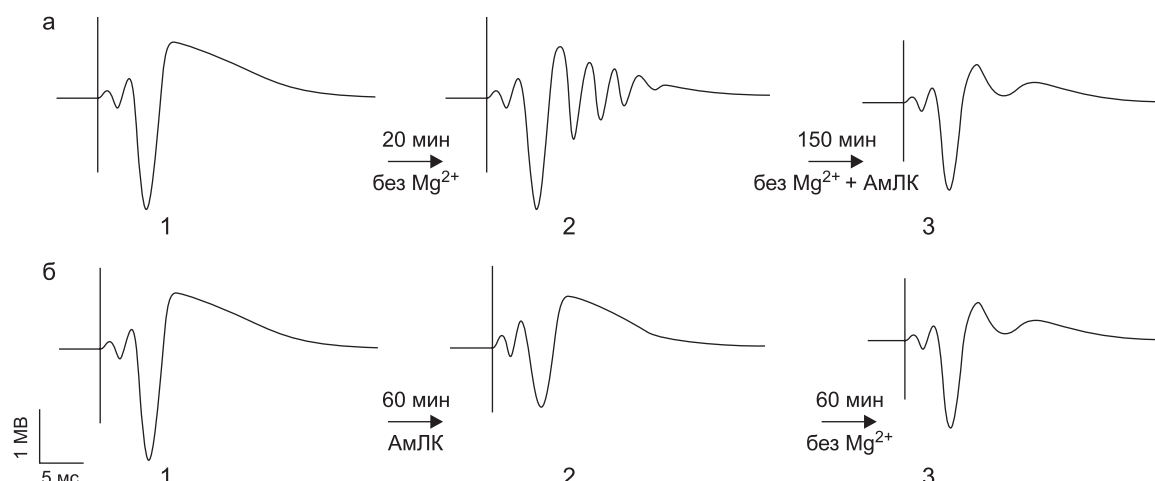


Рис. 1. Регуляция активности глутаматных рецепторов НМДА типа амидом ламбертиановой кислоты.

Над горизонтальными стрелками цифрами указана продолжительность инкубации срезов с указанными веществами. а – компенсация амидом ламбертиановой кислоты гиперактивности глутаматных рецепторов НМДА типа пирамидных нейронов гиппокампа поля СА1, вызванной снятием магниевого блока. 1 – одиночный п-спайк в нормальном растворе; 2 – эпилептиформноподобная активность после 20 мин инкубации среза в безмагниевого растворе; 3 – восстановление одиночных п-спайков после 150 мин инкубации среза в безмагниевого растворе с АмЛК;

б – предотвращение гиперактивности глутаматных рецепторов НМДА типа пирамидных нейронов гиппокампа поля СА1 амидом ламбертиановой кислоты. 1 – одиночный п-спайк в нормальном растворе; 2 – инкубация в нормальном растворе с АмЛК; 3 – отсутствие эпилептиформноподобной активности в безмагниевого растворе.

Fig. 1. Regulation of glutamate receptors NMDA-type by lambertianic acid amide.

Numerals above horizontal arrows indicate the duration of slices incubation with substances under study.

a – hyperactivity of NMDA type glutamate receptors in pyramidal hippocampal neurons of the CA1 field caused by magnesium block removal: compensation by lambertianic acid amide. 1 – Single p-spike in the normal solution; 2 – epileptiform activity of slice after 20 min incubation in a solution without of magnesium ions; 3 – restoration of single p-spikes after 150 min incubation of slice in solution with lambertianic acid amide and without magnesium ions.

b – prevention of NMDA type glutamate receptor hyperactivity in pyramidal hippocampal neurons of the CA1 field by lambertianic acid amide; 1 – single p-spike in the normal solution; 2 – incubation in the normal solution with lambertianic acid amide; 3 – absence of the epileptiform activity from the solution without magnesium ions.

действует с сайтом связывания, находящимся в канальной части рецепторной молекулы ионного канала НМДАР, потенциация не развивалась (рис. 2).

Эти результаты показывают, что проводимая тетанизация коллатералей Шаффера вызывает именно НМДАР-зависимую синаптическую потенциацию. АмЛК не препятствует развитию синаптической потенциации в присутствии эндогенного блокатора (рис. 2).

В третьей серии экспериментов проводили обработку срезов мемантином. Обнаружили, что, как и в случае обработки срезов АмЛК, мемантин подавляет развившуюся в безмагниевого растворе эпилептиформную активность ($n = 5$) (рис. 3).

Однако в случае превентивной обработки срезов мемантином в нормальном растворе при перфузии этих срезов безмагниевого раст-

вором развивалась эпилептиформная активность ($n = 5$).

ОБСУЖДЕНИЕ

В экспериментах на животных (грызунах) для ламбертиановой кислоты и ее производных в настоящее время выявлен широкий спектр биологической активности (Толстикова и др., 2000, 2001, 2004; Tolstikova *et al.*, 2004; Августиневич и др., 2014). В экспериментах, проведенных нами, показано, что АмЛК может оказывать воздействие непосредственно на нервную ткань (срезы гиппокампа).

Нейропротекторный эффект АмЛК проявлялся в условиях отсутствия одного из эндогенных лигандов НМДАР. АмЛК нормализовал развившуюся эпилептиформную активность пирамидных нейронов поля СА1 (рис. 1, а).

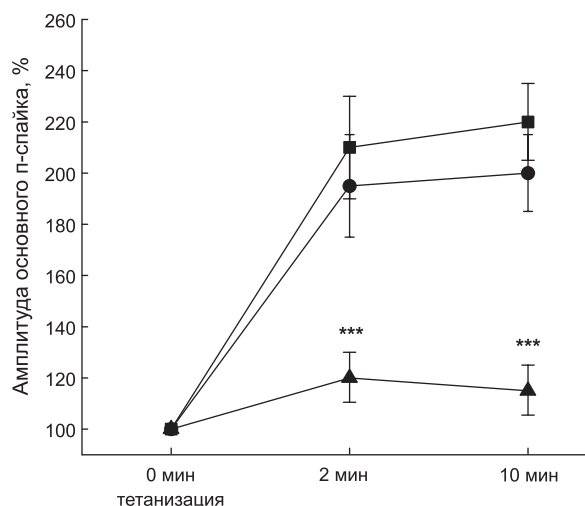


Рис. 2. Влияние АмЛК и МК-801 на развитие долговременной потенциации.

По оси ОХ – время после тетанизации срезов высокочастотной стимуляцией (100 Гц/1с). По оси ОУ – увеличение амплитуды п-спайка каждой из трех групп в % относительно начальной величины (до тетанизации). За 100 % взята амплитуда п-спайков до тетанизации.

■ группа срезов, которую преинкубировали в нормальном растворе (контроль);

● группа срезов, которую преинкубировали в нормальном растворе с добавлением АмЛК (60 мин);

▲ группа срезов, которую преинкубировали в нормальном растворе с добавлением МК-801 (60 мин).

Достоверное отличие амплитуды п-спайков по сравнению с контрольной группой после тетанизации: *** $p \leq 0,001$.

Fig. 2. Influence of lambertianic acid amide and MK-801 on the development of long-term potentiation.

X-axis: time after high-frequency (100 Hz/1c) tetanization of slices.

Y-axis: increase of the p-spike amplitude in each of the three groups as percentage of the initial value (before tetanization). The amplitude of the p-spikes before tetanization is taken to be 100 %.

■ group of slices pre-incubated in the normal solution (control);

● group of slices pre-incubated in the normal solution with lambertianic acid amide (60 min);

▲ group of slices pre-incubated in the normal solution with MK-801 (60 min).

*** Difference of the amplitude of the p-spikes from the control group after tetanization significant at $p \leq 0,001$.

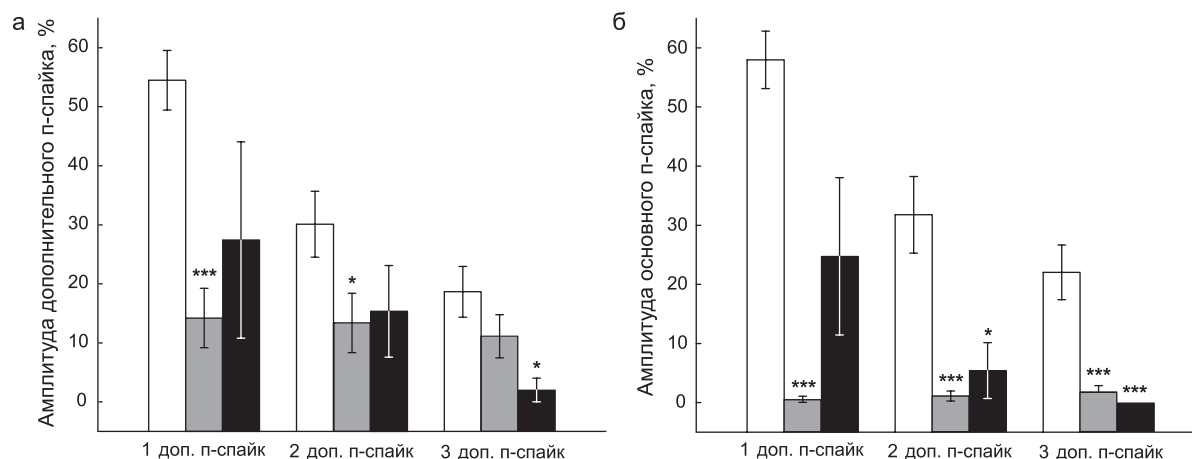


Рис. 3. Динамика уменьшения дополнительных п-спайков под воздействием АмЛК и мемантина.

а – 90 мин после начала инкубации; б – 150 мин после начала инкубации.

Достоверное уменьшение амплитуды дополнительных п-спайков экспериментальной группы по сравнению с контрольной группой в той же самой временной точке: * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

□ группа срезов, которую инкубировали в безмагниевоом растворе (контроль).

■ группа срезов, которую инкубировали в безмагниевоом растворе с добавлением АмЛК;

■ группа срезов, которую инкубировали в безмагниевоом растворе с добавлением мемантина.

Амплитуда дополнительных п-спайков нормирована относительно основного п-спайка.

Fig. 3. Dynamics of reduction of the amplitude of additional p-spikes under the influence of lambertianic acid amide and memantin.

а – 90 minutes after the beginning of incubation; б – 150 minutes after the beginning of incubation.

Reduction of the amplitude of the additional n-spikes in the experimental group compared to the control group at the same time point significant at: * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

□ group of slices incubated in the normal solution (control);

■ group of slices incubated in the solution with lambertianic acid amide and without magnesium ions;

■ group of slices incubated in the solution with memantin and without magnesium ions.

The amplitude of the additional p-spike is normalized relative to the main p-spike.

Кроме того, предварительная обработка срезов блокировала развитие эпилептиформной активности, которая вызывалась в экспериментах удалением ионов магния из омывающей среды (рис. 1, б). В условиях применения физиологического раствора без ионов магния, когда снимается нормальный Mg^{2+} блок ионного канала, происходят аномальное увеличение продолжительности активности НМДАР и избыточное поступление Ca^{2+} в нейрон (Zeevalk, Nicklas, 1992), что может стать причиной эксайтотоксичной гибели клеток. Таким образом, АмЛК при отсутствии ионов магния может блокировать развитие эпилептиформной активности и ассоциированное с ней избыточное поступление Ca^{2+} в нейрон.

Известно, что для нормальной глутамат-зависимой нейротрансмиссии необходимо присутствие и потенциал-зависимое взаимодействие Mg^{2+} с НМДАР (Chen *et al.*, 1992; Chen, Lipton, 2006; Johnson, Kotermanski, 2006). Наши данные показывают, что в отсутствие Mg^{2+} АмЛК нормализует глутамат-зависимую нейротрансмиссию, и нормализация глутамат-зависимой нейротрансмиссии происходит в результате интеграции эффектов глутамата и АмЛК.

Кроме нейропротекторного эффекта, который был выявлен нами в отсутствие эндогенного лиганда НМДАР, обнаружили, что при физиологических условиях АмЛК не препятствует нормальному функционированию нейронов и процессам синаптической пластичности.

Обработка срезов АмЛК не препятствовала развитию ДП в присутствии эндогенного канального блокатора, как это наблюдается, например, при применении высокоаффинного экзогенного лиганда (блокатора) ионного канала НМДАР МК-801 (рис. 2). Эти результаты показывают, что проводимая тетанизация коллатералей Шаффера вызывает НМДАР-зависимую синаптическую потенциацию, так как если бы АмЛК действовал подобно МК-801, потенциация бы не развивалась.

Функционально действие АмЛК на срезы гиппокампа можно сравнить с эффектами мемантина с известными НМДА рецептор-зависимыми механизмами действия (Chen *et al.*, 1992; Chen, Lipton, 2006; Johnson, Kotermanski, 2006).

АмЛК и мемантин воздействовали на срезы гиппокампа сходным образом: не блокировали

развитие НМДАР-зависимой синаптической потенциации; нормализовали эпилептиформную активность нейронов, вызванную удалением эндогенного блокатора каналов НМДАР. Однако только АмЛК показал превентивный эффект – в срезах, обработанных АмЛК, не развивается эпилептиформная активность при помещении их в среду, не содержащую ионов магния.

Известно, что мемантин является низкоаффинным неконкурентным канальным блокатором, он связывается с каналом, который находится в открытом состоянии и способен к быстрому выходу из канала (Chen *et al.*, 1992; Chen, Lipton, 2006). При инкубации срезов в физиологическом растворе как с мемантином, так и с АмЛК, тестирующие стимулы подавались регулярно через две минуты и НМДАР-каналы находились в открытом состоянии порядка нескольких миллисекунд. Вероятно, в случае с мемантином этого времени было недостаточно, чтобы он вступил в реакцию со своим сайтом связывания в канале, находящемся в открытом состоянии. АмЛК, напротив, успешно взаимодействовал, возможно, с другим сайтом, нежели мемантин, и при удалении Mg^{2+} эффективно функционировал как блокатор канала. Вероятно, это выявленное нами превентивное нейропротекторное свойство АмЛК может проявиться как особое преимущество при дальнейших исследованиях и клинических испытаниях вещества.

БЛАГОДАРНОСТИ

В работе использованы материалы, полученные при выполнении интеграционного проекта Президиума СО РАН № 136; базового проекта фундаментальных исследований 35.1.5; гранта РФФИ № 12-01-00639-а; ФНМ-2012-46.

Работа также поддержана грантами Минобрнауки России № RFMEFI61914X0005 и № RFMEFI62114X0010.

ЛИТЕРАТУРА

- Августинович Д.Ф., Фомина М.К., Сорокина И.В. и др. Комплексное исследование эффектов амида ламбертиановой кислоты у самок мышей, находящихся в условиях социального дискомфорта // Бюл. эксперим. биол. медицины. 2014. Т. 157. С. 599–603.
Avgustinovich D.F., Fomina M.K., Sorokina I.V. *et al.* Complex investigation of the effects of lambertianic acid

- amide in female mice under conditions of social discomfort // *Bull. Eks. Biol. Med.* 2014. V. 157. P. 583–587. (In Russian).
- Виноградова О.С. Гиппокамп и память. М.: Наука, 1975. 239 с.
- Vinogradova O.S. Hippocampus and memory. M.: Nauka, 1975. 239 p. (In Russian).
- Зинченко В.П., Долгачева Л.П. Внутриклеточная сигнализация. Пушино: Аналитическая микроскопия, 2003. 83 с.
- Zinchenko V.P., Dolgacheva L.P. Intracellular signaling. Pushchino: Analiticheskaya mikroskopija, 2003. 83 p. (In Russian).
- Сидоров А.В. Физиология межклеточной коммуникации. Минск: БГУ, 2008. 215 с.
- Sidorov A.V. *Physiologija mezhhkločnoj kommunikacii*. Minsk: BGU, 2008. 215 p. (In Russian).
- Толстикова Г.А., Балтина Л.А., Толстикова Т.Г., Шульц Э.Э. Синтетические трансформации высших терпеноидов и алкалоидов // *Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения*. 2002. № 7. С. 9–20.
- Tolstikov G.A., Baltina L.A., Tolstikova T.G., Shults E.E. Synthetic transformations of higher terpenoids and alkaloids // *Khimija i kompjuternoje modelirovanie. Butlerovskie soobshhenija*. 2002. V. 7. P. 9–20. (In Russian).
- Толстикова Т.Г., Долгих М.П., Толстиков Г.А. Ламбертиановая кислота и ее аминокислотные производные – новая группа перспективных нейротропных агентов // *Докл. АН*. 2000. Т. 374. № 2. С. 268–270.
- Tolstikova T.G., Dolgikh M.P., Tolstikov G.A. Lambertian acid and its amino derivatives: a new group of perspective neurotropic agents // *Dokl. Akad. nauk*. 2000. V. 374. No. 2. P. 445–447. (In Russian).
- Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Воевода Т.В., Шульц Э.Э., Толстиков Г.А. Ноотропная активность производных ламбертиановой кислоты // *Докл. РАН*. 2001. Т. 376. № 2. С. 271–273.
- Tolstikova T.G., Sorokina I.V., Voivoda T.V. *et al.* Nootropic activity lambertianic acid derivatives // *Dokl. RAS*. 2001. V. 376. P. 271–273. (In Russian).
- Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Долгих М.П., Харитонов Ю.В., Чернов С.В., Шульц Э.Э., Толстиков Г.А. Нейротропная активность аддуктов ламбертиановой кислоты с N-замещенными маленимидами // *Хим.-фарм. журнал*. 2004. Т. 38. № 10. С. 13–15.
- Tolstikova T.G., Sorokina I.V., Dolgikh M.P. *et al.* Neurotropic activity adducts lambertianic acid N-substituted maleimide // *Khim. Pfarm. Zhurnal*. 2004. V. 38. P. 13–15. (In Russian).
- Bredt D.S., Nicoll R.A. AMPA receptor trafficking at excitatory synapses // *Neuron*. 2003. V. 40. P. 361–379.
- Chen H.S., Lipton S.A. The chemical biology of clinically tolerated NMDA receptor antagonists // *J. Neurochem.* 2006. V. 97. P. 1611–1626.
- Chen H.S., Pellegrini J.W., Aggarwal S.K. *et al.* Open-channel block of NMDA responses by memantine: therapeutic advantage against NMDA receptor-mediated neurotoxicity // *J. Neurosci.* 1992. V. 12. P. 4427–4436.
- Dingledine R., Borges K., Bowie D. *et al.* The glutamate receptor ion channels // *Pharmacol. Rev.* 1999. V. 51. P. 7–61.
- Johnson J.W., Kotermanski S.E. Mechanism of action of memantine // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2006. V. 6. P. 61–67.
- Kennedy M.B. Signal-processing machines at the postsynaptic density // *Science*. 2000. V. 290. P. 750–754.
- Kessels H.W., Malinow R. Synaptic AMPA receptor plasticity and behavior // *Neuron*. 2009. V. 61. P. 340–450.
- Koch C., Segev I. The role of single neurons in information processing // *Nat. Neurosci.* 2000. V. 3. P. 1171–1177.
- Krystal J.H., D'Souza D.C., Mathalon D. *et al.* NMDA receptor antagonist effects, cortical glutamatergic function, and schizophrenia: toward a paradigm shift in medication development // *Psychopharmacology (Berl)*. 2003. V. 169. P. 215–233.
- Lai H.C., Jan L.Y. The distribution and targeting of neuronal voltage-gated ion channels // *Nat. Rev. Neurosci.* 2006. V. 7. P. 548–562.
- Malenka R.C. The long-term potential of LTP // *Nature Rev. Neurosci.* 2003. V. 4. P. 923–926.
- Mehta A., Prabhakar M., Kumar P. *et al.* Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders // *Eur. J. Pharmacol.* 2012. V. 698. P. 6–18.
- Moghaddam B., Jackson M.E. Glutamatergic animal models of schizophrenia // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003. V. 1003. P. 131–137.
- Nowak L., Bregestovski P., Ascher P. *et al.* Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones // *Nature*. 1984. V. 307. P. 462–465.
- Racca C., Stephenson F.A., Streit P. *et al.* NMDA receptor content of synapses in stratum radiatum of the hippocampal CA1 area // *J. Neurosci.* 2000. V. 20. P. 2512–2522.
- Shi S., Hayashi Y., Esteban J.A. *et al.* Subunit-specific rules governing AMPA receptor trafficking to synapses in hippocampal pyramidal neurons // *Cell*. 2001. V. 105. P. 331–343.
- Sweatt J.D. Toward a molecular explanation for long-term potentiation // *Learn. Mem.* 1999. V. 6. P. 399–416.
- Tolstikova T.G., Sorokina I.V., Dolgikh M.P., Kharitonov Y.V., Chernov S.V., Shults E.E., Tolstikov G.A. Neurotropic activity of lambertianic acid adducts with N-substituted maleimides // *Pharm. Chem. J.* 2004. V. 38. No. 10. P. 532–534.
- Zeevalk G.D., Nicklas W.J. Evidence that the loss of the voltage-dependent Mg^{2+} block of the N-methyl-D-aspartate receptor underlies receptor activation during inhibition of neuronal metabolism // *J. Neurochem.* 1992. V. 59. P. 1211–1220.

SYNERGISTIC EFFECT OF MAGNESIUM IONS AND LAMBERTIANIC ACID AMIDE IN THE REGULATION OF GLUTAMATE RECEPTORS OF NMDA-TYPE IN PYRAMIDAL NEURONS OF THE HIPPOCAMPUS

T.A. Zapara¹, S.O. Vechkapova², A.L. Proskura¹, A.S. Ratushnyak¹

¹ Design Technological Institute of Digital Techniques SB RAS, Novosibirsk, Russia;

² Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,

e-mail: zapara_t@mail.ru

Summary

The most common neurodegenerative disorders, such as Alzheimer's, Parkinson's, Huntington's, multiple sclerosis, epilepsy, ischemic brain damage, although caused by different mechanisms, may share a common pathway: anomalies of ionotropic glutamate receptors, particularly of NMDA type. Currently, drugs with glutamatergic mechanisms of action are intensely being developed for the treatment of cognitive disorders and neurodegenerative processes. The aim of this work was to study the effect of lambertianic acid amide on glutamatergic synaptic transmission. The functional integration of glutamate and non-neurotransmitter receptors of hippocampal pyramidal neurons was analyzed. The dominant type of functioning of the plasma membrane receptors is the integration of effects of selective signaling molecules (mediators), numerous internal and external factors, as well as the sharing of signaling pathways. Examination of mouse hippocampal slices showed that lambertianic acid amide did not affect the development of NMDA-dependent synaptic potentiation. It exhibited neuroprotective effects, normalizing the epileptiform activity caused by the absence of the endogenous ion channel blocker of the NMDA receptor. Thus, lambertianic acid extracted from needles and galipot of Siberian cedar pine (*Pinus sibirica* R. Mayr) and its derivatives are a promising source of drugs with glutamatergic mechanism of action suitable for the treatment of cognitive disorders and neurodegenerative diseases.

Key words: synaptic plasticity, long-term potentiation, glutamate receptor, glucocorticoid, neuropeptide receptors, ion channel blocker, lambertianic acid amide.