

**АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ**

*На правах рукопису*

**РИБАЛЬЧЕНКО  
Володимир Васильович**

**ДОСЛІДЖЕННЯ ГЛУТАМАТАКТИВОВАНОЇ  
ПРОВІДНОСТІ ІЗОЛЬОВАНИХ НЕЙРОНІВ  
ГІПОКАМПА ЩУРІВ ЗА ДОПОМОГОЮ  
СТРУКТУРНИХ АНАЛОГІВ ГЛУТАМАТУ  
ТА КОРОТКОТЕРМІНОВОЇ АПЛІКАЦІЇ  
АГОНІСТІВ**

**02.00.10 — Біоорганічна хімія, хімія природних  
і фізіологічно активних речовин**

**АВТОРЕФЕРАТ**  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

**Київ — 1994**

ЛНБ України ім.В.Стефаника



00814143 (L)

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ БІООРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ ТА НАФТОХІМІЇ

на правах рукопису

РИБАЛЬЧЕНКО  
ВОЛОДИМИР ВАСИЛЬОВИЧ

ДОСЛІДЖЕННЯ ГЛУТАМАТАКТИВОВАНОЇ ПРОВІДНОСТІ  
ІЗОЛЬОВАНИХ НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПА ЩУРІВ ЗА ДОПОМОГОЮ СТРУКТУРНИХ  
АНАЛОГІВ ГЛУТАМАТУ ТА КОРОТКОТЕРМІНОВОЇ АПЛІКАЦІЇ АГОНІСТІВ

02.00.10 - Біоорганічна хімія, хімія природних  
і фізіологічно активних речовин

А в т о р е ф е р а т  
дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата  
біологічних наук

Київ - 1994

70 20 388  
Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті біоорганічної хімії та нафтохімії  
АН України.

Наукові керівники:

доктор медичних наук,  
професор  
О.І.Луїт

кандидат біологічних наук  
Р.М.Скрима

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук  
Л.М.Зайцев

кандидат біологічних наук  
А.Я. Циндренко

Провідна установа:

Фізико-хімічний інститут  
ім.О.В.Богатського АН України,  
м.Одеса.

Захист відбудеться " 28 " січня 1994 р. на  
засіданні спеціалізованої вченої ради Д 016.65.01 в Інституті  
біоорганічної хімії та нафтохімії АН України (253660, м.Київ,  
вул.Мурманська, 1).

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Інституту  
біоорганічної хімії та нафтохімії АН України (253660, м.Київ,  
вул.Мурманська, 1).

Автореферат розісланий " 28 " грудня 1993 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради

*Д.М.Федоряк*

Д.М.Федоряк.

ЛНБ ім. В. Стефаніка  
АН України

## 1. ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Елементарні процеси передачі збудження між нейронами мозку, які лежать в основі навчання і пам'яті, зумовлені функціонуванням різних типів глутаматактивованих рецепторів (ГР) нейрональних мембран. Патологічні зміни нормального режиму роботи ГР започатковують виникнення захворювань Паркінсона і Альцгеймера, епілепсії, тяжких порушень обміну речовин та координації.

Для цілеспрямованого пошуку перспективних медичних блокувальників і агоністів ГР важливе докорінне вивчення особливостей будови рецепторів і їх конформаційних перетворень. Особливої ваги в зв'язку з цим набувають дослідження взаємодії ГР з структурними аналогами глутамата, в результаті яких отримуються відомості про зв'язок між будовою цих молекул і їх фармакологічною активністю. Одночасно може бути уточнена існуюча класифікація ГР.

В сучасній класифікації ГР, окрім основних типів - N-метил-D-аспартатних (NMDA) і не-NMDA рецепторів, мало досліджена роль рецепторів 2-аміно-4-фосфономасляної кислоти (AP4). Відомі блокувальні властивості AP4 щодо синаптичної передачі в різних ділянках мозку і сітчатки, але пресинаптична чи постсинаптична локалізація цієї дії здебільшого лишається дискусійною. На основі проведених досліджень фармакологічної дії AP4 і деяких її структурних аналогів на ГР перфузованих нейронів гіпокампу щурів, в поданій роботі робиться висновок про нездатність AP4 блокувати постсинаптичні рецептори не-NMDA-типу, які опосередковують швидку передачу сигналу в синапсах.

Глутаматрецептивний комплекс (ГРК) являє собою білкову утворення, яке складається з поверхневого рецептора і керованого ним трансмембранного іонного каналу. Формування адекватного уявлення про механізми фармакологічної дії препаратів неможливе без попереднього вивчення шляхів передачі сигналу від рецептора до іонного каналу. В представлений роботі динаміка конформаційних станів ГРК вивчалась методом аналізу трансмембранних іонних струмів, які виникають під час аплікації агоністів ГР на ізольовані нейрони. В межах виконання роботи була удосконалена методика аплікації розчинів на нейрон. Це дозволило скоротити одноразову експозицію глутамату до мілісекундних інтервалів, що відповідає фізіологічному часу реалі-

зації синаптичної передачі в живому організмі. Завдяки цьому вдалося імітувати викликану ритмічну активність нейрона і детальніше охарактеризувати конформаційні переходи між активованим і десенситизованим станами рецепторів.

Мета роботи: вивчення конформаційних перехідних процесів в глутаматактивованих рецепторних комплексах і дослідження фармакологічної дії 2-аміно-4-фосфомасляної кислоти та її синтетичних структурних аналогів на глутаматні рецептори

Основні задачі дослідження:

1) розробити методіку короточасної нетравматичної аплікації агоністів на ізольований клітинний нейронний препарат;

2) оцінити фармакологічну дію 2-аміно-4-фосфомасляної кислоти та її структурних аналогів на глутаматні рецептори мембрани ізольованих нейронів гіпокампу;

3) за допомогою методіки короткотривалої аплікації глутамат" отримати відомості про динаміку конформаційних процесів в глутаматрецептивних комплексах під час збудження нейронів глутаматом;

4) на базі отриманих результатів побудувати априорну схему різних конформаційних станів глутаматрецептивного комплексу;

5) оцінити вплив десенситизації глутаматрецептивних комплексів на амплітуду активованих глутаматом струмів при імітації ритмічного збудження нейрона.

Наукова новизна. В роботі вперше наведені результати аналізу фармакологічної дії блокатора синаптичної передачі 2-аміно-4-фосфомасляної кислоти (AP4) на ГР ізольованих нейронів. Вони свідчать про відсутність блокуючої дії AP4 щодо ГР на рівні постсинаптичної мембрани. Вперше показано, що аплікація AP4 здатна активувати ГР за припущенням переважно NMDA типу. Зроблено висновок про відсутність будь-якого впливу AP4 на рецептори не-NMDA типу.

Створена оригінальна методіка дослідження хемоактивованої провідності нейронів уможливила скорочення періоду аплікації агоністів на мембрану до одиниць мілісекунд. Це дозволило досліджувати кінетичні і релаксаційні характеристики глутаматактивованих струмів, на базі яких проаналізовано динаміку конформаційних перетворень ГРК. Отримані результати дозволили деталізувати умови, необхідні для виходу ГР не-NMDA типу з десенситизованого стану.

Під час аплікації глутамату серіями імпульсів досліджені характерні інтервали частот, за яких десенситизація ГР істотно впливає на амплітуду струмів ритмічно збуджуваного нейрона. Подібні експерименти раніше не проводились.

Теоретичне та практичне значення роботи. Отримані результати дозволяють трактувати механізм блокувчої дії AP4 на рівні пресинаптичної, на відміну від постсинаптичної мембрани. Більш детально охарактеризовано стан десенситизації ГР. Створення методики короткотривалої аплікації дозволяє працювати з ізольованим нейроном в реальному темпі проведення синаптичної передачі, що дає змогу вивчати фармакологічні властивості препаратів в умовах, максимально наближених до роботи нейрона *in vivo*. Відомості про дію структурних аналогів AP4 на ГР можуть бути використані для аналізу існуючої класифікації рецепторів і синтезу нових агоністів і блокаторів.

Матеріали роботи доповідались на Всесоюзній нараді "Актуальні питання клітинної біології" (Ленінград, 1969); на Всесоюзному симпозиумі "Іонні канали в біологічних мембранах" (Кара-Даг, 1990); Конференції АН України по Програмі автоматизації наукових досліджень (Київ, 1993).

По матеріалах дисертації опубліковано 7 робіт.

Робота складається із вступу, літературного огляду (I розділ), розгляду методики (II розділ), експериментальної частини (III розділ), обговорення результатів (IV розділ), висновків і списку цитованої літератури.

## 2. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

В першому розділі дисертації зроблено огляд літератури стосовно фізіологічної ролі глутамата, сучасних методів дослідження ГР, класифікації і загального уявлення про функціонування ГР. Розглянуто особливості будови рецепторів. Наведено перелік основних властивостей, притаманних лігандам ГР, серед яких обов'язкова наявність двох кислих і одної основної груп. Основна група повинна знаходитись в  $\alpha$ -положенні до неодмінно присутньої карбоксильної групи. Наявність фосфонової групи надає молекулам властивості блокатора ГР. Серед традиційних блокаторів ГР особливо

відзначається AP4, яка вважається специфічним лігандом окремого типу ГР. Рецептори цього типу знайдені як на пре-, так і постсинаптичних мембранах нейронів. Про механізм блокуючої дії AP4 на синаптичну передачу отримані лише попередні відомості.

До теперішнього часу не існує остаточного уявлення щодо динаміки конформаційних перетворень ГР після взаємодії з лігандом. Добре відома здатність рецептора переходити в десенситизований стан після тривалої взаємодії з молекулою ліганда, але детальна характеристика, як і фізіологічне значення цього стану знаходяться в процесі вивчення.

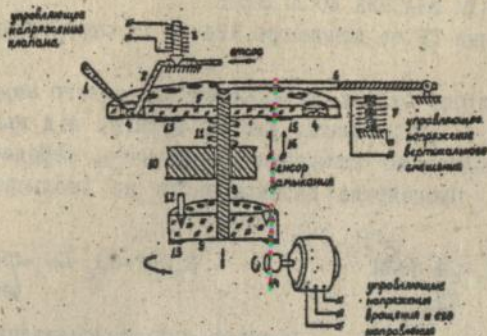
### 3. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В другому розділі викладено особливості використаних і розроблених під час виконання роботи методик, склади розчинів і перелік використаних матеріалів.

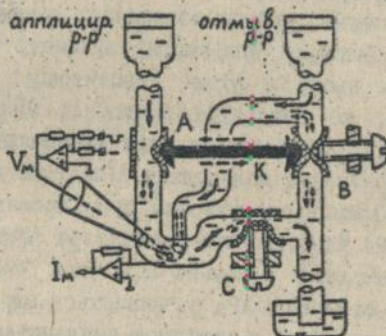
Дослідження ГР проводились на ізольованих перфузованих нейронах гіпокампа щурів. Для випробування фармакологічних властивостей AP4 та її структурних аналогів була використана удосконалена методика швидкої аплікації розчинів (методика "фіксації концентрації"). Автоматизація задання режимів проведення експериментів і протоколювання результатів забезпечувалася за допомогою спеціально розробленого програмного забезпечення і змонтованого електронного обладнання на базі IBM AT/286 комп'ютера (мал.1).

Для вивчення динаміки конформаційних перетворень ГР була розроблена методика короткотривалої аплікації агоністів (мал.2). Експлуатаційний діапазон тривалості аплікації випробуваних розчинів на нейрон - від 6-8 мілісек до 300 мілісек. Для повної зміни розчинів навколо нейрона витрачалось до 10 мілісек. За допомогою методики короткотривалої аплікації було реалізовано можливість аплікації глутамату на нейрон парними імпульсними з міжімпульсними інтервалами від 60 до 200 мілісек і ритмічної аплікації з частотами до 15 Гц.

Використані при проведенні роботи AP4 і її структурні аналоги були синтезовані у відділі тонкого органічного синтезу Інституту біоорганічної хімії та нафтохімії АН України.



Мал.1 Будова керованого клапана в термомеханічному вузлі автоматичної зміни ванночок з випробуваними розчинами установки для ступінчастої аплікації.



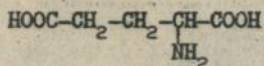
Мал.2 Блок-схема системи короткотривалої аплікації глутамату на ізольований перфузований нейрон.

A - пружний елемент для створення зтиснення і застосування глутаматного розчину в область розташування нейрона. B - пружний елемент для перепускання відсмоктуваного розчину під час аплікації. C - регулятор режиму стаціонарного потоку розчинів. K - двосторонній клапан, ручний за допомогою електромагніту. Суцільними стрілками позначено стаціонарні потоки глутаматного і відсмоктуваного розчинів; уривчастими - переміщення клапана і у відповідності з цим стовбчиків розчинів під час аплікації і відсмоктування.

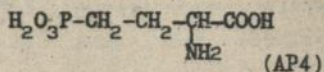
### 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 3.1. Вивчення ГР за допомогою AP4 та її структурних аналогів.

AP4 має подібну будову до молекули природного медіатора синаптичної передачі - L-глутамата. Але на відміну від нього, застосування AP4 призводить до блокування синаптичної передачі між нейронами гіпокампа. Проведення експериментів на ізольованому нейроні



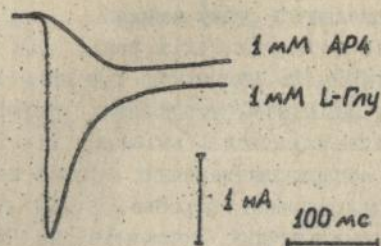
глутамінова к-та



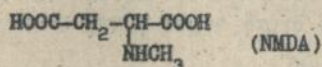
2-аміно-4-фосфономасляна к-та

фактично означає дослідження лише постсинаптичної мембрани, що суттєво уточнює локалізацію фармакологічної дії AP4.

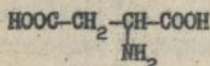
В першу чергу було проведено експерименти по перевірці блокуючої дії AP4. З цією метою після попереднього контрольного запису глутаматактивованого струму, нейрон оброблявся розчином, який міщував 1 ммоль/л AP4. Повторна аплікація глутамату проводилась на фоні підтримуваної на цьому ж рівні концентрації AP4. Отримані результати засвідчили, що амплітуда повторних записів глутаматактивованих струмів на 20-30 % менше, ніж контрольних. Чи означає це насправді прояв блокування молекулами AP4 ГР постсинаптичної мембрани? Для перевірки цього питання було проведено тестування наявності у молекул AP4 властивостей активатора рецепторів. З цією метою запис струму проводився в момент аплікації AP4. З'ясувалося, що в момент аплікації на нейрон AP4 розвивається струм, подібний за формою до глутаматактивованого з помітною тенденцією до десенситизації (мал.3). Амплітуда струмів, активованих AP4 складала до 30 % амплітуди струмів, активованих L-глутаматом. Таким чином, молекули AP4 слід розглядати як часткові активатори ГР постсинаптичної мембрани. Результати ж попередньої серії експериментів пояснюються десенситизацією значної частини ГР, які провзаємодіяли з молекулами AP4, що призводило до зменшення амплітуди глутаматактивованого струму при повторній аплікації глутамату.



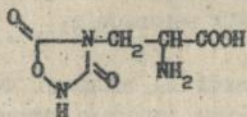
Мал.3 Записи струмів нейрона, активованих L-глутаматом (1 ммоль/л), і AP4 (1 ммоль/л).



N-метил-D-аспарагінова к-та



аспарагінова к-та



квісквалова к-та (KBK)

В сучасній класифікації ГР основний розподіл проводиться між селективними до NMDA, і рецепторами не-NMDA типу. Природним активатором NMDA-рецепторів в організмі вважається L-аспартат (L-асп). Одним з найбільш селективних активаторів не-NMDA-рецепторів є квісквалат (KBK). L-асп і KBK були вжиті в наступних експериментах, метою яких було з'ясування типу рецепторів, здатних активуватися AP4.

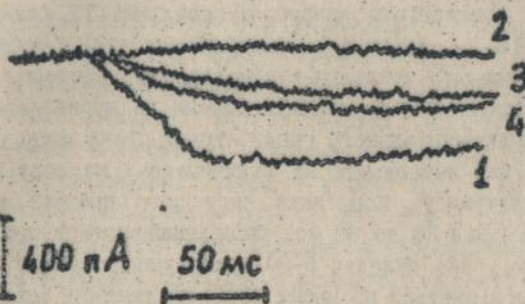
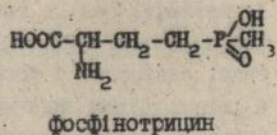
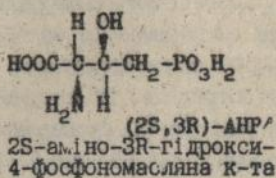
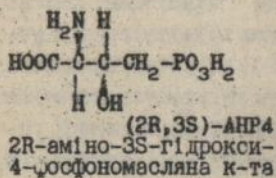
Схема експериментів включала: попередню контрольну аплікацію на нейрон розчину KBK ( $10^{-4}$  моль/л), або L-асп (1 ммоль/л) і запис

збуджуваного струму; короткочасну преінкубацію нейрона в розчині AP4 (1 ммоль/л); повторну аплікацію розчину з KBK / L-асп на фоні підтримуваної концентрації AP4; відмивання нейрона і прикінцевий контрольний запис KBK / L-асп -активованого струму для перевірки вивільненості функціонального стану нейрона.

Аналіз результатів засвідчив, що в разі, коли в ролі агоніста виступала KBK, присутність в оточуючому розчині AP4 практично не впливала на амплітуду квісквалатактивованих струмів. Це фактично свідчить про відсутність ефективною взаємодії AP4 з не-NMDA рецепторами. Спостереження аспартатактивованих струмів нейронів, виділених за допомогою ферментативної обробки, більш ускладнене через негативний вплив протеолітичних ферментів на NMDA рецептори. Незважаючи на це, серія результативних експериментів по викладеній вище схемі була проведена з використанням L-асп в ролі агоніста. В більшості експериментів попередня інкубація нейрона в розчині AP4 і присутність AP4 під час аплікації L-асп призводила до зникнення аспартатактивованих струмів. Це можна пояснити активацією NMDA рецепторів молекулами AP4 з подальшою їх десенситизацією під час преінкубації нейрона в розчині AP4. Аплікація L-асп в таких умовах неспроможна збудити аспартатактивований струм через повну десенситизацію NMDA рецепторів.

Зважаючи на виявлені фармакологічні властивості AP4, цілком обґрунтованим повстало питання дослідження наявності аналогічних властивостей у структурних аналогів AP4. Серед них були випробувані наступні сполуки: 2R-аміно-3S-гідрокси-4-фосфономасляна к-та / (2R,3S)-АНР4/ ; 2S-аміно-3R-гідрокси-4-фосфономасляна к-та / (2S,3R)-АНР4/ і фосфінотрицин. В першу чергу була випробувана їх здатність бути активаторами ГР. З цією метою аплікація розчинів цих сполук, а також AP4, в концентрації 1 ммоль/л, супроводжувалась одночасним записом струмів нейрона. Характерні записи подані на мал.4. Виявилось, що здатність збуджувати струми, подібні до AP4-активованих проявляють (2S,3R)-АНР4 і фосфінотрицин. Однак амплітуда цих струмів в 2-3 рази менша за амплітуду AP4-активованих. Серед інших спостережуваних особливостей слід відзначити відсутність тенденції до десенситизації у (2S,3R)-АНР4-активованих стру-

мів і наявність такої тенденції у фосфінотрицин-активованих струмів.



Мал.4. Записи струмів одного з нейронів при аплікації розчинів:  
1 - АНР4; 2 - (2R,3S)-АНР4; 3 - (2S,3R)-АНР4; 4 - фосфінотрицина в  
концентрації 1 ммол/л.

З метою перевірки здатності (2R,3S)-АНР4, (2S,3R)-АНР4 і фосфінотрицина десенситизувати ГР, була проведена серія експериментів з застосуванням попередньої преінкубації нейрона в розчинах цих сполук (1 ммоль/л). Основним контрольним агоністом служив L-глутамат. Результати експериментів засвідчили відсутність відчутної здатності (2S,3R)-АНР4 десенситизувати ГР і часткову наявність такої здатності у фосфінотрицина. Ці результати цілком узгоджуються з результатами попередньої серії експериментів. Дещо відмінні результати отримані стосовно (2R,3S)-АНР4. Преінкубація нейронів в розчині (2R,3S)-АНР4 не призводила до відчутних змін глутаматактивованого струму. Але після відмивання (2R,3S)-АНР4 спостерігалось деяке зменшення глутаматактивованих струмів, амплітуда яких повністю відновлювалась лише на протязі декількох хвилин.

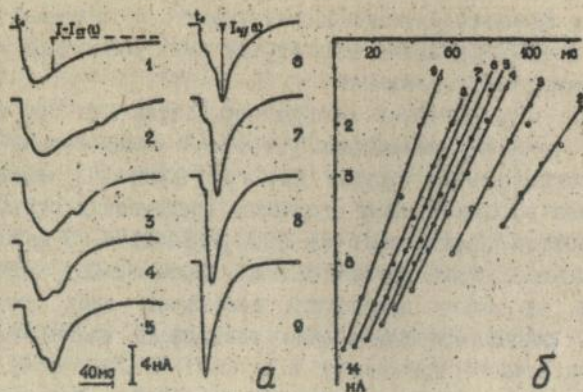
### 3.2. Дослідження не-NMDA рецепторів з використанням методики короткотривалої аплікації L-глутамата.

Чи не найзагадковішим явищем в поведінці ГР, як і багатьох інших рецепторів, є здатність десенситизуватися, тобто втрачати чутливість при занадто тривалій взаємодії з молекулами агоніста. На записі глутаматактивованого струму нейрона це проявляється в наявності стадії експоненціального спаду струму після досягнення максимальної амплітуди, незважаючи на підтримувану на постійному рівні концентрацію глутамату. Константа часу цього процесу для різних нейронів складає від 20 до 80 мс. Спад припиняється при досягненні амплітуди струму, яка складає 5-30 % від максимального значення і далі струм стабілізується на цьому рівні на протязі всього часу дії глутамату. Деякі фармакологічні препарати здатні істотно впливати на характер розвитку десенситизації, але механізм цієї дії невідомий. До теперішнього часу остаточно не з'ясована природа залишкового стабільного компонента струму, як і не до кінця охарактеризований конформаційний стан ГРК, який обумовлює явище десенситизації.

Застосування методики короткотривалої аплікації дозволяє здійснювати швидке відмивання глутамату на різних етапах розвитку десенситизації струму. Це дало змогу вивчати перехідні процеси в ГРК шляхом аналізу ділянок релаксації струмів. Експлуатаційні характеристики установки забезпечували в п'ять разів швидкий темп

відмивання нейрона, ніж розвиток релаксації струмів. Через це більша частина ділянки релаксації струмів була придатна для достовірного аналізу. В цій частині роботи ішлося лише про не-NMDA рецептори, оскільки вони є найбільш швидкими, і встигають після активації досягнути значного ступеня десенситизації в інтервалі 300 мс, що є робочим діапазоном установки. Роботу NMDA рецепторів було заблоковано стандартними способами.

Одне з дискусійних сьогоденних питань є: чи мають спільну природу початковий динамічний і кінцевий стаціонарний компоненти глутаматактивованого струму? Проблема полягає в можливості накладання один на одного двох одночасно збуджуваних струмів, обумовлених роботами різних типів не-NMDA рецепторів. З метою дослідження цього питання були проаналізовані релаксаційні криві на різних ділянках, де можна припустити накладання двох струмів (мал.5). Отримані результати однозначно засвідчили наявність лише одного експоненціального компоненту в процесі спаду струму до нульового рівня після відмивання глутамату (мал.5,Б). Заслужовує на увагу помітне збільшення константи часу релаксації зі збереженням одноекспоненціального характеру спаду струмів в процесі переходу більшої частини рецепторів в десенситизований стан. Характерним явищем слід відзначити (мал.5,А) сплеск струму (off-компонент), який виникав в момент відмивання глутамату. В результаті спеціально проведеного дослідження було з'ясовано, що походження off-компоненту не пов'язане з роботами додаткової групи рецепторів. Воно може бути пояснене або швидкою конформаційною перебудовою іонного каналу в момент дисоціації молекул глутамата з рецепторів, або виникненням інструментального ефекту. Важливим спостереженням виявилася суворя кореляція між ступенем спаду струму внаслідок десенситизації рецепторів і амплітудою off-компоненту. Можливо спостерігати off-компонент повністю зникала при досягненні стаціонарного рівня глутаматактивованого струму, що ототожнюється з досягненням стабільного рівня десенситизації рецепторів. Це дозволило зробити важливі висновки при охарактеризуванні десенситизованого конформаційного стану не-NMDA рецептора незалежно від природи виникнення off-компонента струму.



Мал.5 Дослідження характеристик релаксації струмів до нульового рівня після відмивання глутамату при скороченні часу його аплікації

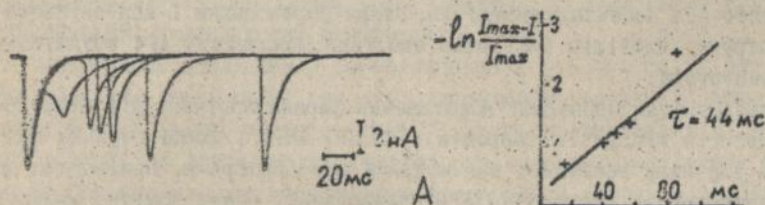
А. Записи струмів при різних термінах аплікації глутамату (1 → 9: скорочення терміну аплікації).

Б. Спрямлені ділянок релаксації струмів із записів частини (А). Амплітуди струмів, відміряні на релаксаційних кривих з інтервалом 10 мс, подані в напівлогарифмічних координатах. Прямі проведено методом найменших квадратів.

### 3.3. Дослідження десенситизації не-NMDA рецепторів перними аплікаціями і серіями аплікацій глутамату.

Кінетичні процеси, пов'язані з переходом рецепторів від активованого до десенситизованого стану цілком зручно вивчати, аналізуючи ділянку переходу від динамічного до стаціонарного компонентів глутаматактивованого струму. Набагато важче вивчати кінетику виходу рецепторів з десенситизованого стану. Методика корототривалої аплікації надала можливість провести ряд дослідів з цього питання. З цією метою аплікація глутамата на нейрон

проводилась парними короткими імпульсами зі зміною інтервалу між першим і другим імпульсами (мал.6,А). Десенситизація не-NMDA рецепторів, збуджених першим імпульсом, призводила до відчутного зменшення амплітуди струму від наступного імпульсу якщо міжімпульсний інтервал не перевищував 100-130 мс. При розгляді повернення рецепторів з десенситизованого (D), недесенситизований (R) стан як реакцію першого порядку  $D \xrightarrow{k_1} R$ , зменшення доли десенситизованих рецепторів в залежності від часу відповідає залежності  $(I_{max}-I(t))/I_{max}=e^{-t/\tau}$ , де  $I_{max}$  - амплітуда струму першого імпульсу аплікації, а  $I(t)$  - амплітуда повторного струму при міжімпульсному інтервалі  $t$ . Напівлогарифмічне представлення величини  $(I_{max}-I(t))/I_{max}$  для записів струмів мал.6,А подане на мал.6,Б.



Мал.6 Дослідження виходу рецепторів з десенситизованого стану.

А. Струми на рона, збуджувані парними імпульсами мінімально коротких аплікацій глутамату зі змінними міжімпульсними інтервалами (t).  
 Б. Залежність величин  $-\ln \frac{I_{max}-I(t)}{I_{max}}$  від t для записів струмів з частини (А).

Отримана оцінка константи часу конформаційного переходу рецепторів з стану D в стан R дуже близька до середніх величин константи часу прямого процесу  $R^* \rightarrow D$ .

Аплікація глутамата на нейрон серіями коротких імпульсів продемонструвала відсутність впливу десенситизації не-NMDA рецепторів на амплітуду струмів при частоті аплікації 5 Гц, невеликий вплив при частоті 8 Гц і значний вплив при частоті більше 10-15 Гц.

#### 4. ОГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ЕКСПЕРИМЕНТІВ

В першу чергу заслуговують на увагу результати досліджень фармакологічних властивостей AP4 через те, що як ефективний блокатор синаптичної передачі, ця амінокислота може стати базою для створення нових антikonгульсантних препаратів. Важливим висновком щодо фармакологічної дії AP4 є фактично цілковита відсутність взаємодії з не-NMDA рецепторами, які обумовлюють швидку передачу сигналів в синапсах. Таким чином, блкуючі властивості AP4 щодо синаптичної передачі між нейронами в гіпокампі слід віднести до неідентифікованої пресинаптичної дії. Окрім цього, вперше продемонстрована можливість AP4 виступати в ролі активаторів ГР. Виходячи з відносно повільної кінетики AP4-активованих струмів і здатності AP4 десенситизувати рецептори-переносники L-Асп-активованого струму, найбільш імовірною здається можливість AP4 збуджувати NMDA рецептори.

Вперше були проведені дослідження фармакологічної дії структурних аналогів AP4 на ГР нейронів. (2S,3R)-АНР4 і фосфінотрицин виявились здатними ефективно взаємодіяти з рецепторами, призводячи до збудження струму схожого на AP4-активований, однак помітно меншої амплітуди. Заслговує на увагу дещо різний характер струмів, активованих (2S,3R)-АНР4 і фосфінотрицином. (2S,3R)-АНР4 активував струм, без помітної тенденції до десенситизації. Це підтвердилось і в експериментах з преінкубацією нейрона в розчині (2S,3R)-АНР4, яка не впливала на амплітуду глутаматактивованих струмів. В протилежність цьому, фосфінотрицинактивований струм проявляє помітну тенденцію до десенситизації. Окрім того, преінкубація нейрона в розчині фосфінотрицина призводила до деякого зменшення глутаматактивованих струмів, що цілком припустимо пояснити десенситизацією NMDA рецепторів, доля яких в сумарному струмі може виявитися невеликою через зазначені в III розділі обставини. Таким чином, можна зробити висновок, що наявність гідроксильної групи у  $\beta$ -вуглецю молекули

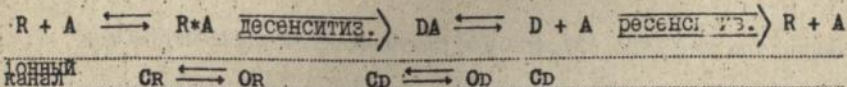
(2S,3R)-АНР4 істотно послаблює її взаємодію з активним центром, відповідальним за десенситизацію рецептора. Відсутність такої групи у молекул АР4 і фосфінотрицина забезпечує їх здатність десенситизувати рецептори. В свою чергу, заміна гідроксильної групи в фосфоновому залишку молекули АР4 метильною призводить до послаблення взаємодії утвореної таким чином молекули фосфінотрицина з рецептором. Без зміни загального характеру цієї взаємодії.

Окремо слід розглянути характер фармакологічної дії (2R,3S)-АНР4. Аплікація (2R,3S)-АНР4 на нейрон не викликала активації струму. Преінкубація нейрона в розчині (2R,3S)-АНР4 помітно не впливала на амплітуду глутаматактивованих струмів, хоча зразу після відмивання (2R,3S)-АНР4, амплітуда цих струмів на протязі декількох хвилин була зменшена. Можливо, це зменшення можна пояснити модулюючим впливом молекули (2R,3S)-АНР4 на регуляторні центри ГР. Існування таких центрів для деяких агентів відомо у NMDA рецепторів. До того ж D-конфігурація  $\alpha$ -вуглецю молекули (2R,3S)-АНР4 надає їй спорідненості з лігандами саме NMDA рецепторів. Протилежна конфігурація молекули (2S,3R)-АНР4 більше споріднює її з молекулою природного активатора L-асп, чим, можливо, і обумовлена здатність (2S,3R)-АНР4 активізувати рецептори.

Проведені дослідження фармакологічної дії АР4 та її структурних аналогів висвітлили, що всі випробувані зразки в більшій чи меншій мірі здатні взаємодіяти з ГР, причому характер цієї взаємодії різний. Це дозволяє сподіватись, що отримані результати можуть стати основою для наступного цілеспрямованого вивчення відзначених особливостей за допомогою цих і інших синтезованих фармакологічних препаратів.

Результати експериментів, проведених з застосуванням методики короткотривалої аплікації глутамату, можуть прислужитися для більш детального уявлення про динаміку конформаційних перетворень в не-NMDA ГРК при взаємодії його рецепторної частини з молекулою L-глу. Складний малюнок розвитку глутаматактивованого струму нейрона породжує чимало припущень щодо природи його походження. Черіdko наявність стаціонарної фази струму, яка лишається після градуального зменшення динамічного компоненту струму, внаслідок десенситизації рецепторів, розглядають як наслідок встановлюваної рівноваги між десенситизованою і недесенситизованою формами рецепторів. Прий-

маючи до уваги відношення амплітуди стаціонарного компоненту до максимальної величини струму, в деяких випадках слід було б припустити, що недесенситизованими лишаються до 30% рецепторів при високій підтримуваній концентрації L-глу. Результати представленої роботи заперечують правомірність подібного розгляду стосовно не-NMDA рецепторів. В першу чергу слід відзначити, що спостережувана одноекспоненціальність кривих релаксації струмів на ділянці переходу від динамічного до стаціонарного компонентів струму підтверджує припустимість розгляду складної поведінки струму як результат роботи єдиної поглядії не-NMDA рецепторів. Далі - нагадати про сувору кореляцію темпів зменшення амплітуди off-компонентів струму і ділянки розвитку десенситизації струму. Це ознака прямого зв'язку між недесенситизованим станом рецепторів і спроможністю їх внеску в генерацію off-компоненту при внесенні в систему збудження в момент відмивання глутамату. Неможливість спостереження off-компоненту при досягненні стаціонарного рівня залишкового струму свідчить про те, що на цьому етапі розвитку струму всі рецептори знаходяться в однотипному конформаційному стані, який ототожнюється зі станом десенситизації. В такому випадку амплітуда стаціонарного залишкового компоненту не може розглядатись мірою кількості недесенситизованих рецепторів. Навіть якщо припустити, що генерація off-компоненту виникає внаслідок інструментального ефекту додаткової аплікації глутамату, згідно з законом Ле-Шательє, повинно спостерігатись тимчасове зміщення встановленої рівноваги. Таким чином, наявність залишкової фази струму може бути пояснена існуванням конформаційного стану, в якому керований не-NMDA рецептором іонний канал або відкривається рідше, або його елементарні струми досягають менш і амплітуди, ніж в початковий момент збудження рецептора. В цьому конформаційному стані спинається вся популяція не-NMDA ГРК при відносно тривалій взаємодії з молекулами L-глу. Для виходу з цього стану обов'язково необхідна стадія відмивання глутаматного розчину. Експерименти з аплікацією L-глу парними імпульсами засвідчили, що темп виходу зі стану десенситизації практично співпадає з темпом його попереднього розвитку. В результаті динаміку конформаційних перетворень не-NMDA ГРК можна подати узагальненою схемою:



де R, R·A і DA є початковий, збуджений і десенситизований стани рецептора; A - молекула активатора (L-глу); CR і OR - закритий і відкритий стани іонного каналу збудженого рецептора, CD і OD - закритий і відкритий стани іонного каналу, що відповідають конформаційному стану DA.

## 5. ВИСНОВКИ

1. Молекули блокатора синаптичної передачі 2-аміно-4-фосфоноаміно-масляної кислоти (AP4) здатні активувати один з типів збуджувачих глутаматних рецепторів мембран нейронів гіпокампа. Збуджені молекулами AP4 рецептори мембрани нейронів гіпокампу не відносяться до не-NMDA типу глутаматних рецепторів.
2. Структурні аналоги AP4 - 2S-аміно-3R-гідрокси-4-фосфономасляна к-та та фосфінотрицин є слабкі агоністи AP4-активованих рецепторів. Молекули 2R-аміно-3E-гідрокси-4-фосфономасляної к-ти не здатні активувати ці рецептори, але проявляють десенситизувачу активність.
3. Стаціонарний компонент десенситизованого струму, збудженого глутаматними рецепторами не-NMDA типу, не являє собою аддитивний вклад додаткової групи рецепторів, що не здатні десенситизуватися.
4. Відношення стаціонарної складової десенситизованого струму, збудженого рецепторами не-NMDA типу, до початкового максимального його значення не віддзеркалює міру встановленої рівноваги між недесенситизованою і десенситизованою формами рецепторів. При досягненні стаціонарного рівня струму вся популяція рецепторів знаходиться в однотипному конформаційному стані.
5. Перехід не-NMDA рецепторів у стан десенситизації є незворотнім. Для виходу рецепторів з цього стану необхідна стадія дисоціації молекули агоніста з рецептора. Вихід не-NMDA рецепторів із стану десенситизації є повільним в тій же мірі, що і розвиток десенситизації. Константа часу цього процесу складає біля 40 мс.
6. При збудженні нейрона глутаматом з частотой більше 10 Гц, десенситизація не-NMDA рецепторів обумовлює прогресивне пригнічення

амплітуди ритмічно збуджуваних глутаматактивованих струмів.

Список робіт, опублікованих за темою дисертації.

1. Преварская Н.Б., Рыбальченко В.В., Скрыма Р.Н. Связь аспартатных и глутаматных рецепторов с полифосфоинозитидной трансдуцирующей системой в нейронах гиппокампа // Цитология, 1989, Т.XXXI, №9, с.1115-1120.
2. Рыбальченко В.В., Преварская Н.Б., Скрыма Р.Н., Мартыщенко Д.И. Возможная модель функционирования воротных механизмов глутаматактивируемых рецепторных комплексов нейронов гиппокампа // Ионные каналы в биологических мембранах. Тезисы докладов Всесоюзного Симпозиума. Кара-Даг, 1990, Тип.ВАСХНИЛ, с.76.
3. Рыбальченко В.В., Преварская Н.Б., Скрыма Р.Н., Луйк А.И. Механизм дифференцирования длительности воздействия L-глутамата на уровень одиночного нейрона гиппокампа // Ионные каналы в биологических мембранах. Тезисы докладов Всесоюзного Симпозиума. Кара-Даг, 1990, Тип.ВАСХНИЛ, с.77.
4. Рыбальченко В.В., Преварская Н.Б., Скрыма Р.Н., Луйк А.И., Кухарь В.П. Современные представления о механизмах передачи сигнала в глутаматуправляемых рецепторных комплексах // В сборн. "Биохимия животных и человека", 1992, Вып.16, Київ, Наукова думка, с.44-56.
5. Рыбальченко В.В., Преварская Н.Б., Скрыма Р.Н., Луйк А.И. Эффекты кратковременной аппликации глутаматсодержащего раствора на изолированные нейроны гиппокампа крыс // Нейрофизиология, 1992, Т.24, №4, с.491-495.
6. Рыбальченко В.В., Преварская Н.Б., Скрыма Р.Н., Луйк А.И. Исследовательские выходы не-NMDA-рецепторов нейронов гиппокампа из состояния десенситизации с использованием парной и ритмической аппликации глутамата // Нейрофизиология, 1992, Т.24, №6, с.713-716.
7. Кухарь В.П., Луйк А.И., Свистунова Н.В., Скрыма Р.Н., Рыбальченко В.В., Белоконь Ю.Н., Кузьмина Н.А. Асимметрический синтез и изучение специфической биоактивности (2R,3S)- и (2S,3R)-2-амино-3-гидрокси-4-фосфономасляных кислот // Хим.-Фарм. журнал, 1993, №1, с.31-34

ПОШУКУВАЧ

*Р.Р.Рибальченко*



**АВ 28.988**