

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ФИЗИОЛОГИИ И БИОХИМИИ
ИМ. И.М. СЕЧЕНОВА РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ДРОНЬ МИХАИЛ ЮРЬЕВИЧ
ИССЛЕДОВАНИЕ НОВЫХ ТИПОВ АНТАГОНИСТОВ
ИОНОТРОПНЫХ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

1.5.5. – Физиология человека и животных

Диссертация

на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель: к.б.н., в.н.с. Барыгин Олег Игоревич

Научный консультант: академик РАН, Заслуженный деятель

науки РФ, д.м.н., профессор Спасов Александр Алексеевич

САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

2024

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	8
Глава	1.
ЛИТЕРАТУРЫ	ОБЗОР 15
1.1. Физиология ионотропных глутаматных рецепторов.....	15
1.1.1. Рецепторы глутамата – их разнообразие, классификация и субъединичная организация.....	15
1.1.2. Доменная организация субъединиц ионотропных глутаматных рецепторов и их трансмембранная топология.....	17
1.1.3. Обмен и синаптическая передача глутамата.....	19
1.1.4. Функционирование и кинетические процессы ионотропных глутаматных рецепторов.....	24
1.2. Фармакология ионотропных глутаматных рецепторов.....	25
1.2.1. Многообразие лигандов ионотропных глутаматных рецепторов и проблема поиска клинически-толерантных блокаторов.....	25
1.2.2. Кинетика блокады ионотропных глутаматных рецепторов.....	27
1.3. Механизмы ингибирования ионотропных глутаматных рецепторов.....	30

1.3.1.				Конкурентный	
антагонизм.....					30
1.3.2.	Бесконкурентный	антагонизм:	блокада	ионного	
канала.....					36
1.3.3.	Неконкурентный	антагонизм:		аллостерическая	
модификация.....					45
1.4.	Заключение.....				52
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....					54
2.1.				Используемые	
растворы.....					54
2.2.	Приготовление	срезов	мозга	и экстракция	
нейронов.....					54
2.3.	Регистрация	трансмембранных		ионных	
токов.....					56
2.4.	Методы	обработки	и	представления	
данных.....					57
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ					
ОБСУЖДЕНИЕ.....					61
3.1.	Поиск блокаторов ионотропных глутаматных рецепторов в ряду				
диазепинбензимидазолов.....					61
3.1.1.	Скрининг			производных	
диазепинбензимидазолов.....					61
3.1.2.	Исследование концентрационной зависимости ДАБ-19 для NMDAR,				
КН- и КП-AMPA.....					68

3.1.3. Описание механизмов действия ДАБ-19 на NMDA-рецепторы.....	71
3.1.4. Описание механизмов действия ДАБ-19 на кальций-непроницаемые AMPA-рецепторы.....	77
3.1.5. Описание механизмов действия ДАБ-19 на кальций-проницаемые AMPA рецепторы.....	83
3.1.6. Заключение по разделу.....	88
3.2. Верификация результатов <i>in silico</i> анализа соединений, сконструированных для связывания с сайтом ифенпродила, производных бифенила.....	90
3.2.1. Заключение по разделу.....	93
3.3. Поиск блокаторов AMPA-рецепторов в ряду противоэпилептических соединений.....	95
3.3.1. Скрининг антиконвульсантов.....	95
3.3.2. Исследование концентрационной зависимости фенитоина и пентобарбитала для КП- и КН-AMPA-рецепторов.....	97
3.3.3. Сравнение эффективности действия фиксированной концентрации фенитоина в диапазоне концентраций агониста.....	100
3.3.4. Способность фенитоина оставаться в закрытой поре КН-AMPA-рецептора.....	101
3.3.5. Оценка активности фенитоина и пентобарбитала в присутствии циклотиазида.....	103

3.3.6.	Заключение	по
разделу.....		105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		106
ВЫВОДЫ		108
СПИСОК		
ЛИТЕРАТУРЫ		109

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

5,7-DCKA – 5,7-дихлоркинуреновая кислота

7-CKA – 7-хлоркинуреновая кислота

ADAR2 – изоформа 2 аденозиндезаминазы

AMPA – рецепторы к α -амино-3-гидрокси-5-метил-4изоксазолпропионовой кислоте

ATD – аминотерминальный домен

AV-101 – L-4-хлоркинуренин

CGP-78608 – [(1S)-1[(7-бromo-2,3-диоксо-1,4-дигидрохиноксалин-5-ил)метиламино]этил] фосфоновой кислоты гидрохлорид

CGS-19755 – цис-4-фосфометил-2-пиперидин карбоновая кислота

CNQX – 6-циано-7-нитрохиноксалин-2,3-дион

CPP – (\pm)-3-(2-карбоксихиперазин-4-ил)пропил-1-фофоновая кислота

CTD – C- терминальный домен

D-AP5 – D-2-амино-5-фосфопентаноат

DCS – D-циклосерин

BGG-492 – селурампанел, N-[7-изопропил-6-(2-метилпиразол-3-ил)-2,4-диоксо-1H-хиназолин-3-ил]-метансульфонамид

DL-AP7 – DL-2-амино-7-фосфоэнантиомерная кислота

DNQX – 6,7-динитрохиноксалин-2,3-дион

EААТ – транспортёр возбуждающих аминокислот

GABA-T – ГАМК-трансаминаза

GAD – декарбоксилаза глутаминовой кислоты

Gln - глутамин

Glu – глутаминовая кислота

GluRs – глутаматные рецепторы

GS - глутаминсинтетаза

KAR – рецепторы к каиновой кислоте

LBD – лиганд-связывающий домен

mGluR – метаботропный глутаматный рецептор

MK-801 - дизоцилпин

NBQX – 2,3-диоксо-6-нитро-7-сульфамоил-бензо[7]хиноксалин

NMDAR – рецепторы к N-метил-D-аспартату

PAG – фосфат-активируемая глутаминаза

PEPA – 4-[2-(фенилсульфаниламино)этилтио]-2,6-дифторфеноксиацетамид

Ro-25-6981 – 4-[(1R,2S)-3-(4_бензилпиперидин-1-ил)-1-гидрокси-2-метилпропил]фенол

SNAT – электрогенные и электронейтральные ко- и антитранспортеры незаряженных аминокислот

SSDH – янтарная полуальдегиддегидрогеназа

TD – трансмембранный домен

VGLUT – везикулярный транспортер глутамата

VAX – вольт-амперная характеристика

ГАМК(GABA) – γ -аминомасляная кислота

ГАМК-A – ионотропный рецептор к ГАМК типа A

ГЭБ – гемато-энцефалический барьер

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИК₅₀ – концентрация (лиганда), вызывающая ингибирование величиной в 50%

КН-AMPA – кальций-непроницаемые AMPA-рецепторы

КП-AMPA – кальций-проницаемые AMPA-рецепторы

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НАМ – негативный аллостерический модулятор

ПАМ – позитивный аллостерический модулятор

СИОЗС – селективные ингибиторы обратного захвата серотонина

СПИД – синдром приобретённого иммунодефицита

ЦАП-АЦП – цифро-аналоговый преобразователь-аналого-цифровой преобразователь

ЦНС – центральная нервная система

ВВЕДЕНИЕ.

Актуальность работы. L-глутаминовая кислота (глутамат) - наиболее важный и наиболее распространённый возбуждающий нейромедиатор центральной нервной системы [1]. Рецепторы к глутамату обнаружены и на постсинаптической, и на пресинаптической мембране химического синапса, и в меньшем количестве на внесинаптических участках плазматической мембраны нейронов и опосредуют глутаматергическую трансмиссию [2,3]. Эти рецепторы регулируют широкий спектр процессов в головном, спинном мозге, а также в периферической нервной системе [4, 5]. После высвобождения из пресинаптических терминалей глутамат способен активировать два негомологичных класса рецепторов: ионотропные (лиганд-управляемые ионные каналы) и метаботропные (рецепторы, связанные с G-белками) глутаматные рецепторы. Как правило, метаботропные рецепторы глутамата выполняют модулирующую функцию, в то время как ионотропные глутаматные рецепторы опосредуют быстрое проведение сигналов [6]. Внутри семейства ионотропных глутаматных рецепторов в свою очередь можно выделить 3 подкласса [7]. Наибольший интерес представляют NMDA и Ca^{2+} -проницаемые AMPA-рецепторы вследствие своей способности пропускать кальций, являющийся одним из универсальных вторичных посредников внутри клеток [8; 9]. Многие патологические состояния являются следствием некорректной работы системы глутаматергической передачи [10; 11]. Отсюда вытекает одна из важнейших фармакологических задач - поиск новых, более избирательных и эффективных антагонистов глутаматных рецепторов. В клинической практике активно используются 3 антагониста ионотропных глутаматных рецепторов. Мемантин, препарат, используемый для лечения болезни Альцгеймера, является селективным блокатором каналов NMDA рецепторов. IC_{50} мемантина для разных подтипов NMDA рецепторов равна примерно 0.5 - 1 μM при потенциале на мембране -80 мВ в отсутствие ионов магния и примерно 5-10 μM при

потенциале на мембране около -30 мВ в присутствии 1 мМ ионов магния [12]. Мемантин способен ингибировать AMPA рецепторы только в существенно более высоких концентрациях. Противосудорожный препарат перампанел является селективным аллостерическим антагонистом AMPA рецепторов. Он одинаково эффективно ингибирует кальций-проницаемые и кальций-непроницаемые AMPA рецепторы [13], а его IC_{50} по разным данным составляет 60 – 7000 нМ. Даже в концентрации 30 μ М перампанел слабо влияет на NMDA рецепторы [14]. Также, в 2019 году управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов одобрило использование энантиомера кетамина в качестве быстродействующего антидепрессанта для интраназального введения. Среди препаратов, используемых для блокады ионотропных глутаматных рецепторов в экспериментальных условиях, стоит упомянуть еще несколько соединений. ИЭМ-1460, полученный Гмиро В.Е. в Институте экспериментальной медицины является селективным блокатором каналов кальций-проницаемых AMPA рецепторов. Его IC_{50} для кальций-проницаемых AMPA рецепторов около 3 μ М, а для NMDA и кальций-непроницаемых AMPA рецепторов больше 100 μ М [15]. DNQX и APV являются селективными конкурентными антагонистами AMPA и NMDA рецепторов, соответственно. IC_{50} для них находятся в субмикромольных/микромольных диапазонах концентраций [16]. Таким образом, насчитывается всего лишь три клинически-толерантных соединения, способных дискретно осуществлять блокаду NMDA, кальций-проницаемых и кальций-непроницаемых AMPA рецепторов в концентрациях ниже 50 μ М. В настоящее время решение задачи поиска новых модуляторов ионотропных глутаматных рецепторов является одним из основных направлений работы междисциплинарной лаборатории нейробиологии и лаборатории биофизики синаптических процессов, в частности в течение последних лет ведётся скрининг широкого ряда соединений (например,

противоэпилептические препараты, соединения, связывающиеся с сайтом связывания ифенпродила NMDA-рецепторов, а так же производные диазепинбензимидазолов) на активность по отношению к ионотропным рецепторам глутамата.

Целью диссертационной работы является поиск, изучение механизмов ингибирования и структурных детерминант блокады ионотропных рецепторов глутамата противоэпилептическими препаратами, производными диазепинбензимидазола, а так же экспериментально синтезированными соединениями – производными бифенила.

Для достижения этой цели были решены следующие задачи:

1. Электрофизиологический скрининг антагонистических эффектов производных диазепинбензимидазола на NMDA- и КН-АМРА-рецепторы.
2. Электрофизиологический скрининг антагонистических эффектов антиконвульсантов на КН- и КП-АМРА-рецепторы.
3. Электрофизиологическая валидация активности соединений – производных бифенила, для которых была предсказана блокада NMDA-рецепторов в области сайта связывания ифенпродила.
4. Электрофизиологическая характеристика механизмов действия ДАБ-19 на NMDA-, КН- и КП-АМРА-рецепторы.
5. Электрофизиологическая характеристика механизмов действия противоэпилептического препарата фенитоина как блокатора КН-АМРА-рецепторов.

Научная новизна.

Было открыто соединение ДАБ-19, обладающее выраженной активностью в отношении NMDA-, КН- и КП-АМРА-рецепторов, а также электрофизиологически описаны его механизмы действия на данные

рецепторы. В мире не существует аналогов, демонстрирующих подобного рода селективность в отношении ионотропных глутаматных рецепторов.

Впервые были обнаружены аллостерические антагонисты NMDA-рецепторов среди производных бифенила.

Для фенитоина, в дополнение к потенциал-зависимым натриевым каналам, была типирована новая мишень: AMPA-рецепторы. Впервые была показана нетипичная селективность фенитоина к КН-AMPA-рецепторам по отношению к КП-AMPA-рецепторам, которой обладает лишь пентобарбитал.

Научно-практическая значимость:

ДАБ-19 является высокоактивным низкоселективным ингибитором ионотропных глутаматных рецепторов и является многообещающим прототипом активной фармацевтической субстанции, проявляющей свои исключительные свойства для снижения эксайтотоксичности у пациентов с заболеваниями нервной системы, при которых осуществляется дисбаланс в активности глутаматергической системы.

Репрофилированное соединение фенитоин может принести значимый вклад в фармакотерапию патологических состояний нервной системы в качестве блокатора AMPA-рецепторов, что имеет прямую практическую значимость в свете способности данного соединения на молекулярном уровне снижать эксайтотоксичность, тем самым предотвращая гибель нейронов. Фенитоин является хорошо зарекомендовавшим себя препаратом, что снижает затраты на его клинические исследования по сравнению с разработкой новых субстанций для нейротерапии. В дополнение, выявленная структурная общность пентобарбитала и фенитоина может быть использована для дизайна и синтеза селективных блокаторов КН-AMPA-рецепторов.

Смоделированные *in silico* производные бифенила дают возможность использовать эти соединения в качестве инструментов изучения самих NMDA-рецепторов и молекулярной фармакологии их аминокислотного домена (АТД). Таким образом, они могут использоваться в качестве прототипа лекарства с целью совершенствования методов прогноза в биоинформатике и дальнейшего исследования NMDA-рецепторов, равно как и быть транслированными в клиническую медицину.

Методология и методы исследования. Эксперименты проводились с использованием электрофизиологических подходов: осуществлялась фиксация потенциала в конфигурации «целая клетка» на изолированных нейронах мозга крыс линии Вистар. Путём вибродиссоциации выделялись пирамидальные нейроны зоны CA1 гиппокампа для исследования NMDA- и Ca^{2+} -непроницаемых AMPA-рецепторов, и гигантские холинергические интернейроны стриатума для исследования Ca^{2+} -проницаемых AMPA-рецепторов. Для модуляции рецепторов в исследовательских целях использовались разнообразные фармакологические агенты, активация NMDA-рецепторов осуществлялась 100 μM NMDA и 10 μM глицина, в то время как активация AMPA-рецепторов реализовывалась аппликацией каината в концентрации 100 μM .

Положения, выносимые на защиту:

- ДАБ-19 является низкоселективным высокоактивным блокатором NMDA-, КН- и КП-AMPA-рецепторов.
- Фенитоин является антагонистом кальций-непроницаемых AMPA рецепторов. Молекулярный механизм действия фенитоина на AMPA-рецепторы совпадает с таковым у пентобарбитала.
- Производные бифенила с высокой активностью блокируют NMDA-рецепторы в сайте связывания ифенпродила.

Апробация работы. Основные положения диссертации были представлены на международных и российских симпозиумах и конференциях: XXIV Санкт-Петербургская Ассамблея молодых ученых и специалистов (Санкт-Петербург, 2019), III объединённый научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2021), конференция российского нейробиохимического общества RUSNEUROCHEM (Санкт-Петербург, 2022), XXIV съезд физиологического общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, 2023).

Личный вклад автора. Автор отобрал и проанализировал литературу, релевантную области исследования. Приведённые результаты, полученные в ходе экспериментов и описанные в диссертационной работе, получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор проводил статистическую обработку экспериментальных данных, осуществлял их анализ и интерпретацию, принимал участие в подготовке публикаций по материалам работы.

Финансовая поддержка работы. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты №20-34-90039, №16-04-01080), субсидии Комитета по науке и высшей школе г. Санкт-Петербурга (диплом серии ПСП №19350). Также работа поддержана средствами Министерства науки и высшего образования РФ (соглашение №075-15-2022-296 о предоставлении гранта в форме субсидий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Павловский центр «Интегративная физиология – медицине, высокотехнологичному здравоохранению и технологиям стрессоустойчивости»», в рамках национального проекта «Наука и университеты»).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 2 в журналах, рекомендованных ВАК РФ, а также получено решение о

выдаче 1 патента РФ на изобретение №2800550 «Блокатор ионотропных глутаматных рецепторов». Список опубликованных статей:

1. Nadezhda S. Temnyakova, Dmitry A. Vasilenko, Oleg I. Barygin, Mikhail Y. Dron, Elena B. Averina, Yuri K. Grishin, Vladimir V. Grigoriev, Vladimir A. Palyulin, Maxim V. Fedorov, Dmitry S. Karlov. Ifenprodil-like NMDA receptor modulator based on the biphenyl scaffold. // *Mendelev Communications*.2020.V.3,I.3,P.342-343.
DOI:10.1016/j.mencom.2020.05.027.
2. Dron MY, Zhigulin AS, Tikhonov DB and Barygin OI. Screening for Activity Against AMPA Receptors Among Anticonvulsants - Focus on Phenytoin. // *Front. Pharmacol.* 2021. T.12. P. 775040.
DOI: 10.3389/fphar.2021.775040.
3. DS Karlov, NS Temnyakova, DA Vasilenko, OI Barygin, MY Dron, AS Zhigulin, EB Averina, YK Grishin, VV Grigoriev, AV Gabriel'yan, VA Aniol, NV Gulyaeva, SV Osipenko, YI Kostyukevich, VA Paulin, PA Popov, MV Fedorov. Biphenyl scaffold for the design of NMDA-receptor negative modulators: molecular modeling, synthesis, and biological activity // *RSC Medicinal Chemistry*. 2022. T. 13. №. 7. P. 822-830.
DOI: 10.1039/d2md00001f.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 126 страницах машинописного текста и состоит из глав: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, список литературы, включающий в себя 156 источников. Работа содержит 4 схемы, 10 формул, 10 таблиц, а также 45 рисунков.

Благодарности. Автор выражает благодарность Карлову Д.С., Диваевой Л.Н. и Морковнику А.С. за сотрудничество в рамках проводимых проектов.

Также автор выражает признательность Шаниной А.В. за помощь в иллюстрировании диссертационной работы.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1. Физиология ионотропных глутаматных рецепторов.

1.1.1. Рецепторы глутамата – их разнообразие, классификация и субъединичная организация.

Органическое соединение, наиболее известное в научной литературе и биохимических справочниках как L-глутамат – протеиногенная аминокислота, которая связывается со специфическими белками нервной системы и выполняет роль медиатора, приводит к деполяризации мембран и оказывает таким образом свои регуляторные влияния [17]. Эти регуляторные влияния осуществляются через два подтипа рецепторов: ионотропные и метаботропные [18]. Метаботропные рецепторы глутамата относятся к суперсемейству рецепторов, сопряженных с G-белками, и осуществляют сигнальную трансдукцию, которая ведет к увеличению синтеза рецепторов к глутаминовой кислоте и обеспечивают медленную реакцию на глутаматергические сигналы, интенсифицируя работу синапса, в то время как лиганд-управляемые ионные каналы обеспечивают мгновенную индукцию трансмембранных ионных токов [19]. На данный момент выделяют 4 типа рецепторов глутамата, 1 из которых относится к метаботропным (mGluR), и 3 – к ионотропным.

Ионотропные глутаматные рецепторы, благодаря развитию фармакологических инструментов, были разделены на NMDAR (они

избирательно отвечают на N-метил-D-аспарат), кальций-проницаемые и кальций-непроницаемые AMPAR (активируются альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовой кислотой) и рецепторы к каинату (они активируются каиновой кислотой). Перечисленные агонисты избирательно активируют глутаматные рецепторы и широко используются в качестве экспериментальных агентов в нейробиологии. Глутамат же, как эндогенный лиганд, с разной силой активирует NMDAR, кальций-проницаемые и кальций-непроницаемые AMPAR и рецепторы к каинату в связи с различной чувствительностью рецепторов к нему. Все три подтипа ионотропных глутаматных рецепторов включают в себя 4 субъединицы - такая вариативность расширяет диапазон функциональных свойств ионных каналов. Таким образом, ионотропные глутаматные рецепторы являются тетрамерами [20]. С позиций субъединичной стехиометрии NMDAR являются исключительно гетеротетрамерами, в то время как AMPAR и каинатные рецепторы могут быть как гетеро-, так и гомотетрамерами [21].

Молекулярное клонирование позволило насчитать порядка 18 генов, являющимися матрицами для синтеза субъединиц, собирающихся в тетрамерные белки. (таб. 1.) NMDA-рецепторы обслуживаются семью генами, AMPAR – четырьмя, рецепторы к каинату – пятью. Принадлежность двух орфанных рецепторов не является точно установленной, однако они имеют высокий уровень гомологии по отношению к другим субъединицам [22].

Стоит также отметить тот факт, что широкое разнообразие субъединиц ионотропных глутаматных рецепторов возможно за счёт механизмов альтернативного сплайсинга, суть которого заключается в пост-трансляционной модификации мРНК субъединиц, что способствует формированию каналов с различными биофизическими свойствами. Ярким примером является способность для AMPA-рецепторов пропускать ионы кальция в зависимости от субъединичного состава – за это свойство

ответственна аденозиндезаминаза-2(ADAR2), которая осуществляет модификацию пре-мРНК GluR2 субъединицы в Q/R сайте, соответствующему 607 остатку, в котором кодон глутамина (Q) преобразуется в кодон аргинина (R). Отредактированные GluR2 (R) субъединицы впоследствии становятся способными формировать кальций-непроницаемые каналы, в то время как GluR2(Q)-содержащие каналы проницаемы для ионов кальция [23]. Изменение биофизических свойств также случится, если, например, сопрягать разные NR2 субъединицы NMDA-рецептора: рекомбинация субъединиц канала приведет к изменению его кинетических свойств и затронет как процессы активации, так и десенситизации [24]. Таким образом, широкая распространенность различных вариаций ионотропных глутаматных рецепторов позволяет лабильно регулировать электрогенные процессы в головном, спинном мозге и периферической нервной системе.

Таблица 1. Гены субъединиц ионотропных глутаматных рецепторов и их локализация на хромосомах человека [1].

Ген	Субъединица	Иные названия	Семейство	Хромосомная локализация
GRIA1	GluA1	GluR-A, GluR1	AMPA	5q31.1
GRIA2	GluA2	GluR-B, GluR2	AMPA	4q32-q33
GRIA3	GluA3	GluR-C, GluR3	AMPA	Xq25-q26
GRIA4	GluA4	GluR-D, GluR4	AMPA	11q22
GRIK1	GluK1	GluR5	KAR	21q22.11
GRIK2	GluK2	GluR6	KAR	6q16.3-q21
GRIK3	GluK3	GluR7	KAR	1p34-p33
GRIK4	GluK4	KA1	KAR	11q22.3
GRIK5	GluK5	KA2	KAR	19q13.2
GRIN1	GluN1	NR1	NMDAR	9q34.3
GRIN2A	GluN2A	NR2A	NMDAR	16p13.2
GRIN2B	GluN2B	NR2B	NMDAR	12p12
GRIN2C	GluN2C	NR2C	NMDAR	17q25
GRIN2D	GluN2D	NR2D	NMDAR	19q13.1-qter
GRIN3A	GluN3A	-	NMDAR	9q31.1
GRIN3B	GluN3B	-	NMDAR	9q13.3

GRID1	GluD1	GluR Δ 1	Орфанные рецепторы	10q22
GRID2	GluD2	GluR Δ 2	Орфанные рецепторы	4q22

1.1.2. Доменная организация субъединиц ионотропных глутаматных рецепторов и их трансмембранная топология.

Первоначальные сведения о структурно-функциональной организации глутаматных рецепторов были получены с использованием методов криоэлектронной микроскопии – Сафферлинг с соавторами описали одиночные, частичные изображения как нативных, так и рекомбинантных AMPA-рецепторов [25]. Также благодаря методам кристаллографии стало возможным описать структуру гомотетрамерного GluA2-рецептора с разрешением 3.6 Å [26]. Полученная информация позволила сделать заключение о наличии у этих структур внутренней двухсторонней вращательной симметрии, а также что глутаматный рецептор есть не что иное, как димер димеров [27]. Четыре субъединицы ионотропного глутаматного рецептора формируют пору в мембране, образуя интегральный белок. Так, например, функциональные NMDA-рецепторы собираются в комплекс по принципу 2NR1+2NR3 или 2NR1+2NR2 [28]. Сравнение последовательностей аминокислот NMDAR, AMPAR и KAR, позволяет сделать выводы о сходстве архитектур в ряду этих рецепторов. Архитектуры эти являются модульными и включают в себя 4 дискретных полуавтономных домена: С-концевого домена (CTD), расположенного интрацеллюлярно, трансмембранного домена (TD), прошивающего мембрану, а также два домена, которые расположены во внеклеточном пространстве: лиганд-связывающего (LBD) и аминоконцевого (ATD), рис. 1. [29].

Такая композиция является следствием молекулярной эволюции белков: живые системы, как про-, так и эукариоты эксплуатировали предшественников ионотропных глутаматных рецепторов с различными

целями - так, например, бактериальные клетки экспрессируют селективный к ионам калия глутаматный рецептор, у растений же глутаматные рецепторы, по всей видимости, участвуют в сигнальной трансдукции при воздействии света, а благодаря модельному организму *Drosophila melanogaster* были описаны схожие ионотропные глутаматные рецепторы, принимающие участие в хеморецепции [30,31,32]. Следует, однако, отметить невысокий уровень гомологии рецепторов, участвующих в обонянии у *Drosophila melanogaster* по отношению к ионотропным глутаматным рецепторам человека (около 30%) [33]. В дополнение также стоит упомянуть и о некоторой гомологии между калиевыми каналами и глутаматными рецепторами млекопитающих, общим предком которых являются бактериальные глутаматные рецепторы, часть аминокислотных последовательностей которых более гомологична первым, а другая – вторым [34].

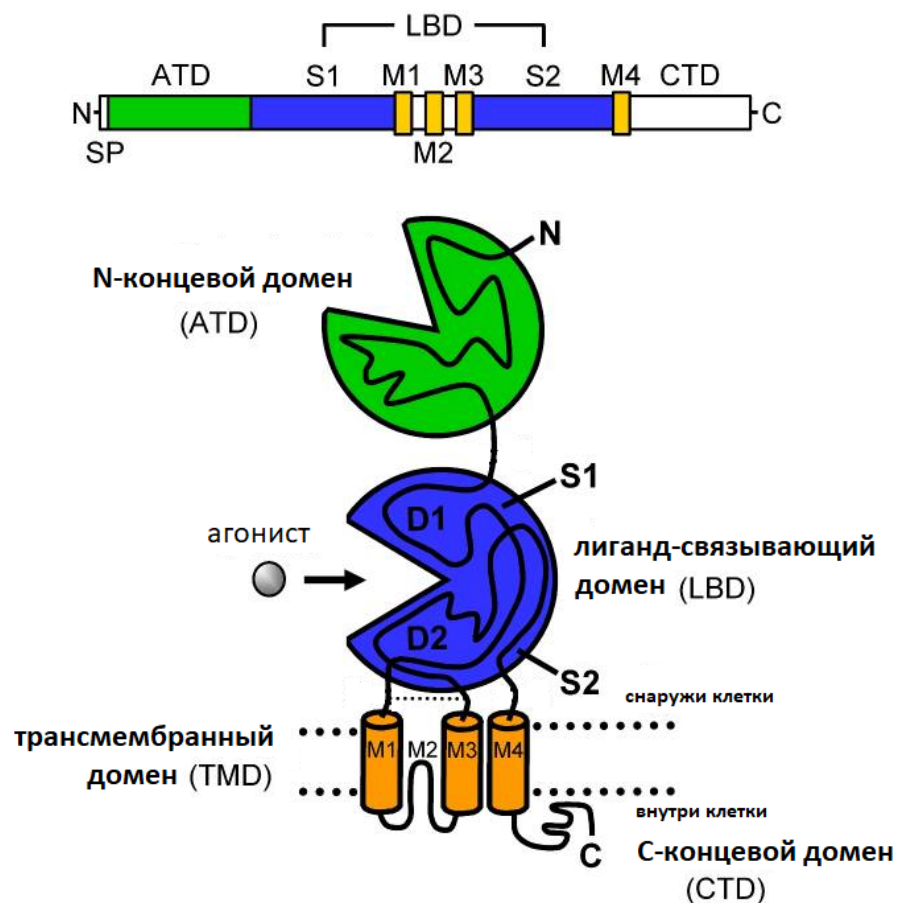


Рисунок 1. Доменная организация ионотропных глутаматных рецепторов. Все субъединицы имеют общую мембранную топологию и включают в себя C-терминальный домен, трансмембранный домен: сегменты M1, M3, M4 + M2, полупрошивающий мембрану, лиганд-связывающий домен (сегменты S1+S2), внеклеточный аминотерминальный домен. Переработано из [29].

1.1.3. Обмен и синаптическая передача глутамата.

Глутамат практически не проходит через гематоэнцефалический барьер и для нужд мозга преимущественно синтезируется нейронами и глией. В синтезе глутамата задействованы реакции окисления глюкозы до α -кетоглутаровой кислоты и последующего трансаминирования. Будучи поглощённым клетками, глутамат может быть израсходован на различные нужды – метаболизироваться (участвовать в синтезе белка, диссимилировать с образованием энергии) или же повторно использоваться в качестве нейромедиатора [35].

В нервных окончаниях повторное использование глутамата осуществляется за счет глутамин-глутаматного (рис.2) цикла и считается основным способом рециркуляции глутамата: в пресинапсе глутамат помещается в синаптические пузырьки везикулярным транспортером глутамата с последующим высвобождением через экзоцитоз (вероятно, глутамат в состоянии выделяться и не везикулярным путем через белки цитоплазматической мембраны). Астроциты, поглощая глутамат из внеклеточной жидкости, трансформируют его в глутамин, который, выделяясь во внеклеточную жидкость, поглощается нейронами и снова превращается в глутамат для последующего его использования. Такая концепция разделения глутамата на два пула была описана в начале 1970-х годов, с последующим доказательством преобладающего глиального синтеза глутамина, когда с использованием методов иммуноцитохимии было

показано, что глутаматсинтаза является ферментом глиии [36]. Также в 2000 году была показана способность нейронов *de novo* осуществлять синтез глутамата [37]. Глутамат в то же время является прекурсором основного тормозного медиатора ГАМК: реакция катализируется декарбоксилазой глутаминовой кислоты в ГАМКергических нейронах. Интересным является факт того, что главные возбуждающие и тормозные системы нейротрансмиссии взаимосвязаны на метаболическом уровне (рис.3)[38]. Глутамат, достигая постсинапса, активирует все возможные не-NMDA рецепторы (AMPA, KAR, mGluR), позволяя току ионов натрия через AMPA и KAR деполяризовать постсинаптическую мембрану. Деполяризация мембраны снимает блок ионами магния NMDA-рецепторов, которые, будучи связанными коагонистом глицином или D-серином (субъединицы NR1) и глутаматом (субъединицы NR2), позволяют ионам кальция проникнуть внутрь клетки-мишени. Коагонисты увеличивают вероятность открытия NMDA-канала, который связан с глутаматом. Осуществляется дальнейшая передача сигнала. Повышение уровня ионов кальция в цитозоле провоцирует ретроградную трансмиссию, влияя на постсинапс. Ретроградный сигнал продуцирует продолжительные изменения, позволяющие пресинапсу испускать большее или меньшее число везикул глутамата с последующей активацией [39].

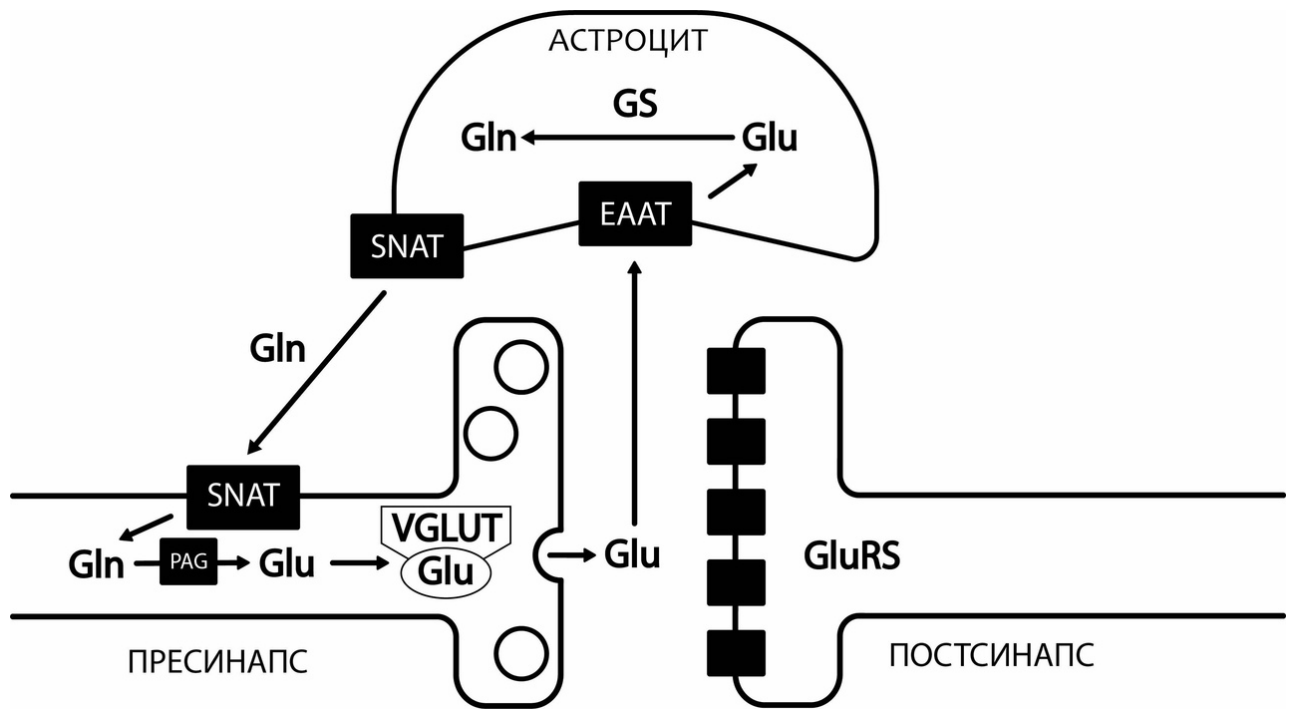


Рисунок 2. Глутамат-глутаминовый цикл. Глутамат, экзоцитозом высвобождаемый везикулами в синаптическую щель, впоследствии захватывается транспортерами возбуждающих аминокислот астроцитов. В астроцитах глутаминсинтетаза преобразует глутамат в глутамин, который транспортируется в пресинаптический нейрон через внеклеточное пространство SNAT системой. В пресинаптическом нейроне глутамин обратно трансформируется в глутамат фосфат-активируемой глутаминазой. Глутамат упаковывается в пресинаптические везикулы везикулярным переносчиком/транспортером глутамата. Сокращения: EAAT, транспортёр возбуждающих аминокислот; Gln, глутамин; Glu, глутамат; GluRs, рецепторы к глутамату; GS, глутаминсинтетаза; PAG, фосфат-активируемая глутаминаза; SNAT, ко- и антитранспортеры незаряженных аминокислот (электрогенные и электронейтральные); VGLUT, везикулярные переносчики глутамата.

Каинатные рецепторы могут экспрессироваться на пресинапсе и также участвовать в регуляции высвобождения глутамата или подавлять торможение, опосредованное рецепторами ГАМК [40,41].

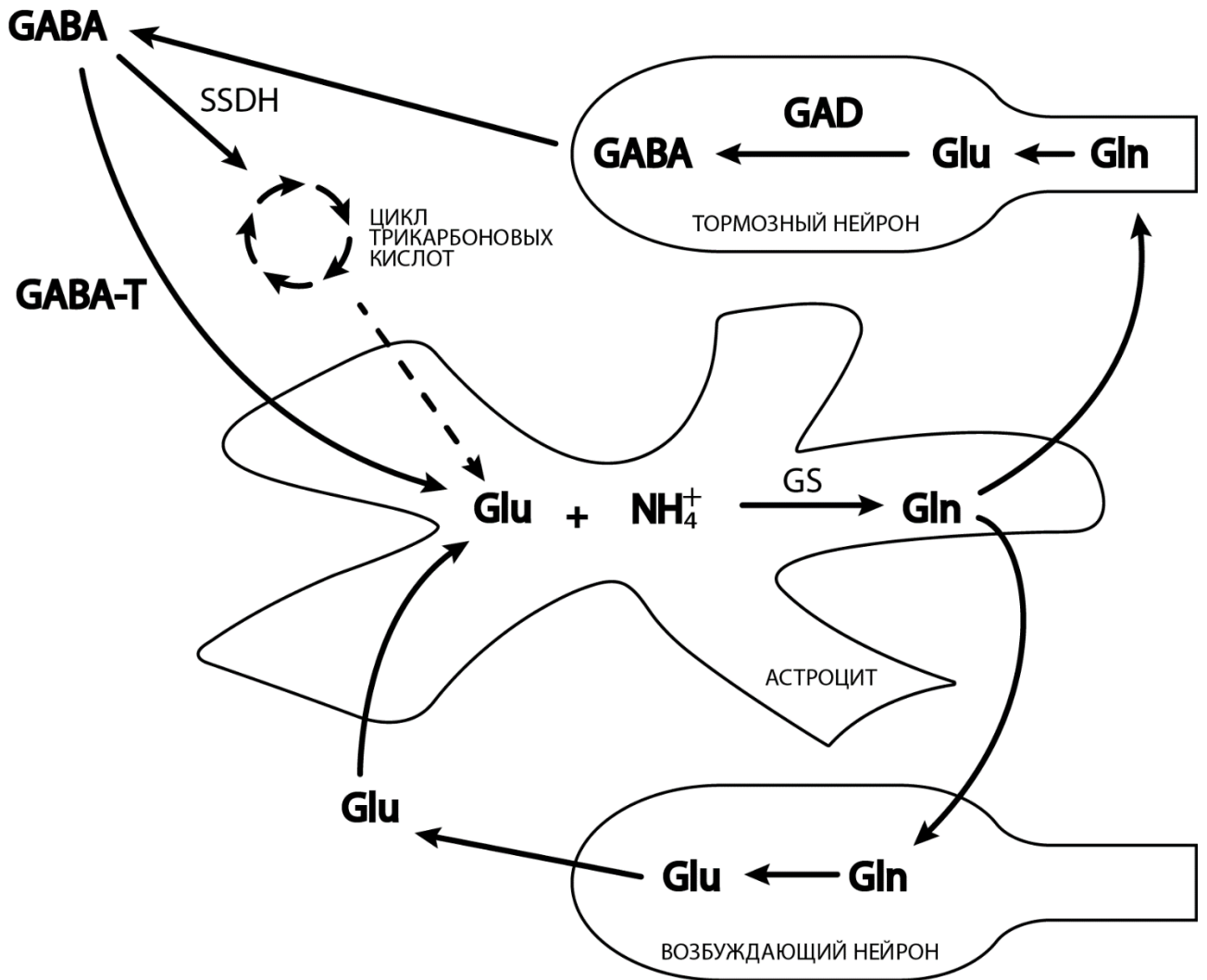


Рисунок 3. Схема обмена медиаторов. Тормозный медиатор ГАМК(GABA) и возбуждающий медиатор глутамат(Glu) имеют схожий пул прекурсоров в обменных путях. В ГАМКергическом нейроне глутамин(Gln) превращается в глутамат, который, в свою очередь, трансформируется в ГАМК под действием декарбоксилазы глутаминовой кислоты(GAD). Эта ГАМК может быть вовлечена в цикл трикарбоновых кислот с участием фермента янтарной полуальдегиддегидрогеназы (SSDH), а также катаболизироваться ГАМК-трансаминазой(GABA-T) в глутамат. Впоследствии глутамин может быть захвачен тормозными или возбуждающими нейронами для последующего синтеза глутамата.

Метаботропные рецепторы глутамата также могут быть расположены как на пре-, так и постсинапсе и являются сопряженными с системами, ответственными за внутриклеточную динамику кальция – инозитолтрифосфатом или аденилатциклазой. Будучи активированными в постсинаптическом нейроне, такие рецепторы могут понижать активность ионотропных рецепторов глутамата или, за счёт передачи сигнала на ядерную ДНК, увеличивать плотность ионотропных глутаматных рецепторов в синаптическом контакте [42,43].

На протяжении всего онтогенеза сложная внутренняя и внешняя клеточная машинерия ставит перед нейронами порой разнонаправленные коммуникативные задачи, которые осуществляются за счет NMDAR и AMPAR. Как следствие субъединичный профиль экспрессии рецепторов, их стехиометрия и взаимная колокализация могут высоко варьировать от одного синаптического контакта нейрона к другому[44], позволяя пластично реагировать на широкий диапазон задач за счёт изменения тех или иных свойств: частота работы каналов, время открытого состояния, способность к входящему выпрямлению[45,46], снижение чувствительности (десенситизация изменяет либо частоту, либо время работы каналов). Так, например, в онтогенетическом отношении у крыс уровень экспрессии NR3A субъединиц значительно выше в молодом возрасте и убывает по мере взросления, тогда как экспрессия NR3B увеличивается со временем жизни животного. Экспрессия NR1 субъединиц стабильна на протяжении всего онтогенеза, но с возрастом имеет тенденцию к падению [47].

1.1.4. Функционирование и кинетические процессы ионотропных глутаматных рецепторов.

Ионотропные глутаматные рецепторы, как и другие ионные каналы, могут быть охарактеризованы тремя принципиальными состояниями, изображёнными на схеме.

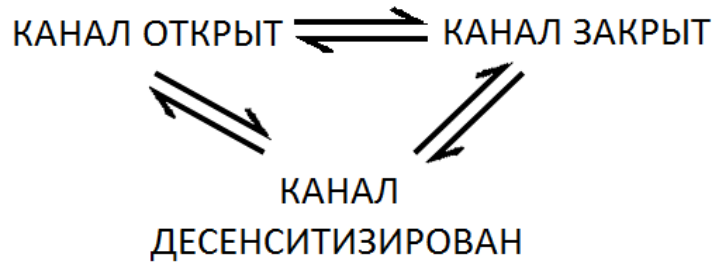


Схема 1. Канал может десенситизироваться обратимым способом, находясь как в открытом, так и в закрытом состояниях. Переработано из [48].

В целом, кинетические процессы, происходящие при активации ионотропных глутаматных рецепторов, можно описать следующей схемой:

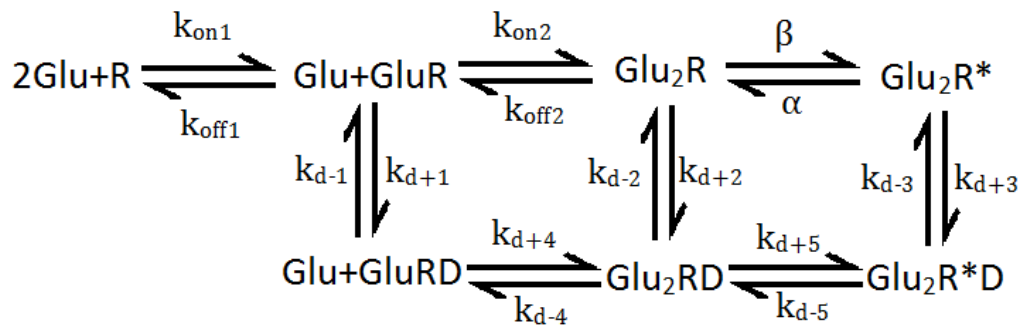


Схема 2. Кинетика ионотропных глутаматных рецепторов [49].

R - ионотропный глутаматный рецептор, GluR - одна молекула глутамата (агониста) связана с рецептором, Glu_2R - две молекулы глутамата связаны с рецептором, Glu_2R^* - канал в открытой конформации, GluRD , Glu_2RD , $\text{Glu}_2\text{R}^*\text{D}$ - ионный канал находится в десенситизированном состоянии, k - константы скоростей реакций.

В таблице 2 описаны кинетические константы скоростей, предложенные Джоной и Лестером, для указанной выше схемы (NMDA и AMPA-рецепторы). Компоненты $\text{Glu}+\text{GluR}$ и Glu_2R , отображённые в схеме 2, демонстрируют переходные состояния при присоединении молекул агониста - в данных точках происходят конформационные изменения, увеличивающие вероятность того, что канал впоследствии откроется. Так как процесс конформационных изменений нестабилен, остается и вероятность перехода

канала в десенситизированное состояние, при котором глутамат связан с каналом, но электрогенные процессы при этом не протекают. Исследования NMDA рецепторов показывают, что таких промежуточных конформаций и соответствующих им кинетических точек может быть и более двух [50].

Таблица 2. Кинетические константы скоростей NMDA и AMPA рецепторов. [51,52].

Константы прямых реакций			Константы обратных реакций		
	AMPA	NMDA		AMPA	NMDA
k_{on} (моль ⁻¹ с ⁻¹)	4.59×10^6	10×10^6	k_{off1} (с ⁻¹)	4.26×10^3	4.7
k_{on2} (моль ⁻¹ с ⁻¹)	28.4×10^6	5×10^6	k_{off2} (с ⁻¹)	3.26×10^3	9.4
β (с ⁻¹)	4.24×10^3	46.5	α (с ⁻¹)	900	91.6
k_{d+1} (с ⁻¹)	2.89×10^3	0	k_{d-1} (с ⁻¹)	39.2	0
k_{d+2} (с ⁻¹)	172	8.4	k_{d-2} (с ⁻¹)	0.727	1.8
k_{d+3} (с ⁻¹)	17.7	0	k_{d-3} (с ⁻¹)	4	0
k_{d+4} (моль ⁻¹ с ⁻¹)	1.27×10^6	0	k_{d-4} (с ⁻¹)	45.7	0
k_{d+5} (с ⁻¹)	16.8	0	k_{d-5} (с ⁻¹)	190.4	0

1.2. Фармакология ионотропных глутаматных рецепторов.

1.2.1 Многообразие лигандов ионотропных глутаматных рецепторов и проблема поиска клинически-толерантных блокаторов.

Химико-фармакологический подход изучения ионотропных рецепторов глутамата был и до сих пор является информативным и актуальным методом исследования ионотропных рецепторов глутамата в связи с тем, что получение рентгеновских структур трансмембранных белков является трудновыполнимой задачей из-за плохой их растворимости: это в свою очередь затрудняет получение кристалла и снижает качество рентгенограммы. Процесс получения кристаллов мембранных белков с необходимыми параметрами может потребовать нескольких человеко-лет [53]. Само функциональное (как, впрочем, и структурное) деление и идентификация ионотропных глутаматных рецепторов основаны на избирательной активации или ингибировании ортостерическими лигандами (агонистами и конкурентными антагонистами), а также применении

каналоблокаторов. Именно применение фармакологических подходов и позволило описать широкий ряд процессов, в которые вовлечены ионотропные (так же, как и метаботропные) рецепторы глутамата, активируемые возбуждающими аминокислотами: научение и память, пластичность в онтогенезе, эпилептогенез, острая нейропатология – гипоксия/ишемия, инсульт, гипогликемия, отравление экзогенными токсинами, хроническая нейропатология – болезнь Альцгеймера, хорea Гентингтона, болезнь Паркинсона и поражения мотонейронов [54]. Описанные выше процессы косвенным или прямым образом сопряжены с понятием эксайтотоксичности, которая может быть компенсирована изменением субъединичного состава NMDA-рецепторов (онтогенетически, в норме), при котором в ходе синаптической активности сокращается время протекания ионного тока, а вместе с ним и поступление ионов кальция в клетку, что предотвращает гибель нейронов [4]. Сублетальные концентрации глутамата могут реализовывать и так называемое NMDA-прекондиционирование, при котором реализуется ряд механизмов, устраняющее повреждение нейронов, вызванное глутаминовой кислотой [55]. В случае, если компенсации не происходит или она оказывается недостаточной, поступивший и аккумулировавшийся в цитозоль нейрона кальций инициирует ряд нейротоксических процессов (активация системы каспаз, разобщение митохондриальной транспортной цепи), приводящих к гибели нейрона [56].

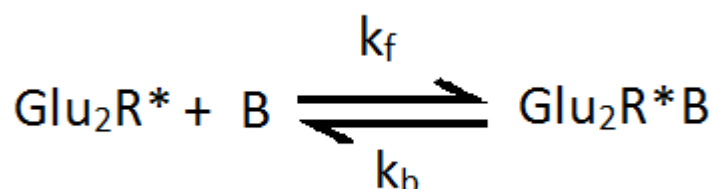
Несмотря на кажущееся богатство фармакологических агентов – ингибиторов ионотропных глутаматных рецепторов, весьма ироничным является тот факт, что лишь единицы из этого многообразия являются клинически-толерантными в связи с большим числом побочных эффектов (лезии Олни) [57] и, порой, несмотря на малую их эффективность (мемантин) в связи с элементарным отсутствием их аналогов, тем не менее применяются в терапии нервных болезней. Впрочем, лабораторная фармакология является

ценным инструментом для разработки новых лигандов – потенциальных лекарственных субстанций, ведь, как широко известно, помимо концентрации администрируемого лекарства, важным является аспект фармакодинамический, отвечающий на вопрос особенностей взаимодействия лиганда и рецептора, модуляции работы мишени.

Этот раздел будет посвящён молекулярным механизмам действия ингибиторов ионотропных глутаматных рецепторов, а также успехам или неудачам имплементации тех или иных соединений, которые реализуют описываемые механизмы действия в медицинской практике.

1.2.2. Кинетика блокады ионотропных глутаматных рецепторов.

Элементарная кинетическая схема блокады с учётом изложенных выше сведений может выглядеть различным образом в зависимости от свойств проницаемости самого блокатора. В наиболее частом случае, если блокатор



не попадает внутрь клетки через каналы, кинетическая схема выглядит так:

Схема 3

где Glu_2R^* - открытый канал, B – блокатор, k_f и k_b – кинетические константы процессов ассоциации и диссоциации.

Согласно схеме 3 кинетика образования продуктов реакции – заблокированных рецепторов будет выглядеть следующим образом:

$$[\text{Glu}_2\text{R}^*\text{B}] = \frac{k_f[B]}{k_f[B] + k_b} (1 - e^{-(k_f[B] + k_b)t}) \quad (1)$$

В случае элиминации блокатора из системы можно получить уравнение, описывающее кинетику отмыва блокатора:

$$[Glu_2R^*B] = [Glu_2R^*B]_0 e^{-k_b t}, \quad (2)$$

при условии, что $[Glu_2R^*B]_0$ – концентрация заблокированных рецепторов в момент удаления блокатора из системы.

Приведенные формулы прямо характеризуют взаимоотношения блокатора и рецепторов в момент протекания реакции: а) кинетика отмыва блокатора всегда медленнее кинетики развития блокады б) скорость развития блокады созависима с концентрацией блокатора; скорость кинетики отмыва такой зависимостью не обладает в) кинетика отмыва характеризуется исключительно константной скорости диссоциации блокатора.

В том случае, если в системе находятся два блокатора, предположительно имеющие общий сайт связывания и конкурирующие за него, анализ кривых отмыва прояснит факт таковой стерической конкуренции. Подобный протокол включает анализ трех кривых отмыва: блокатора №1, блокатора №2, смеси блокатора №1 и блокатора №2 в соответствующих концентрациях. Величина ингибирования электрических токов блокатором B_1 при наличии в системе блокатора B_2 будет охарактеризована как:

$$BB_{1(B_2)} = \frac{k_f^{B_1} [B_1]}{1 + k_f^{B_1} [B_1] + k_f^{B_2} [B_2]} = \frac{BB_1 - BB_1 * BB_2}{1 - BB_1 * BB_2} \quad (3)$$

где $[B_1]$ и $[B_2]$ – концентрации блокаторов B_1 и B_2 , $k_f^{B_1}$ и $k_f^{B_2}$ – константы ассоциации блокаторов B_1 и B_2 , а BB_1 , BB_2 и $BB_{1(B_2)}$ – ингибирование электрогенных процессов рецепторов веществами B_1 и B_2 дискретно, а также веществом B_1 в присутствии B_2 соответственно.

К сожалению, в случае, если кинетика отмыва блокатора B_1 и блокатора B_2 примерно идентична, применимость такого подхода не является возможной

ввиду того, что все три кинетические кривые отмыва будут занимать одно и то же пространство осциллограммы, что ровным счётом не даст никакой информации о взаимовлиянии блокаторов при действии на общий сайт связывания.

Следует отметить, что данные, полученные в экспериментах *in vitro* не всегда могут быть полностью сопоставимы с данными в опытах *in vivo* в связи с множественными факторами, происходящими также и стохастическим образом, в живых системах, на которые порой достаточно сложно опереться в рамках методологии проводимых исследований. Однако именно подходы редукции и формализации помогают сделать первый шаг в сторону понимания тех или иных процессов в живой материи. К тому же, информация, полученная в ходе чистых лабораторных экспериментов, позволяет оперировать математическими моделями и осуществлять более точные прогнозы в дальнейших исследованиях, что является особенно ценным в омиксных технологиях или, к примеру, медицинской химии и фармакологии/фармакогеномике/персонализированной медицине.

1.3. Механизмы ингибирования ионотропных глутаматных рецепторов.

1.3.1. Конкурентный антагонизм.

Все ионотропные глутаматные рецепторы связывают глутамат (GluN2/GluA/GluK), как и ко-медиаторы (GluN1, GluN3, GluD), при помощи лиганд-связывающего домена, сформированного областями S1 (аминокислотная цепь между аминотерминальным и первым трансмембранным доменом) и S2 (последовательность аминокислот между трансмембранными доменами 2 и 3), в промежутке между долями D1 и D2, напоминающими «двухстворчатую раковину», и потому именуемыми «clamshell». В состоянии покоя трансмембранные спирали M3 перекрывают пору канала. В присутствии агониста происходит стягивание долей лиганд-связывающих центров, преактивируя все еще закрытый канал. Дальнейшее сближение долей D2 и D1 в ходе открытия канала при сохранении взаимодействия «задних» частей раковин в димере вызывает существенное расхождение долей D2, которое достаточно быстро приводит к натяжению линкеров между лиганд-связывающим и трансмембранным доменами, и, как следствие, расхождению трансмембранных спиралей M3 и открытию затвора канала [58]. Сайт связывания с молекулой L-глутамата представлен на рис. 4. В этом же сайте связывания NMDA-рецепторы селективно связывают N-метил-D-аспартат, AMPA-рецепторы – α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазолпропионовую кислоту, KA-рецепторы – каиновую кислоту. В случае, если лиганд действует на ортостерический сайт, а стягивание долей

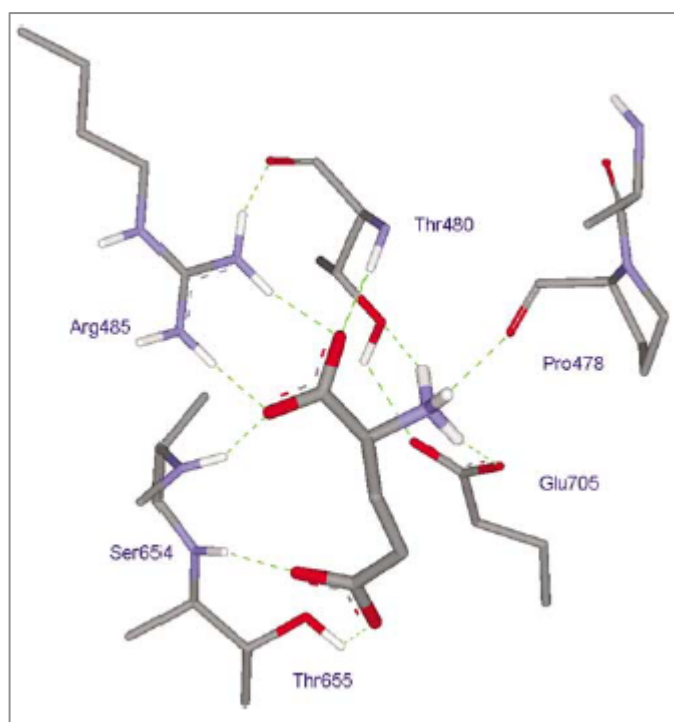


Рисунок 4. Кристаллизованная структура *L*-глутамата, связанного в области S1-S2 *GluA2* субъединицы. В структуре α -карбоксильная группа глутамата образует солевой мостик с Arg485 и водородную связь с Thr480, в то время как ω -карбоксильная образует водородные связи с Ser654 и Thr655. Аминогруппа глутамата образует солевой мостик с Glu705, а также водородные связи с Thr480 и Pro478[59]. Стоит отметить, что специфические взаимодействия при связывании глутамата многообразны и могут иметь различия.

при этом меньше, чем при влиянии агониста (то есть стабилизируется открытая форма домена), вероятность активации рецептора падает, так как не осуществляется расхождения трансмембранных спиралей M3. По такому принципу и реализуют свой механизм действия конкурентные антагонисты. Конкурентные антагонисты принято классифицировать на три основные группы, взаимодействующие с:

- 1) глутамат-связывающим доменом NMDAR(GluN2)
 примеры: CPP, ИК₅₀=0,64±0,06 μM; D-AP5, ИК₅₀=3,7±0,32 μM; DL-AP7, ИК₅₀=11,1±2,1 μM, при использовании NMDA в концентрации 40 μM [60].
- 2) глутамат-связывающим доменом AMPAR и KAR (GluA/GluK)
 примеры: CNQX, ИК₅₀= 0,4 μM для AMPAR и 4 μM для KAR [61], NBQX, ИК₅₀=0,06 μM в пиковый компонент ответа [62]; DNQX, ИК₅₀=0,5 μM при конкуренции с [³H]AMPA [63];
- 3) глицин/D-серин-связывающим доменом (GluN1/GluN3/GluD)
 примеры: 7-СКА, ИК₅₀=0,56 μM [64], 5,7-ДСКА, ИК₅₀=0,24±0,02 μM [65], CGP-78608, ИК₅₀=0,006 μM [66].

На рисунке 5 показана модель связывания DNQX с лиганд-узнающим сайтом связывания AMPA-рецептора.

Проблематика использования конкурентных антагонистов заключается в том, что их активность падает, в случае если концентрация глутамата в синаптической щели увеличивается, и увеличивается, в случае если концентрация глутамата в синаптической щели уменьшена, что, в свою очередь, может приводить к их неэффективности. Тем не менее, были и попытки ввести подобного рода препараты в клиническую практику, учитывая, что антагонисты глицинового сайта NMDAR должны с меньшей вероятностью вызывать нежелательные побочные эффекты, связанные с изменением поведения, наблюдаемые в клинических испытаниях по сравнению с другими антагонистами NMDA-рецептора [68]. Так, например, Селфотел (CGS-19755), конкурентный антагонист NMDA-рецепторов, исследовался на предмет терапии инсульта, обладая при этом нейропротективным, анальгетическим, анксиолитическим и противосудорожными эффектами, однако, клинические исследования были прекращены в связи с отсутствием эффективности [69]. Другое соединение, Селурампанел (BGG492), конкурентный антагонист

AMPA/KAR, исследовалось на предмет терапии эпилепсии (эффективность доказана), но вероятность дальнейшей его разработки и переход в фазу III клинических исследований является маловероятным в связи с низкой возможностью коммерциализации из-за наличия более эффективного неконкурентного антагониста AMPAR, перампанела [70].

Другое плацебо-контролируемое рандомизированное мультицентровое исследование для терапии мигрени показало эффективность Селурампанела, но в рамках проверки концепции было неуспешным из-за высокого плацебо-эффекта – требуются дальнейшие исследования особенностей пациентов (тяжесть приступа, его частота и продолжительность, наличие аллодинии или ауры), которые испытали облегчение головной боли при терапии Селурампанелом [71]. Таким образом, проведённое исследование также поднимает вопрос участия ионотропных глутаматных рецепторов в патофизиологии мигрени.

Продолжаются клинические исследования AV-101 и D-циклосерина. Пролекарство 4-хлоркинуруенин (AV-101), проникает через ГЭБ, превращаясь в 7-хлоркинуреновую кислоту, которая является конкурентным антагонистом глицинового сайта NMDAR [72]. Монотерапия БДР не улучшала общие депрессивные симптомы, что, возможно, связано с низкой концентрацией 7-хлоркинуреновой кислоты в спинномозговой жидкости, что позволяет сделать вывод о том, что 4-хлоркинуруенин не трансформируется в 7-хлоркинуреновую кислоту [73]. Не увенчалось успехом и исследование NCT03078322 (фаза 2): 180 пациентов с фармакорезистентной депрессией, которые получали адъювантную терапию AV-101 с СИОЗС или селективным ингибитором обратного захвата серотонина и норадреналина [74]. Совместное применение 4-хлоркинуруенина с пробенецидом дозозависимо увеличивало концентрацию 7-хлоркинуреновой кислоты в диализате префронтальной коры крыс в 885 раз, что даёт надежду в терапии депрессивных состояний [75].

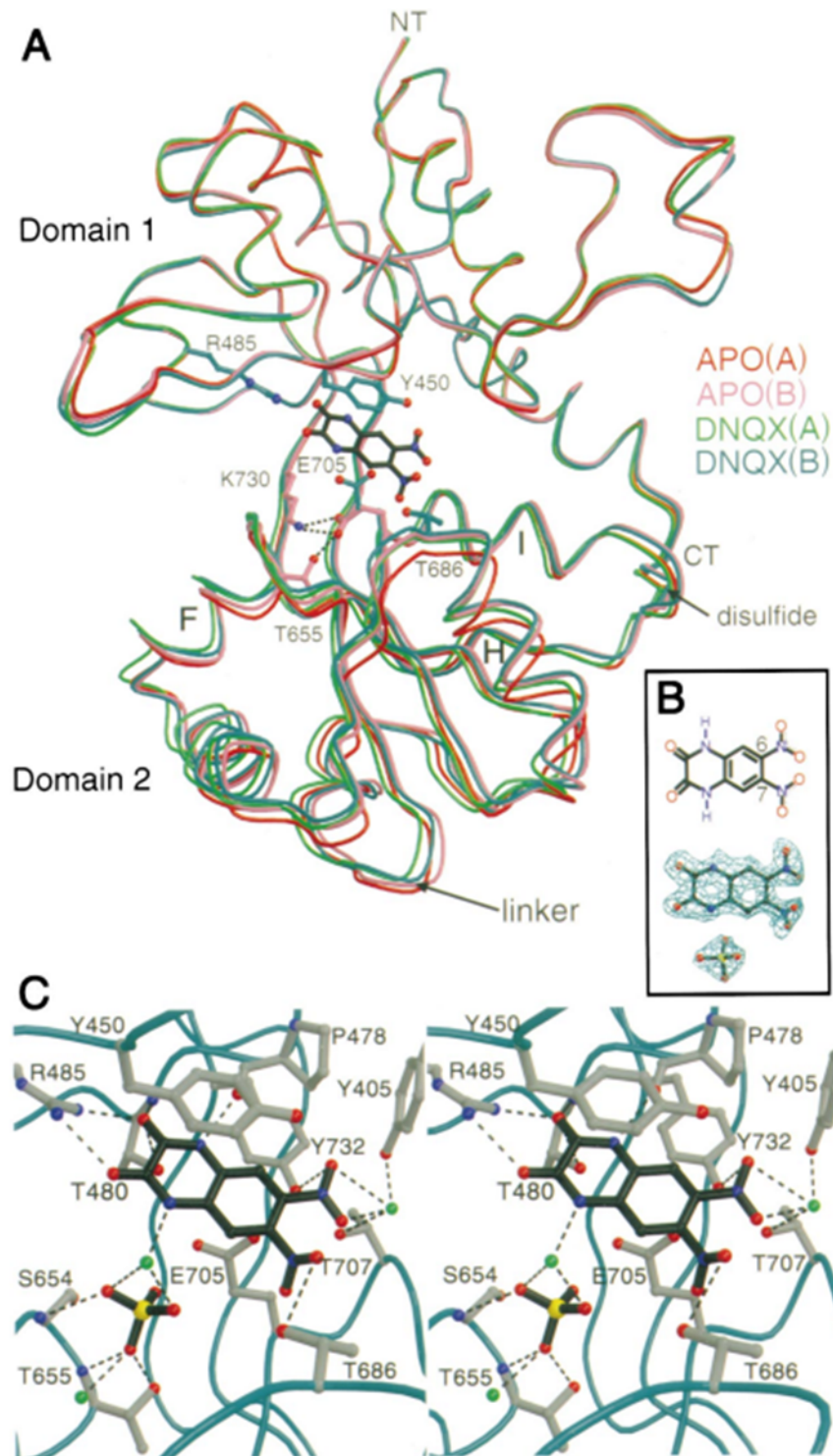


Рисунок 5. Наложение расширенной D1/D2 структуры *GluA2* флор и области связывания DNQX. А. Две белковые (ApoA и ApoB) молекулы, а также две молекулы DNQX (DNXQA и DNQXB) в каждой ассиметричной части были наложены с использованием только Ca атомов домена 1. Апо-протомеры окрашены в красный и розовый цвета; DNQX протомеры окрашены в светлый и тёмно-зеленые цвета. DNQX отображён чёрным, выбранные

боковые цепи от DNQX показаны тёмно-зелёным цветом. Конформационные изменения, которым подвержен Glu-705, показан в сравнении с его ориентацией в AroB и DNQXB. В апо-состоянии Glu-705 принимает водородные связи боковых цепей Lys-730 и Thr-655. В. Химическая структура DNQX и изменение электронной плотности молекулы в присутствии сульфат-аниона. С. Взаимодействие между DNQX, сульфат-анионом и долями SIS2J. Боковые цепи DNQX окрашены серым, молекулы воды – зелёным, сама молекула DNQX окрашена чёрным. Водородные связи между DNQX, сульфат-анионом и SIS2J обозначены черными пунктирными линиями [67].

Полученные данные нашли отражение в новом клиническом исследовании NCT05280054 лекарственного взаимодействия между AV-101 и пробенецидом у здоровых добровольцев, результаты не опубликованы [76].

D-циклосерин (DCS) – антибиотик широкого спектра действия для лечения туберкулёза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью [77], репрофилируется в качестве парциального агониста глицинового сайта NMDAR, который, по результатам мета-анализа, может быть эффективен при различных психических заболеваниях, включая шизофрению, тревожные расстройства, зависимости, расстройства пищевого поведения, большое депрессивное расстройство и прочие неврологические заболевания [78]. Так, например, рандомизированное, плацебо-контролируемое исследование с двойным ослеплением показало выраженный антидепрессивный эффект D-циклосерина в дозе 1000 мг/сутки как по шкале оценки исследователя, так и по шкале самооценки, при использовании в качестве дополнительной терапии у фармакорезистентных пациентов с большим депрессивным расстройством [79]. Клинические исследования D-циклосерина имеют большую актуальность в настоящее время в связи с длительной историей его применения в медицинской практике. Этот пример, наряду с применением

амброксола при болезни Паркинсона [80], ярко демонстрирует актуальность репрофилирования лекарственных средств.

1.3.2. Бесконкурентный антагонизм: блокада ионного канала.

Трансмембранный домен (TMD, собственно, формируемый субъединицами ионный канал), имеющий перевернутую ориентацию в мембране по сравнению с потенциал-зависимыми ионными каналами, состоит из трех трансмембранных спиралей M1, M3 и M4, а также из полупрошивающей мембрану M2-петли (P-loop), расположенной между спиральями M1 и M3, и соединён с лиганд-связывающим доменом гибкими полипептидными линкерами S1-M1, M3-S2 и S2-M4 [81]. Апекс, или вершина M2 сегмента, иначе именуемая N/Q/R сайт, представляет собой фильтр селективности, определяющий проницаемость для кальция, проводимость канала и его блокаду [82]. В NMDA-рецепторе функционально необходимой аминокислотой является аспарагин (N-сайт), расположенный на кончике петли, а скопление гидрофильных остатков нисходящей части, примыкающей к концу, образует сужение канала; явное ассиметричное расположение аспарагинов N-сайтов NR1- и NR2-субъединиц может объяснить их неодинаковую роль в кальциевой проницаемости и блокаде ионами магния [83]. В AMPA-рецепторах пре-мРНК может редактироваться, что в результате приведет к изменению генетически-кодируемого глутамина (Q) в аргинин (R) в 607 положении, и, в так называемом Q/R сайте порообразующей петли M2, осуществится переключение с нейтрального на положительно-заряженный остаток в селективном фильтре, и канал перестанет быть проницаем для ионов кальция [84]. На рисунке 6 показана структура открытого состояния AMPAR (GluA2).

Блокаторы поры ионного канала принято классифицировать на два основных класса:

1) Ловушечного типа («trapping blockers»), которые не препятствуют закрытию канала. Классическими примерами каналоблокаторов NMDAR являются МК-801 (дизоцилпин, $IK_{50}=0,03-0,1 \mu M$), кетамин ($IK_{50}=1 \mu M$) [86], фенциклидин ($IK_{50}=0,45 \mu M$) [87] и мемантин ($IK_{50}=1-3 \mu M$) [88], которые имеют общность в своем компактном конусообразном строении с положительным зарядом аминогруппы на вершине [89]. На фоне эпидемии СПИДа в 1990-ые годы были попытки репрофилировать пентамидин, противомикробный препарат для лечения пневмоцистной пневмонии, для коррекции неврологический нарушений, ассоциированных с неврологическими проявлениями СПИДа. Действительно, *in vitro*, препарат блокировал NMDA-рецепторы по механизму частичной ловушки, но в условиях *in vitro* он плохо проникает через ГЭБ, что не позволило транслировать исследование в клиническую практику [90].

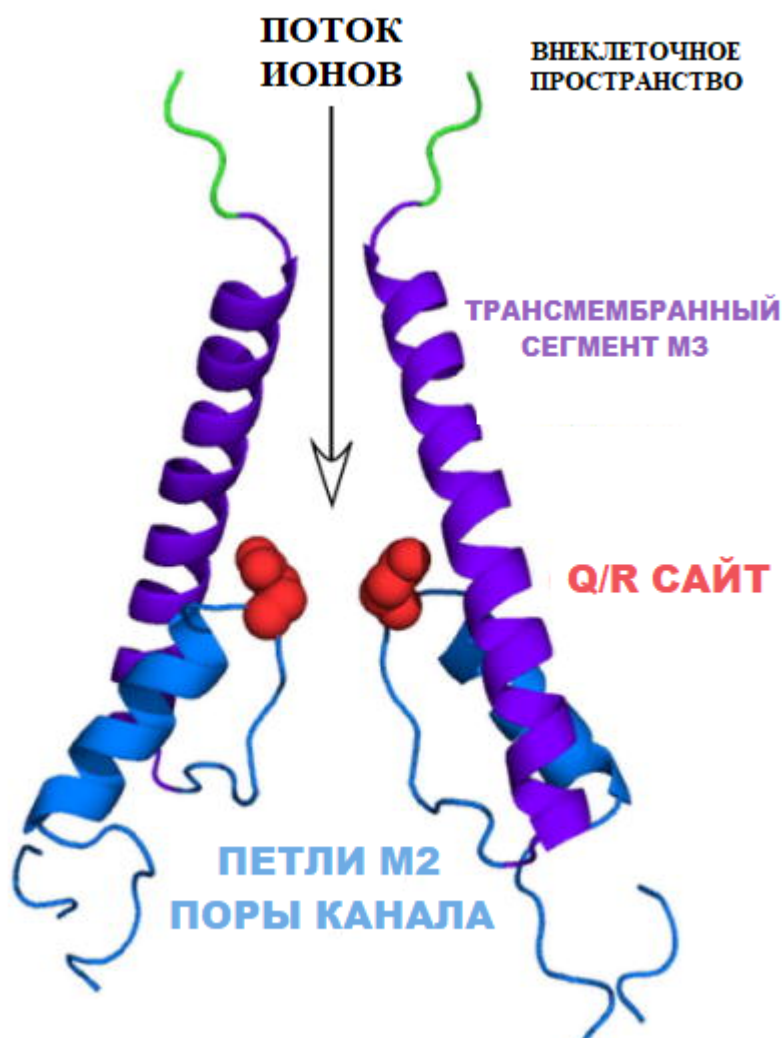


Рисунок 6. Структура открытого состояния AMPAR (GluA2). Путь прохождения ионов через ионотропные глутаматные рецепторы в основном определяется трансмембранным сегментом M3 и петлями M2. На конце M2, способствующему сужению канала, находится сайт Q/R/N (показано красным). Сайт Q/R для не-NMDAR, сайт N для NMDAR, соответственно. В NMDAR дополнительный сайт в M3-сегменте GluN1, мотив DRPEER, также способствует кальциевой проницаемости. Гомологичные остатки в структуре AMPAR выделены зелёным цветом. Переработано из [85].

В то же время блокаторы AMPAR имеют вытянутую в пространстве форму: полиамины (1-нафтилацетилспермин, КП-AMPAР ИК₅₀=0,33 μM) [91], токсины, содержащие в своей формуле полиаминный компонент (филантотоксин-74, КП-AMPAР ИК₅₀=0,3 μM) [92], дикатионные аналоги

каналоблокаторов NMDAR (производное адамантана ИЭМ-1460, КП-AMPAР ИК₅₀=2,6 μМ) [93], которые располагают определенным расстоянием между гидрофобной компонентой и терминальной аминогруппой [94]. Исключение составляет пентобарбитал, в 8 раз более активный по отношению к КН-AMPAР, нежели чем к КП-AMPAР: было продемонстрировано, что одиночная мутация остатка в Q/R сайте субъединицы GluA2(R586Q) значительно снижает чувствительность к этому соединению [95,96]. Лаборатория биофизики синаптических процессов ИЭФБ РАН внесла значимый вклад в понимание структурных детерминант блокады и описала способ конструирования каналоблокаторов ионотропных глутаматных рецепторов [97,15].

2) Препятствующие закрытию канала, связывающиеся с воротным механизмом и потому именуемыми «foot-in-the-door», то есть работающие по принципу «нога-в-двери». Такой механизм действия осуществим в силу большого размера таких молекул, что не позволяет им полностью разместиться в поре закрытого канала. Классическими примерами подобных блокаторов NMDAR являются 9-аминоакридин (ИК₅₀=15 μМ) [98] и такрин, его тетрагидропроизводное (ИК₅₀=25 μМ) [99], ингибитор ацетилхолинэстеразы для терапии болезни Альцгеймера, более не используемый в клинической практике в связи появлением современных аналогов. Исследования производных такрина продолжаются непрекращающимися попытками их разработки для нейротерапии, и в 2021 году учеными Института экспериментальной медицины академии наук Чехии

было показано нейропротективное действие 7-фенокситакрин [100]. Нами было проведено исследование диминазена, другого противомикробного препарата, который является структурным аналогом пентамидина, на предмет его ингибирующей активности NMDA-рецепторов. Диминазен ингибировал NMDA-рецепторы с ИК₅₀=13 μМ по механизму “foot-in-the-

door”, но, так же как и пентамидин, является плохо проницаемым для ГЭБ [101]. В другой работе мы показали слабовыраженный ингибирующий эффект диминазена на AMPA-рецепторы, механизм которого не удалось установить из-за быстрой кинетики отмыва диминазена [102]. Блокаторы AMPA-рецепторов, действующие по механизму “foot-in-the-door”, неизвестны. Соединения с подобным механизмом действия на ионотропные глутаматные рецепторы пока что не нашли применения в клинической практике.

В случае, если лиганд несёт заряд, то электрическое поле мембраны может усиливать или ослаблять ингибирующий эффект. Классическим примером потенциалзависимости в физиологических условиях является закупоривание ионом магния NMDA-рецептора, предотвращающее его избыточную активацию. (Рис 7, 8.) Потенциалзависимость, выражаемая через значение δ , позволяет определить как глубину связывания катионных блокаторов с ионотропными глутаматными рецепторами, так и гипотетическую конкуренцию блокатора за сайт связывания иона магния в канале NMDA-рецептора. Стоит отметить, что величина δ безразмерна и лишь отражает долю электрического поля мембраны, пресекаемую заряженным блокатором от внешней её стороны к сайту связывания. Для оценки действия катионных блокаторов в условиях, приближенных к физиологическим, запись ионных токов осуществляется в растворе с пониженной концентрацией ионов магния при потенциале фиксации -30 мВ. Значение δ для ионов магния имеет приблизительное значение 0,7 и зависит от субъединичного состава NMDA-рецепторов [104,105].

Кетамин, производное фенциклидина, является каналоблокатором NMDAR и ограниченно применяется для наркоза и анестезии из-за ряда недостатков, наблюдаемых при его использовании [107]. Изначально он разрабатывался как диссоциативный анестетик, то есть лекарство, которое

лишает субъекта ощущений от его собственного тела [108]. Несмотря на галлюцинации и эйфорию вкупе с различного рода когнитивными нарушениями, испытываемые при его использовании, кетамин используют в ряде неотложных состояний, при которых сбор анамнеза является затруднённым и

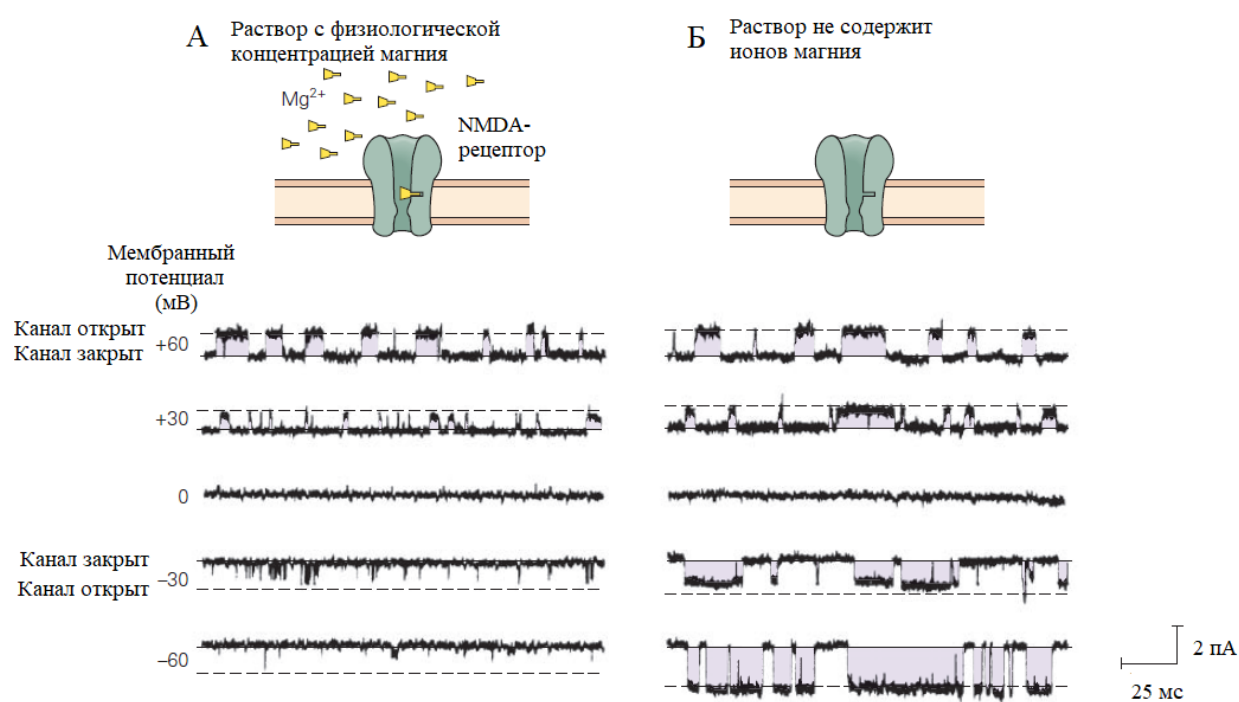


Рисунок 7. Запись одиночных NMDA-рецепторов первичной культуры нейронов гиппокампа мозга крыс. Открытие ионного канала зависит не только от присутствия магния, но и напряжения на мембране. Отклонения вниз указывают на входящий ток, отклонения вверх – выходящий ионный ток. А. Когда Mg^{2+} присутствует в нормальной концентрации во внеклеточном растворе (1,2 мМ), канал в значительной степени заблокирован при потенциале -60 мВ. При отрицательном мембранном потенциале обнаруживаются быстрые, проскакивающие, направленные внутрь токи. Деполяризация до уровней +30/+60 мВ снимает магниевую блокаду и способствует прохождению более длительного выходящего тока. Б. При удалении ионов магния из внеклеточного раствора открытие и закрытие ионного канала более не зависят от напряжения. Канал открыт

при потенциале -60 мВ, ток меняет направление при значениях, близких к 0 мВ. Переработано из [103].

необходимо использовать средство, в меньшей степени угнетающее дыхательную систему и повышающее ряд гемодинамических параметров, таких как частота сердечных сокращений, сердечный выброс и артериальное давление [109]. Из-за психотропного профиля действия кетамин внесен в список II наркотических средств и психотропных веществ, оборот которых в Российской Федерации ограничен и в отношении которых устанавливаются меры контроля в соответствии с законодательством Российской Федерации и международными договорами Российской Федерации [110]. Фенциклидин, входящий в список I наркотических средств, вызывает у нормальных лиц психотическое состояние, очень похожее на симптомы шизофрении, и, как и кетамин, своим действием имитируя когнитивные, негативные и аффективные симптомы шизофрении, такие как социальная отторженность и исполнительная дисфункция, используется в качестве модели шизофрении животных в рамках гипотезы о гипофункции NMDA-рецепторов при шизофрении [111]. Высокая афинность МК-801 и фенциклидина провоцировали у животных ряд побочных эффектов, к которым относятся нарушение памяти и научения, атаксию и вакуолизацию нейронов, что скорее создает проблему при разработке подобных клинически-толерантных соединений [112].

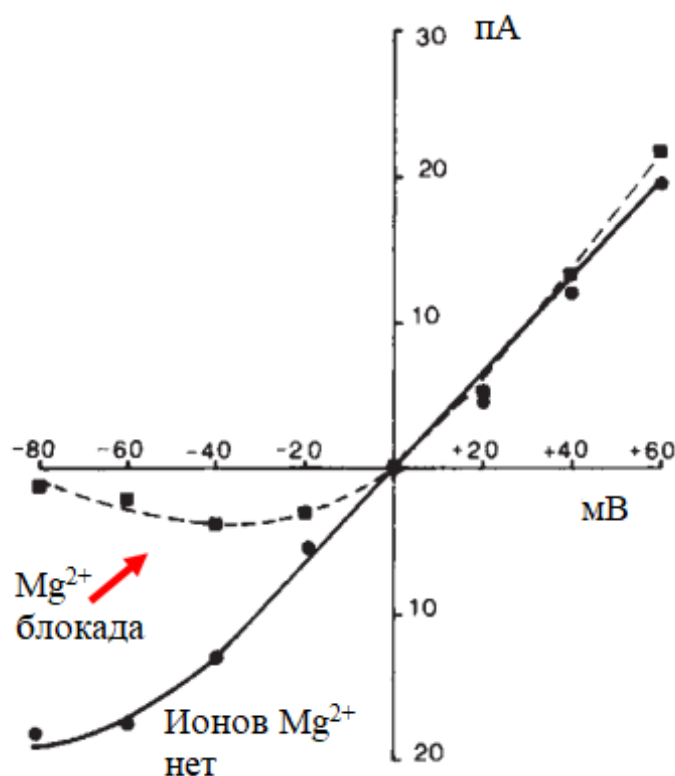


Рисунок 8. Вольт-амперная характеристика NMDA-рецептора. В растворе, содержащем $500 \mu\text{M}$ Mg^{2+} ионные токи уменьшаются в диапазоне отрицательных потенциалов, ВАХ демонстрирует область так называемого «отрицательного сопротивления». Переработано из [106].

Несмотря на всё вышесказанное, однократное внутривенное введение кетамина оказывает быстрый антидепрессантный эффект в течение часов, который может длиться вплоть до одной недели. Открытие такого быстрого антидепрессантного эффекта (по сравнению с обычными антидепрессантами, эффект от которых развивается в течение нескольких месяцев) в перспективе позволит разработать новую линейку препаратов, влияющих на сигнальные каскады, ассоциированные с модуляцией NMDA-рецепторов [113]. Энантиомер кетамина, (S)-кетамин используется для терапии большого депрессивного расстройства и при фармакорезистентной депрессии в виде интраназального спрея. (R)-кетамин (аркетамин) и гидроксиноркетамин проходят клинические исследования на предмет эффективности в терапии депрессивных расстройств [114]. В свете этих данных интересной является

работа 2017 года по поиску антидепрессантов и нейролептиков, ингибирующих ионотропные глутаматные рецепторы. Так, например, флуоксетин способен ингибировать NMDA (аллостерически) и кальций-проницаемые AMPA-рецепторы (по бесконкурентному механизму) с IC_{50} 36 и 43 μ M соответственно, а в концентрации 100 μ M он ингибировал кальций-проницаемые рецепторы на 36% от интегрального тока, полученного при их активации [115]. Другим примером является пентабарбитал, положительный аллостерический модулятор ГАМК-А, который является бесконкурентным ингибитором КН-AMPA [116]. Производное адамантана мемантин, в отличие от кетамина, не демонстрирует столь выраженных побочных эффектов и применяется в неврологии для терапии болезни Альцгеймера, и, несмотря на его низкую эффективность, используется для улучшения когнитивной функции пациентов [117]. Мемантин проходит клинические исследования в качестве средства, замедляющего прогрессирование болезни Паркинсона [118]. Мемантин является блокатором NMDA-рецепторов, действующим по принципу «частичной ловушки» [12]. Меньшее сродство каналоблокаторов к NMDA-рецепторам, действующих по принципу «частичной ловушки», снижает вероятность развития нежелательных побочных эффектов [119].

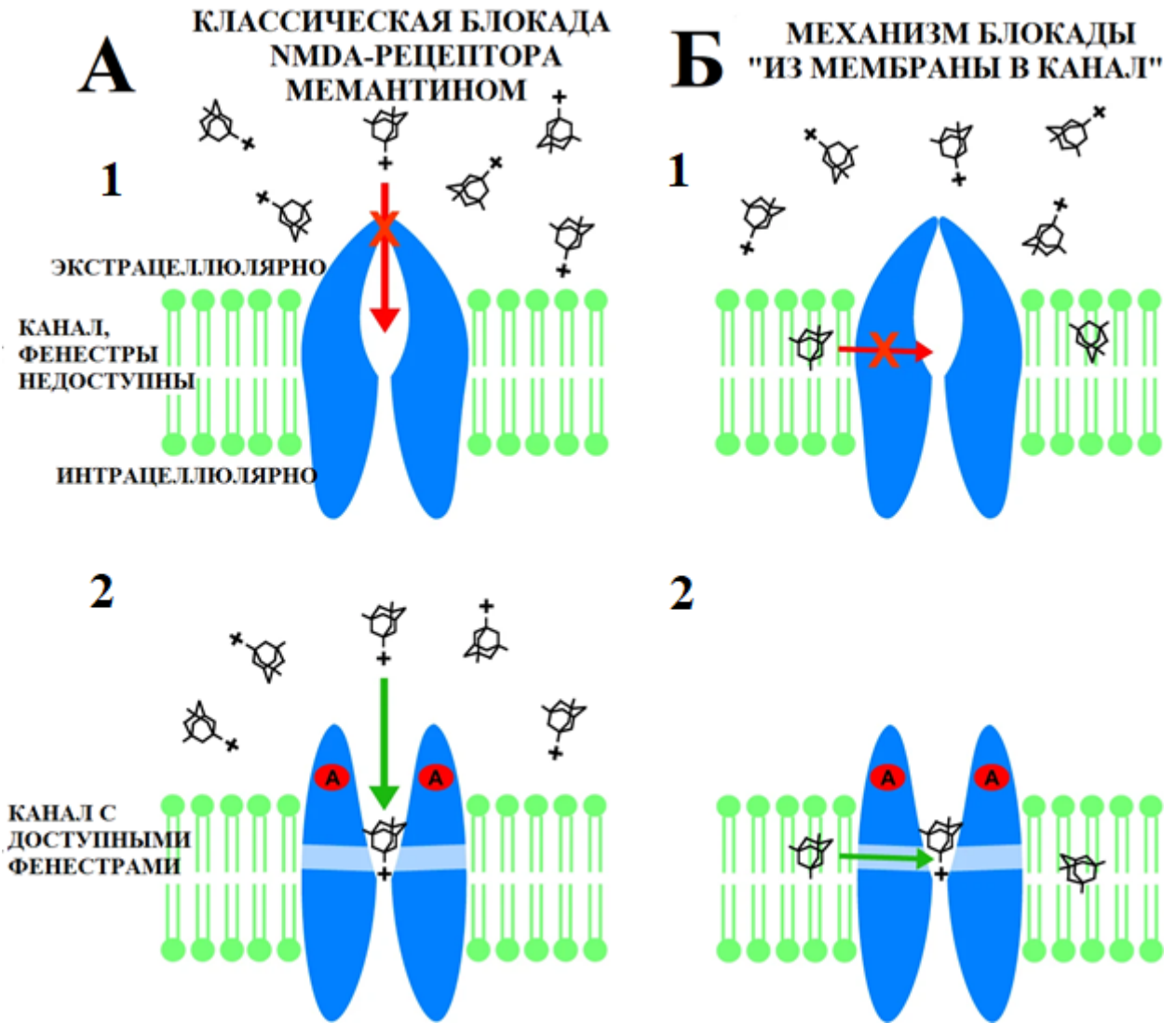


Рисунок 9. Механизм действия блокатора «Из мембраны в канал». А. Классический путь блокады канала. 1. Заряженные молекулы мемантина во внеклеточном растворе не могут связаться с сайтом, так как канал закрыт. 2. После связывания агониста и открытия канала происходит связывание мемантина глубоко в поре канала. Б. Тип блокады «Из мембраны в канал». 1. Незаряженные молекулы мемантина в мембране не могут получить доступ к сайту связывания через недоступные фенестры. 2. Несущие заряда молекулы мемантина, оставшиеся в мембране после его удаления из внеклеточного раствора, получают доступ к сайту связывания через фенестры, которые стали доступны при изменении конформации рецептора. Переработано из [121].

Недавно был показан и другой путь ингибирования NMDA-рецепторов, заключающийся в том, что незаряженные молекулы мемантина способны проникать по гидрофобному пути через плазматическую мембрану прямо в ионный канал через фенестры, возникающие в нём в ходе конформационных изменений, что свидетельствует о том, что лиганд-управляемые каналы так же, как и потенциал-зависимые каналы, могут ингибироваться по механизму «из мембраны в канал» (membrane to channel) (Рис. 9). Мемантин, являясь низкомолекулярным соединением, обладает быстрой кинетикой как блокады, так и диссоциации, что, как считается, снижает вероятность появления эффектов, которые демонстрируют диссоциативные анестетики [120]. В заключение хочется отметить неоспоримое преимущество применения каналоблокаторов над конкурентными антагонистами в клинической практике ввиду независимости их действия от высоких концентраций агониста в синаптической щели, что часто встречается в патофизиологии расстройств нервной системы.

1.3.3. Неконкурентный антагонизм: аллостерическая модификация.

Ионотропные глутаматные рецепторы обладают широким набором сайтов их аллостерической регуляции. Подобного рода регуляция более выражена у NMDA-рецепторов, нежели чем у не-NMDAR в связи с тесной комплектацией аминотерминального (АТД) и лиганд-связывающего доменов, предрасполагающей к связыванию с молекулами-регуляторами [122]. Напротив, АТД домен AMPA-рецепторов скорее вовлечён в процесс транспортировки и сборки рецепторов [123]. Интересно, что АТД гомологичен глутамат-связывающему домену метаботропных глутаматных рецепторов [124]. Этот домен ионотропных глутаматных рецепторов содержит сайты связывания эндогенных модуляторов: белков, ионов цинка, полиаминов (спермин и спермидин), протонов H^+ , внеклеточных ионов, лектинов и нейростероидов. Также в этой области происходит связывание диарильных соединений, таких как фенилэтанолamines [125]. Сигналы,

которые при этом иницируются, носят различный характер и могут приводить как к модификации десенситизации, так и ингибированию функции рецептора [126]. АТД GluN2B-содержащих NMDAR связывает цинк, действующий как аллостерический ингибитор, и полиамины, действующие как аллостерические потенциаторы. Предполагается, что спермин связывается на границе нижней доли субъединиц GluN1 и GluN2B и уменьшает отталкивание между отрицательными зарядами нижних долей, стабилизируя интерфейс в компактной форме, повышая чувствительность к глицину, что увеличивает вероятность того, что канал перейдет в открытое состояние [127]. Сродство ионов цинка выше к GluN2A (наномолярный диапазон концентраций), чем к GluN2B (микромолярный диапазон концентраций), однако связывание в обеих субъединицах осуществляется за счёт координации остатков верхней и нижней долей АТД, приводящей к стабилизации конформации с закрытой щелью [128]. Связывание цинка с АТД повышает чувствительность к протонам, ингибирующей активность NMDA-рецепторов [129]. Существует модель, которая предполагает, что если лиганд, связываясь с АТД, стабилизирует его в конфигурации с открытой щелью, то он является ПАМ, а в случае если взаимодействие в результате приведет к закрытию щели, то это свидетельствует в пользу его действия как НАМ [130].

Ифенпродил, антагонист α_1 -адренорецепторов, применяющийся в качестве вазодилататора, также является и аллостерическим ингибитором NMDA-рецепторов и блокирует его двухкомпонентным образом: ИК₅₀ составляют 0,75 и 161 μM соответственно [131]. Такое поведение ифенпродила связано с его высокой избирательностью к GluN2B субъединицам NMDA-рецепторов, связывание при этом осуществляется, в отличие от ионов цинка, на границе раздела димеров АТД GluN1/GluN2B по механизму индуцированного соответствия [132]. Кривая блокады ифенпродилом NMDA-рецепторов представлена на рисунке 10. Каракас, Симоровски и Фурукава предложили

модель связывания фенилэтанолamines, к которым также относится и Ro 25-6981, в котором гетеродимерное расположение GluN1b/GluN2B создает карман связывания фенилэтанолamines, состоящий из остатков GluN1b R1, GluN2B R1 и GluN2B R2; на рисунке 11 представлена структура GluN1b/GluN2B гетеродимера в комплексе с ифенпродилем. Феномен ифенпродила заключается в его способности избирательно блокировать GluN2B субъединицу, что вдохновило множество ученых в области медицинской химии на разработку препаратов и с исходным фармакофором, но не обладающих при этом антагонистической активностью к α_1 -адренорецепторам [135]. Вызывает интерес способность ифенпродила купировать тиннитус в испытаниях на животных [136], а недавнее плацебо-контролируемое клиническое исследование с двойным ослеплением показало его эффективность при краткосрочной терапии посттравматического стрессового расстройства у подростков [137]. Ещё одно экспериментальное исследование показало, что ифенпродил, купируя эксайтотоксические эффекты, развивающиеся в ходе субарахноидального кровоизлияния, улучшает долгосрочный неврологический дефицит, что создает предпосылки для использования ингибиторов NMDA-рецепторов в терапии инсультов [138].

Среди позитивных аллостерических модуляторов AMPA-рецепторов особенно выделяется циклотиазид, способный снимать десенситизацию –flip формы субъединиц, чувствительность к циклотиазиду которых определена серином в положении 754 [139]. Анирацетам и PERA, напротив, способны снижать десенситизацию –flip версий субъединиц [140]. Десенситизация – способность ионного канала ограничивать ионный ток до нескольких миллисекунд после связывания глутамата – детерминирована альтернативным сплайсингом предшествующего экстраклеточного участка M4 ТМД, что приводит к различной скорости десенситизации ионных каналов: –flip варианты десенситизируют в несколько раз быстрее, чем –flip

варианты [141,142]. Характеризуя действие ПАМ в целом, можно сказать, что они, связываясь на границе раздела димеров ЛСД, образуют ряд контактов, стабилизирующих димеризованную конфигурацию, и предотвращают переход в релаксированное состояние после связывания с агонистом, предотвращая десенсибилизацию [143]. Классическими негативными аллостерическими модуляторами AMPA-рецепторов, используемых в лабораторной фармакологии, и проявляющих противосудорожные и нейропротективные эффекты, являются 2,3-бензодиазепины GYKI 47261 ($IC_{50}=2,5 \mu\text{M}$), GYKI 52466 ($IC_{50}=10-20 \mu\text{M}$) и его аналог GYKI 53655. [144].

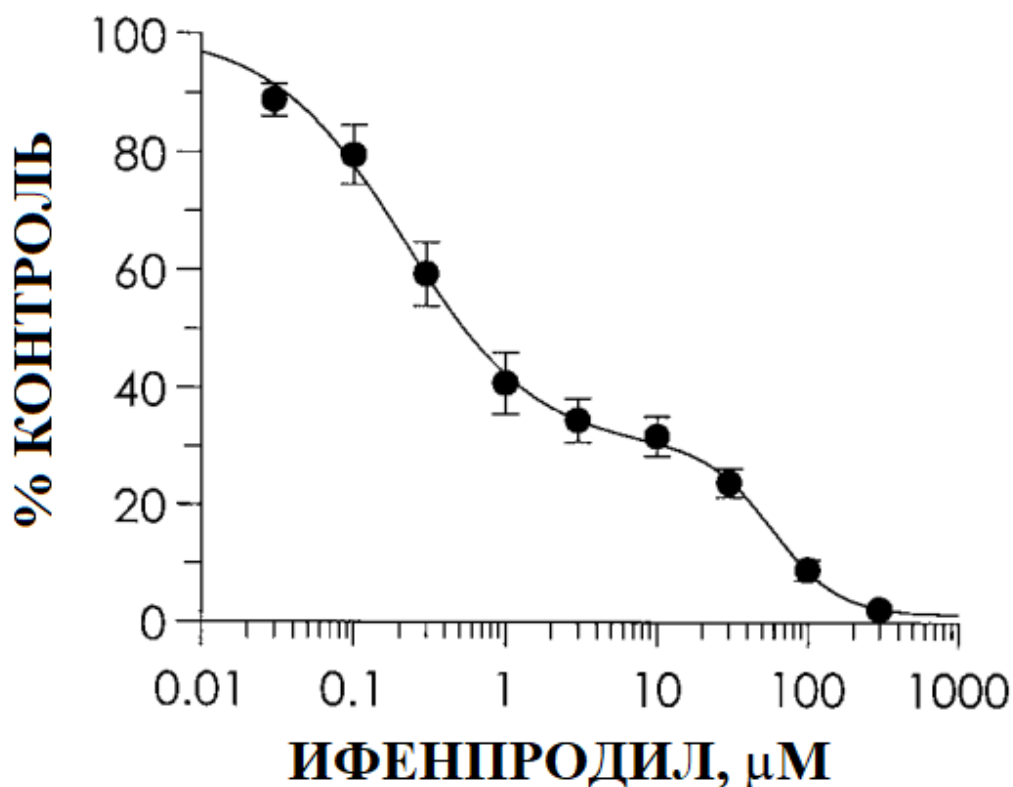


Рисунок 10. Кривая двухфазного ингибирования ифенпродилем NMDA-рецепторов. IC_{50} высокоаффинного компонента составил 0,21 μM (субъединица *GluN2B*), а низкоаффинного – 58 μM (субъединица *GluN2A*). Переработано из [133].

Первым селективным антагонистом АМРА-рецепторов, внедренным в клиническую практику, является перампанел [145]. Он лицензирован в качестве дополнительной терапии парциальных и генерализованных тонико-клонических судорог пациентов старше 12 лет, а также рассматривается перспективным в терапии эпилептического статуса в связи с его фармакодинамическим профилем: была показана способность перампанеля устранять эпилептический статус животных в литий-пилокарпиновой модели эпилепсии [146]. Большое количество работ посвящено высокой эффективности и благоприятным показателям переносимости перампанеля, в том числе и при длительном использовании [147]. В нашей лаборатории было показано, что:

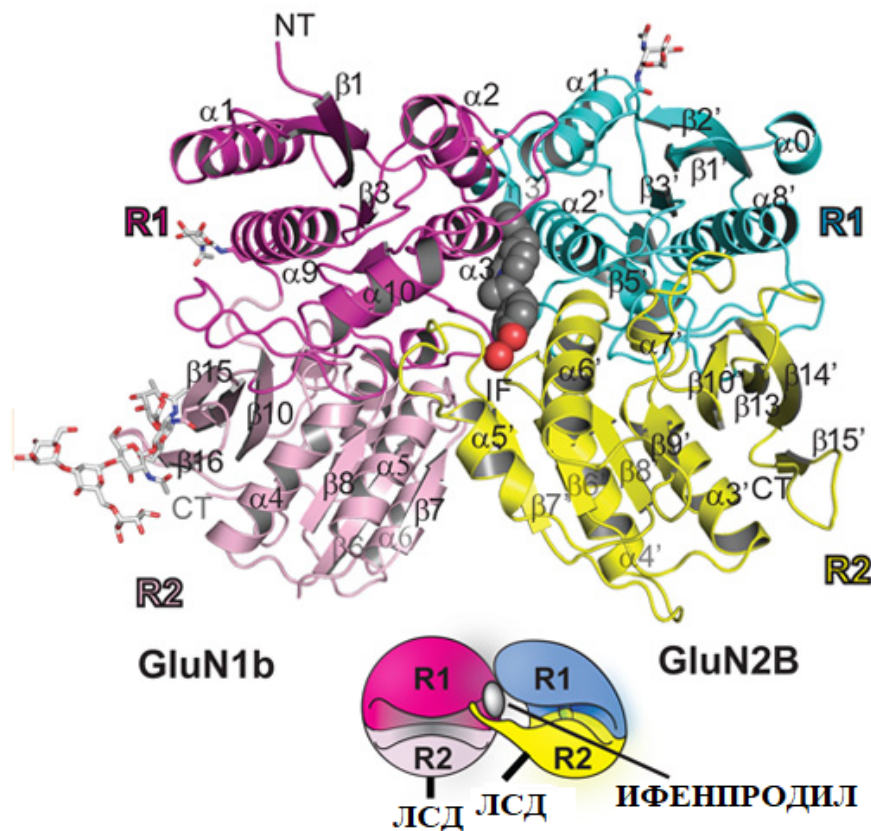


Рисунок 11. Структура гетеродимера АТД GluN1b/GluN2B в комплексе с ифенпродилом при разрешении 2,6 Å. АТД GluN1b и GluN2B имеют двудольную архитектуру, состоящую из долей R1 (пурпурный и голубой) и R2 (светло-розовый и жёлтый). Ифенпродил (молекула показана серым цветом)

*расположен на границе раздела гетеродимеров. Цети N-гликозилирования показаны белым цветом. На рисунке (ниже) показана приблизительная ориентация АТД *GluN1b* и *GluN2B* с черными полосами под R2, обозначающие С-концевые части, где начинаются лиганд-связывающие домены. Переработано из [134].*

- 1) перампанел в одинаковой степени ингибирует как КП-, так и –КН АМРА-рецепторы (ИК₅₀ составил 0,06 μМ)
- 2) циклотиазид снижал ингибирующую активность перампанела, сдвигая кривую концентрационной зависимости перампанела вправо
- 3) GYKI-52466 конкурирует с перампанелом за сайт связывания в АМРА-рецепторе [13].

В работе Елшанской в группе с соавторами было показано, что подобного рода неконкурентные ингибиторы срабатывают как клинья, не позволяющие конформационным изменениям в лиганд-связывающем домене распространяться на ионный канал, удерживая его в закрытом состоянии (рис. 12).

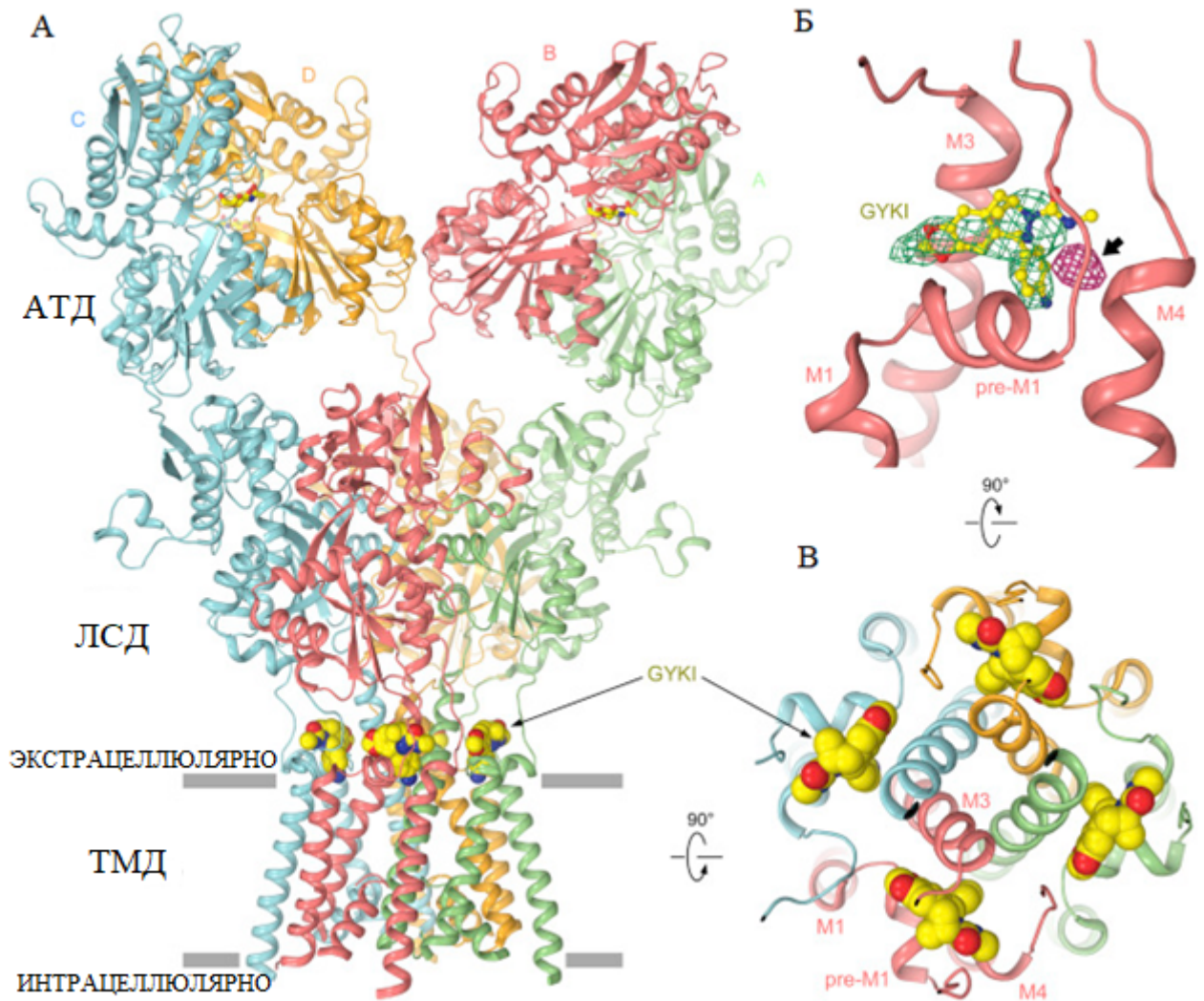


Рисунок 12. Структура AMPA-рецептора в комплексе с неконкурентным ингибитором GYKI. А. Структура GluA2GYKI представлена параллельно мембране и перпендикулярно общей 2-кратной оси молекулярной симметрии. Каждая субъединица окрашена в свой цвет. Внутренняя и внешняя стороны мембраны обозначены параллельными серыми линиями. Молекулы GYKI представлены в модели заполнения пространства. Б. Сайт связывания GYKI в соответствующей субъединице в приближении. Молекула GYKI представлена в виде шаростержневой модели. В. Вид сверху на 4 сайта связывания GYKI на границе между линкерами ТМД и ТМД-ЛСД доменов. Переработано из [148].

1.4. Заключение.

Фармакологически ионотропные глутаматные рецепторы модулируются большим набором разнообразных лигандов. Так, например, на рисунке 13, помимо конкурентных антагонистов и каналоблокаторов, отображены и соединения, способные ингибировать NMDA-рецептор в зависимости от его субъединичной организации.

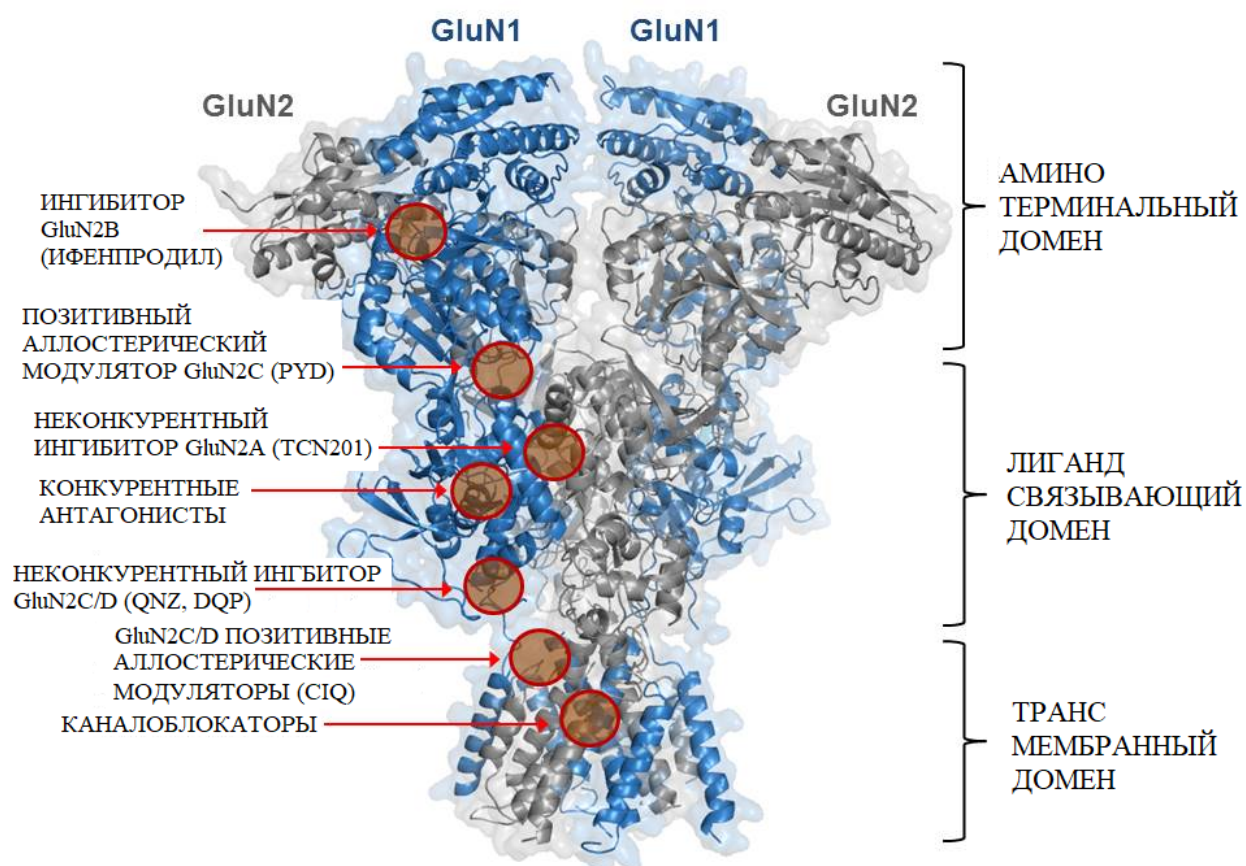


Рисунок 13. Многообразие модуляторов NMDA-рецепторов и их сайты связывания.

Несмотря на такое разнообразие, лишь малая часть этой когорты может быть использована при лечении тех или иных патологий ЦНС в связи с большим количеством нежелательных реакций, испытываемых пациентами. В таблице 3 приведены немногочисленные антагонисты ионотропных

глутаматных рецепторов, которые применяются в клинической практике, а также их мишени.

Таблица 3. Клинически-толерантные блокаторы ионотропных глутаматных рецепторов и их мишени.

№	Шифр/ Название	ИК ₅₀ NMDAR	ИК ₅₀ AMPAR	
			КН-AMPA	КП-AMPA
1	Мемантин	0.5 - 1 μ M	-//-	-//-
2	Перампанел	-//-	63 \pm 8 nM	60 \pm 6 nM
3	Кетамин	0,43 \pm 0,10 μ M	-//-	-//-

Работы прошлых десятилетий были скорее сконцентрированы на особенностях функционирования ионотропных глутаматных рецепторов и эти исследования позволили не только глубже понять функционирование мозга в фокусе основной возбуждающей медиаторной системы, но и найти и некоторые лекарства, а также протоколы исследования механизмов действия этих лекарств. Таким образом, накопленные знания позволяют осуществлять дизайн и синтез соединений, связывающихся в конкретном сайте определенной субъединицы – и один из разделов исследований будет посвящён поиску эффективных модуляторов сайта связывания ифенпродила, соединения, которое привлекает внимание медицинского сообщества с момента синтеза этой молекулы по настоящее время. Другой раздел, напротив, посвящен поиску низкоселективного блокатора ионотропных глутаматных рецепторов в ряду диазепинбензимидазолов, соединений, полученных в ходе экспериментального синтеза двух привилегированных структур, одна из которых включает в себя диазепиновый, а вторая – бензимидазольный фармакофор. Заключительный раздел посвящен поиску антагонистов ионотропных глутаматных рецепторов среди антиконвульсантов и исследованию особенности действия противосудорожного препарата фенитоина на КП- и КН-AMPA-рецепторы.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

2.1. Используемые растворы.

Для проведения эксперимента необходимо приготовление следующих растворов: раствор для получения острых переживающих срезов, внеклеточный, а также пипеточный раствор. Пропись приготовления растворов представлена в таблице 4. В случае растворения экспериментальных проб в диметилсульфоксиде конечная его концентрация в рабочем растворе не превышала 0,6%.

2.2. Приготовление срезов мозга и экстракция нейронов.

Все манипуляции с животными были проведены в соответствии с принципами Базельской декларации и рекомендациями Комиссии по гуманному обращению с животными Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН. Крыс линии Вистар 13-18 дней декапитировали под уретановым наркозом. Быстро извлечённый мозг охлаждался до 2-4 С°. Далее осуществлялась фиксация мозга цианоакрилатным клеем на платформу вибратора 7000 smz2 Campden Instruments (Великобритания), которая впоследствии крепилась в металлический резервуар, предварительно заполненный охлажденным раствором для приготовления срезов мозга. Полученные коронарные срезы гиппокампа и стриатума толщиной 250 микрон хранились в аналогичном растворе, аэрированном карбогеном (95% O₂, 5% CO₂), 24-26 С°. Работа со срезами продолжалась после экспозиции их в растворе спустя 1,5-2 часа в целях профилактики последствий депрессии синаптической передачи, встречаемой при остром опыте. Нейроны экстрагировались из срезов методом вибродиссоциации [149] без применения энзиматической обработки. Пирамидные нейроны были получены из зоны CA1 гиппокампа для записи интегральных токов NMDA и КН-АМРА-рецепторов, в то время как гигантские холинергические нейроны,

Таблица 4. Состав используемых растворов.

Название раствора	рН раствора	Концентрация, mM													
		NaCl	KCl	CaCl ₂	MgSO ₄	NaHCO ₃	NaH ₂ PO ₄	D-глюкоза	HEPES	EGTA	CsCl	CsF			
Раствор для срезов	≈7,4 барбогаж карбогеном	124	5	1,3	2	26	1,24	10	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	100
Внеклеточный раствор	7,4 необходимо доведение с HCl	143	5	2,3	2	-/-	-/-	22	10	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	40
Пипеточный раствор	7,2 необходимо доведение с CsOH	5	-/-	0,5	-/-	-/-	-/-	-/-	10	5	-/-	-/-	-/-	-/-	100

экспрессирующие КП-АМРА-рецепторы, были получены из стриатума. Нейроны идентифицировались по морфологическим и фармакологическим критериям (типирование КП-АМРА-рецепторов осуществлялось блокаторм ИЭМ-1925) [150].

2.3. Регистрация трансмембранных ионных токов.

Схема электрофизиологической установки представлена на рисунке 14.

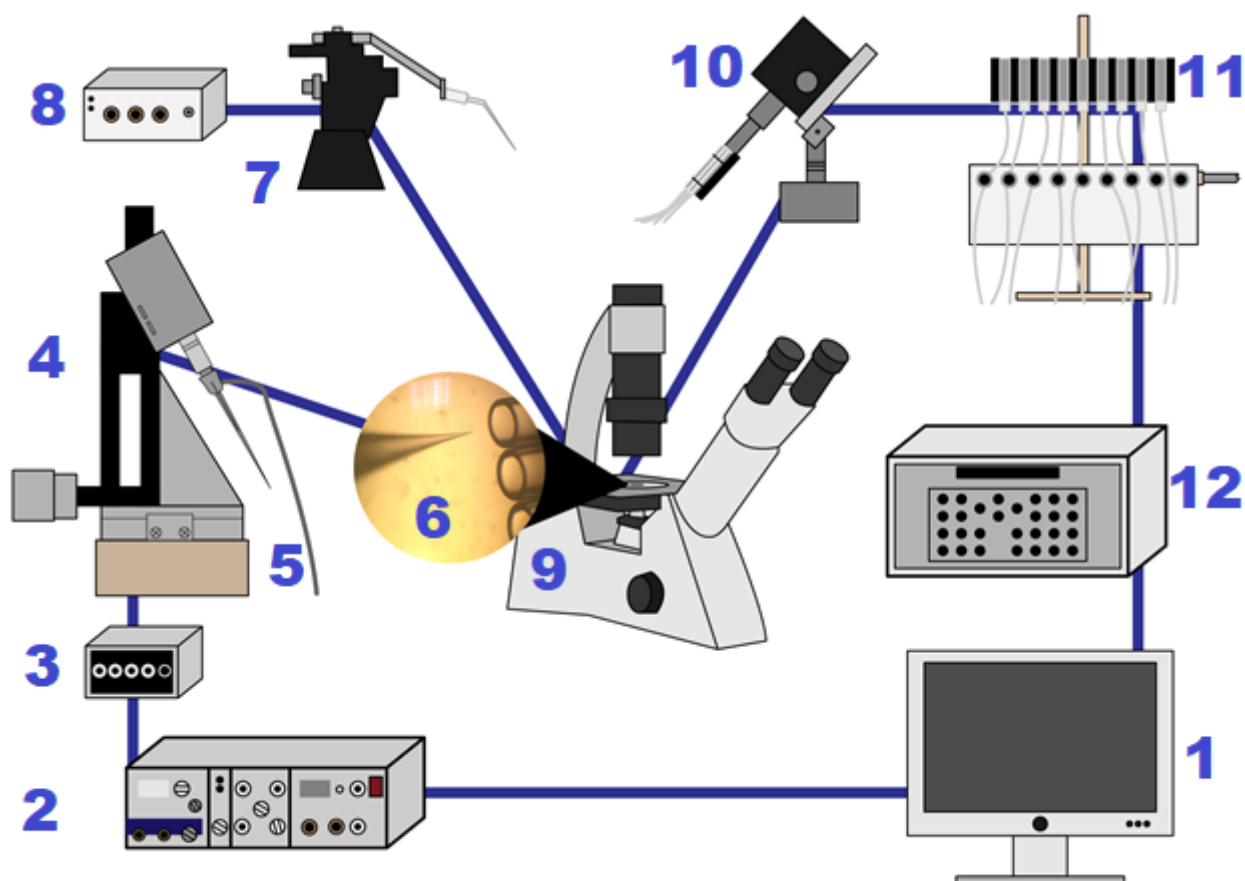


Рисунок 14. Схема установки для проведения электрофизиологических экспериментов. 1. Персональный компьютер 2. Усилитель ЕРС-8 “НЕКА Elektronik” (Германия) 3. Устройства ЦАП/АЦП 4. Ручной микроманипулятор 5. Patch-пипетка и трубка для образования контакта с нейроном. 6. Экспериментальная камера 7. Вибродиссоциатор 8. Блок питания вибродиссоциатора 9. Инвертированный микроскоп 10. Шаговый двигатель системы аппликации растворов 11. Клапанная система подачи растворов на 8 каналов. 12. Блок управления системы быстрой подачи

растворов RCS-200 “BioLogic” (Франция). Насос удаления жидкости и ёмкость для использованного раствора на рисунке не указаны.

Запись интегральных ионных токов осуществлялась методом «patch clamp» в конфигурации «целая клетка» при потенциале фиксации -80 мВ. Сигнал фильтровался в полосе частот 0-5 кГц и оцифровывался с частотой дискретизации 1 кГц. Регистрацию и анализ данных, управление системой аппликации и контроль поддерживаемого на мембране потенциала осуществлялся с помощью персонального компьютера. Скорость смены растворов системой аппликации составляет 10-15 мс. Patch-пипетка сопротивлением 2-5 МОм изготавливались с помощью кузницы Р-97 (Sutter Instruments, США). Активация NMDA-рецепторов осуществлялась с использованием NMDA в концентрации 100 мМ и ко-агонистом глицином в концентрации 10 мМ. Активация AMPA-рецепторов осуществлялась каинатом в концентрации 100 мМ. Фармакологические модуляторы и реактивы были приобретены у фирм “Sigma” (США), “Tocris” (США), “Helicon” (Россия), “Fluka” (Швейцария). ИЭМ-1925 для типирования КП-AMPA-рецепторов синтезирован В.Е. Гмиро в ФГБНУ «ИЭМ» РАН. Аналоги ифенпродила на основе бифенила предоставлены Д.С. Карловым, Сколковский институт науки и технологий. Производные диазепинбензимидазолов синтезированы Л.Н. Диваевой и Морковником А.С. в лаборатории органического синтеза НИИ ФОХ ЮФУ, Ростов-на-Дону.

2.4. Методы обработки и представление данных.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы MicrocalTM Origin 6.0. Данные представлены в виде «среднее ± стандартное отклонение», рассчитанное на основании не менее 4 экспериментов. Для расчёта значений ИК₅₀ использовалось уравнение Хилла:

$$B = \frac{100}{1 + \left(\frac{C}{\text{ИК}_{50}}\right)^n}, \quad (4)$$

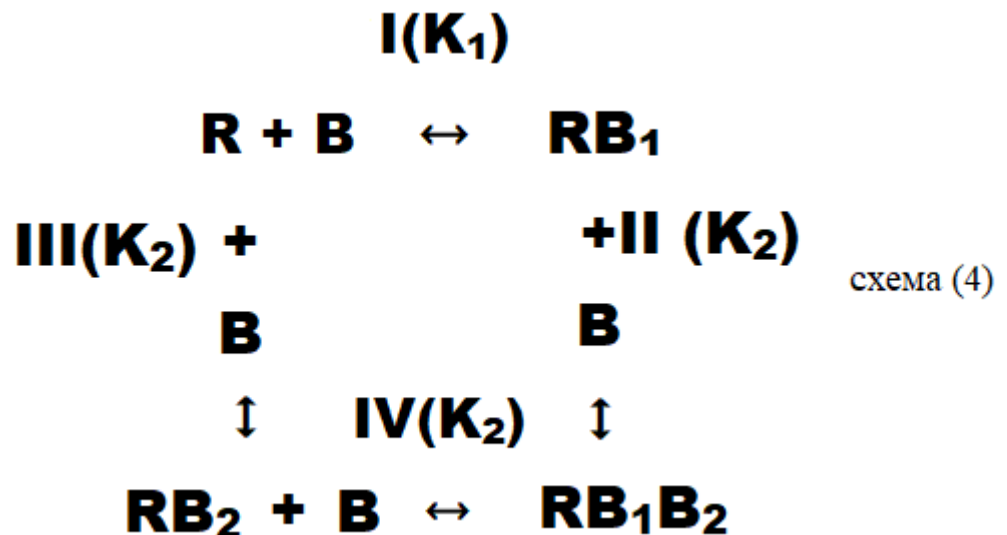
где B – процент блокады, C – концентрация блокатора, IK_{50} – концентрация блокатора, вызывающая 50% ингибирование тока, n – коэффициент Хилла.

Оценка потенциал-зависимости действия лигандов осуществлялась на основании уравнения Вудхол [151]:

$$K_d(V) = k_d(0) \left(\exp\left(\frac{z\delta FV}{RT}\right) \right), \quad (5)$$

где k_d – равновесная константа диссоциации, V – мембранный потенциал, z – валентность молекулы блокатора, δ – фракция мембранного поля, которую должен преодолеть блокатор для достижения сайта связывания внутри поры канала из внеклеточного раствора, F – константа Фарадея, R – газовая температура и T – абсолютная температура.

Формула была адаптирована для схемы 4, в которой связывание лиганда имеет как потенциал-зависимый, так и потенциал-независимый компоненты:



R – рецептор, B – блокатор, K_1 и K_2 – кажущиеся константы диссоциации связывания лиганда с сайтами 1 и 2.

В случае взаимоисключающего связывания лиганда с двумя центрами (реакции I и III), один из которых является потенциал-зависимым, уравнение принимает вид:

$$B = 100 - \frac{100}{1 + \frac{C}{K_1 \cdot \exp\left(\frac{Fz\delta}{RT}V\right) + \frac{C}{K_2}}}, \quad (6)$$

где B выражается в процентах.

Если связывание с двумя сайтами осуществляется независимо ($I=IV$, $II=III$), то блокада будет охарактеризована следующим образом:

$$B = 100 - \frac{100}{1 + \frac{C}{K_1 \cdot \exp\left(\frac{Fz\delta}{RT}V\right) + \frac{C \cdot C}{(K_1 \cdot \exp\left(\frac{Fz\delta}{RT}V\right)) \cdot K_2} + \frac{C}{K_2}}}, \quad (7)$$

В случае, если происходит последовательное связывание двух молекул (I и II , при этом первым занят потенциал-зависимый сайт), то формула принимает следующий вид:

$$B = 100 - \frac{100}{1 + \frac{C}{K_1 \cdot \exp\left(\frac{Fz\delta}{RT}V\right) + \frac{C \cdot C}{(K_1 \cdot \exp\left(\frac{Fz\delta}{RT}V\right)) \cdot K_2}}}, \quad (8)$$

Если же оба сайта связывания потенциал-зависимы, K_2 необходимо заменить на $K_2 \cdot \exp\left[\left(\frac{Fz\delta_2}{RT}V\right)\right]$.

При событии проникновения блокатора через ионный канал, формула модифицируется:

$$B = 100 - \frac{100}{1 + \frac{C}{K_b \cdot \exp\left(\frac{Fz\delta_b}{RT}V\right) + K_p \cdot \exp\left(\frac{Fz\delta_p}{RT}V\right)}}, \quad (9)$$

где K_b и δ_b описывают связывание с сайтом, а K_p и δ_p – проникновение лиганда.

В случае взаимоисключающего связывания лиганда с двумя центрами, один из которых является потенциал-зависимым, и при этом происходит проваливание блокатора через ионный канал в цитоплазму, уравнение принимает вид:

$$B = 100 - \frac{100}{1 + \frac{c}{K_1 b \cdot \exp\left(\frac{Fz\delta_b}{RT}V\right) + K_1 p \cdot \exp\left(\frac{Fz\delta_p}{RT}V\right) + \frac{c}{K_2} + \frac{c^2}{\left(K_1 b \cdot \exp\left(\frac{Fz\delta_b}{RT}V\right) + K_1 p \cdot \exp\left(\frac{Fz\delta_p}{RT}V\right)\right) \cdot K_2}} \quad (10)$$

Описанные выше формулы апробированы в работе Николаева М.В. [152].

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.

3.1. Поиск блокаторов ионотропных глутаматных рецепторов в ряду diazepambenzimidazoles.

3.1.1. Скрининг производных diazepambenzimidazoles.

Все соединения исследовались на ингибирующую способность NMDA- и AMPA-рецепторов с использованием пирамидных нейронов гиппокампа в протоколе совместной аппликации соединений с агонистом, а также агонистом в контроле (пример на рис. 15), либо по протоколу «аппликация агониста, коаппликация агониста с блокатором, отмыв агонистом» (пример на рис. 16).

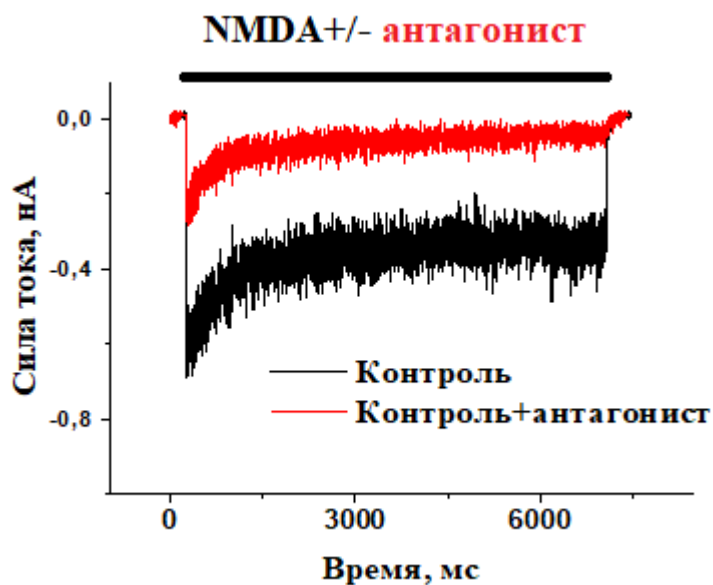


Рисунок 15. NMDAR-токи. Пример записи контроля и коаппликации.

Перечень исследуемых субстанций включает в себя соединения со следующими шифрами: ДАБ-1, ДАБ-7, ДАБ-8, ДАБ-12, ДАБ-19, ДАБ-20, ДАБ-21, ДАБ-22, ДАБ-32, ДАБ-35, ДАБ-40, ДАБ-41, ДАБ-45, ДАБ-47, ДАБ-48, ДАБ-49, ДАБ-52, ДАБ-53, ВІF-59, ВІF-60, ВІF-69.

В таблице 6 представлены формулы этих соединений и их ингибирующие активности при аппликации в концентрации 100 μ M.

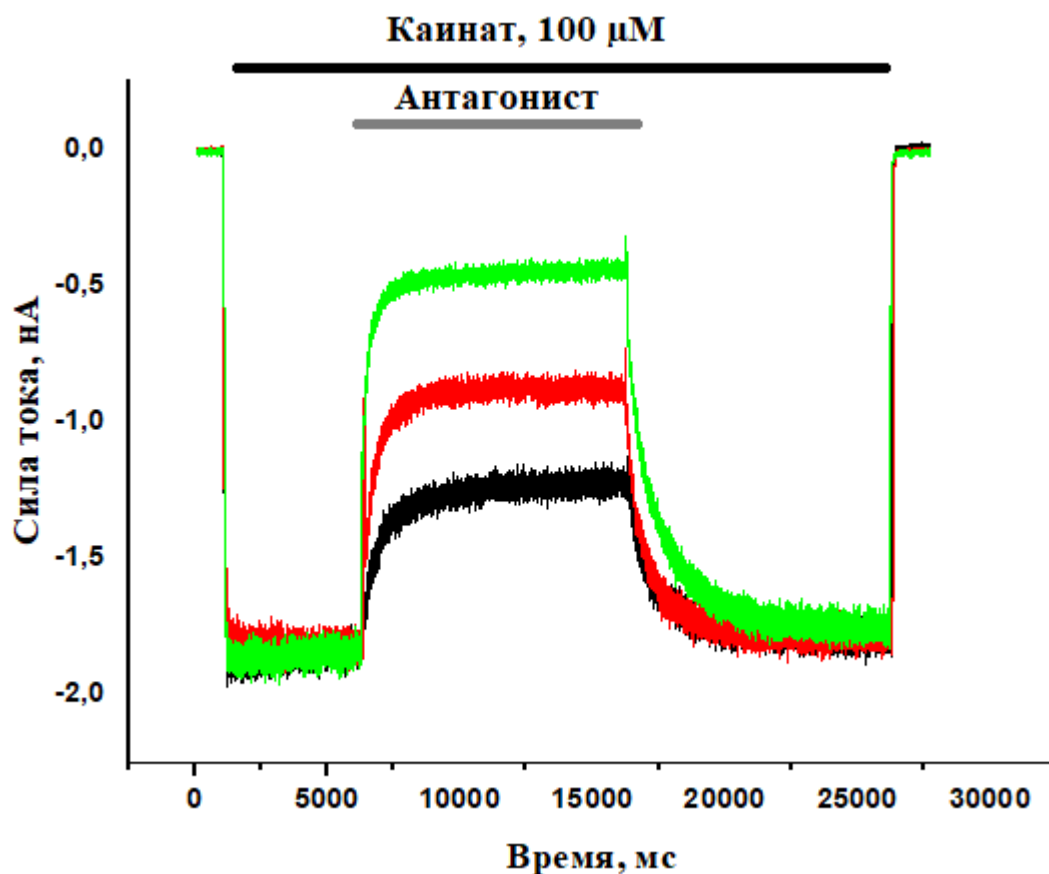


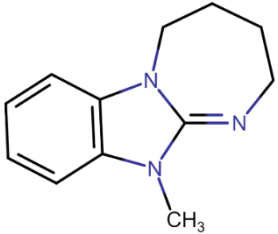
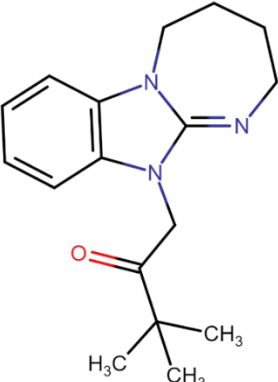
Рисунок 16. КН-AMPA-токи. Начало блокады на 6 секунде, повторная подача агониста на 16 секунде.

Нижеприведённая таблица 5 описывает результаты расчёта концентраций полумаксимального ингибирования соединений, демонстрировавших наибольший ингибирующий эффект или представивших структурный интерес в ходе проведения процедуры электрофизиологического скрининга.

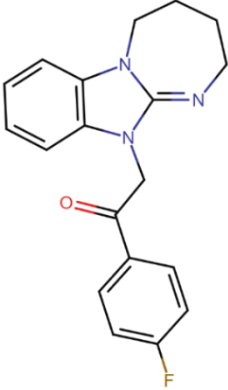
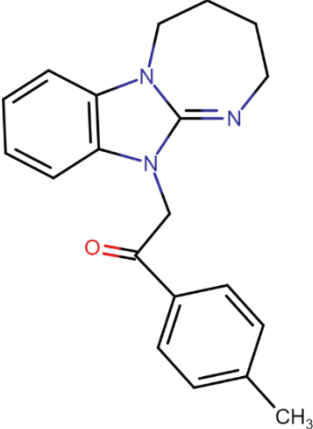
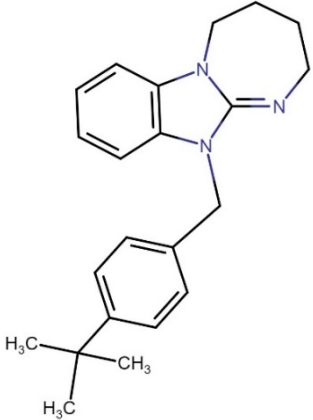
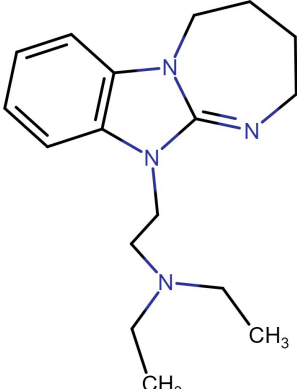
Таблица 5. Значения величин полублокады для соединений, активность которых была выявлена в результате скрининга.

Шифр пробы	ИК ₅₀ NMDAR, μM n=5	ИК ₅₀ КН-AMPA, μM n=5
ДАБ-1	146,7 \pm 48,2	-//-
ДАБ-8	69,9 \pm 20,8	96,6 \pm 1,6
ДАБ-12	9,4 \pm 2,6	139,6 \pm 22,5
ДАБ-19	11,0 \pm 1,6	15,5 \pm 1,5
ДАБ-20	24,0 \pm 4,4	-//-
ДАБ-32	8,5 \pm 2,7	107,2 \pm 2,6
ДАБ-40	30,6 \pm 6,5	-//-
ДАБ-47	22,5 \pm 1,9	-//-
ДАБ-48	2,5 \pm 0,6	83,0 \pm 7,0
ДАБ-49	3,6 \pm 1,2	-//-
ДАБ-53	225,8 \pm 77,0	-//-

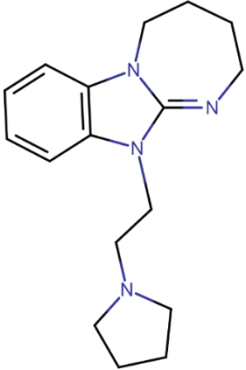
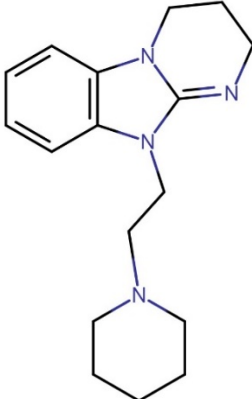
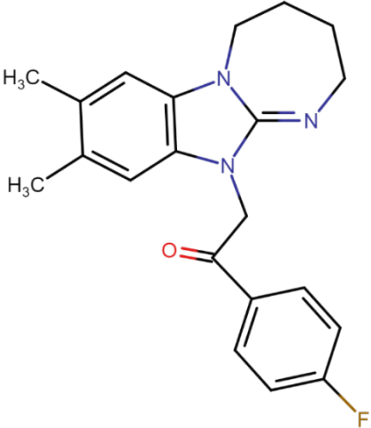
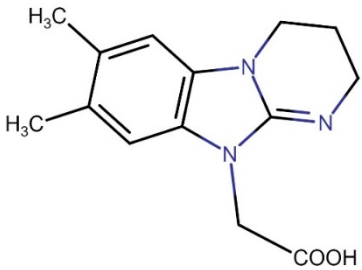
Таблица 6. Результат скрининга. Процент блокады интегральных токов NMDA- и КН-AMPA-рецепторов производными diazepinbenzimidazola в концентрации 100 μM .

Шифр пробы	Структурная формула	nX	Блокада NMDAR, % n=4	Блокада КН-AMPA, % n=4
ДАБ-1		HI	61,9 \pm 2,4	10,9 \pm 0,4
ДАБ-7		HBr	52,7 \pm 5,3	7,6 \pm 0,7

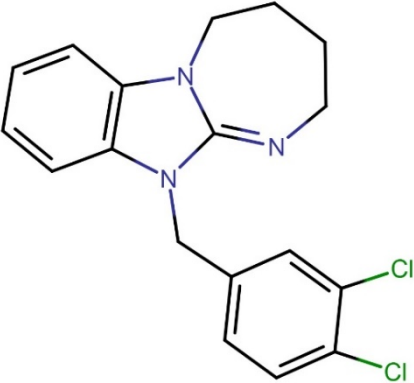
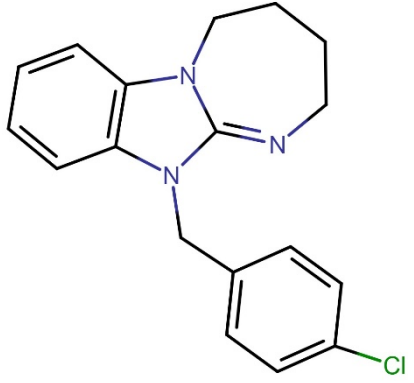
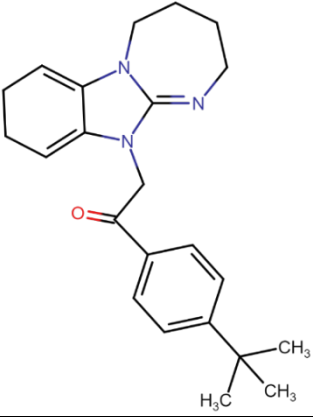
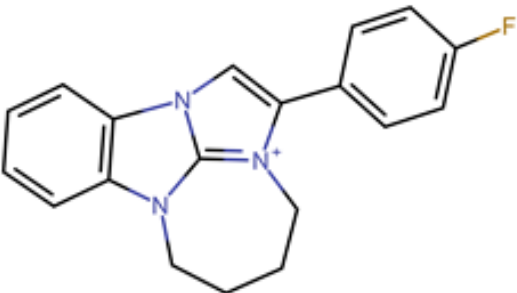
Продолжение таблицы 6.

ДАБ-8		HBr	48,7±1,0	51,4±1,1
ДАБ-12		HBr	92,3±1,6	41,1±0,9
ДАБ-19		HBr	100	100
ДАБ-20		2HCl	89,9±1,7	13,4±1,0

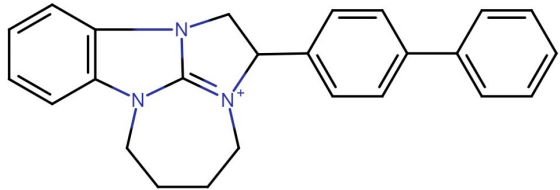
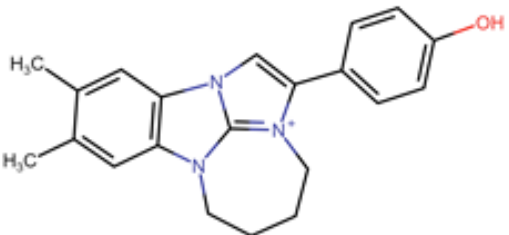
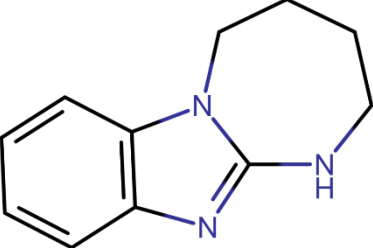
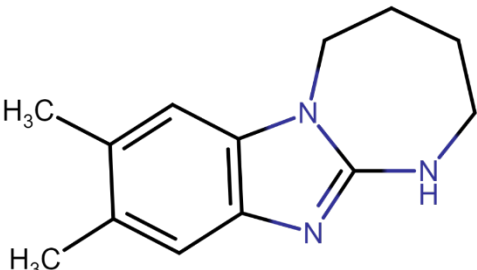
Продолжение таблицы 6.

ДАБ-21		2HCl	62,4±5,2	18,6±0,9
ДАБ-22		2HCl	65,2±4,5	18,9±1,1
ДАБ-32		HBr	82,2±2,6	55,9±2,9
ДАБ-35		-/-	34,2±12,9	10,4±0,6

Продолжение таблицы 6.

ДАБ-40		HCl	82,9±1,2	0
ДАБ-41		HCl	66,9±1,4	0
ДАБ-45		HBr	77,8±4,1	49,7±4,3
ДАБ-47		Br ⁻	81,2±2,2	25,4±1,0

Окончание таблицы 6.

ДАБ-48		Br^-	$98,2 \pm 0,8$	$59,0 \pm 1,1$
ДАБ-49		Br^-	$93,6 \pm 0,8$	$25,5 \pm 1,9$
ДАБ-52		-//-	$42,0 \pm 3,8$	$8,6 \pm 0,7$
ДАБ-53		-//-	$53,8 \pm 3,9$	$8,3 \pm 0,4$

Наибольшую NMDA-ингибирующую активность проявило соединение с шифром ДАБ-48, в то время как ДАБ-19 блокировал как NMDA-, так и КН-АМРА-рецепторы. В ходе дополнительных исследований была найдена ещё одна мишень – КП-АМРА-рецепторы. Таким образом, ДАБ-19 обладает уникальным профилем ингибирования, механизмы действия которого было решено охарактеризовать более подробно в дальнейших экспериментах.

3.1.2. Исследование концентрационной зависимости ДАБ-19 для NMDAR, КН- и КП-АМРА.

Для построения дозозависимых кривых были использованы следующие концентрации ДАБ-19:

- NMDAR – 1, 3, 10, 30, 45, 60, 100 μM
- КН-АМРА – 1, 3, 10, 30, 100 μM
- КП-АМРА – 1, 3, 10, 15, 30 μM

Результаты экспериментов представлены на рисунке 19 и сводной таблице 7.

Пример записи NMDA-токов представлен на рисунке 17, запись интегральных токов КН-АМРА-рецепторов – на рисунке 18.

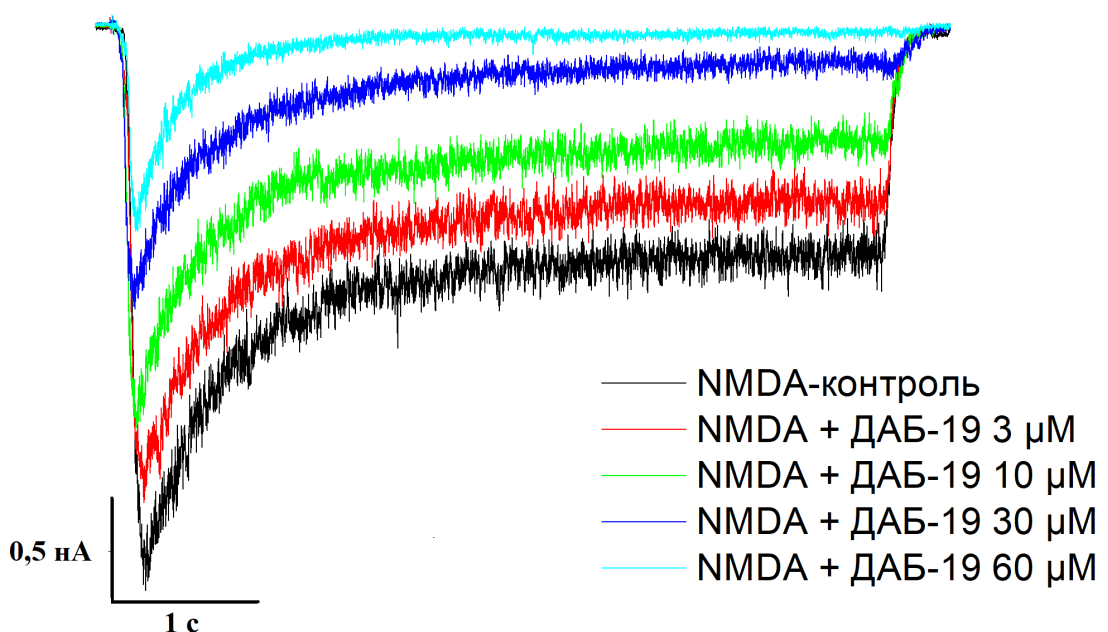


Рисунок 17. Ингибирование NMDA-рецепторов при различных концентрациях ДАБ-19.

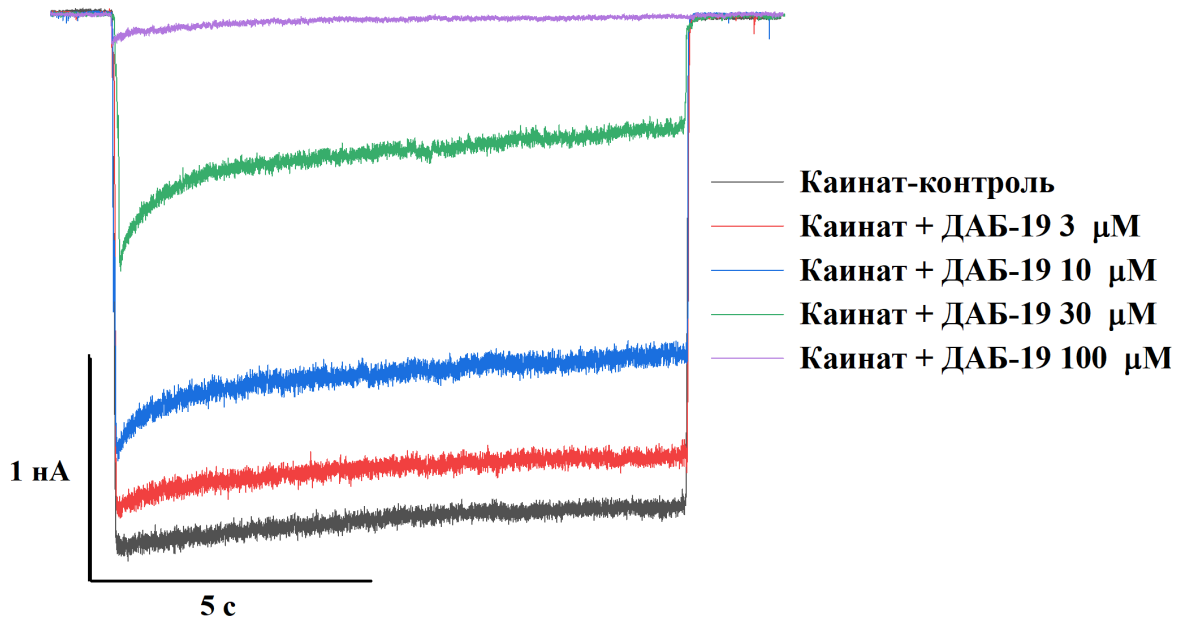


Рисунок 18. Ингибирование КН-АМРА-рецепторов при различных концентрациях ДАБ-19.

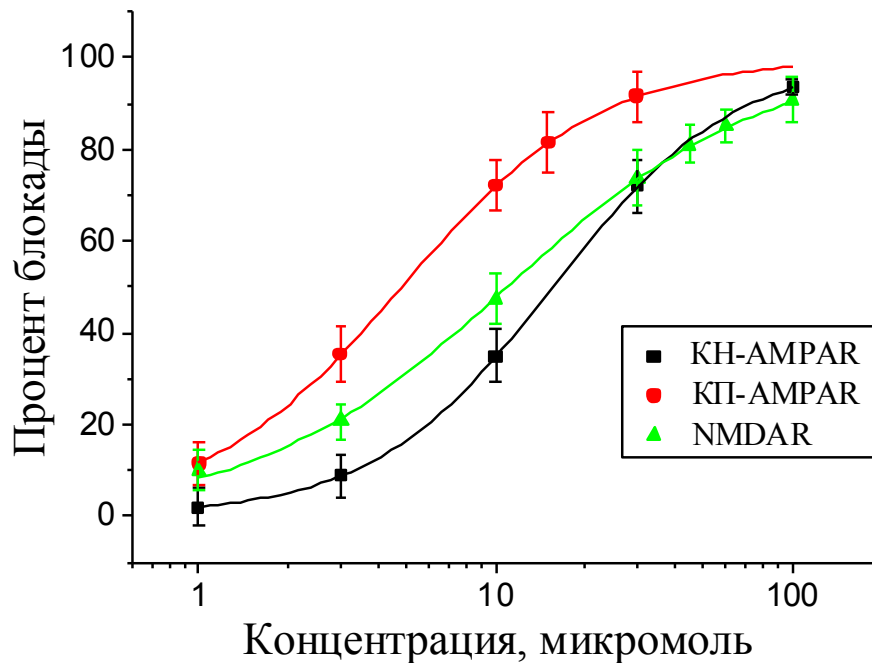


Рисунок 19. Кривые дозозависимости, описывающие действие ДАБ-19 на NMDAR, КП- и КН-АМРА-рецепторы.

Таблица 7. Сводная таблица, характеризующая ингибирующую активность ДАБ-19 в отношении ионотропных глутаматных рецепторов, а также способность ДАБ-19 к кооперативному связыванию.

Рецептор	ИК ₅₀ , μM	Коэффициент Хилла
NMDAR, n=8	11,0 \pm 1,6	1,0 \pm 0,1
КН-AMPA, n=9	15,4 \pm 1,4	1,4 \pm 0,2
КП-AMPA, n=6	4,7 \pm 0,8	1,2 \pm 0,2

Коэффициент Хилла — безразмерная величина, характеризующая кооперативность связывания лиганда с рецептором или ферментом:

- $n > 1$ Положительный кооперативный эффект: присоединение одной молекулы лиганда к рецептору или активному центру фермента облегчает (увеличивает сродство) дальнейшее связывание лиганда
- $n < 1$ Отрицательный кооперативный эффект: присоединение одной молекулы лиганда к рецептору или активному центру фермента уменьшает сродство к лиганду и затрудняет его дальнейшее связывание.
- $n = 1$ Отсутствие кооперативного эффекта: сродство рецептора или фермента к лиганду не зависит от уже присоединённых молекул лиганда.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что ДАБ-19 - это низкоселективный высокоактивный антагонист ионотропных глутаматных рецепторов. Далее было осуществлено более детальное исследование механизмов действия данного соединения на ионотропные рецепторы глутамата.

3.1.3. Описание механизмов действия ДАБ-19 на NMDA-рецепторы.

Агонист-зависимость.

В данной серии экспериментов было исследовано, как антагонист ДАБ-19 реагирует на изменение концентрации агониста. Было проведено сравнение эффективности ингибирования фиксированной концентрацией ДАБ-19 (10 μM) при различных концентрациях агониста NMDA (от 10 до 3000 μM), $n=5$. По результатам, представленным на рисунке 20, можно заметить, что эффективность ингибирования ДАБ-19 не только не уменьшалась, но даже усиливалась с увеличением концентрации агониста. Это позволяет сделать определенный вывод о том, что ДАБ-19 действует на NMDA-рецепторы неконкурентным образом, но, в то же время и агонист-зависимо.

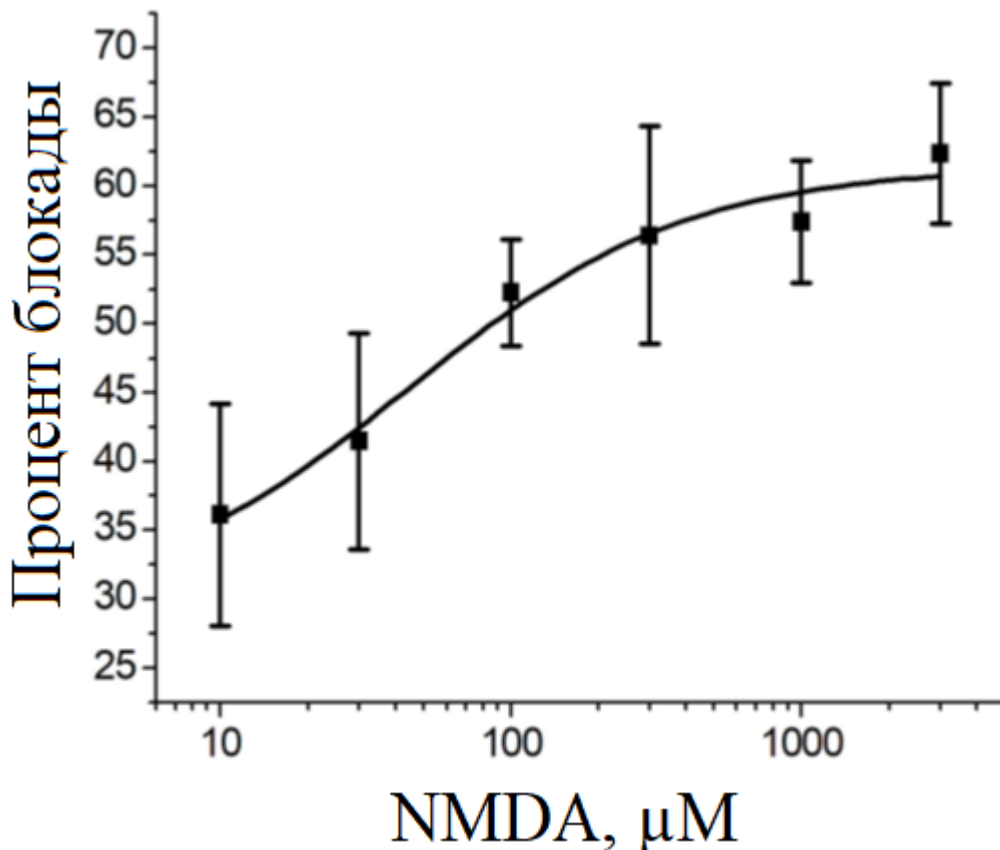


Рисунок 20. Агонист-зависимость действия ДАБ-19 на NMDA-рецепторы. На графике представлена зависимость эффективности ингибирования ДАБ-19 NMDA-рецепторов пирамидных нейронов гиппокампа от

концентрации агониста NMDA. Для проведения эксперимента использовалась фиксированная концентрация ДАБ-19, равная 10 μM . Диапазон концентраций агониста варьировался от 10 до 3000 μM . Из графика можно сделать вывод, что эффективность ингибирования NMDA рецепторов при использовании ДАБ-19 не только не снижается, но даже усиливается с увеличением концентрации агониста. Такое преимущество позволяет судить об эффективности данного соединения в условиях, при которых концентрации глутамата в синапсе провоцируют эксайтотоксические эффекты.

Потенциал-зависимость.

При $\text{pH}=7,4$ молекулы ДАБ-19 несут положительный заряд +1. Это позволило нам изучить, связываются ли молекулы в пору канала NMDA-рецепторов, исследуя эффективность ингибирования при разных значениях потенциала на мембране (от +40 до -120 мВ). Из рисунка 21 видно, что эффективность ингибирования ДАБ-19 монотонно усиливается при гиперполяризации мембраны в области отрицательных потенциалов. Это свидетельствует о том, что блокада поры канала является основным молекулярным механизмом ингибирования NMDA-рецепторов этим соединением. Значение параметра δ , который характеризует глубину расположения сайта связывания в электрическом поле мембраны, составило $0,8 \pm 0,2$, $n=6$. Стоит отметить, что ингибирование ДАБ-19 сохраняется и в области положительных потенциалов (25-30%), что говорит о наличии дополнительного сайта связывания во внеклеточных доменах рецептора.

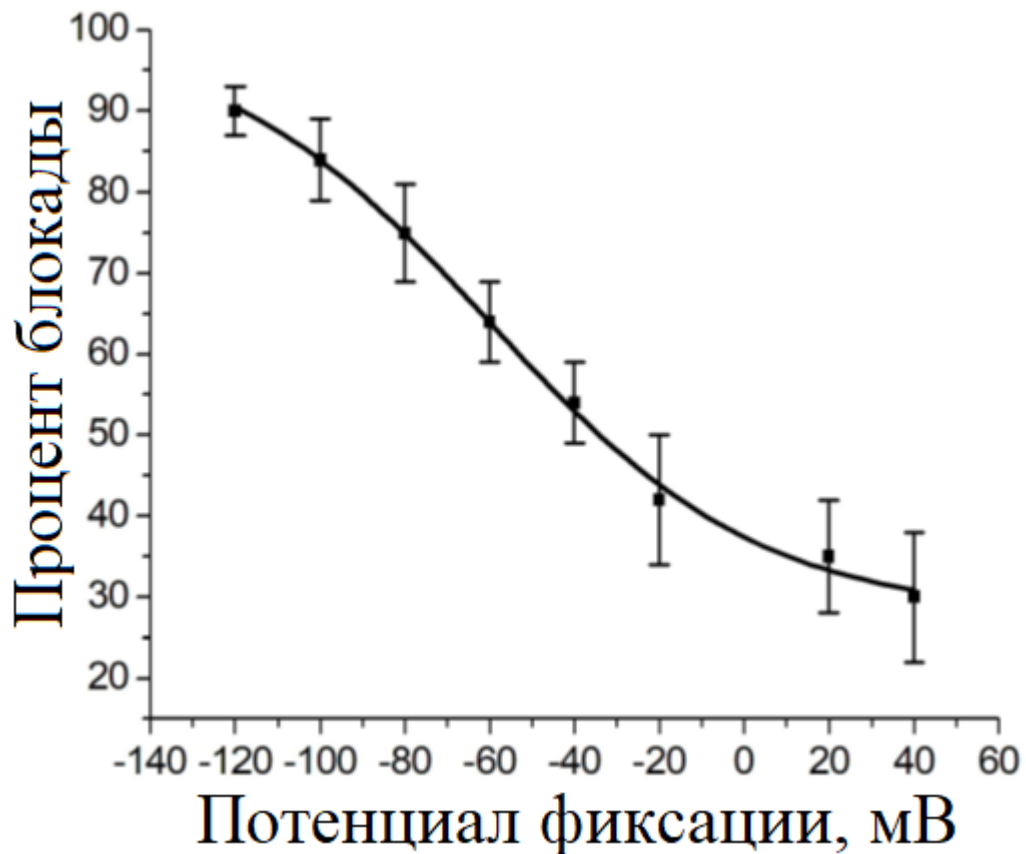


Рисунок 21. Зависимость ингибирования NMDA-рецепторов пирамидных нейронов гиппокампа от потенциала на мембране. На графике изображена зависимость действия ДАБ-19 (20 μM) на NMDA рецепторы от мембранного потенциала. Эксперименты проведены путем изменения потенциала от +40 до -120 мВ. Из графика видно, что эффект ДАБ-19 на NMDA рецепторы является потенциал-зависимым. При гиперполяризации мембраны (в области отрицательных потенциалов) наблюдается увеличение ингибирующего действия ДАБ-19. Это указывает на то, что ДАБ-19 блокирует NMDA-каналы преимущественно по механизму блокады ионного канала.

Кинетика отмыва.

В следующей серии экспериментов была исследована кинетика действия ДАБ-19 на NMDA-рецепторы. Поскольку кинетика связывания зависит от концентрации используемого блокатора, была проанализирована кинетика отмыва соединения, так как эта информация является наиболее

информативной. Кинетика отмыва ДАБ-19 хорошо описывается моноэкспоненциальной функцией. Постоянная времени отмыва (τ) при потенциале мембраны -80 мВ составила 4.2 ± 1.8 сек ($n=4$). Блокаторы с медленной кинетикой отмыва, например, дизоцилпин, обычно проявляют выраженные побочные эффекты. Однако, скорость отмыва ДАБ-19 была достаточно быстрой, что уменьшает вероятность появления серьезных побочных эффектов в связи с продолжительной блокадой NMDA рецепторов.

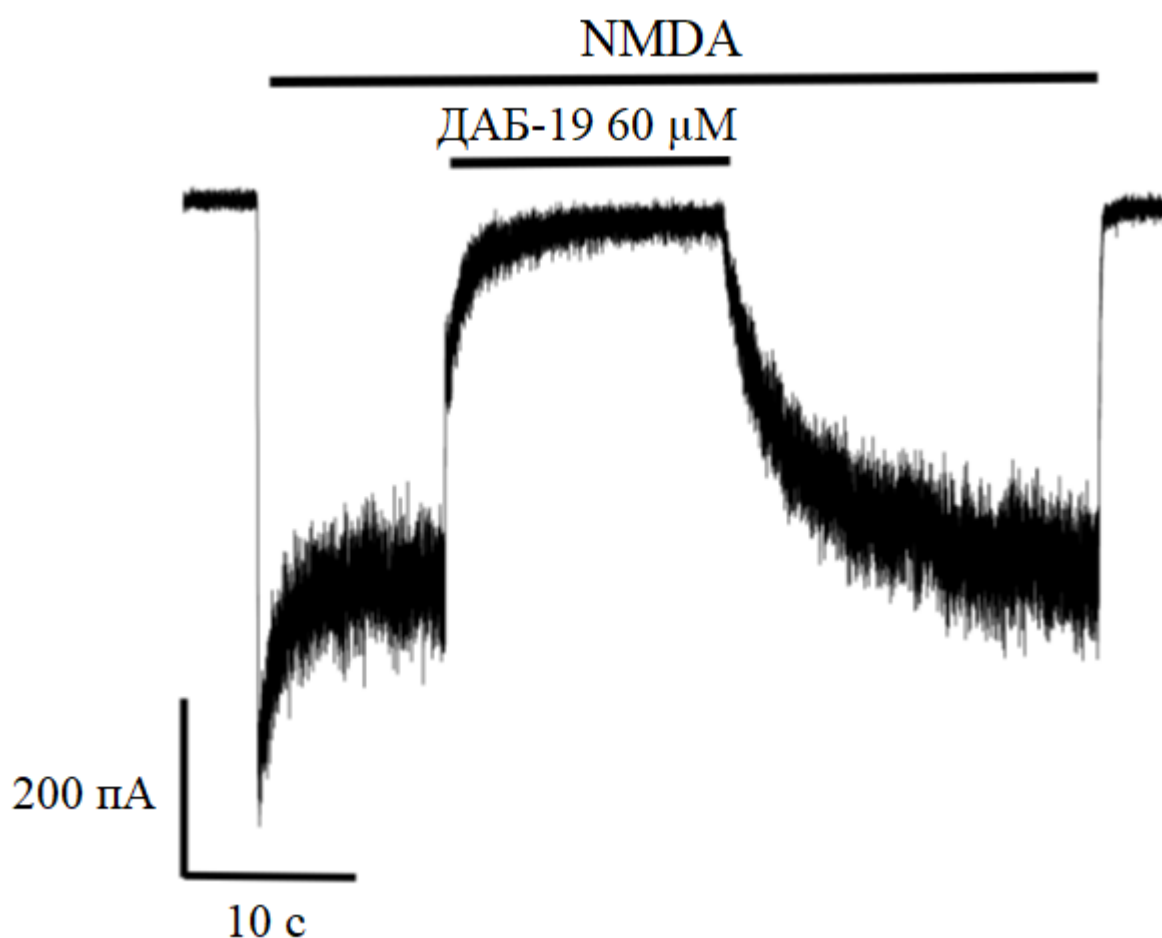


Рисунок 22. Кинетика отмыва ДАБ-19 для NMDA-рецепторов. Репрезентативный пример кинетики отмыва ДАБ-19 в концентрации $60 \mu\text{M}$.

Взаимодействие с воротным механизмом канала. Эффект ловушки.

При проведении анализа влияния ДАБ-19 на NMDA рецепторы в различных экспериментальных протоколах не было обнаружено характерных признаков

блокады по типу хвостовых токов и овершутов (механизм «foot-in-the-door»), при отмыве, без и с присутствием агониста. Для того, чтобы проверить способность ДАБ-19 задерживаться в закрытых каналах (так называемый эффект ловушки), использовался модифицированный протокол с двойной аппликацией. Этот протокол включал контрольную аппликацию агониста, блокаду насыщающей концентрацией ДАБ-19, 30-секундную паузу во внеклеточном растворе, тестирующую аппликацию агониста, еще одну паузу во внеклеточном растворе и дополнительную контрольную аппликацию агониста. Как показано на рисунке 23, амплитуда ответа на тестирующую аппликацию агониста была ниже, чем на контрольных аппликациях агониста. Это указывает на то, что часть молекул ДАБ-19 осталась запертой в закрытых каналах NMDA рецепторов. Процент таких запертых молекул составил $41 \pm 13\%$ ($n=6$).

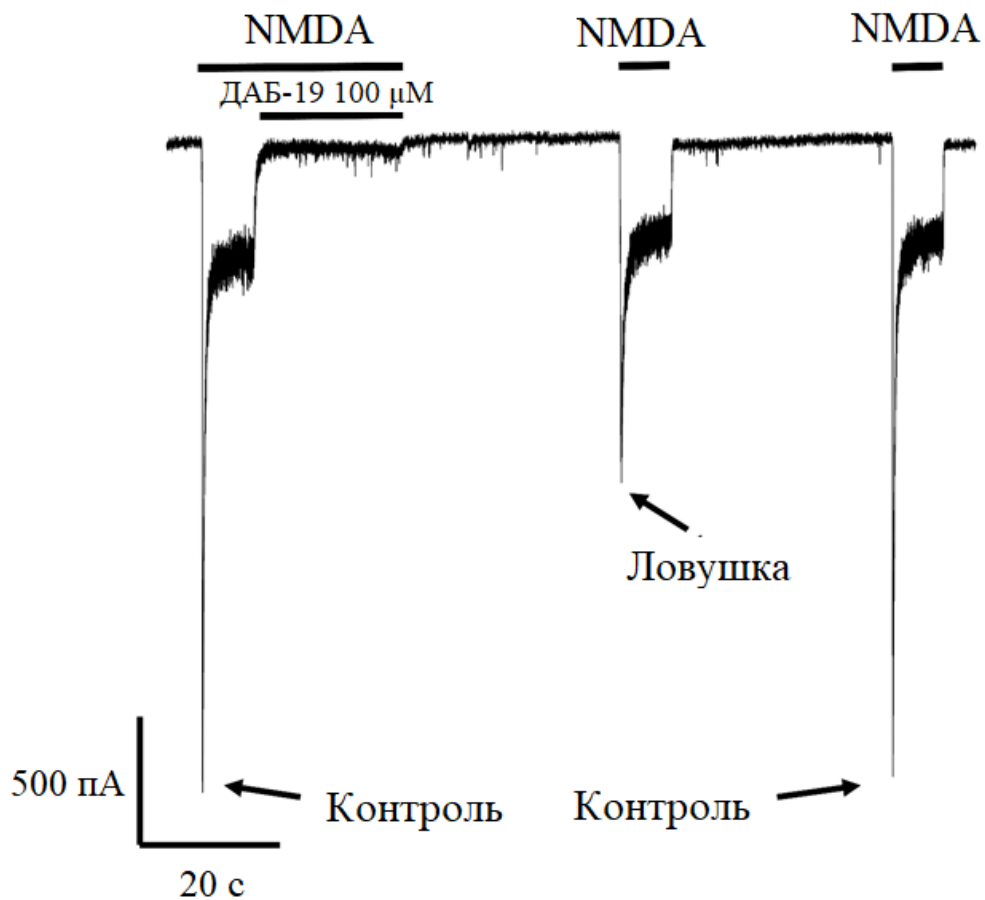


Рисунок 23. Эффект ловушки ДАБ-19 в канале NMDA-рецептора. Представлен репрезентативный пример воздействия ДАБ-19 в концентрации 100 μM на NMDA рецепторы с использованием модифицированного протокола "двойной аппликации". Этот пример наглядно показывает частичную ловушку блокатора внутри закрытого канала.

Влияние ДАБ-19 на закрытые рецепторы.

Для выявления действия ДАБ-19 на закрытые NMDA-рецепторы осуществлялась аппликация этого соединения в концентрации 100 μM во внеклеточном растворе, с последующей активацией NMDA-рецепторов исключительно агонистом. Как видно из рисунка 24, переход рецепторов из закрытой конформации в открытую после экспозиции соединением ДАБ-19 на протяжении 30 секунд не совпадает с контрольной записью активации NMDA-рецепторов, что свидетельствует в пользу того, что модификация NMDA-рецепторов в конформации закрытого состояния является реализуемой. (n=7)

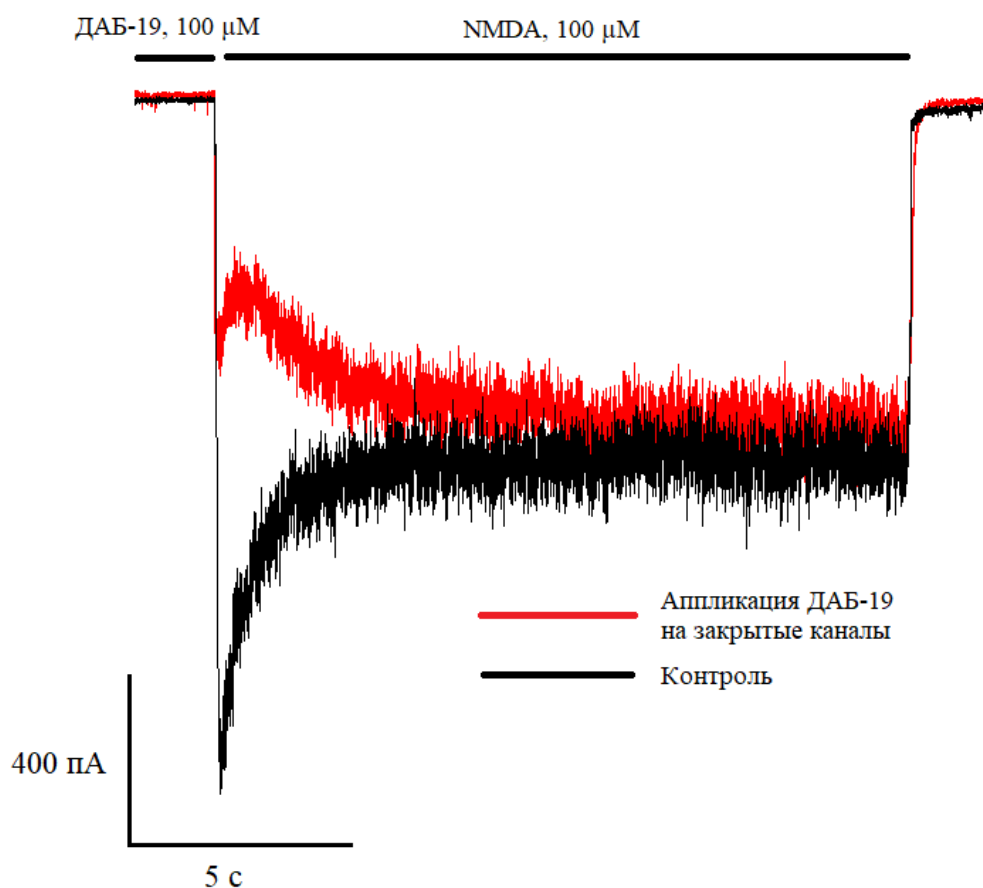


Рисунок 24. Действие ДАБ-19 на закрытые каналы NMDA-рецепторов. NMDAR-токи, репрезентативный пример. Активация NMDA-рецепторов после аппликации ДАБ-19, 100 μM во внеклеточном растворе на закрытые каналы. Чёрным отмечена контрольная аппликация.

3.1.4. Описание механизмов действия ДАБ-19 на кальций-непроницаемые AMPA-рецепторы.

Агонист-зависимость.

В рамках данного исследования был проведен ряд экспериментов, целью которых было изучение влияния концентрации агониста каината на эффективность ингибирования ДАБ-19. В диапазоне концентраций от 30 до 3000 μM было обнаружено, что эффективность ингибирования ДАБ-19 снижается при увеличении концентрации агониста. Рисунок 26 подтверждает данную тенденцию, показывая, что даже при очень высокой концентрации агониста (3000 μM) ингибирование оставалось значительным, составляя около 60%, $n=6$. Исходя из этого, можно сделать вывод, что ингибирование

кальций-непроницаемых AMPA рецепторов с использованием ДАБ-19 является неконкурентным и при этом зависит от концентрации агониста. В отличие от этого, в случае конкурентных антагонистов, таких как DNQX, при условии высокой концентрации агониста ингибирование прекращается.

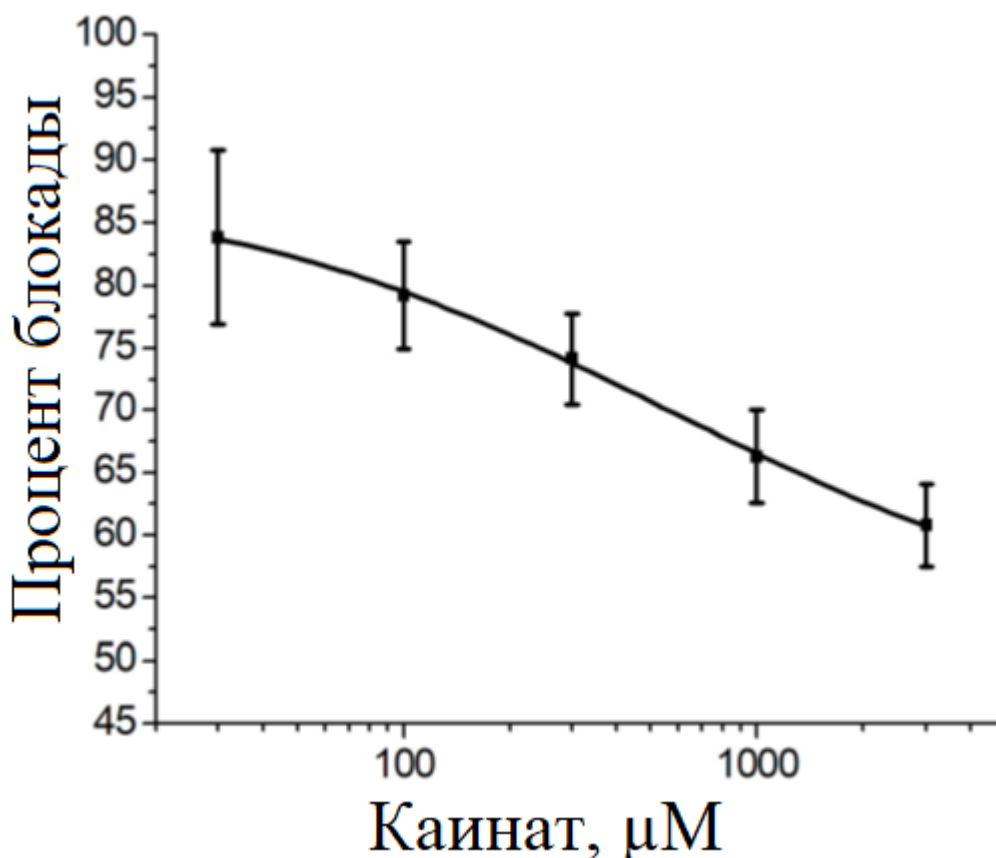


Рисунок 25. Зависимость эффективности ингибирования кальций-непроницаемых AMPA рецепторов пирамидных нейронов гиппокампа от концентрации каината. Использовалась фиксированная концентрация ДАБ-19 (30 μM), в то время как концентрация агониста каината варьировала в диапазоне от 30 до 3000 μM . Из рисунка видно, что с увеличением концентрации агониста каината эффективность ингибирования ДАБ-19 снижается. Однако, даже при самой высокой насыщающей концентрации агониста (3000 μM) ингибирование остается выраженным, составляя примерно 60%. Это позволяет сделать вывод, что ингибирование кальций-непроницаемых AMPA рецепторов с помощью ДАБ-19 является неконкурентным, однако зависит от присутствия агониста каината.

Потенциал-зависимость.

ДАБ-19 в концентрации 30 μM был изучен на способность эффективно ингибировать кальций-непроницаемые AMPA-рецепторы при различных значениях вольтажа на мембране. В отличие от NMDA-рецепторов, эффективность ингибирования КН-AMPA-рецепторов соединением ДАБ-19 не зависела от потенциала на мембране, $n=4$. Это позволяет сделать вывод о том, что сайт связывания с ДАБ-19 расположен во внеклеточных доменах рецептора. В связи с тем, что действие ДАБ-19 на КН-AMPA-рецепторы является неконкурентным, можно предположить, что данное соединение является негативным аллостерическим модулятором этого подтипа ионотропных глутаматных рецепторов.

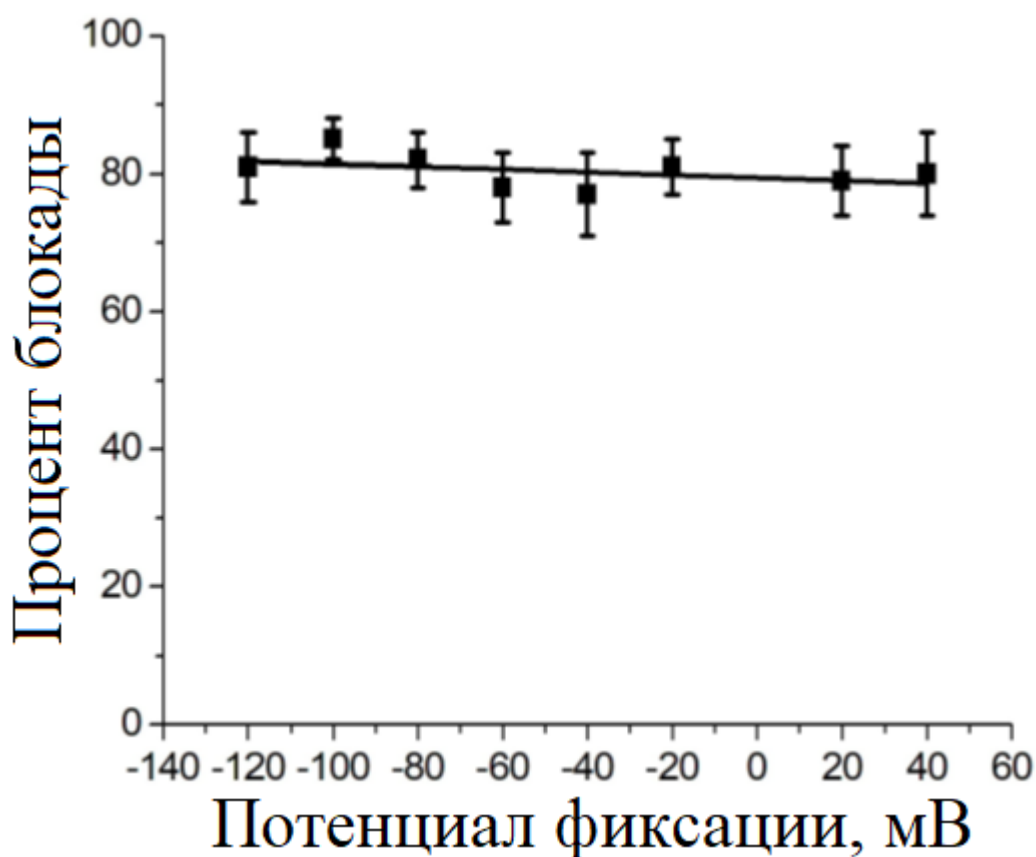


Рисунок 26. Зависимость ингибирования КН-AMPA рецепторов пирамидных нейронов гиппокампа от потенциала на мембране. Потенциал изменялся в диапазоне от +40 до -120 мВ при фиксированной концентрации ДАБ-19 (30 μM). Из графика можно увидеть, что эффективность ингибирования не

изменяется в зависимости от потенциала мембраны. Это указывает на то, что ДАБ-19 оказывает ингибирующий эффект на кальций-непроницаемые АМРА рецепторы независимо от степени поляризации мембраны. Полученные результаты подтверждают гипотезу о том, что сайт связывания ДАБ-19 располагается во внеклеточной области данных рецепторов.

Кинетика отмыва.

В следующей серии экспериментов изучалась кинетика воздействия ДАБ-19 на КН-АМРА рецепторы. Было обнаружено, что кинетика отмыва ДАБ-19 хорошо соответствует моноэкспоненциальной функции. При потенциале на мембране -80 мВ константа времени отмыва (τ) составляла 4.8 ± 1.6 секунды ($n=5$). Это указывает на то, что ДАБ-19 имеет относительно быструю кинетику действия и эффективно отмывается с кальций-непроницаемых рецепторов в течение этого временного интервала.

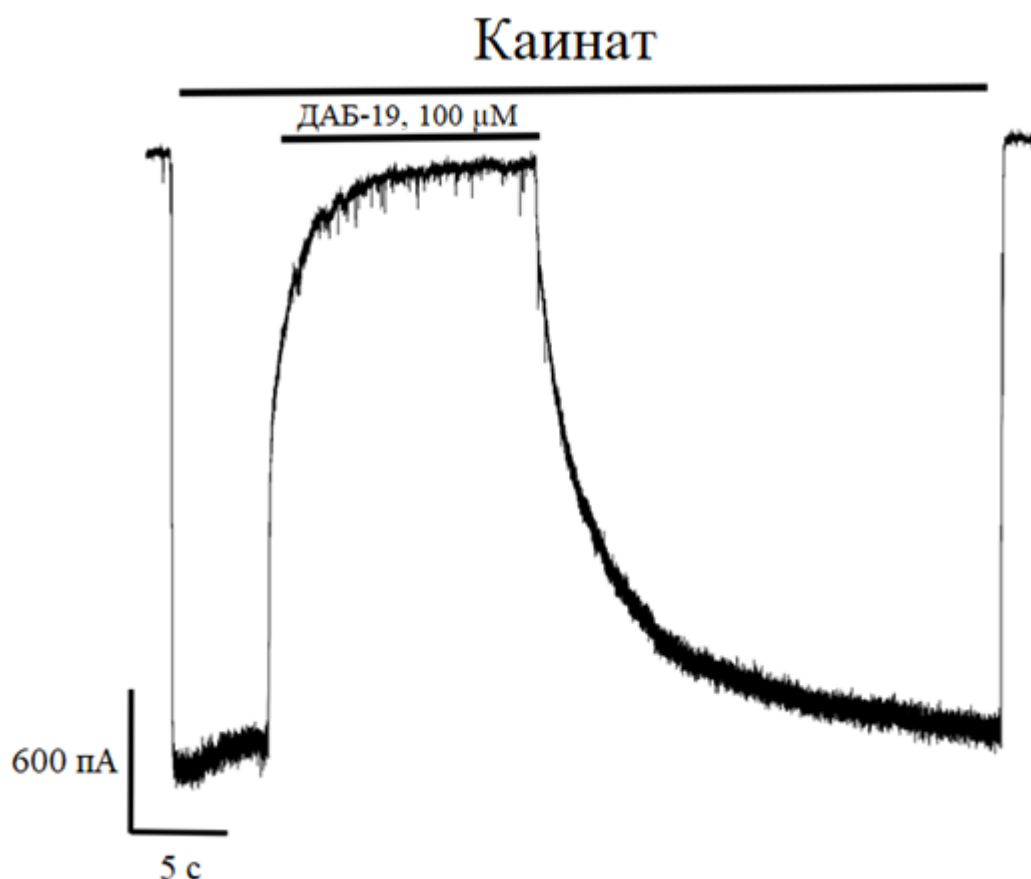


Рисунок 27. Кинетика отмыва ДАБ-19 в концентрации 100 μM для КН-АМРА-рецепторов пирамидных нейронов гиппокампа.

Взаимодействие с воротным механизмом канала. Эффект ловушки.

Рисунок 28 показывает результаты, полученные в последующей серии экспериментов, где исследовалась способность ДАБ-19 оставаться в закрытых каналах КН-АМРА рецепторов (эффект ловушки) с использованием модифицированного протокола двойной аппликации. Было обнаружено, что амплитуда ответа на тестирующую аппликацию агониста практически не отличалась от амплитуды ответа на контрольные аппликации агониста (менее 10%), $n=7$. Это означает, что молекулы ДАБ-19 не могут оставаться в закрытых каналах кальций-непроницаемых АМРА рецепторов, подтверждая предположения об его аллостерическом действии. Характерных признаков блокады для механизма действия «foot-in-the-door» также не было выявлено.

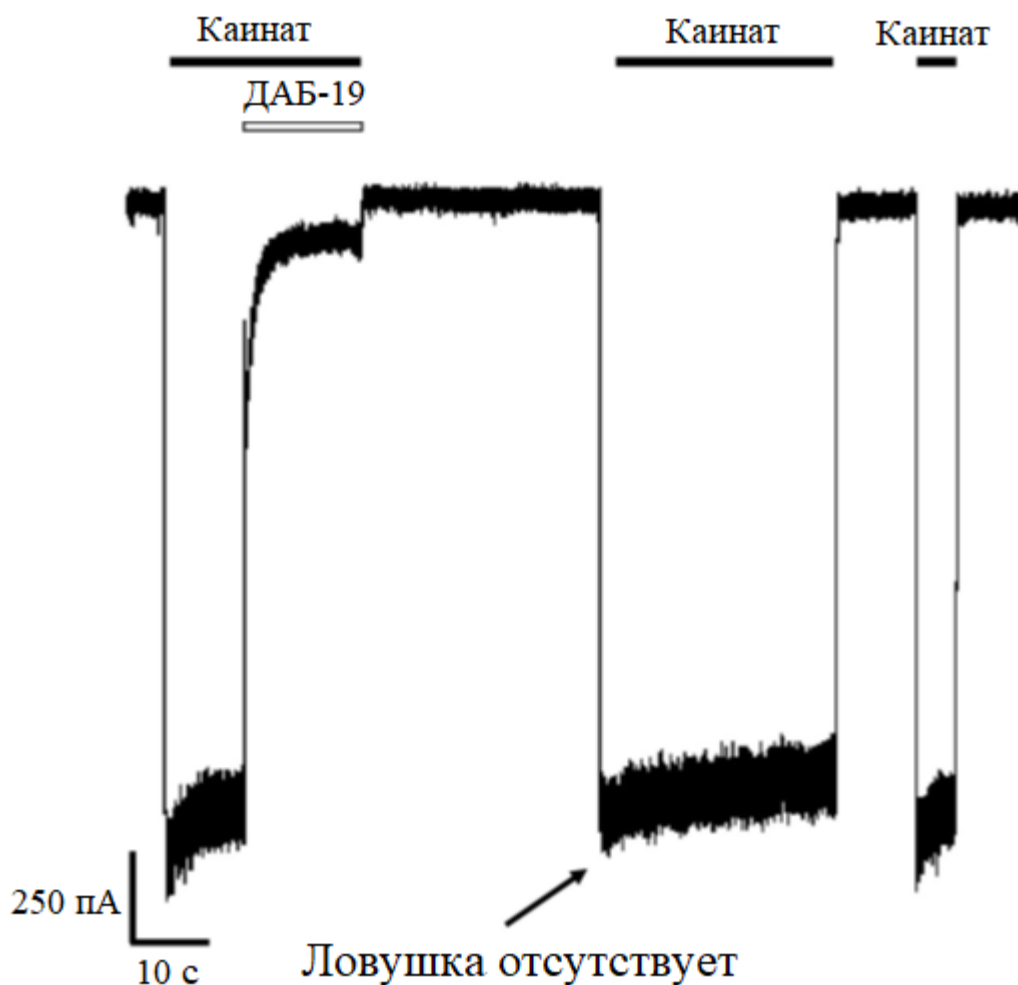


Рисунок 28. Действие ДАБ-19 в концентрации 100 μM на КН-АМРА рецепторы пирамидных нейронов гиппокампа в протоколе двойной аппликации. Обнаружено, что ДАБ-19 практически не остается в закрытых каналах (эффект ловушки составляет менее 10%).

Влияние ДАБ-19 на закрытые кальций-непроницаемые АМРА-рецепторы.

Благодаря тому, что ионотропные глутаматные рецепторы генерируют стационарный ток, был использован протокол, в котором перед активацией каналов вместе с внеклеточным раствором апплицировался ДАБ-19 в концентрации 100 μM на протяжении 30 секунд. В момент подачи агониста можно увидеть, что развитие ответа происходит постепенно, вследствие отмыва связавшегося с рецептором антагониста. Проведенные эксперименты свидетельствуют в пользу того, что основным механизмом действия ДАБ-19

на КН-AMPA-рецепторы является взаимодействие с рецепторами в закрытой конформации, $n=8$.

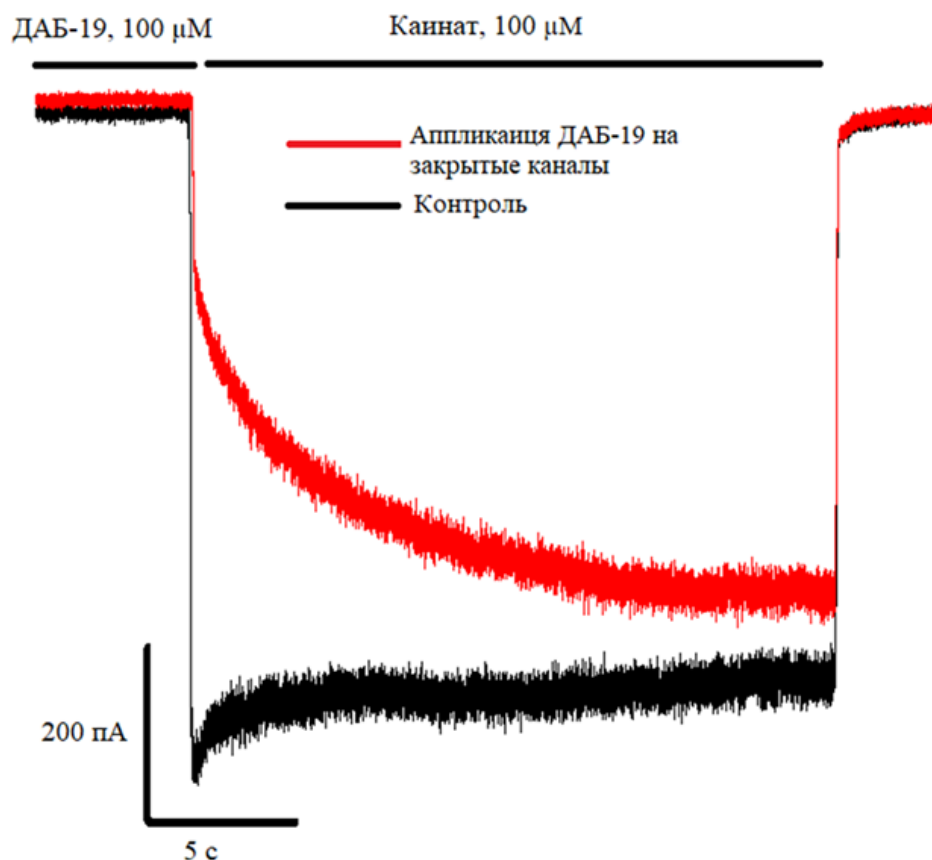


Рисунок 29. Действие ДАБ-19 на закрытые каналы КН-AMPA пирамидных нейронов гиппокампа. Развитие ответа на агонист происходит постепенно вследствие отмыва связанного с рецептором антагониста. Чёрным отмечена контрольная аппликация.

3.1.5. Описание механизмов действия ДАБ-19 на кальций-проницаемые AMPA рецепторы.

Агонист-зависимость.

Были проведены эксперименты, где сравнивалась эффективность ингибирования ДАБ-19 при постоянной концентрации (10 μM) с различными концентрациями агониста каината (10 – 3000 μM). Анализ графика 30 позволяет судить о том, что эффективность ингибирования ДАБ-19 остается неизменной при изменении концентрации агониста. Это позволяет сделать

чёткий вывод о том, что ДАБ-19 проявляет неконкурентное действие на КН-АМРА-рецепторы, $n=5$.

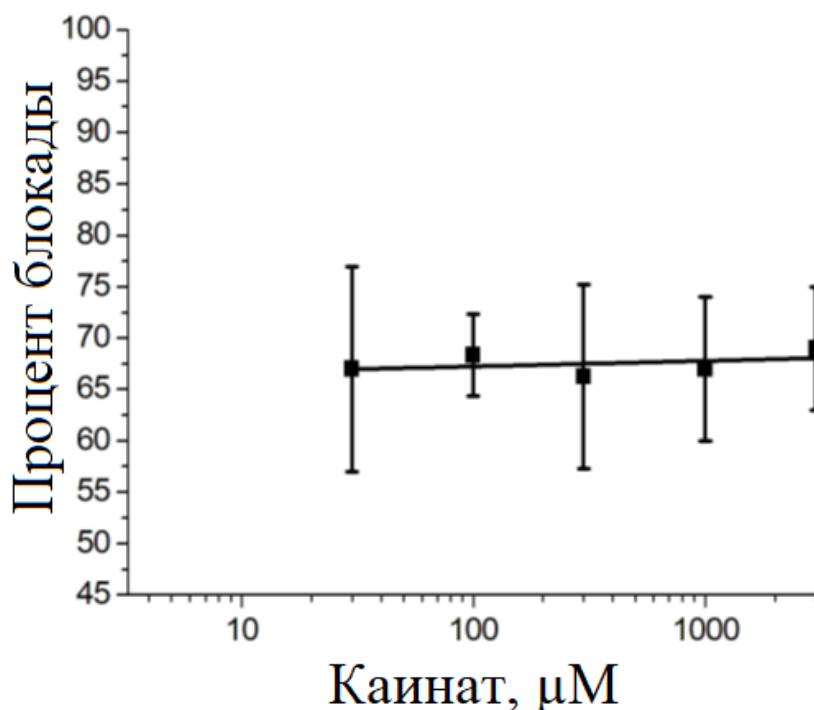


Рисунок 30. Зависимость эффективности ингибирования КП-АМРА-рецепторов гигантских интернейронов стриатума фиксированной концентрацией ДАБ-19 (10 μM) от концентрации агониста каината в диапазоне 30 – 3000 μM .

Потенциал-зависимость.

В последующих экспериментах исследовалось влияние различных значений мембранного потенциала (+40 до -120 мВ) на эффективность ингибирования КП-АМРА-рецепторов с использованием фиксированной концентрации ДАБ-19 (15 μM). Наблюдалось монотонное увеличение эффективности ингибирования ДАБ-19 в случае гиперполяризации мембраны, подобно тому, как это было отмечено для NMDA рецепторов. Это подтверждает предположение о том, что блокада поры канала является главным молекулярным механизмом ингибирования кальций-проницаемых АМРА рецепторов этим соединением. Кроме того, наблюдалось отсутствие

ослабления блокады в диапазоне потенциалов от -80 до -120 мВ, что указывает на то, что ДАБ-19 не проникает внутрь клетки через канал. Этот феномен является характерной особенностью многих блокаторов КП-АМРА-рецепторов [153]. Было определено значение параметра δ , описывающего глубину расположения сайта связывания в электрическом поле мембраны – оно составило 0.6 ± 0.2 , $n=5$. Важно отметить, что ингибирование ДАБ-19 наблюдалось даже при положительных значениях потенциала. Это может свидетельствовать о наличии дополнительного сайта связывания во внеклеточных доменах рецептора.

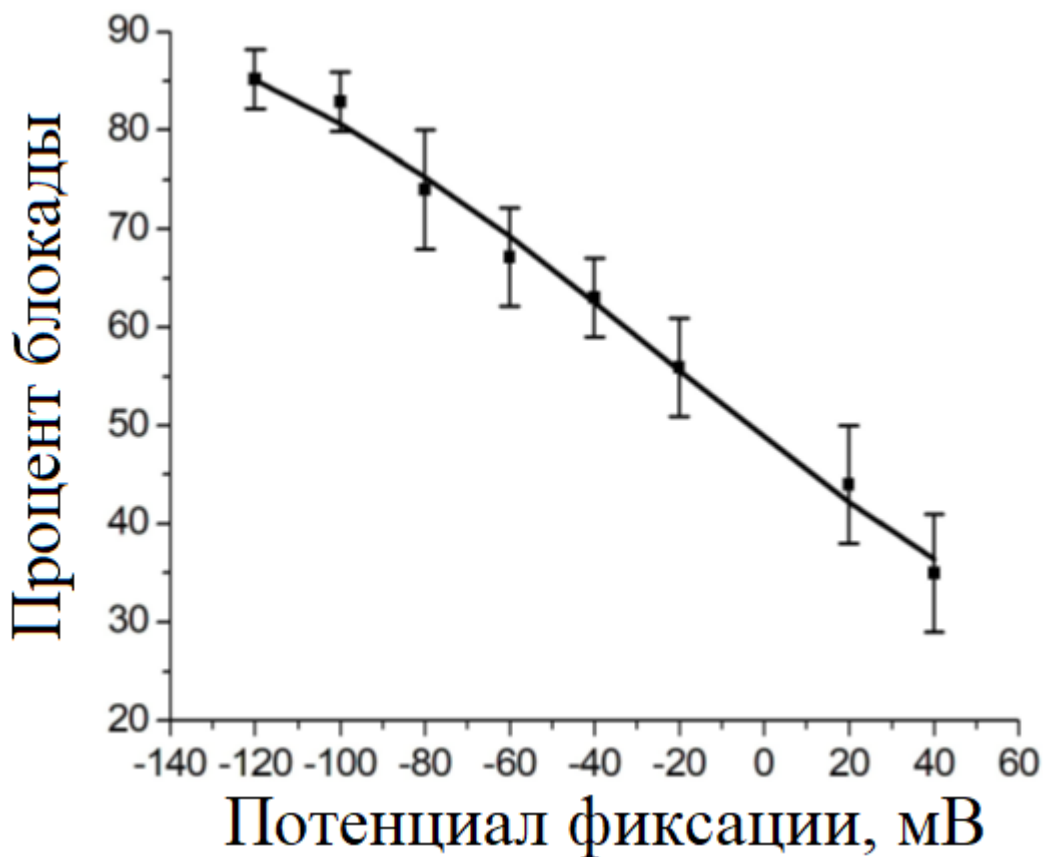


Рисунок 31. Зависимость ингибирования КП-АМРА рецепторов гигантских интернейронов стриатума от потенциала на мембране. Эффективность ингибирования ДАБ-19 возрастает при гиперполяризации мембраны (отрицательные значения потенциала) и достигает максимального значения при -120 мВ. При деполяризации мембраны (положительные значения

потенциала) эффективность ингибирования снижается, но остается наблюдаемой даже при +40 мВ.

Кинетика отмыва.

Для расчета кинетики отмыва осуществлялась аппликация ДАБ-19 в насыщающей концентрации 100 μM на КП-AMPA-рецепторы. τ составила 16 ± 5 секунд, что указывает на более медленную кинетику отмыва по сравнению с NMDA-рецепторами, $n=4$.

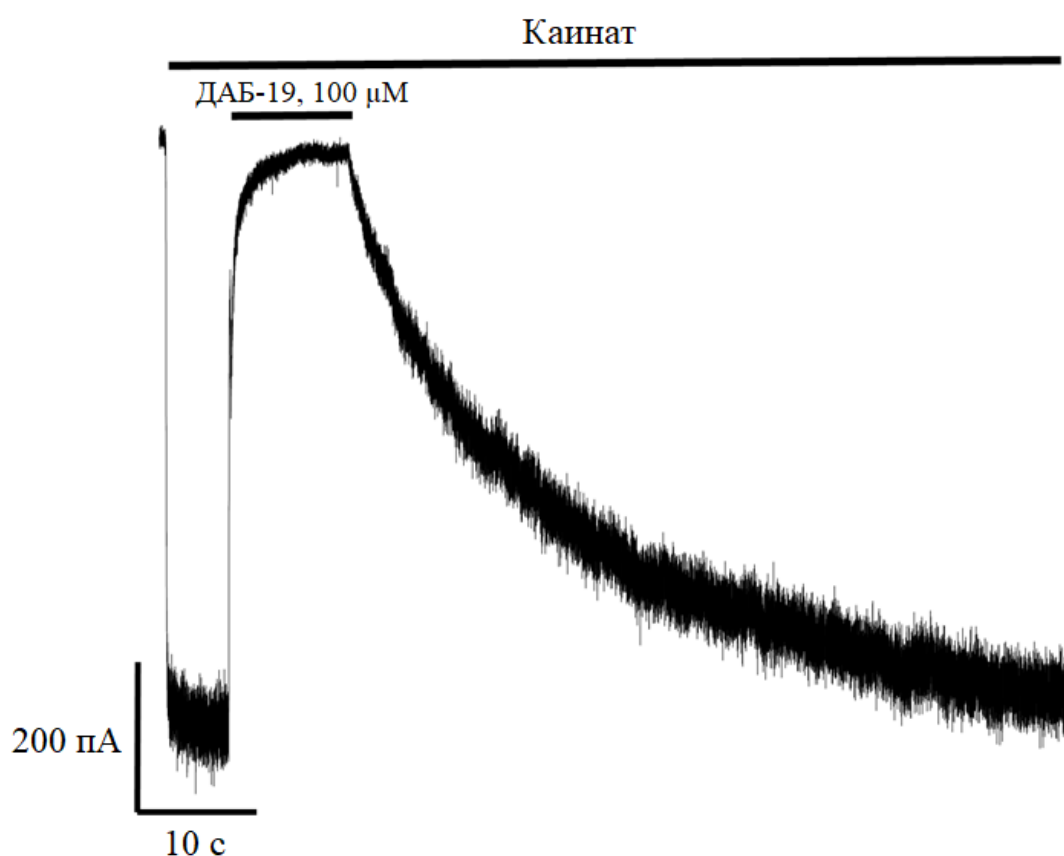


Рисунок 32. Кинетика отмыва ДАБ-19 в концентрации 100 μM для КП-AMPA-рецепторов гигантских интернейронов стриатума.

Взаимодействие с воротным механизмом канала. Эффект ловушки.

Во время анализа кинетики действия ДАБ-19 на кальций-проницаемые AMPA рецепторы не было обнаружено характерных признаков блокады механизмом "foot-in-the-door" (хвостовые токи и овершуты). В связи с этим, а также учитывая потенциал-зависимость действия ДАБ-19 на КП-AMPA-

рецепторы, было решено проверить, способен ли ДАБ-19 оставаться внутри закрытых каналов (эффект ловушки) КП-АМРА рецепторов. Для этого использовался модифицированный протокол с двойной аппликацией агониста. На рисунке 33 показано, что амплитуда ответа на тестирующую аппликацию агониста была ниже, чем амплитуда ответа на контрольные аппликации агониста. Это подтверждает, что определённая часть молекул ДАБ-19 оставалась внутри закрытых каналов КП-АМРА-рецепторов. Доля ловушки составила $42 \pm 10\%$ ($n=5$). Это указывает на наличие эффекта ловушки ДАБ-19 на рецепторы АМРА.

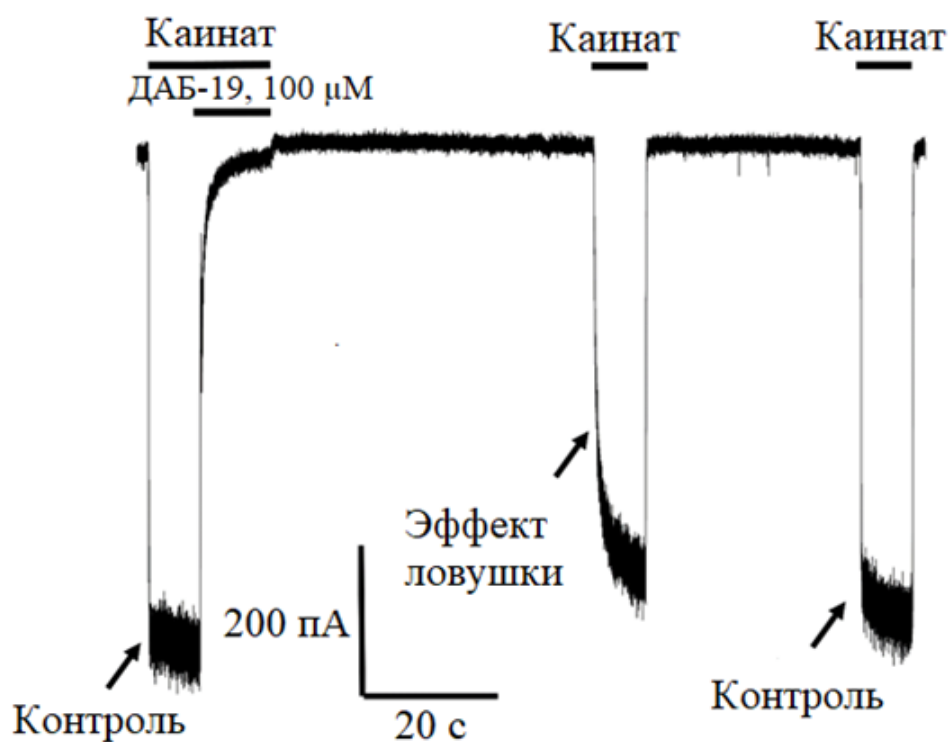


Рисунок 33. Репрезентативный пример действия ДАБ-19 на КП-АМРА-рецепторы гигантских интернейронов стриатума в модифицированном протоколе «двойной аппликации». Выявлен эффект «ловушки».

Влияние ДАБ-19 на закрытые кальций-проницаемые АМРА-рецепторы.

Был использован протокол, аналогичный таковому при исследовании NMDA- и КН-АМРА-рецепторов. На рисунке 34 продемонстрирован эффект действия ДАБ-19 на закрытые КП-АМРА-рецепторы, что указывает на

второй механизм действия ДАБ-19 на КП-АМРА-рецепторы в дополнение к свойству ДАБ-19 оставаться в закрытой поре ионного канала, $n=5$.

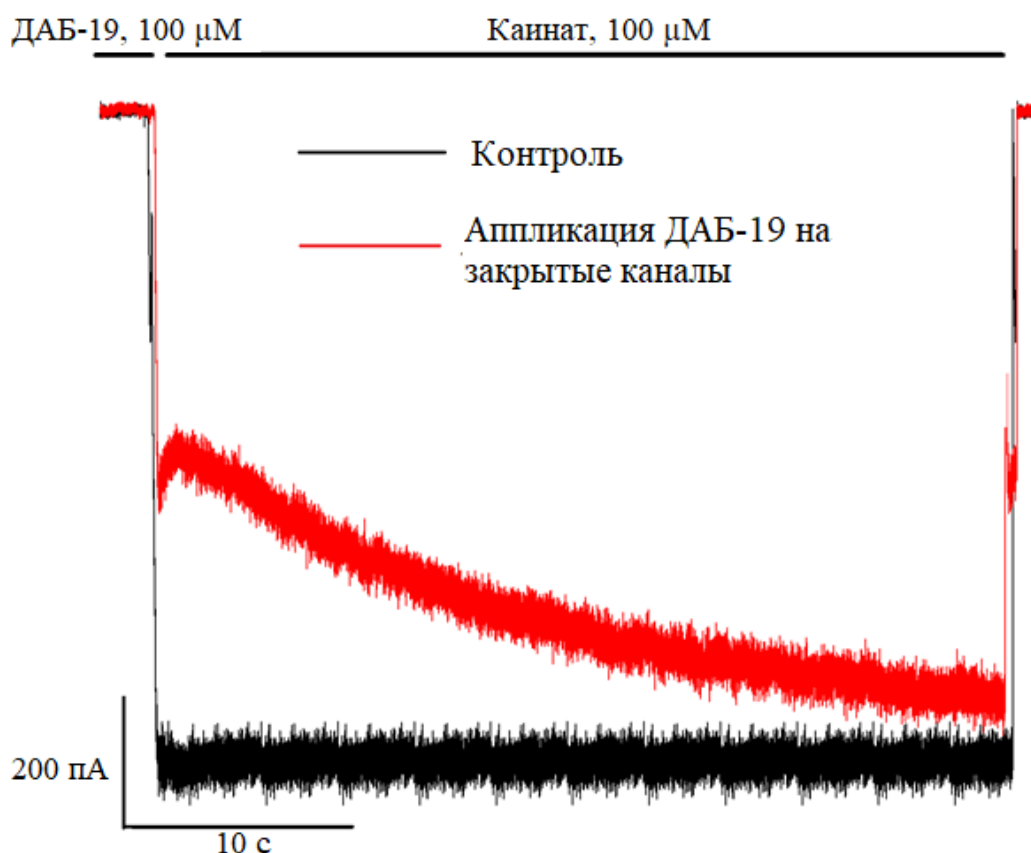


Рисунок 34. Действие ДАБ-19 на закрытые каналы КП-АМРА-рецепторов гигантских интернейронов стриатума.

3.1.6. Заключение по разделу.

По результатам электрофизиологического скрининга производных диазепинбензимидазолов было выявлено соединение ДАБ-19, которое обладает уникальным фармакологическим профилем как антагонист ионотропных глутаматных рецепторов, которым не обладают другие антагонисты ионотропных глутаматных рецепторов. В клинической практике не существует лекарственных средств с подобной модой действия. Изложенные в разделе результаты экспериментальной работы, в свою очередь, свидетельствуют о перспективах применения ДАБ-19 как потенциально нового лекарственного средства. Такое средство может проявлять комбинированные эффекты и быть использовано в терапии

эпилепсии, тревожных расстройств и терапии болезни Паркинсона. Механизм действия ДАБ-19 опосредован рядом свойств, основанных на взаимодействии с глутаматными ионотропными рецепторами, изложенных в таблице 8.

Таблица 8. Особенности проявляемых эффектов ДАБ-19 на ионотропные глутаматные рецепторы.

	NMDAR	КН-AMPA	КП-AMPA
Неконкурентное взаимодействие	ДА	ДА	ДА
Потенциал-зависимость	ДА	НЕТ	ДА
Блокада поры канала	ДА	НЕТ	ДА
Действие на закрытые каналы	ДА	ДА	ДА

В заключение следует отметить, что Таран А.С. под руководством д.м.н., профессора Спасова А.А. в её диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук «Нейропсихотропные эффекты производных диазепино[1,2а] бензимидазола» в 2017 году была показана способность ДАБ-19 снижать летальность при коразоловой интоксикации, а также, что ДАБ-19 по уровню анксиолитической активности превосходит диазепам [154].

3.2. Верификация результатов *in silico* анализа соединений, сконструированных для связывания с сайтом ифенпродила, производных бифенила.

В рамках сотрудничества с химическим факультетом МГУ и Сколковским институтом науки и технологий была проведена валидация активности негативного аллостерического модулятора NMDA-рецептора, полученного в результате виртуального скрининга, который обладает бифенильным скаффолдом и по результатам докинга, связывается с NMDA-рецептором по механизму связывания ифенпродила. С помощью электрофизиологических подходов был подтвержден прогноз активности вещества – бифенильного аналога ифенпродила (соединение №10а). Для того, чтобы сравнить концентрационный эффект действия данного соединения нами была также построена контрольная двухкомпонентная кривая дозозависимости для ифенпродила, она представлена на рисунке 35, ИК₅₀ для –NR2В субъединиц составила $0,5 \pm 0,2$ μM , $n=5$. По результатам экспериментов ИК₅₀ к NR2В NMDA-рецепторов для соединения №10а составила 5 ± 2 μM , $n=5$. Предполагаемый сайт связывания данного соединения и его формула представлены на рисунке 37, двухфазная кривая ингибирования NMDA-рецепторов - на рисунке 36.

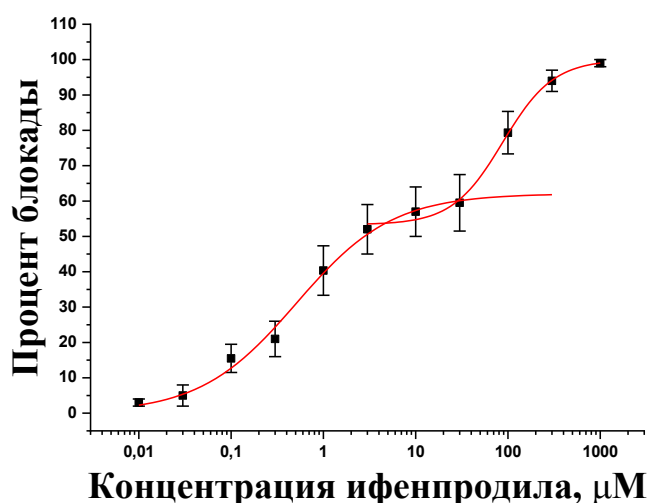


Рисунок 35. Контрольная кривая блокады -NR2B и -NR2A субъединиц NMDA-рецептора.

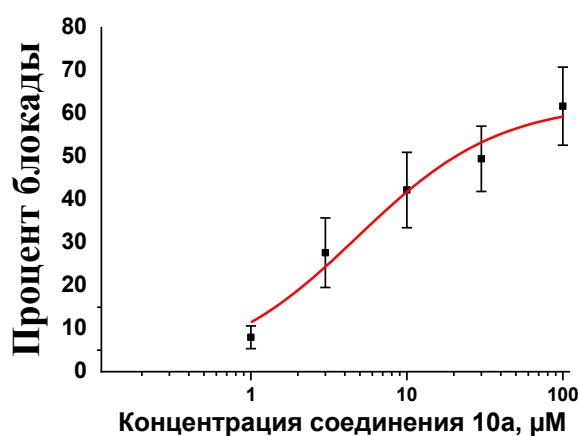


Рисунок 36. Кривая ингибирования NMDA-рецепторов экспериментально синтезированным соединением №10а.

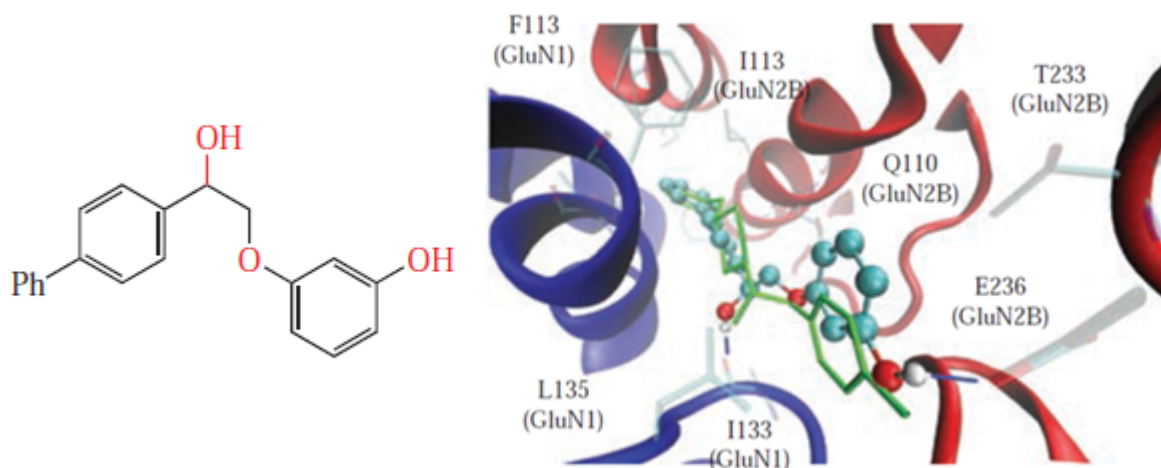


Рисунок 37. Возможный сайт связывания экспериментально синтезированного соединения №10а в сайте связывания ифенпродила; ифенпродил отмечен зеленым цветом, синие линии соответствуют водородным связям. Соединение №10а образует водородную связь с Glu236, заполняя карман, сформированный Tyr109, Thr110(GluN1), Pro78, Ile111 и Phe114(GluN2B).

Результаты данных исследований позволили расширить линейку соединений, которые осуществляют блокаду NMDA-рецепторов с большей активностью. Структуры и активности этих соединений представлены в таблице 9.

Таблица 9. Результаты электрофизиологических исследований соединений 10a-10j. Для наиболее активных производных (10h, 10i) активность увеличилась в 50-100 раз по сравнению с исходным соединением.

Шифр	X	R1	R2	R3	R4	ИК ₅₀ , μM, n=5
10a	-O-	-H	-OH	-OH	-H	5.0±2.0
10e	-NH-	-H	-OH	-OH	-H	0.45±0.12
10h	-NH-	-H	-NHSO ₂ CH ₃	-OH	-H	0.1±0.03
10i	-NH-	-H	-NHSO ₂ CH ₃	-OH	-Br	0.05±0.02
10j	-O-	-H	-OH	-NH ₂	-H	5.0±2.0

Для соединения 10h, как одного из наиболее активных, мы также отсняли кривую дозозависимости, представленную вместе с примерами полученных интегральных NMDA-токов на рисунке 38.

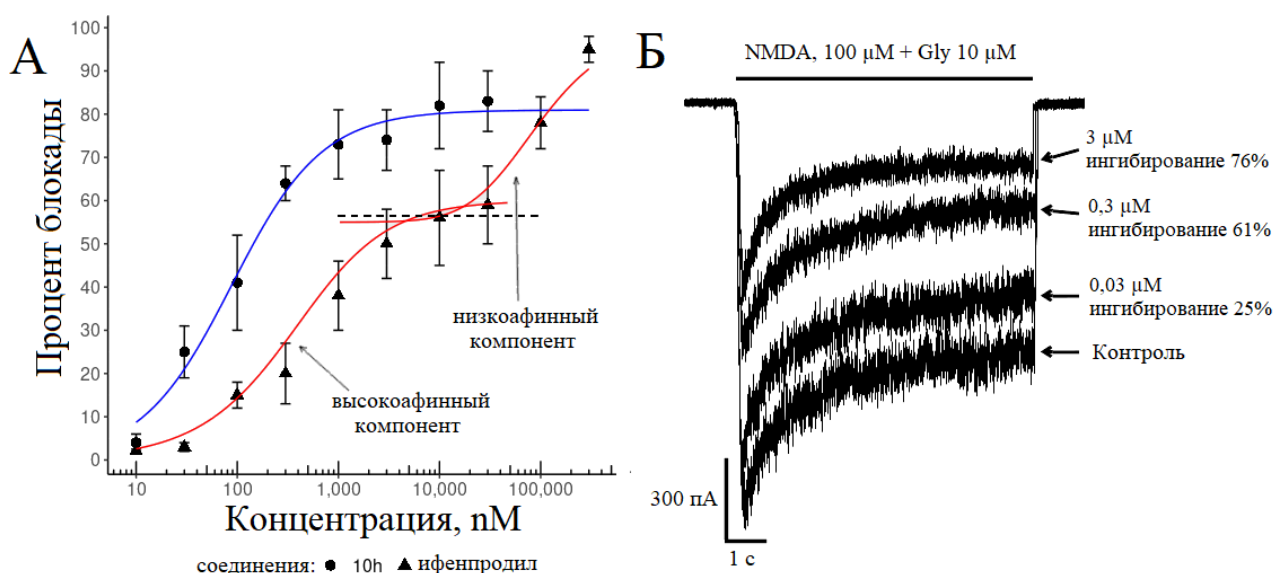


Рисунок 38. Ингибирование NMDA-рецепторов пирамидных нейронов гиппокампа экспериментально синтезированным соединением №10h. А. Кривая ингибирования NMDA-рецепторов экспериментально синтезированным соединением №10h в сравнении с кривой для ифенпродила. Б. Репрезентативные примеры ингибирования NMDA-токов при использовании соединения 10h в концентрациях 3, 0,3 и 0,03 μM .

3.2.1. Заключение по разделу.

По итогам валидации активности в когорте бифенил-содержащих проб были найдены соединения 10h и 10i, проявившие наибольшую эффективность блокады NR2-субъединиц NMDA-рецепторов. Электрофизиологический анализ был подтверждён методом радиолигандного связывания, проведённого в лаборатории нейрорецепции Института физиологически активных веществ д.б.н. В.В. Григорьевым. Благодаря проделанной работе стало возможным описание взаимосвязи «структура-активность», которая была выявлена результатами молекулярного моделирования, в основе которого лежало предположение об исключительном сходстве экспериментальных соединений связываться с аналогичным ифенпродилу образом. Полученные производные бифенила, активность которых была подтверждена электрофизиологически, в отличие от аллостерического антагониста ифенпродила не связываются с hERG-каналами (калиевые

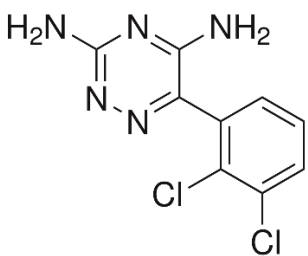
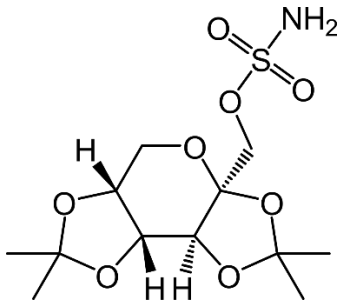
каналы сердца), являющейся важной антимишенью при разработке лекарственных средств. В 2015 году Игараши с соавторами показал, что антагонисты -NR2B субъединицы NMDA-рецепторов, которые экспрессируются субталамическими ядрами, нормализуют активность моторной петли при оксидофамин-спровоцированном паркинсонизме у крыс [155]. Подобные исследования, в дополнение к уже описанным в аналитическом обзоре, расширяют потенциал разработанных и охарактеризованных в данном разделе антагонистов NR2B-субъединиц NMDA-рецепторов.

3.3. Поиск блокаторов AMPA-рецепторов в ряду противоэпилептических соединений.

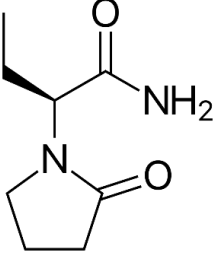
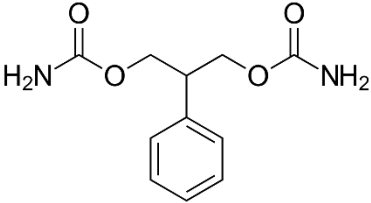
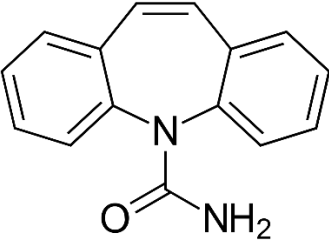
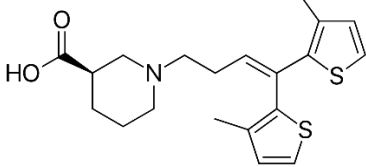
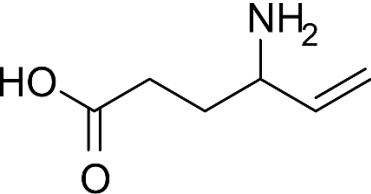
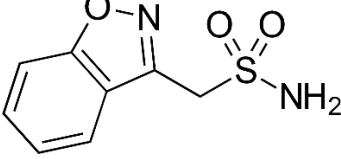
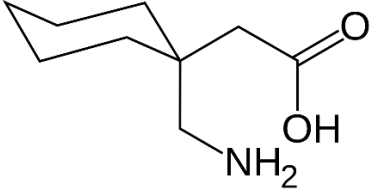
3.3.1. Скрининг антиконвульсантов.

Был проведен скрининг противоэпилептических соединений на ингибирующую активность КН- и КП-AMPA-рецепторов, результаты представлены в таблице 9. Перечень исследуемых соединений включает в себя: ламотриджин, топирамат, левитерацетам, фелбамат, карбамазепин, тиагабин, вигабатрин, зонисамид, габапентин и фенитоин. Используемая концентрация для скрининга составила 100 μM .

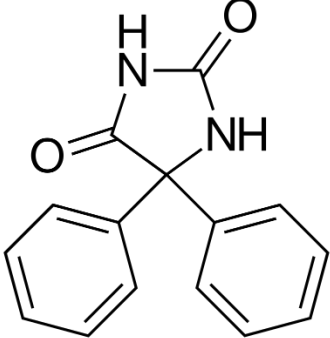
Таблица 10. Активность антиконвульсантов в роли блокаторов AMPA-рецепторов.

Антиконвульсант	Формула	Блокада КП-AMPA, % n=5	Блокада КН-AMPA, % n=5
Ламотриджин		13 \pm 3	14 \pm 5
Топирамат		14 \pm 2	12 \pm 2

Продолжение таблицы 10

Леветирацетам		9±3	6±2
Фелбамат		10±4	16±4
Карбамазепин		15±4	11±3
Тиагабин		10±2	14±2
Вигабатрин		10±3	8±1
Зонисамид		11±3	11±2
Габапентин		12±5	20±6

Окончание таблицы 10.

Фенитоин		38±3	75±4
----------	---	------	------

Таким образом было найдено противоэпилептическое средство – блокатор потенциал-зависимых натриевых каналов фенитоин, активность которого оказалась достаточно высокой. Была проведена серия экспериментов, направленных на описание его молекулярных механизмов действия на AMPA-рецепторы.

3.3.2. Исследование концентрационной зависимости фенитоина для КП- и КН-AMPA-рецепторов.

ИК₅₀ фенитоина для кальций-непроницаемых AMPA-рецепторов составил 30±4 μM, n=5, а для кальций-проницаемых AMPA-рецепторов 250±60 μM, n=5. Подобной селективностью к кальций-непроницаемым AMPA-рецепторам обладает пентобарбитал [156], что делает эту субстанцию весьма исключительной, так как прочие блокаторы AMPA-рецепторов имеют более высокую активность к кальций-проницаемым AMPA-рецепторам в силу большего размера их ионной поры. Концентрационно-зависимые кривые фенитоина представлены на рисунке 39. Фенитоин является бифенильным производным гидантоина. Для выявления структурных детерминант блокады фенитоином нами было исследовано действие ряда соединений, схожих с ним по структуре. Активность этого ряда структурно схожих молекул оказалась существенно ниже, чем у самого фенитоина (рисунок 40). Одного гидантоинового кольца, а также гидантоинового кольца с бензильным

радикалом оказалось недостаточно для эффективной блокады кальций-непроницаемых AMPA-рецепторов.

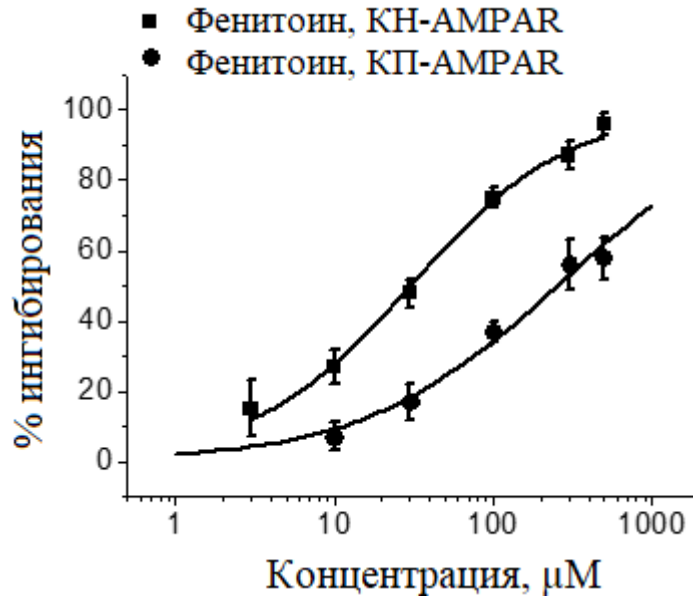


Рисунок 39. Кривые концентрационных зависимостей действия фенитоина на КН- и КП-AMPA-рецепторы, $n=5$. Фенитоин более активен по отношению к КН-AMPA-рецепторам.

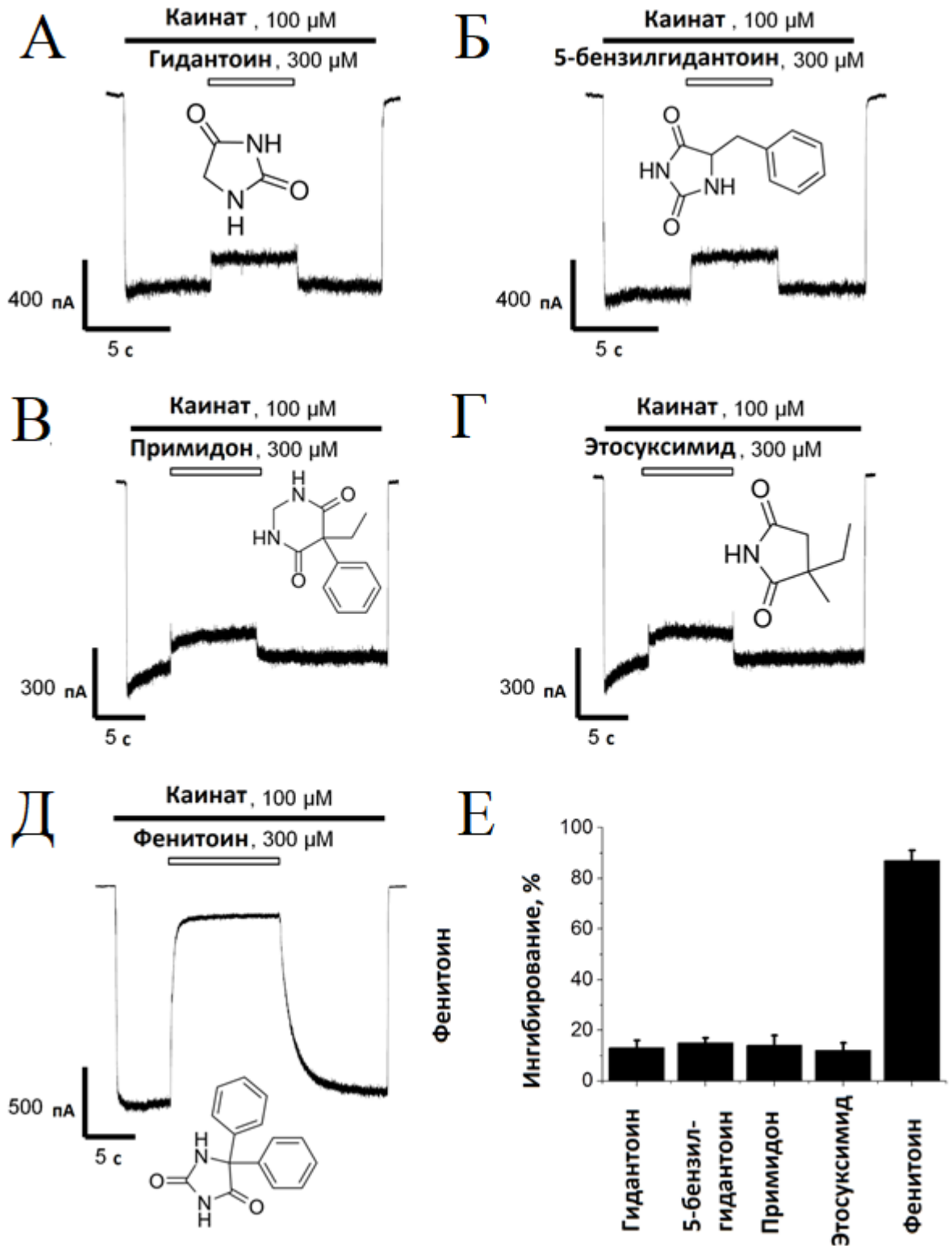


Рисунок 40. Активность соединений, структурно схожих с фенитоином, по отношению к КН-АМРА-рецепторам пирамидных нейронов гиппокампа, $n=4$.

3.3.3. Сравнение эффективности действия фиксированной концентрации фенитоина в диапазоне концентраций агониста.

Для того, чтобы выявить конкуренцию фенитоина за центр связывания с агонистом были проведены исследования с использованием диапазона концентраций каината: 10 μM , 30 μM , 100 μM , 300 μM , 1 mM , 3 mM . Действие фенитоина было исследовано в концентрациях 30 и 300 μM . Как видно из рисунка 41, экспериментальные кривые выходили на плато в отличие от кривой контроля, что свидетельствует о том, что действие фенитоина является неконкурентным, но тем не менее агонист-зависимым.

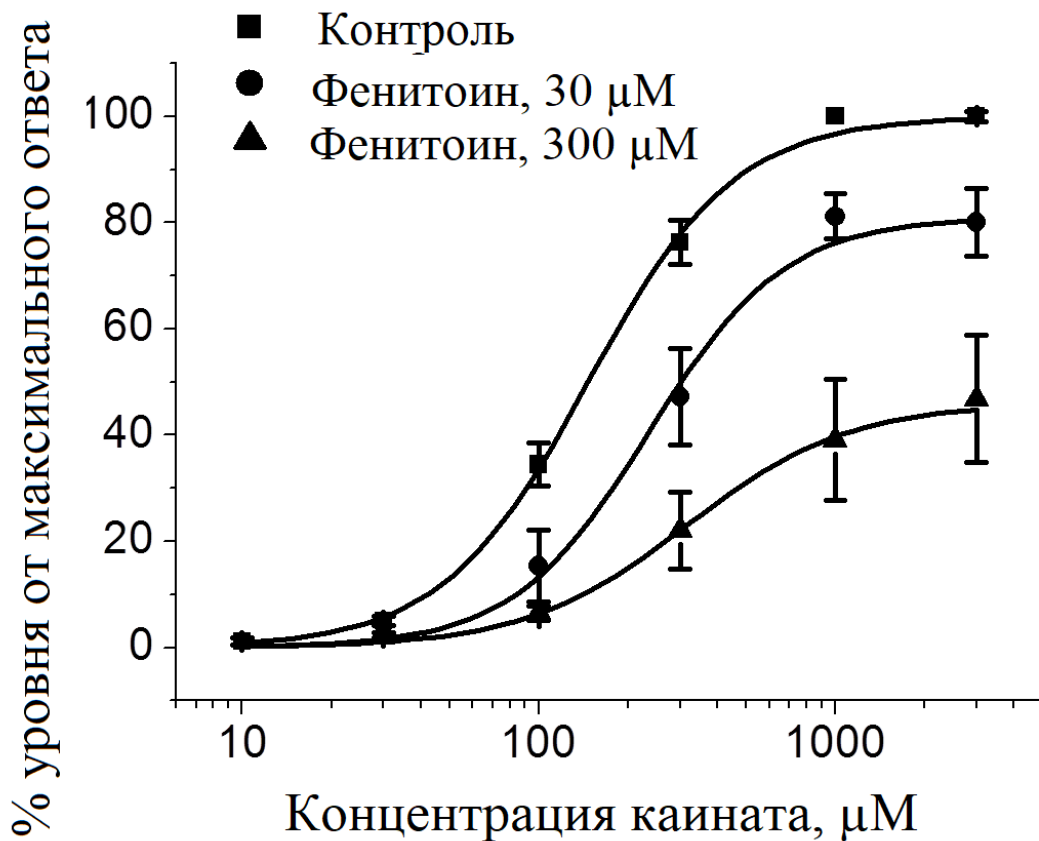


Рисунок 41. Ингибирование КН-АМРА-рецепторов пирамидных нейронов гиппокампа фенитоином является неконкурентным. Кривая активации каинатом в сравнении с кривыми активации в присутствии фенитоина в концентрациях 30 и 300 μM . Максимальный ответ снижается в случае обеих концентраций фенитоина, $n=6$.

Стоит отметить, что аналогичным образом проявляет свой эффект и пентобарбитал [156], кривая которого, в отличие от конкурентного антагониста DNQX, но также, как и кривая фенитоина, выходила на плато.

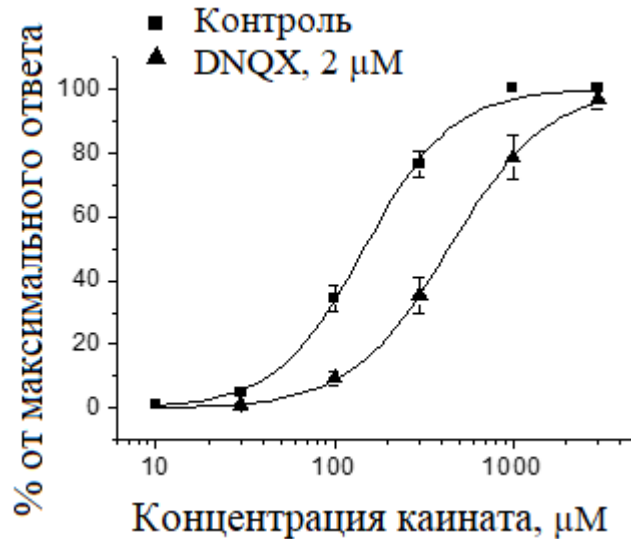


Рисунок 42. Ингибирование КН-АМРА-рецепторов пирамидных нейронов СА1 зоны гиппокампа DNQX является неконкурентным. DNQX демонстрирует классическую кривую конкурентного антагониста АМРА-рецепторов, $n=6$.

3.3.4. Способность фенитоина оставаться в закрытой поре КН-АМРА-рецептора.

Как было упомянуто в аналитическом обзоре, пентобарбитал является бесконкурентным антагонистом, что наводит на предположение о том, что фенитоин также действует по этому механизму. Для подтверждения этого предположения был использован стандартный протокол для выявления эффекта «ловушки» с каинатом в качестве агониста в концентрации 100 мкМ, подробно описанный в предыдущем разделе. Контрольная кривая отмыва фенитоина для сравнения была получена путем его коаппликации на фоне действия каината (рис.43, протокол №2). На рисунке 43 показан результат проведенных экспериментов: при повторной аппликации каината в протоколе №1 наблюдалась двух-экспоненциальная кинетика отмыва фенитоина, совпадающая по быстрой компоненте с таковой контрольной.

Сопоставление кривых отмыва позволяет заключить, что фенитоин демонстрирует выраженный «ловушечный» эффект при блокаде КН-АМРА-рецепторов.

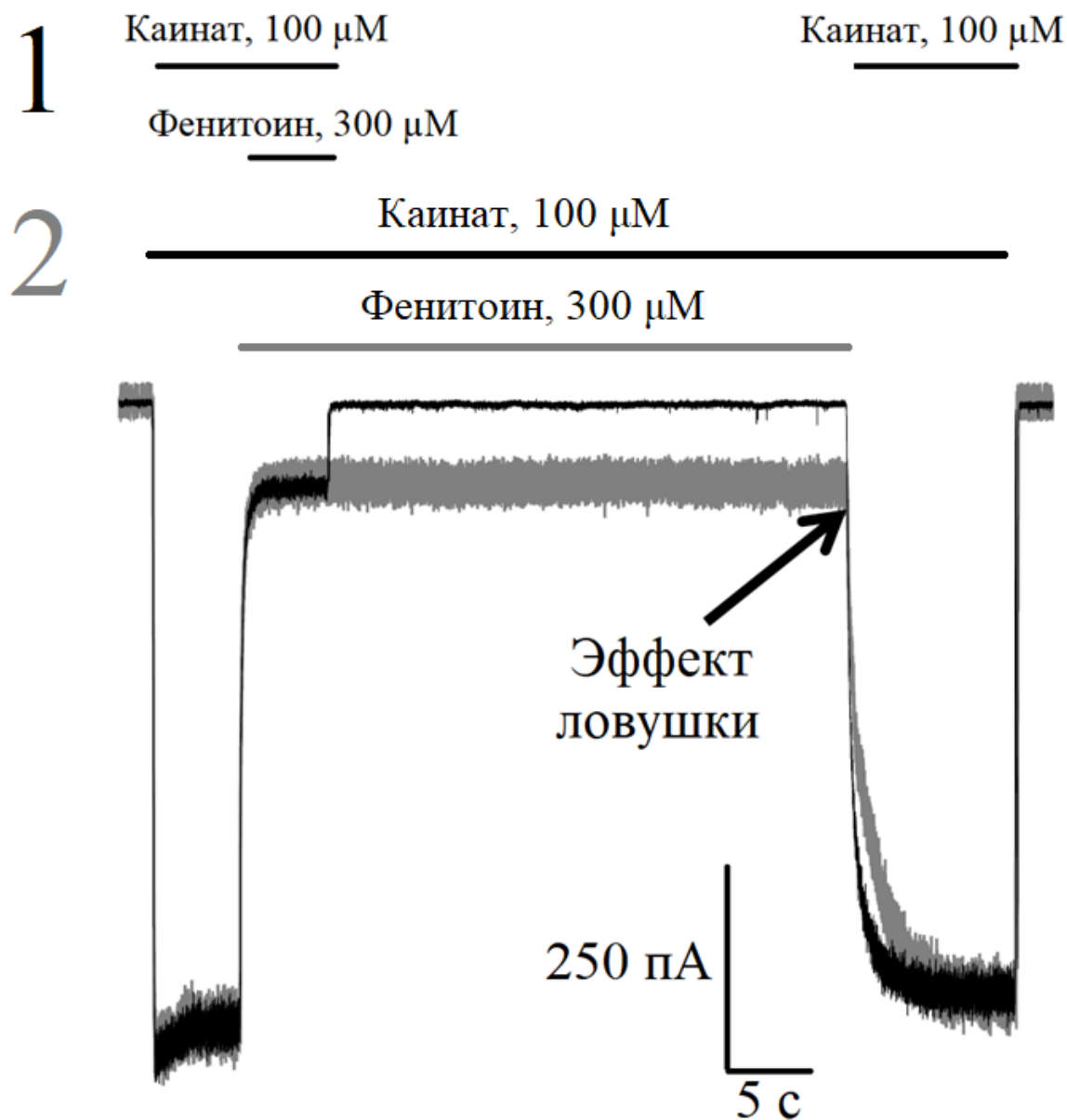


Рисунок 43. Эффект ловушки фенитоина при блокаде КН-АМРА пирамидных нейронов гиппокампа. Протокол 1 представляет из себя стандартный протокол для выявления эффекта ловушки, протокол 2 – блокада фенитоином интегральных токов, полученных при активации КН-АМРА-рецепторов каинатом, $n=4$.

3.3.5. Оценка активности фенитоина в присутствии циклотиазида.

Циклотиазид – ПАМ, снимающий эффект десенситизации AMPA-рецепторов. В 2003 году Джексон и соавторы продемонстрировали, что ингибирование пентобарбиталом намного слабее в присутствии циклотиазида, чем без него [156]. Мы решили произвести аналогичную серию экспериментов для фенитоина. В связи с этим был проведён сравнительный анализ эффективности действия фенитоина (100 μM) в присутствии циклотиазида в концентрации 100 μM . (рис. 44.) Циклотиазид индуцировал 8-кратную (8 ± 2) потенциацию интегральных КН-AMPA ионных токов пирамидальных нейронов гиппокампа зоны CA1. (рис. 44, А) Активность фенитоина в присутствии циклотиазида снижалась до $21 \pm 7\%$ (рис. 44, В) по сравнению с контролем $74 \pm 4\%$ (рис. 44, Б). Диаграмма на рис. 44, Г обобщает результаты, полученные в ходе проведённых экспериментов.

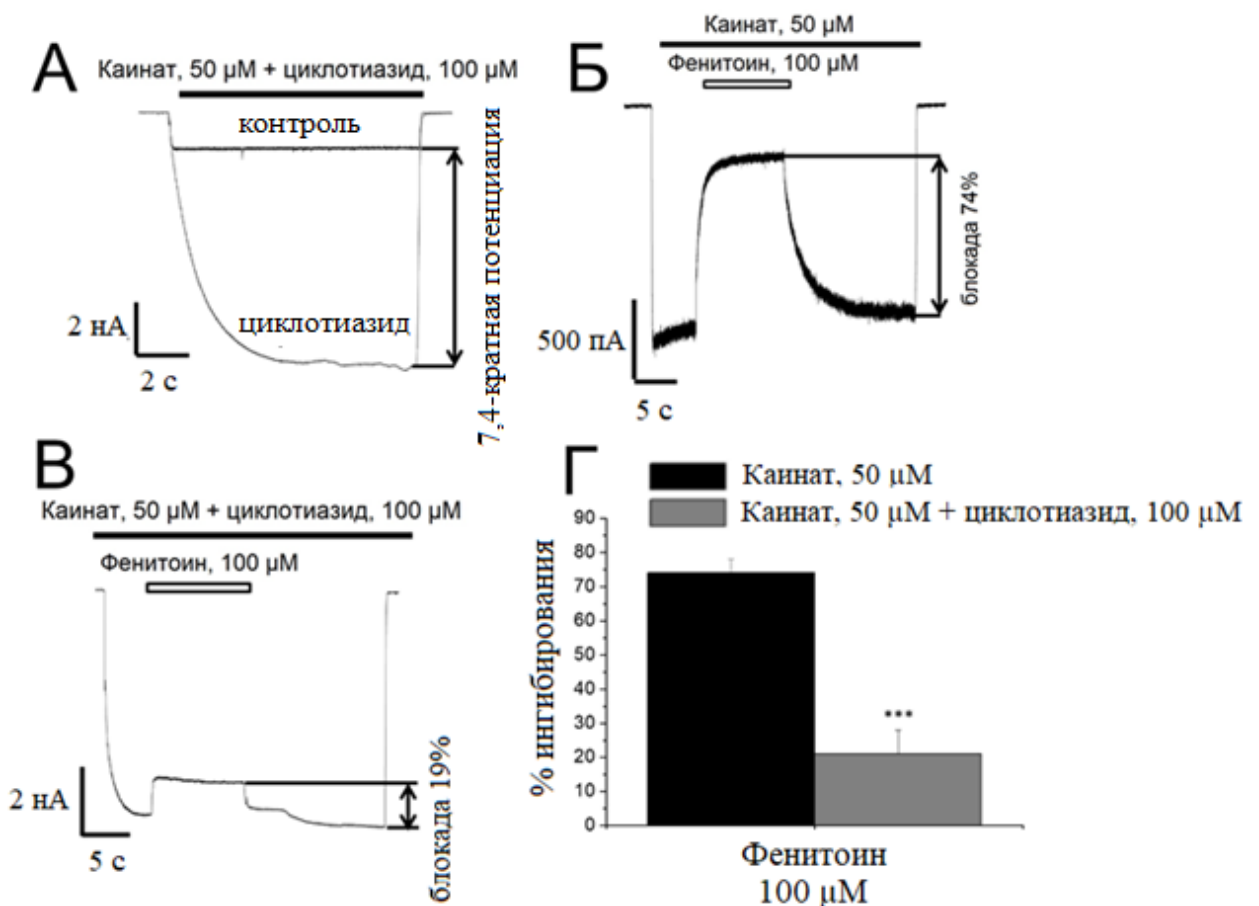


Рисунок 44. Снижение эффективности блокады фенитоина в присутствии циклотиазида. А. Потенциация ионных токов КН-АМРА под действием циклотиазида, 100 μ М. Б, В. Примеры снижения активности фенитоина, 100 μ М под действием циклотиазида (В), по сравнению с контролем (Б). Г. Диаграмма, демонстрирующая спад ингибирования КН-АМРА-рецепторов фенитоином в присутствии циклотиазида. * $p < 0,001$., $n = 5$.

В результате сравнения фармакологических активностей фенитоина и пентобарбитала, а также сравнения 3D-структур исследуемых молекул (рис. 45) можно сделать предположение о том, что эти соединения имеют общий сайт связывания.

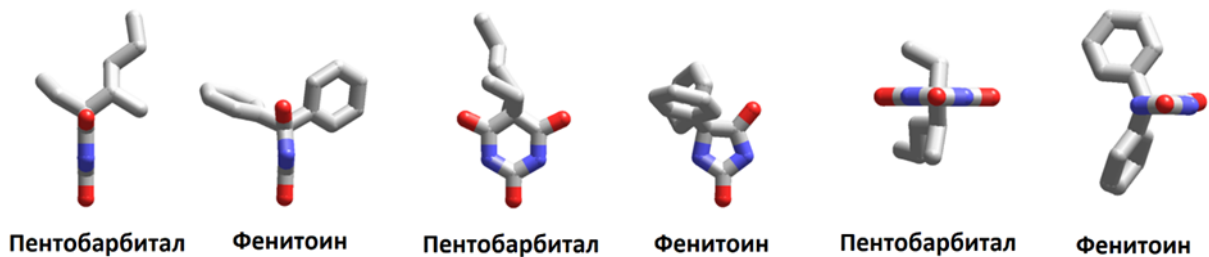


Рисунок 45. Сравнение 3D-структур фенитоина и пентобарбитала в различных пространственных положениях. 3D структуры демонстрируют близкую схожесть направлений функциональных групп. Результаты анализа любезно предоставлены Тихоновым Д.Б.

В 1995 году было продемонстрировано, что мутация остатка Q/R сайта субъединицы GluA2 (R586Q) значительно снижает активность пентобарбитала, что, в свою очередь, позволяет предполагать, что связывание пентобарбитала осуществляется в сайте селективного фильтра центральной поры канала [96]. В свете упомянутых данных является логичным вывод о том, что фенитоин, как и пентобарбитал, ингибирует активность АМРА-рецепторов путем связывания с Q/R сайтом исследуемых ионных каналов.

3.3.6. Заключение по разделу.

После того, как перампанел был одобрен в составе адьювантной терапии первично-генерализованных и парциальных приступов эпилепсии, в научном сообществе необычайно вырос интерес к физиологии и фармакологии AMPA-рецепторов. Скрининг, проведённый нами и включавший в себя поиск ингибиторов AMPA-рецепторов в ряду противоэпилептических препаратов электрофизиологическими подходами, позволил выявить фенитоин, эффективно блокирующий вышеупомянутые рецепторы с $IC_{50}=30$ μ M. Дальнейшие тесты с использованием фармакологических подходов позволили нам сделать вывод о том, что по характеру действия фенитоин соответствовал пентобарбиталу. Близкое структурное сходство этих блокаторов предполагает наличие общего сайта связывания в поре ионного канала, а также конкретный механизм ингибирования в области Q/R сайта. Считалось, что основной мишенью фенитоина являются потенциал-зависимые натриевые каналы. Нами же было показано, что фенитоин ингибирует КН-AMPA-рецепторы с эффективностью, аналогичной эффективности блокады потенциал-зависимых натриевых каналов, что расширяет представление о том, каким образом фенитоин реализует свои фармакологические эффекты.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Современная нейрофизиология располагает колоссальными знаниями о функционировании глутаматергического синапса. Тем не менее, несмотря на широкий набор фармакологических агентов, действующих на этот синапс, набор лекарственных препаратов для клинического применения невелик и имеет ряд ограничений в применении, связанных с большим количеством побочных эффектов, которые, к примеру, демонстрирует кетамин. Мемантин проявляет свои терапевтические эффекты и улучшает когнитивные функции у пациентов с болезнью Альцгеймера, но малоэффективен в начальной стадии заболевания. Многообещающим открытием стало применение перампанеля в медицинской практике: феномен клинически-толерантного блокатора AMPA-рецепторов открывает перспективы для разработки соединений, которые могут эффективно реализовывать свой терапевтический потенциал и не демонстрировать при этом выраженных побочных эффектов. Уровень разработки новых, современных модуляторов ионотропных глутаматных рецепторов должен соответствовать современной повестке, связанной с ростом нейродегенеративных заболеваний, становящихся год к году всё более и более значимыми.

В рамках диссертационного исследования было реализовано три проекта, посвященных поиску новых лекарств и репрофилированию уже имеющихся. Первый проект был посвящен исследованию антагонистической активности диазепинбензимидазолов в отношении трёх типов ионотропных глутаматных рецепторов: NMDA, КН-AMPA, КП-AMPA. В ходе скрининга когорты субстанций выявлено низкоселективное высокоактивное вещество ДАБ-19, которое является антагонистом трёх типов глутаматных ионотропных рецепторов: NMDAR, КН-AMPAR и КП-AMPAR. Молекулярный механизм действия ДАБ-19 опосредован рядом свойств, основанных на

взаимодействии с глутаматными ионотропными рецепторами: неконкурентное ингибирование, потенциалзависимость, блокада поры ионного канала, влияние на рецепторы в закрытом состоянии.

Не менее важной областью для поиска антагонистов ионотропных глутаматных рецепторов является и селективное ингибирование субъединиц этих рецепторов, значимость которого была продемонстрирована в литературном обзоре. Нам удалось добиться значительных успехов в разработке таких молекул, основываясь на активности лишь одного соединения с шифром 10a. На основании полученных результатов об активности субстанции 10a стал возможен дизайн таких соединений, которые превзошли по активности исходное в сотню раз, не провоцируя при этом адренолитических эффектов.

Проведенные исследования, благодаря открытию новой мишени для фенитоина – AMPA-рецепторов, позволяют расширить понимание назначаемой терапии в лечении эпилепсии, и прежде всего полученные данные могут оказаться полезными практикующим эпилептологам. В обзоре уже упоминалась величина IC_{50} фенитоина для потенциал-зависимых натриевых каналов мозга: она варьирует в диапазоне от 7 до 22 μM . На фоне этих величин IC_{50} фенитоина для КН-AMPA-рецепторов, рассчитанного нами, составил 30 ± 4 μM , что может свидетельствовать и как в пользу терапевтического эффекта, опосредованного фенитоином на AMPA-рецепторы, так и в пользу побочных эффектов: для подробного анализа эффектов необходимо проведение клинических исследований. Структурное сходство с пентобарбиталом, а также исключительная селективность данных соединений к КН-AMPA-рецепторам и знание молекулярных механизмов их действия в дальнейшем может оказаться полезным при разработке более селективных и высокоактивных ингибиторов КН-AMPA-рецепторов.

ВЫВОДЫ.

1. По результатам электрофизиологического скрининга было выявлено ингибирующее действие производных диазепинбензимидазолов на ионотропные рецепторы глутамата.
2. По результатам электрофизиологического скрининга ДАБ-19 был выявлен (как наиболее активная субстанция) ингибитор NMDA-, КП- и КН-AMPA-рецепторов в ряду производных диазепинбензимидазолов.
3. Было показано каналоблокирующее действие ДАБ-19 на NMDA- и КП-AMPA-рецепторы и аллостерическое действие на оба типа AMPA-рецепторов.
4. По результатам электрофизиологического скрининга был выявлен блокатор AMPA-рецепторов среди соединений с противосудорожной активностью – фенитоин.
5. Были получены дозозависимые эффекты для фенитоина и предложен его молекулярный механизм действия.
6. Был подтвержден виртуальный *in silico* прогноз, а также показано ингибирующее действие экспериментально-синтезированных производных бифенила на NMDA-рецепторы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

- [1] Collingridge G. L., Singer W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity //Trends in pharmacological sciences. – 1990. – Т. 11. – №. 7. – С. 290-296.
- [2] Sladeczek F., Momiyama A., Takahashi T. Presynaptic inhibitory action of a metabotropic glutamate receptor agonist on excitatory transmission in visual cortical neurons //Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences. – 1993. – Т. 253. – №. 1338. – С. 297-303.
- [3] Platt S. R. The role of glutamate in central nervous system health and disease—a review //The Veterinary Journal. – 2007. – Т. 173. – №. 2. – С. 278-286.
- [4] Portera-Cailliau C., Price D. L., Martin L. J. N-methyl-D-aspartate receptor proteins NR2A and NR2B are differentially distributed in the developing rat central nervous system as revealed by subunit-specific antibodies //Journal of neurochemistry. – 1996. – Т. 66. – №. 2. – С. 692-700.
- [5] Wang J. Q. et al. Phosphorylation of glutamate receptors: a potential mechanism for the regulation of receptor function and psychostimulant action //Journal of neuroscience research. – 2006. – Т. 84. – №. 8. – С. 1621-1629.
- [6] Reiner A., Levitz J. Glutamatergic signaling in the central nervous system: ionotropic and metabotropic receptors in concert //Neuron. – 2018. – Т. 98. – №. 6. – С. 1080-1098.
- [7] Fleming J. J., England P. M. Developing a complete pharmacology for AMPA receptors: a perspective on subtype-selective ligands //Bioorganic & medicinal chemistry. – 2010. – Т. 18. – №. 4. – С. 1381-1387.
- [8] Washburn M. S. et al. Differential dependence on GluR2 expression of three characteristic features of AMPA receptors //Journal of Neuroscience. – 1997. – Т. 17. – №. 24. – С. 9393-9406.

- [9] Plutino S., Sciacaluga M., Fucile S. Extracellular mild acidosis decreases the Ca²⁺ permeability of the human NMDA receptors //Cell Calcium. – 2019. – T. 80. – C. 63-70.
- [10] Nicotera P., Lipton S. A. Excitotoxins in neuronal apoptosis and necrosis //Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism. – 1999. – T. 19. – №. 6. – C. 583-591.
- [11] Meldrum B. S. Excitotoxicity and selective neuronal loss in epilepsy //Brain pathology. – 1993. – T. 3. – №. 4. – C. 405-412.
- [12] Kotermanski S. E., Wood J. T., Johnson J. W. Memantine binding to a superficial site on NMDA receptors contributes to partial trapping //The Journal of physiology. – 2009. – T. 587. – №. 19. – C. 4589-4604.
- [13] Barygin O. I. Inhibition of calcium-permeable and calcium-impermeable AMPA receptors by perampanel in rat brain neurons //Neuroscience Letters. – 2016. – T. 633. – C. 146-151.
- [14] Hanada T. et al. Perampanel: a novel, orally active, noncompetitive AMPA receptor antagonist that reduces seizure activity in rodent models of epilepsy //Epilepsia. – 2011. – T. 52. – №. 7. – C. 1331-1340.
- [15] Bolshakov K. V. et al. Design of antagonists for NMDA and AMPA receptors //Neuropharmacology. – 2005. – T. 49. – №. 2. – C. 144-155.
- [16] Mueller A. L. et al. Arylamine spider toxins antagonize NMDA receptor-mediated synaptic transmission in rat hippocampal slices //Synapse. – 1991. – T. 9. – №. 4. – C. 244-250.
- [17] Amara S. G., Fontana A. C. K. Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate //Neurochemistry international. – 2002. – T. 41. – №. 5. – C. 313-318.

- [18] Curtis D. R., Phillis J. W., Watkins J. C. The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids //The Journal of physiology. – 1960. – T. 150. – №. 3. – C. 656.
- [19] Kew J. N. C., Kemp J. A. Iontropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology //Psychopharmacology. – 2005. – T. 179. – C. 4-29.
- [20] Rosenmund C., Stern-Bach Y., Stevens C. F. The tetrameric structure of a glutamate receptor channel //science. – 1998. – T. 280. – №. 5369. – C. 1596-1599.
- [21] Dingledine R. et al. The glutamate receptor ion channels //Pharmacological reviews. – 1999. – T. 51. – №. 1. – C. 7-62.
- [22] Tsuzuki K., Ozawa S. Glutamate Receptors //e LS. – 2001.
- [23] Peng P. L. et al. ADAR2-dependent RNA editing of AMPA receptor subunit GluR2 determines vulnerability of neurons in forebrain ischemia //Neuron. – 2006. – T. 49. – №. 5. – C. 719-733.
- [24] Wyllie D. J. A., Behe P., Colquhoun D. Single-channel activations and concentration jumps: comparison of recombinant NR1a/NR2A and NR1a/NR2D NMDA receptors //The Journal of physiology. – 1998. – T. 510. – №. 1. – C. 1-18.
- [25] Safferling M. et al. First images of a glutamate receptor ion channel: oligomeric state and molecular dimensions of GluRB homomers //Biochemistry. – 2001. – T. 40. – №. 46. – C. 13948-13953.
- [26] Sobolevsky A. I., Rosconi M. P., Gouaux E. X-ray structure, symmetry and mechanism of an AMPA-subtype glutamate receptor //Nature. – 2009. – T. 462. – №. 7274. – C. 745-756.
- [27] Tichelaar W. et al. The three-dimensional structure of an ionotropic glutamate receptor reveals a dimer-of-dimers assembly //Journal of molecular biology. – 2004. – T. 344. – №. 2. – C. 435-442.

- [28] Ulbrich M. H., Isacoff E. Y. Rules of engagement for NMDA receptor subunits //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – T. 105. – №. 37. – C. 14163-14168.
- [29] Traynelis S. F. et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function //Pharmacological reviews. – 2010. – T. 62. – №. 3. – C. 405-496.
- [30] Chen G. Q. et al. Functional characterization of a potassium-selective prokaryotic glutamate receptor //Nature. – 1999. – T. 402. – №. 6763. – C. 817-821.
- [31] Lam H. M. et al. Glutamate-receptor genes in plants //Nature. – 1998. – T. 396. – №. 6707. – C. 125-126.
- [32] Benton R. et al. Variant ionotropic glutamate receptors as chemosensory receptors in *Drosophila* //Cell. – 2009. – T. 136. – №. 1. – C. 149-162.
- [33] Croset V. et al. Ancient protostome origin of chemosensory ionotropic glutamate receptors and the evolution of insect taste and olfaction //PLoS genetics. – 2010. – T. 6. – №. 8. – C. e1001064.
- [34] Kuner T., Seeburg P. H., Guy H. R. A common architecture for K⁺ channels and ionotropic glutamate receptors? //Trends in neurosciences. – 2003. – T. 26. – №. 1. – C. 27-32.
- [35] Yang L., Venneti S., Nagrath D. Glutaminolysis: a hallmark of cancer metabolism //Annual review of biomedical engineering. – 2017. – T. 19. – C. 163-194.
- [36] Danbolt N. C. Glutamate uptake //Progress in neurobiology. – 2001. – T. 65. – №. 1. – C. 1-105.
- [37] Hassel B., Bråthe A. Neuronal pyruvate carboxylation supports formation of transmitter glutamate //Journal of Neuroscience. – 2000. – T. 20. – №. 4. – C. 1342-1347.

- [38] Sonnewald U., Schousboe A. Introduction to the glutamate–glutamine cycle //The Glutamate/GABA-Glutamine Cycle: Amino Acid Neurotransmitter Homeostasis. – 2016. – C. 1-7.
- [39] Jessell T. M., Kandel E. R. Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication //Cell. – 1993. – T. 72. – C. 1-30.
- [40] Chittajallu R. et al. Regulation of glutamate release by presynaptic kainate receptors in the hippocampus //Nature. – 1996. – T. 379. – №. 6560. – C. 78-81.
- [41] Rodríguez-Moreno A., Herreras O., Lerma J. Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus //Neuron. – 1997. – T. 19. – №. 4. – C. 893-901.
- [42] Reiner A., Levitz J. Glutamatergic signaling in the central nervous system: ionotropic and metabotropic receptors in concert //Neuron. – 2018. – T. 98. – №. 6. – C. 1080-1098.
- [43] Ngomba R. T. et al. (ed.). mGLU Receptors. – Springer International Publishing, 2017.
- [44] Toth K., McBain C. J. Target-specific expression of pre- and postsynaptic mechanisms //The Journal of Physiology. – 2000. – T. 525. – №. 1. – C. 41-51.
- [45] Kamboj S. K., Swanson G. T., Cull-Candy S. G. Intracellular spermine confers rectification on rat calcium-permeable AMPA and kainate receptors //The Journal of physiology. – 1995. – T. 486. – №. 2. – C. 297-303.
- [46] Donevan S. D., Rogawski M. A. Intracellular polyamines mediate inward rectification of Ca²⁺-permeable alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1995. – T. 92. – №. 20. – C. 9298-9302.

- [47] Low C. M., Wee K. S. L. New insights into the not-so-new NR3 subunits of N-methyl-D-aspartate receptor: localization, structure, and function //Molecular pharmacology. – 2010. – Т. 78. – №. 1. – С. 1-11.
- [48] Lin F., Stevens C. F. Both open and closed NMDA receptor channels desensitize //Journal of Neuroscience. – 1994. – Т. 14. – №. 4. – С. 2153-2160.
- [49] Rusakov D. A., Kullmann D. M. Extrasynaptic glutamate diffusion in the hippocampus: ultrastructural constraints, uptake, and receptor activation //Journal of Neuroscience. – 1998. – Т. 18. – №. 9. – С. 3158-3170.
- [50] Lester R. A., Jahr C. E. NMDA channel behavior depends on agonist affinity //Journal of Neuroscience. – 1992. – Т. 12. – №. 2. – С. 635-643.
- [51] Jonas P., Major G., Sakmann B. Quantal components of unitary EPSCs at the mossy fibre synapse on CA3 pyramidal cells of rat hippocampus //The Journal of physiology. – 1993. – Т. 472. – №. 1. – С. 615-663.
- [52] Dravid S. M., Prakash A., Traynelis S. F. Activation of recombinant NR1/NR2C NMDA receptors //The Journal of physiology. – 2008. – Т. 586. – №. 18. – С. 4425-4439.
- [53] Ковальчук М. В., Попов В. О. Рентгеновское и синхротронное излучение—путь к познанию структуры биомакромолекул //Наука в России. – 2013. – №. 3. – С. 4-12.
- [54] Lodge D. et al. The 1980s: D-AP5, LTP and a decade of NMDA receptor discoveries //Neurochemical research. – 2019. – Т. 44. – С. 516-530.
- [55] Sragovich S. et al. Molecular alterations associated with the NMDA preconditioning-induced neuroprotective mechanism against glutamate cytotoxicity //Journal of Molecular Neuroscience. – 2012. – Т. 47. – С. 519-532.
- [56] Dutta R., Trapp B. D. Mechanisms of neuronal dysfunction and degeneration in multiple sclerosis //Progress in neurobiology. – 2011. – Т. 93. – №. 1. – С. 1-12.

- [57] Olney J. W., Labruyere J., Price M. T. Pathological changes induced in cerebrocortical neurons by phencyclidine and related drugs //Science. – 1989. – Т. 244. – №. 4910. – С. 1360-1362.
- [58] Радченко Е. В. и др. Лиганды глутаматных AMPA-рецепторов: механизмы действия и новые хемотипы //Биомедицинская химия. – 2021. – Т. 67. – №. 3. – С. 187-200.
- [59] Watkins J. C., Jane D. E. The glutamate story //British journal of pharmacology. – 2006. – Т. 147. – №. S1. – С. S100-S108.
- [60] Lodge D. et al. A comparison between the in vivo and in vitro activity of five potent and competitive NMDA antagonists //British journal of pharmacology. – 1988. – Т. 95. – №. 3. – С. 957-965.
- [61] Brickley S. G. et al. CNQX increases GABA-mediated synaptic transmission in the cerebellum by an AMPA/kainate receptor-independent mechanism //Neuropharmacology. – 2001. – Т. 41. – №. 6. – С. 730-736.
- [62] Weiser T. AMPA receptor antagonists for the treatment of stroke //Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders. – 2005. – Т. 4. – №. 2. – С. 153-159.
- [63] Honore T. et al. Quinoxalinediones: potent competitive non-NMDA glutamate receptor antagonists //Science. – 1988. – Т. 241. – №. 4866. – С. 701-703.
- [64] Kemp J. A. et al. 7-Chlorokynurenic acid is a selective antagonist at the glycine modulatory site of the N-methyl-D-aspartate receptor complex //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1988. – Т. 85. – №. 17. – С. 6547-6550.
- [65] Frankiewicz T., Pilc A., Parsons C. G. Differential effects of NMDA-receptor antagonists on long-term potentiation and hypoxic/hypoglycaemic excitotoxicity in hippocampal slices //Neuropharmacology. – 2000. – Т. 39. – №. 4. – С. 631-642.

- [66] Catarzi D., Colotta V., Varano F. Competitive Gly/NMDA receptor antagonists //Current topics in medicinal chemistry. – 2006. – T. 6. – №. 8. – C. 809-821.
- [67] Armstrong N., Gouaux E. Mechanisms for activation and antagonism of an AMPA-sensitive glutamate receptor: crystal structures of the GluR2 ligand binding core //Neuron. – 2000. – T. 28. – №. 1. – C. 165-181.
- [68] Nicholson K. L., Balster R. L. The discriminative stimulus effects of N-methyl-D-aspartate glycine-site ligands in NMDA antagonist-trained rats //Psychopharmacology. – 2009. – T. 203. – C. 441-451.
- [69] Ikonomidou C., Turski L. Why did NMDA receptor antagonists fail clinical trials for stroke and traumatic brain injury? //The Lancet Neurology. – 2002. – T. 1. – №. 6. – C. 383-386.
- [70] Faught E. BGG492 (selurampanel), an AMPA/kainate receptor antagonist drug for epilepsy //Expert Opinion on Investigational Drugs. – 2014. – T. 23. – №. 1. – C. 107-113.
- [71] Gomez-Mancilla B. et al. Randomized, multicenter trial to assess the efficacy, safety and tolerability of a single dose of a novel AMPA receptor antagonist BGG492 for the treatment of acute migraine attacks //Cephalalgia. – 2014. – T. 34. – №. 2. – C. 103-113.
- [72] Woodward J. J. A comparison of the effects of ethanol and the competitive glycine antagonist 7-chlorokynurenic acid on N-methyl-D-aspartic acid-induced neurotransmitter release from rat hippocampal slices //Journal of neurochemistry. – 1994. – T. 62. – №. 3. – C. 987-991.
- [73] Park L. T. et al. A randomized trial of the N-methyl-d-aspartate receptor glycine site antagonist prodrug 4-chlorokynurenine in treatment-resistant depression //International Journal of Neuropsychopharmacology. – 2020. – T. 23. – №. 7. – C. 417-425.

[74] AV-101 as Adjunct Antidepressant Therapy in Patients With Major Depression (ELEVATE) // Онлайн-база данных клинических исследований и информации об их результатах национальной библиотеки США URL: <https://clinicaltrials.gov>. (дата обращения: 06.08.2023).

[75] Patel W. et al. Probenecid increases the concentration of 7-chlorokynurenic acid derived from the prodrug 4-chlorokynurenine within the prefrontal cortex //Molecular Pharmaceutics. – 2020. – Т. 18. – №. 1. – С. 113-123.

[76] AV-101 Alone and in Combination With Probenecid in Healthy Subjects // Онлайн-база данных клинических исследований и информации об их результатах национальной библиотеки США URL: <https://clinicaltrials.gov>. (дата обращения: 06.08.2023).

[77] de Chiara C. et al. D-Cycloserine destruction by alanine racemase and the limit of irreversible inhibition //Nature chemical biology. – 2020. – Т. 16. – №. 6. – С. 686-694.

[78] Schade S., Paulus W. D-cycloserine in neuropsychiatric diseases: a systematic review //International Journal of Neuropsychopharmacology. – 2016. – Т. 19. – №. 4. – С. pyv102.

[79] Heresco-Levy U. et al. A randomized add-on trial of high-dose D-cycloserine for treatment-resistant depression //International Journal of Neuropsychopharmacology. – 2013. – Т. 16. – №. 3. – С. 501-506.

[80] Mullin S. et al. Ambroxol for the treatment of patients with Parkinson disease with and without glucocerebrosidase gene mutations: a nonrandomized, noncontrolled trial //JAMA neurology. – 2020. – Т. 77. – №. 4. – С. 427-434.

[81] Twomey E. C., Sobolevsky A. I. Structural mechanisms of gating in ionotropic glutamate receptors //Biochemistry. – 2018. – Т. 57. – №. 3. – С. 267-276.

- [82] Hansen K. B. et al. Structure, function, and allosteric modulation of NMDA receptors //Journal of General Physiology. – 2018. – T. 150. – №. 8. – C. 1081-1105.
- [83] Kuner T. et al. Structure of the NMDA receptor channel M2 segment inferred from the accessibility of substituted cysteines //Neuron. – 1996. – T. 17. – №. 2. – C. 343-352.
- [84] Cull-Candy S. G., Farrant M. Ca²⁺-permeable AMPA receptors and their auxiliary subunits in synaptic plasticity and disease //The Journal of physiology. – 2021. – T. 599. – №. 10. – C. 2655-2671.
- [85] Wollmuth L. P. Ion permeation in ionotropic glutamate receptors: Still dynamic after all these years //Current opinion in physiology. – 2018. – T. 2. – C. 36-41.
- [86] Yamakura T., Chavez-Noriega L. E., Harris R. A. Subunit-dependent inhibition of human neuronal nicotinic acetylcholine receptors and other ligand-gated ion channels by dissociative anesthetics ketamine and dizocilpine //The Journal of the American Society of Anesthesiologists. – 2000. – T. 92. – №. 4. – C. 1144-1153.
- [87] Rogawski M. A. et al. Interaction of phencyclidine with voltage-dependent potassium channels in cultured rat hippocampal neurons: comparison with block of the NMDA receptor-ionophore complex //Journal of Neuroscience. – 1989. – T. 9. – №. 11. – C. 4051-4061.
- [88] Parsons C. G. et al. Comparative patch-clamp studies with freshly dissociated rat hippocampal and striatal neurons on the NMDA receptor antagonistic effects of amantadine and memantine //European Journal of Neuroscience. – 1996. – T. 8. – №. 3. – C. 446-454.

- [89] Kroemer R. T. et al. Quantitative analysis of the structural requirements for blockade of the N-methyl-D-aspartate receptor at the phencyclidine binding site //Journal of medicinal chemistry. – 1998. – T. 41. – №. 3. – C. 393-400.
- [90] Reynolds I. J., Aizenman E. Pentamidine is an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist and is neuroprotective in vitro //Journal of Neuroscience. – 1992. – T. 12. – №. 3. – C. 970-975.
- [91] Koike M., Iino M., Ozawa S. Blocking effect of 1-naphthyl acetyl spermine on Ca²⁺-permeable AMPA receptors in cultured rat hippocampal neurons //Neuroscience research. – 1997. – T. 29. – №. 1. – C. 27-36.
- [92] Kopach O. et al. Ca²⁺-Permeable AMPA Receptors Contribute to Changed Dorsal Horn Neuronal Firing and Inflammatory Pain //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – T. 24. – №. 3. – C. 2341.
- [93] Buldakova S. L. et al. Characterization of AMPA receptor populations in rat brain cells by the use of subunit-specific open channel blocking drug, IEM-1460 //Brain research. – 1999. – T. 846. – №. 1. – C. 52-58.
- [94] Twomey E. C. et al. Mechanisms of channel block in calcium-permeable AMPA receptors //Neuron. – 2018. – T. 99. – №. 5. – C. 956-968. e4.
- [95] Taverna F. A. et al. Sensitivity of AMPA receptors to pentobarbital //European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology. – 1994. – T. 267. – №. 3. – C. R3-R5.
- [96] Yamakura T. et al. The sensitivity of AMPA-selective glutamate receptor channels to pentobarbital is determined by a single amino acid residue of the $\alpha 2$ subunit //FEBS letters. – 1995. – T. 374. – №. 3. – C. 412-414.
- [97] Antonov S. M. et al. Novel adamantane derivatives act as blockers of open ligand-gated channels and as anticonvulsants //Molecular Pharmacology. – 1995. – T. 47. – №. 3. – C. 558-567.

- [98] Barygin O. I. et al. Blockade of NMDA receptor channels by 9-aminoacridine and its derivatives //Neuroscience letters. – 2009. – Т. 451. – №. 1. – С. 29-33.
- [99] Vorobjev V. S., Sharonova I. N. Tetrahydroaminoacridine blocks and prolongs NMDA receptor-mediated responses in a voltage-dependent manner //European journal of pharmacology. – 1994. – Т. 253. – №. 1-2. – С. 1-8.
- [100] Kaniakova M. et al. 7-phenoxytacrine is a dually acting drug with neuroprotective efficacy in vivo //Biochemical Pharmacology. – 2021. – Т. 186. – С. 114460.
- [101] Dron MY, Zhigulin AS, Barygin OI. Mechanisms of NMDA receptor inhibition by diarylamidine compounds. Eur J Neurosci. 2020 Apr;51(7):1573-1582. doi: 10.1111/ejn.14589. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31605636.
- [102] Жигулин А. С., Дронь М. Ю., Барыгин О. И. Механизмы ингибирования АМРА рецепторов диминазеном //Российский физиологический журнал им. ИМ Сеченова. – 2021. – Т. 107. – №. 8. – С. 1039–1048-1039–1048.
- [103] Kandel E. R. et al. Principles of Neural Science (5th editio., p. 1760). – 2012. – P. 216.
- [104] Kuner T., Schoepfer R. Multiple structural elements determine subunit specificity of Mg²⁺ block in NMDA receptor channels //Journal of Neuroscience. – 1996. – Т. 16. – №. 11. – С. 3549-3558.
- [105] Huang Z., Gibb A. J. Mg²⁺ block properties of triheteromeric GluN1–GluN2B–GluN2D NMDA receptors on neonatal rat substantia nigra pars compacta dopaminergic neurones //The Journal of physiology. – 2014. – Т. 592. – №. 10. – С. 2059-2078.
- [106] Nowak L. et al. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones //Nature. – 1984. – Т. 307. – №. 5950. – С. 462-465.

- [107] Peltoniemi M. A. et al. Ketamine: a review of clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics in anesthesia and pain therapy //Clinical pharmacokinetics. – 2016. – Т. 55. – С. 1059-1077.
- [108] Liu G. et al. Ketamine a dissociative anesthetic: Neurobiology and biomolecular exploration in depression //Chemico-Biological Interactions. – 2020. – Т. 319. – С. 109006.
- [109] Диасамидзе К. Э. и др. Кетамин. Современная история длиною в 50 лет //Анестезиология и реаниматология (Медиа Сфера). – 2021. – №. 5. – С. 86-92..
- [110] Федеральный закон от 08.01.1998 N 3-ФЗ (ред. от 28.04.2023) "О наркотических средствах и психотропных веществах" (с изм. и доп., вступ. в силу с 09.05.2023)
- [111] Stahl S. M. Stahl's essential psychopharmacology: neuroscientific basis and practical applications. – Cambridge university press, 2021. – P. 111-114.
- [112] Iversen L. L., Kemp J. A. Non-competitive NMDA antagonists as drugs //The NMDA receptor. – 1994. – С. 469-486.
- [113] Zanos P., Gould T. D. Mechanisms of ketamine action as an antidepressant //Molecular psychiatry. – 2018. – Т. 23. – №. 4. – С. 801-811.
- [114] Henter I. D., Park L. T., Zarate Jr C. A. Novel glutamatergic modulators for the treatment of mood disorders: current status //CNS drugs. – 2021. – Т. 35. – №. 5. – С. 527-543.
- [115] Barygin O. I. et al. Inhibition of the NMDA and AMPA receptor channels by antidepressants and antipsychotics //Brain Research. – 2017. – Т. 1660. – С. 58-66.
- [116] Jackson M. F. et al. Desensitization of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors facilitates use-dependent inhibition by pentobarbital //Molecular pharmacology. – 2003. – Т. 64. – №. 2. – С. 395-406.

- [117] Медведев В. Э. Мемантин при терапии болезни Альцгеймера //Обозрение психиатрии и медицинской психологии имени ВМ Бехтерева. – 2010. – №. 4. – С. 51-55.
- [118] McFarthing K. et al. Parkinson's disease drug therapies in the clinical trial pipeline: 2022 update //Journal of Parkinson's Disease. – 2022. – Т. 12. – №. 4. – С. 1073-1082.
- [119] Rogawski M. A. Low affinity channel blocking (uncompetitive) NMDA receptor antagonists as therapeutic agents—toward an understanding of their favorable tolerability //Amino acids. – 2000. – Т. 19. – С. 133-149.
- [120] Parsons C. G., Danysz W., Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist—a review of preclinical data //Neuropharmacology. – 1999. – Т. 38. – №. 6. – С. 735-767.
- [121] Wilcox M. R. et al. Inhibition of NMDA receptors through a membrane-to-channel path //Nature Communications. – 2022. – Т. 13. – №. 1. – С. 4114.
- [122] Karakas E., Furukawa H. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel //Science. – 2014. – Т. 344. – №. 6187. – С. 992-997.
- [123] Zhao H. et al. Preferential assembly of heteromeric kainate and AMPA receptor amino terminal domains //Elife. – 2017. – Т. 6. – С. e32056.
- [124] Pellicciari R., Costantino G., Macchiarulo A. Metabotropic glutamate receptors: a structural view point //Pharmacochemistry Library. – 2000. – Т. 31. – С. 231-237.
- [125] Hansen K. B., Furukawa H., Traynelis S. F. Control of assembly and function of glutamate receptors by the amino-terminal domain //Molecular pharmacology. – 2010. – Т. 78. – №. 4. – С. 535-549.

- [126] Herin G. A., Aizenman E. Amino terminal domain regulation of NMDA receptor function //European journal of pharmacology. – 2004. – T. 500. – №. 1-3. – C. 101-111.
- [127] Geoffroy C., Paoletti P., Mony L. Positive allosteric modulation of NMDA receptors: mechanisms, physiological impact and therapeutic potential //The Journal of Physiology. – 2022. – T. 600. – №. 2. – C. 233-259.
- [128] Stroebel D., Paoletti P. Architecture and function of NMDA receptors: an evolutionary perspective //The Journal of Physiology. – 2021. – T. 599. – №. 10. – C. 2615-2638.
- [129] Furukawa H. Structure and function of glutamate receptor amino terminal domains //The Journal of physiology. – 2012. – T. 590. – №. 1. – C. 63-72.
- [130] Zhu S., Paoletti P. Allosteric modulators of NMDA receptors: multiple sites and mechanisms //Current opinion in pharmacology. – 2015. – T. 20. – C. 14-23.
- [131] Legendre P., Westbrook G. L. Ifenprodil blocks N-methyl-D-aspartate receptors by a two-component mechanism //Molecular pharmacology. – 1991. – T. 40. – №. 2. – C. 289-298.
- [132] Bhatt J. M. et al. Effect of ifenprodil on GluN1/GluN2B N-methyl-D-aspartate receptor gating //Molecular pharmacology. – 2013. – T. 83. – №. 1. – C. 9-21.
- [133] Kew J. N. C. et al. Developmental changes in NMDA receptor glycine affinity and ifenprodil sensitivity reveal three distinct populations of NMDA receptors in individual rat cortical neurons //Journal of Neuroscience. – 1998. – T. 18. – №. 6. – C. 1935-1943.
- [134] Karakas E., Simorowski N., Furukawa H. Subunit arrangement and phenylethanolamine binding in GluN1/GluN2B NMDA receptors //Nature. – 2011. – T. 475. – №. 7355. – C. 249-253.

- [135] Borza I., Domany G. NR2B selective NMDA antagonists: the evolution of the ifenprodil-type pharmacophore //Current topics in medicinal chemistry. – 2006. – T. 6. – №. 7. – C. 687-695.
- [136] Guitton M. J. et al. Blockade of cochlear NMDA receptors prevents long-term tinnitus during a brief consolidation window after acoustic trauma //Neural plasticity. – 2007. – T. 2007.
- [137] Sasaki T. et al. Ifenprodil tartrate treatment of adolescents with post-traumatic stress disorder: A double-blind, placebo-controlled trial //Psychiatry Research. – 2022. – T. 311. – C. 114486.
- [138] Sun J. et al. Ifenprodil improves long-term neurologic deficits through antagonizing glutamate-induced excitotoxicity after experimental subarachnoid hemorrhage //Translational Stroke Research. – 2021. – C. 1-14.
- [139] Sun Y. et al. Mechanism of glutamate receptor desensitization //Nature. – 2002. – T. 417. – №. 6886. – C. 245-253.
- [140] Sekiguchi M. et al. A novel allosteric potentiator of AMPA receptors: 4-[2-(phenylsulfonylamino) ethylthio]-2, 6-difluoro-phenoxyacetamide //Journal of Neuroscience. – 1997. – T. 17. – №. 15. – C. 5760-5771.
- [141] Rosenmund C., Mansour M. How to be desensitized //Nature. – 2002. – T. 417. – №. 6886. – C. 238-239.
- [142] Koike M. et al. Regulation of kinetic properties of GluR2 AMPA receptor channels by alternative splicing //Journal of Neuroscience. – 2000. – T. 20. – №. 6. – C. 2166-2174.
- [143] Rossi G. N. et al. Molecular Pathways of the Therapeutic Effects of Ayahuasca, a Botanical Psychedelic and Potential Rapid-Acting Antidepressant //Biomolecules. – 2022. – T. 12. – №. 11. – C. 1618.

- [144] Перфилова В. Н., Тюренок И. Н. Глутаматные ионотропные рецепторы: структура, локализация, функции //Успехи физиологических наук. – 2016. – Т. 47. – №. 1. – С. 80-96.
- [145] Rogawski M. A., Hanada T. Preclinical pharmacology of perampanel, a selective non-competitive AMPA receptor antagonist //Acta Neurologica Scandinavica. – 2013. – Т. 127. – С. 19-24.
- [146] Brigo F. et al. Perampanel in the treatment of status epilepticus: a systematic review of the literature //Epilepsy & Behavior. – 2018. – Т. 86. – С. 179-186.
- [147] Пылаева О. А., Мухин К. Ю. Применение нового антиэпилептического препарата перампанел (Файкомпа) в лечении эпилепсии (обзор зарубежной литературы) //Русский журнал детской неврологии. – 2014. – №. 3. – С. 36-42.
- [148] Yelshanskaya M. V. et al. Structural bases of noncompetitive inhibition of AMPA-subtype ionotropic glutamate receptors by antiepileptic drugs //Neuron. – 2016. – Т. 91. – №. 6. – С. 1305-1315.
- [149] Vorobjev V. S. Vibrodissociation of sliced mammalian nervous tissue //Journal of neuroscience methods. – 1991. – Т. 38. – №. 2-3. – С. 145-150.
- [150] Samoiloва M. V. et al. The open channel blocking drug, IEM-1460, reveals functionally distinct α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate receptors in rat brain neurons //Neuroscience. – 1999. – Т. 94. – №. 1. – С. 261-268.
- [151] Woodhull A. M. Ionic blockage of sodium channels in nerve //The Journal of general physiology. – 1973. – Т. 61. – №. 6. – С. 687-708.
- [152] Nikolaev M., Tikhonov D. Light-Sensitive Open Channel Block of Ionotropic Glutamate Receptors by Quaternary Ammonium Azobenzene Derivatives //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 18. – С. 13773.

- [153] Tikhonova T. B. et al. Organic blockers escape from trapping in the AMPA receptor channels by leaking into the cytoplasm //Neuropharmacology. – 2008. – Т. 54. – №. 4. – С. 653-664.
- [154] Таран А.С. Нейропсихотропные эффекты производных диазепино[1,2а]бензимидазола: дис. – Волгоградский государственный медицинский университет, 2017.
- [155] Igarashi M. et al. The NR2B antagonist, ifenprodil, corrects the l-DOPA-induced deficit of bilateral movement and reduces c-Fos expression in the subthalamic nucleus of hemiparkinsonian rats //Neuroscience Research. – 2015. – Т. 96. – С. 45-53.
- [156] Jackson M. F. et al. Desensitization of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors facilitates use-dependent inhibition by pentobarbital //Molecular pharmacology. – 2003. – Т. 64. – №. 2. – С. 395-406.