<https://doi.org/10.32863/1682-7392-2019-3-67-137-139>

СОВРЕМЕННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ ИЗУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ, ВЛИЯЮЩИХ НА КОГНИТИВНЫЕ ФУНКЦИИ

Скребицкий В.Г., Шаронова И.Н.

Научный центр неврологии, Москва

Проблема нарушений когнитивных функций остается одной из наиболее значимых в современной неврологии, поскольку когнитивный дефицит сопровождает развитие многих неврологических заболеваний, включая болезни Альцгеймера, Паркинсона и другие нейродегенеративные патологии, а также цереброваскулярные расстройства. Для коррекции когнитивных нарушений используют фармакологические препараты, объединяемые под общим названием «ноотропы», представляющие собой большой круг веществ с разными фармакологическими свойствами, оказывающими активирующее влияние на обучение, улучшающие память и умственную деятельность. В настоящее время активно разрабатываются и внедряются в клиническую практику новые препараты этого класса, однако для многих из них механизмы действия остаются неясными. Выявление свойств и отбор веществ с ноотропными свойствами осуществляются главным образом на основании эмпирических наблюдений и поведенческих экспериментов на животных, в то время как их клеточные и рецепторные мишени остаются неизученными. Понимание нейрональных механизмов действия этих препаратов, включая данные об изменениях эффективности синапсов, модуляции рецепторов и ионных каналов, несомненно, будет способствовать их более эффективному использованию и созданию новых соединений с ноотропными свойствами.

Одной из современных технологий, применяемых для изучения клеточных механизмов действия ноотропов, наряду с молекулярно-биологическими, фармакологическими и другими подходами, является использование широкого спектра электрофизиологических методов, позволяющих получить важную информацию о механизмах действия лекарственных средств этого класса. Одним из наиболее современных электрофизиологических подходов, используемых для изучения свойств рецепторов, ионных каналов и механизмов действия лекарственных препаратов, является метод регистрации токов в условиях фиксации напряжения – так называемый пэтч-кламп метод (patch clamp method) или метод локальной фиксации потенциала [4]. Этот метод даёт возможность экспериментатору контролировать разность потенциалов между сторонами мембраны нейрона и измерять ионные токи, проходящие через нее, что, в конечном итоге, позволяет делать выводы о том, как ионные каналы реагируют на электрическое и химическое воздействие.

Одна из существующих конфигураций этого метода – регистрация от целой клетки (“whole-cell recording”) наиболее часто применяется для записи активности нейронов в срезах мозга, сохраняющих синаптические связи с другими клетками. На рис 1 представлена микрофотография расположения клеток в пирамидном слое поля CA1 гиппокампа и пирамидной клетки в месте с регистрирующей микропипеткой. На том же рисунке показана типичная запись спонтанных ионных токов в нейроне, показанном на фотографии. Видно, что активность состоит из миниатюрных токов амплитудой от 10-15 до 300-400 пА, которые являются результатом воздействия на клеточ-

Рис. 1. Фотографии пирамидных клеток в слое str. pyramidalis поля CA1 гиппокампа (а) и отдельная клетка с регистрирующей микропипеткой (б); (в) – спонтанные тормозные токи, зарегистрированные в этой клетке.

НАУЧНЫЕ СТАТЬИ

Рис. 2. Влияние Ноопепта (1 мкМ) на активность интернейронов в str. radiatum поля CA1 (регистрация в режиме фиксации тока). (а) – временной ход изменений частоты разрядов интернейронов под действием Ноопепта (усреднение по 5 клеткам $\pm$ SEM). (б) – Типичный пример влияния Ноопепта на спонтанные разряды интернейрона.

ную мембрану квантов ГАМК, спонтанно выделяющихся из терминалей тормозных интернейронов, расположенных в разных слоях поля CA1.

Технология регистрации ионных токов в срезах мозга позволяет получить информацию о механизмах действия веществ с ноотропными свойствами. Нами получены данные о синаптических механизмах действия одного из ноотропных препаратов – Ноопепта. Этот препарат обладает ноотропным, нейропротекторным и анксиолитическим действием, он улучшает способность к обучению и память [2]. В опытах на срезах гиппокампа мы обнаружили, что введение в проточную среду 1 мкМ Ноопепта приводит к существенному увеличению амплитуды и частоты миниатюрных токов, связанных с активацией ГАМК_A рецепторов. При блокаде синаптической передачи с помощью тетродотоксина изменений спонтанных тормозных токов под действием Ноопепта не наблюдали, что позволило предположить, что мишенью Ноопепта являются не сами пирамидные нейроны, а тормозные интернейроны, заканчивающиеся на них. Это предположение нашло подтверждение в экспериментах с регистрацией активности интернейронов радиального слоя поля CA1, в которых было обнаружено, что их спонтанная активность значительно усиливается в присутствии Ноопепта (рис. 2). Полученные результаты свидетельствуют о том, что одним из механизмов действия Ноопепта является усиление тормозных процессов в гиппокампе. Физиологическое значение обнаруженного эффекта состоит в увеличении тонического торможения во внутригиппокампальных путях, что может лежать в основе анксиолитического действия препарата.

Существенный прогресс в изучении рецепторных и молекулярных механизмов действия физиологически активных веществ, включая препараты, улучшающие когнитивные функции, был достигнут благодаря внедрению в практику экспериментальных исследований технологии регистрации ионных токов в изолированных нейронах. Преимущество регистрации с помощью пэтч-кламп метода от изолированных нейронов по сравнению со срезами мозга состоит в возможности проведения исследований на нейронах, изолированных от синаптических воздействий со стороны других нейронов, а также исключать другие неконтролируемые влияния. Экспериментатор может помещать клетку в среду с определённым химическим составом, что обеспечивает возможность

активировать определенный тип рецепторов и потенциал-управляемых ионных каналов и точно контролировать концентрацию исследуемых веществ. В лаборатории функциональной синаптологии была разработана оригинальная методика изоляции клеток из срезов мозга с помощью вибродиссоциации [5], которая позволяет выделять нейроны без применения протеолитических ферментов. Эта методика нашла широкое применение в различных лабораториях по всему миру. С ее использованием нами были проведены исследования влияния на активность лиганд-управляемых каналов ряда препаратов, обладающих нейропротекторными и прокогнитивными свойствами. Одним из таких препаратов является лекарственное средство Семакс. Несмотря на то, что Семакс широко используется в неврологической практике при острой и хронической недостаточности мозгового кровообращения, а также в качестве ноотропного и нейропротекторного лекарственного средства, механизм его действия до настоящего времени не выяснен. Используя технологию регистрации токов с помощью пэтч-кламп метода, мы обнаружили, что Семакс потенцирует ГАМК-активируемые токи в изолированных клетках Пуркинье мозжечка и угнетает активность глициновых рецепторов в пирамидных нейронах гиппокампа [3]. Обнаруженная модуляция активности ГАМК_A рецепторов может быть одним из механизмов, обеспечивающих нейропротекторные и ноотропные эффекты Семакса.

Для выявления клеточных мишеней и механизмов действия ноотропных препаратов используется также технология оптической регистрации активности нейронов, в частности, метод оптической регистрации Ca^{2+} сигнала, который позволяет количественно оценить влияние препарата на динамику изменений концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , а также выявить локализацию и клеточную специфичность действия этих веществ. Эта информация также важна для понимания механизмов действия исследуемых препаратов, поскольку изменение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} является начальным звеном многих сигнальных каскадов, запускаемых при действии физиологически активных веществ. В опытах на культурах гиппокампа обнаружили, что под действием Ноопепта возрастает частота кальциевых сигналов в str. radiatum (область локализации тормозных интернейронов), в слое же пирамидных нейронов значимого изменения этого параметра не происходит [1]. Эти наблюдения находятся в соответствии с полученными ранее данными об усилении активности тормозных интернейронов радиального слоя и подтверждают сделанное ранее предположение о том, что первичной мишенью Ноопепта являются ГАМКергические интернейроны области str. radiatum.

Одной из современных технологий, используемых для понимания механизмов функционирования нейрональных рецепторов и ионных каналов, является молекулярное моделирование, которое стало одной из наиболее интенсивно развивающихся областей науки. Такой подход позволяет определить конкретное место связывания лиганда на белковой молекуле рецептора/канала, а также исследовать связь структура-активность, что имеет важное практическое значение для разработки новых лекарственных препаратов.

Таким образом, применение современных технологий исследования нейрональной активности мозга позволяет идентифицировать клеточные и молекулярные мишени действия препаратов, влияющих на когнитивные функции, а именно, типы нейронов, вовлеченных в реализацию эффектов, и рецепторные системы и ионные каналы, с которыми взаимодействуют эти препараты. Все это очень важно для совершенствования уже применяемых и создания новых отечественных препаратов, предотвращающих развитие разных форм нарушения когнитивной деятельности и способствующих улучшению памяти и обучения.

Литература

1. Колбаев, С.Н. Влияние ноопепта на динамику $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нейронах культивируемых срезов гиппокампа крысы / С.Н. Колбаев., О.П. Александрова, И.Н. Шаронова, В.Г. Скребицкий // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 2017. – Т. 164, №9. – С. 309-313.
2. Островская, Р.У. Оригинальный ноотропный и нейропротективный дипептид ноопепт (ГВС-111) / Р.У. Островская, Т.А. Гудашева, Т.А. Воронина Т.А., С.Б. Середенин // Эксперим. клин. фармакол. – 2002. – Т. 65, №5. – С. 66–72.
3. Шаронова, И.Н. Модуляция ГАМК- и глицинаактивируемых токов препаратом “Семакс” в изолированных нейронах мозга / И.Н. Шаронова, Ю.В. Буканова, Н.Ф. Мясоедов, В.Г. Скребицкий // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 2017. – Т. 164, №11. – С. 564-569.
4. Hamill, O.P. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches / O.P. Hamill, A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, F.J. Sigworth // Pflügers Arch. – 1981. – V. 391, № 2. – P. 85-100.
5. Vorobjev, V.S. Vibrodissociation of sliced mammalian tissue / V.S. Vorobjev // J. Neurosci. Methods. – 1991. – V. 38. – С. 145-151.