

НЕЙРОФАРМАКОЛОГИЯ

НОВОЕ ПРОИЗВОДНОЕ ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ РГПУ-135 (ГЛУТАРОН, НЕЙРОГЛУТАМИН) МОДУЛИРУЕТ ИОННЫЕ ТОКИ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКОВ

Ю. Д. Игнатов¹, А. И. Вислобоков¹, И. Н. Тюренков², В. В. Багметова²

Новое производное глутаминовой кислоты РГПУ-135 (гидрохлорид 3-фенилглутаминовой кислоты, глутарон, нейроглутамин) в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкМ дозозависимо и обратимо модулирует трансмембранные натриевые, калиевые и, в большей степени, кальциевые ионные токи нейронов моллюсков прудовика и катушки: в концентрациях 1 – 10 мкМ незначительно активизирует кальциевые и калиевые токи, 100 мкМ — увеличивает амплитуду кальциевых токов на 5 – 10 %, 1000 мкМ — подавляет натриевые и калиевые токи на 5 – 12 %. РГПУ-135 не влияет на потенциал поверхностного заряда мембраны и воротные механизмы ионных каналов. Эффекты РГПУ-135 быстро обратимы, что указывает на относительно непрочное связывание со структурами мембраны и ионных каналов.

Ключевые слова: производные глутаминовой кислоты; РГПУ-135 (глутарон, нейроглутамин); мембранотропное действие; нейроны; натриевые; кальциевые; калиевые ионные токи

ВВЕДЕНИЕ

Новое производное глутаминовой кислоты с лабораторным шифром РГПУ-135 — гидрохлорид 3-фенилглутаминовой кислоты (глутарон, нейроглутамин) обладает оригинальным спектром фармакологической активности: выраженное антидепрессивное действие сочетается с анксиолитическим и нейропротекторным эффектами, а также ноотропными, активирующими и иммуностимулирующими свойствами [7, 10, 11]. На основе РГПУ-135 разрабатывается новое антидепрессивное, анксиолитическое и нейропротекторное лекарственное средство. Нейропсихотропное действие РГПУ-135, как и других психотропных средств, может реализоваться за счет влияния на нейромедиаторные системы ЦНС [1, 7, 9, 11], электрическую возбудимость нервной ткани [2, 13], активность ионных каналов мембран нейронов [3 – 6, 12 – 14, 15]. Модуляция активности ионных каналов может лежать в основе влияния нейропсихотропных средств на высвобождение и обратный захват нейромедиаторов. В связи с этим представляется актуальным изучение влияния РГПУ-135 на ионные токи нейронов, через которое могут опосредоваться его нейропсихотропные эффекты.

Цель работы — исследование изменений натриевых, кальциевых и калиевых ионных токов под влиянием РГПУ-135 в широком диапазоне концентраций на нейронах моллюсков, ионные каналы которых имеют принципиальное сходство с нейронами теплокровных животных [7].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объектом исследования были неидентифицированные изолированные нейроны моллюсков — прудовика большого (*Lymnaea stagnalis*) и катушки роговой (*Planorbarius corneus*). Использовали растворы с различным ионным составом (таблица). Перфузирующий (наружный) раствор подавался в камеру, где находился нейрон на полиэтиленовой микропипетке, а диализирующий (внутриклеточный) — внутрь этой пипетки. Исследуемые вещества добавляли в перфузирующий раствор. Для измерения трансмембранных ионных токов применяли метод внутриклеточной перфузии изолированных нейронов и фиксации мембранного потенциала [6, 12].

Использовали субстанцию РГПУ-135, полученную на кафедре органической химии Российского государственного педагогического университета им. А. И. Герцена (Санкт-Петербург, Россия). Ее растворяли в соответствующих наружных растворах в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкМ. Кривые ионных токов и потенциалов визуально оценивали на экране осциллографа, с помощью преобразователя АЦП — ЦАП вводили в компьютер и распечатывали на принтере. 12-разрядный ЦАП позволял регистрировать малейшие изменения в амплитудах токов.

Результаты обрабатывали с использованием статистической программы SPSS-17. Для проверки гипотезы о различиях между группами проводили непараметрический дисперсионный анализ Фридмана, для доказательства различий между контролем и эффектами вещества в разных концентрациях — апостериорное попарное сравнение с использованием критериев Вилкоксона. Для оценки каждого изменения тока при определенной концентрации использовали не менее 5 измерений. На графиках представлены значения средних арифметических и 95 % доверительные интервалы. Для построения графиков использовали пакет программ Excel.

¹ Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова, институт фармакологии им. А. В. Вальдмана, 197022, Санкт-Петербург, ул. Л. Толстого, 6/8.

² Волгоградский государственный медицинский университет.

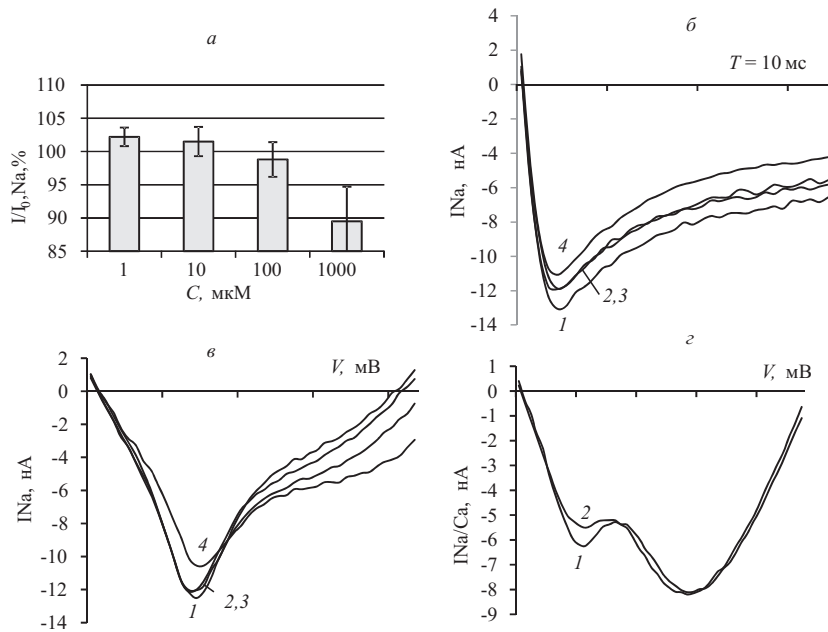


Рис. 1. Изменения натриевого тока нейронов прудовика под влиянием нейроглутамата ($n = 8$).

a — зависимости “концентрация — эффект”. *б* — изменения амплитуды и кинетики тока при действии нейроглутамата: 1 — отмывание, 2 — контроль, 3 — 100 мкМ, 4 — 1000 мкМ. *в* — вольт-амперные характеристики натриевых каналов: 1 — нейроглутамин 1 мкМ, 2 и 3 — контроль и отмывание (кривые сливаются), 4 — 1000 мкМ. *г* — то же для натрий-кальциевых каналов: 1 — контроль, 2 — нейроглутамин 1000 мкМ. По оси абсцисс: *a* — концентрация, *б* — время, *в* и *г* — пилообразное смещение мембранного потенциала от -40 до 30 мВ за 20 (*в*) и 40 (*г*) мс; по оси ординат — ионный ток (*a*: 1 — при действии вещества, I_0 — до действия, %); *б* — *в*: I_{Na} — натриевый ток, *г* — натрий-кальциевый ток; доверительные интервалы при $p = 95 \%$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Под влиянием вещества РГПУ-135 наблюдали незначительные, зависящие от концентрации и обратимые изменения амплитуды натриевого тока (рис. 1, *a*). При действии РГПУ-135 в концентрациях 1 и 10 мкМ происходило увеличение тока или наблюдалась тенденция к его увеличению (рис. 1). В концентрации 100 мкМ проявлялась тенденция подавления тока, а в концентрации 1000 мкМ — подавление тока на 10–12%. Эффекты наступали быстро, устранялись при отмывании также довольно быстро (за 2–3 мин), что указывает на невысокую прочность связывания молекул вещества со структурами мембраны (или ионных каналов).

Кинетика развития тока (рис. 1, *б*) под влиянием РГПУ-135 и положение максимума вольт-амперной характеристики мембраны (рис. 1, *в*, *г*) не изменялись.

Влияние вещества РГПУ-135 на кальциевые токи (рис. 2) во всем диапазоне концентраций от 1 до

1000 мкМ было преимущественно активирующим (наблюдалось увеличение амплитуды тока на 3–10%) и зависимым от концентрации (рис. 2, *a*). Кинетика развития тока (рис. 2, *б*) и положение максимума вольт-амперной характеристики мембраны (рис. 2, *в*) не изменялись.

Вещество РГПУ-135 при действии в концентрации 1000 мкМ подавляло натриевые токи, не изменяя или слегка увеличивая кальциевые (рис. 1, *a*, *г* и рис. 2, *a*). На суммарной натрий-кальциевой вольт-амперной характеристике мембраны (рис. 1, *г*) левая часть кривой, отражающая натриевый ток, подавлена, а правая часть, связанная с кальциевым током, не изменена.

Влияние РГПУ-135 на амплитуду медленного калиевого тока было сходным с его влиянием на натриевые токи (рис. 3, *a*). Оно было зависимым от концентрации, обратимым, двухфазным: наблюдалась небольшая активация тока при концентрациях 1–10 мкМ и подавление на 5–13% при действии в концентрации 1000 мкМ.

Ионный состав растворов (в мМ) для регистрации ионных токов и мембранных потенциалов

Ионные токи	NaCl	CsCl	CaCl ₂	MgCl ₂	KCl	Tris-OH	pH
<i>Внеклеточный раствор</i>							
Общий входящий ток и регистрация внутриклеточных потенциалов	100	—	2	1,5	5	5	7,5
Кальциевый входящий ток	—	100	10	1,5	—	5	7,5
Калиевый выходящий ток	100	—	2	1,5	5	5	7,5
<i>Внутриклеточный раствор</i>							
Входящие токи	—	120	—	—	—	5	7,4
Калиевые выходящие токи	—	—	—	—	120	5	7,4

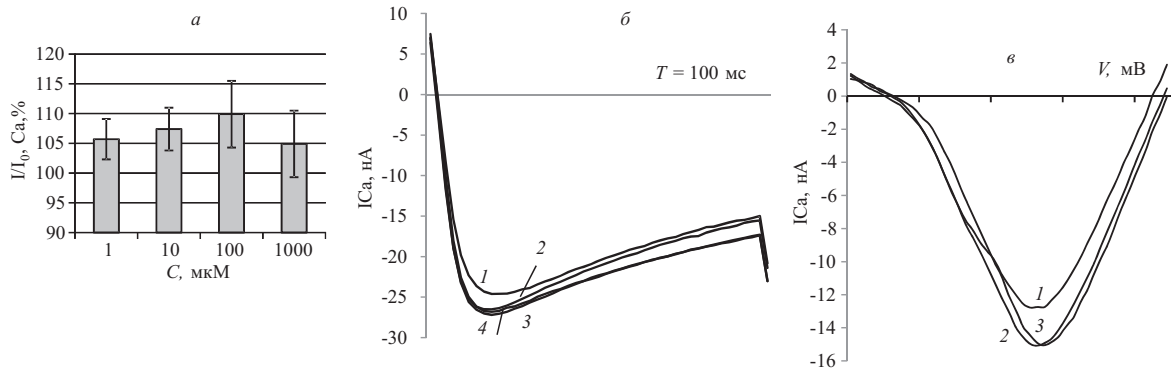


Рис. 2. Изменения кальциевого тока нейронов прудовика под влиянием нейроглутамин ($n = 8$).

a — зависимости “концентрация — эффект”. *б* — изменения амплитуды и кинетики тока при действии нейроглутамин, кривые сверху вниз: 1 — контроль, 2 — 1 μM , 3 — 100, 4 — 1000 μM . *в* — вольт-амперные характеристики при действии нейроглутамин: 1 — контроль, 2 — 100 μM , 3 — 1000. По оси абсцисс: *a* — концентрация, *б* — время, *в* — пилообразное смещение мембранного потенциала от -40 до 50 мВ длительностью 100 мс; по оси ординат — ионный ток (*a*: 1 — при действии вещества, I_0 — до действия, %); *б* — *в*: ICa — кальциевый ток; доверительные интервалы при $p = 95 \%$.

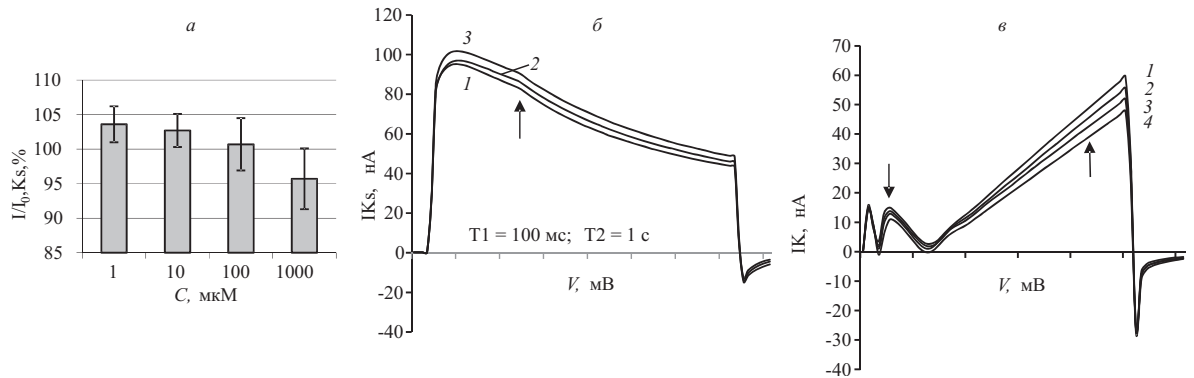


Рис. 3. Изменения калиевых ионных токов нейронов прудовика под влиянием нейроглутамин ($n = 9$).

a — зависимости “концентрация — эффект”. *б* — изменения амплитуды и кинетики тока под влиянием нейроглутамин, кривые снизу вверх над стрелкой: 1 — 1000 μM , 2 — контроль, 3 — 1 μM . *в* — вольт-амперные характеристики при действии нейроглутамин; под левой стрелкой — быстрый калиевый ток, над правой — медленный калиевый ток: 1 — 1 μM , 2 — 10, 3 — 100 μM , 4 — контроль. По оси абсцисс: *a* — концентрация; *б* — время: слева до стрелки — $T1$, далее — $T2$; *в* — пилообразное смещение мембранного потенциала от -40 до 50 мВ длительностью 100 мс; по оси ординат: ионные токи: (*a*: 1 — при действии вещества, I_0 — до действия, %); *б* — IKs — медленный калиевый ток, *в* — IK — суммарные калиевые токи (быстрый и медленный); доверительные интервалы при $p = 95 \%$.

Восстановление тока в процессе отмывания нейронов происходило так же, как для кальциевых и натриевых токов довольно быстро — за 2–3 мин. Кинетика активации и инактивации тока под влиянием РГПУ-135 не изменялась (рис. 3, б), положение вольт-амперной характеристики мембраны на оси потенциалов не изменялось, изменялся только ее наклон (рис. 3, в), что указывает на отсутствие влияния вещества как на воротные механизмы каналов, так и на потенциал поверхностного заряда мембраны нейронов.

Характер влияния РГПУ-135 на быстрые калиевые токи напоминал его влияние на медленные калиевые. Для сравнения общий характер подавления выходящих быстрых и медленных калиевых ионных токов показан на рис. 3, в. В самом начале на записи после возникновения емкостных токов мембраны (кривые направлены вверх) следуют небольшие по амплитуде выходящие быстрые калиевые токи, их амплитуда изменялась незначительно. Затем следуют линейно нарастающие выходящие медленные калиевые токи, которые изменялись в большей степени. В самом конце в правой части записи снова вид-

ны емкостные токи мембраны, направленные вниз и возникающие на выключение линейно нарастающего деполаризующего смещения потенциала.

Неспецифические токи утечки мембраны при действии РГПУ-135 во всем диапазоне исследованных концентраций (1–1000 μM) и при регистрации всех ионных токов либо изменялись незначительно (на 0,5–1 нА), либо оставались неизменными, поэтому явной тенденции характерных изменений этих токов установить не удалось.

Функционирование ионных каналов лежит в основе многих физиологических процессов, а ряд заболеваний нервной и сердечно-сосудистой системы связан с нарушением работы ионных каналов и ионного баланса клеток. Мембраноактивные фармакологические вещества могут менять работу ионных каналов [3, 4, 8]. Так, местные анестетики, некоторые противоритмические средства блокируют ионные каналы — их называют каналоблокаторами. Другие фармакологические средства способны, в зависимости от условий, либо умеренно увеличивать амплитуды ионных токов, либо умеренно их

подавлять – их называют модуляторами [4, 6, 8]. Среди нейротропных средств встречаются и каналоблокаторы, и модуляторы, и вещества со смешанным типом влияния на ионные каналы [3, 4, 8]. Например, анксиолитик афобазол блокирует ионные каналы [12, 14], ноотроп пиррацетам в концентрации 1–2 мМ подавляет калиевые токи почти на 50 % [15].

Незначительное увеличение амплитуды трансмембранных натриевых, кальциевых и калиевых ионных токов нейронов моллюсков под влиянием РГПУ-135 в концентрациях 1–10 мкМ можно расценивать как активирующее действие на ионные каналы. При этом активация была выражена преимущественно для кальциевых токов. Повышение концентрации ионов кальция в постсинаптической клетке запускает каскад белок-белковых взаимодействий, приводящих в конечном итоге к структурным и функциональным изменениям в нейроне [3, 4, 8]. Поэтому в клетке под влиянием изучаемого вещества могут возникать многообразные модулирующие эффекты — вплоть до активации геномного аппарата, а в синаптических окончаниях — усиленный выброс медиаторов. О модуляции ионных токов свидетельствует и тенденция меньшей активации и большего подавления натриевых и калиевых токов под влиянием РГПУ-135. Модулирующее влияние нового производного глутаминовой кислоты РГПУ-135 может объяснять его нейропсихотропную активность.

ВЫВОДЫ

1. Новое производное глутаминовой кислоты РГПУ-135 (гидрохлорид 3-фенилглутаминовой кислоты, глутарон, нейроглутамин) проявляет мембранотропную активность при внеклеточном действии.

2. Вещество РГПУ-135 в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мкМ дозозависимо и обратимо модулирует трансмембранные натриевые, калиевые и, в большей степени, кальциевые ионные токи нейронов моллюсков прудовика и катушки: в концентрациях 1–10 мкМ незначительно активирует кальциевые и калиевые токи, 100 мкМ — увеличивает амплитуду кальциевых токов на 5–10 %, 1000 мкМ — подавляет натриевые и калиевые токи на 5–12 %.

3. Вещество РГПУ-135 не влияет на потенциал поверхностного заряда мембраны и воротные механизмы ионных каналов. Эффекты РГПУ-135 быстро обратимы,

что указывает на относительно непрочное связывание со структурами мембраны и ионных каналов.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы “Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу”, утвержденной постановлением Правительства РФ от 17 февраля 2011 г. № 91 (проект “2.1 Нейроглутамин 2011”).

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. Е. Бородкина, В. С. Кудрин, П. М. Клодт, В. Б. Наркевич, И. Н. Тюренков, *Экспер. и клин. фармакол.*, **72**(1), 60–64 (2009).
2. Л. Е. Бородкина, Г. М. Молодавкин, И. Н. Тюренков, *Экспер. и клин. фармакол.*, **72**(1), 57–60 (2009).
3. А. И. Вислобоков, Ю. Д. Игнатов, *Психофармакол. и биол. наркология*, **7**(3–4), 2121–2130 (2007).
4. А. И. Вислобоков, Ю. Д. Игнатов, *Технологии живых систем*, **7**(3), 3–13 (2010).
5. Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **70**(4), 44–58 (2007).
6. О. Ю. Гречко, А. И. Вислобоков, Ю. Д. Игнатов и др., *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, **9**(4), 29–35 (2011).
7. В. В. Епишина, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Волгоград (2006).
8. Ю. Д. Игнатов, А. И. Вислобоков, К. Н. Мельников, *Вестн. РАМН*, **10**, 35–40 (2004).
9. И. П. Кодониди, Э. Т. Оганесян, А. А. Глушко и др., *Хим.-фарм. журн.*, **43**(10), 32–39 (2009).
10. О. В. Меркушенкова, В. В. Епишина, И. Н. Тюренков, Е. С. Остроглядов, *Фундаментальные исследования*, **12**(Ч. 3), 523–524 (2007).
11. О. В. Меркушенкова, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Волгоград (2009).
12. С. Б. Середенин, Ю. Д. Игнатов, А. И. Вислобоков, К. Н. Мельников, *Психофармакол. и биол. наркология*, **5**(4), 1061–1070 (2005).
13. И. Н. Тюренков, М. Н. Багметов, В. В. Епишина, Л. Е. Бородкина, А. В. Воронков, *Экспер. и клин. фармакол.*, **69**(3), 19–22 (2006).
14. И. Б. Цорин, И. П. Палка, Г. Г. Чичканов, *Экспер. и клин. фармакол.*, **72**(1), 41–45 (2009).
15. E. I. Solntseva, J. V. Bukanova, R. U. Ostrovskaya, et al., *Gen. Pharmacol.*, **29**(1), 85–89 (1997).

Поступила 31.05.12

THE NEW GLUTAMIC ACID DERIVATIVE RGPU-135 (GLUTARON, NEUROGLUTAMIN) MODULATES ION CURRENTS IN MOLLUSK NEURONS

Yu. D. Ignatov¹, A. I. Vislobokov¹, I. N. Tyurenkov², and V. V. Bagmetova²

¹ St. Petersburg Pavlov State Medical University, ul. L'va Tolstogo 6/8, St. Petersburg, 197022, Russia;

² Volgograd State Medical University, pl. Pavshikh Bortsov la, Volgograd, 400131, Russia;

The new glutamic acid derivative RGPU-135 (3-phenylglutamic acid hydrochloride, glutaron, neuroglutamin) produces dose-dependent and reversible modulation of transmembrane sodium, potassium and, to a greater extent, calcium ion currents in neurons of *Lymnaea stagnalis* and *Planorbarius corneus* mollusks at concentrations of 1, 10, 100, and 1000 μM. At concentrations within 1–10 μM micromole, Ca and K currents are activated rather insignificantly; at 100 μmole, the amplitude of calcium currents is increased by 5–10%; and at 1000 μM, the Na and K ion currents are suppressed by 5–12%. RGPU-135 does not influence the membrane surface charge potential and the gating of ion channels. The effects of RGPU-135 were quickly reversible, which indicated the relatively weak drug binding to the membrane structures and ion channels.

Key words: Glutamic acid derivatives; 3-phenylglutamic acid hydrochloride (RGPU-135, glutaron, neuroglutamin); membranotropic effect; neurons; sodium-; potassium-; and calcium-ion currents