

**Д.И. Осолодкин:** В своей работе вы приводите результаты молекулярного докинга синтезированных вами соединений. Не могли бы вы уточнить следующие детали:

Какие методы были использованы для молекулярного докинга?

**А.А. Назарова:** Моим соавтором Дмитрием Карловым ранее были проанализированы имеющиеся литературные данные о соединениях, проявляющих свойства положительных аллостерических модуляторов AMPA-рецептора, оценены необходимые для лучшего связывания структурные фрагменты, выбраны лиганды для построения фармакофора. На основе этих исследований мы предположили, что бис(тетрагидрохиназолины) структурно близки к некоторым известным положительным модуляторам и являются перспективными для изучения их влияния на рецептор. Прогностические модели были построены с помощью подходов 3D-QSAR и MM-PBSA. Модель рецептора GluA2 была подготовлена на основе известной рентгеновской структуры (код PDB 3RNN7).

**Д.И. Осолодкин:** Какова была цель молекулярного докинга -- генерация идей о способах связывания, количественный анализ либо что-то ещё?

**А.А. Назарова:** Если я правильно поняла вопрос, то в первую очередь количественный анализ. Цель молекулярного докинга состояла в прогнозе активности, проводился вычислительный дизайн для бис(тетрагидрохиназолинов) с различными ароматическими и алифатическими линкерами, получилось так, что одним из лучших линкеров был гидрохиноновый фрагмент. Оценка проводилась по результатам моделирования молекулярной динамики и расчетам энтальпии связывания методом MMPBSA для полученных в результате докинга поз. Также неплохо смотрелся этиленгликолевый и пропиленгликолевый линкеры (синтез и исследование таких соединений планируется в дальнейшем). Этилендиамин смотрелся хуже. Но докинг показал также, что в зависимости от заместителей в положении 2 гетероцикла соединения 7a-e по-разному располагаются в рецепторе.

**Д.И. Осолодкин:** Есть ли какие-то количественные соответствия между результатами молекулярного докинга и наблюдаемыми биологическими эффектами?

**А.А. Назарова:** Опытные данные по активности нашей серии соединений не позволили проследить чёткую зависимость структура-активность, как мы ожидали. Для построения достоверных количественных соотношений необходима большая выборка данных. Для биспиримидинов с ароматическим линкером результаты докинга качественно соотносятся с наблюдаемой активностью (слайд 8). У метильного производного (7a) наблюдается заполнение кармана связывания объёмным гидрофобным циклогексановым фрагментом, а метильный заместитель отвечает за минимизацию объёма гидрофобных группировок в растворителе (внутридоменном пространстве), это ведёт к улучшению связывания, а, следовательно, и активности. Соединение 7d с объёмным трет-бутильным заместителем во втором положении докируется иначе - циклогексановый фрагмент находится во внутридоменном пространстве, а карман остаётся незаполненным, что ведёт к уменьшению активности.

**Д.И. Осолодкин:** Некоторые соединения являются положительными модуляторами рецептора, а некоторые -- отрицательными. Каков биологический эффект каждого из этих направлений модуляции? Почему для одного набора соединений проводятся эксперименты с каинат-индуцированными токами, а для другого -- просто с мембранной проводимостью? В чём отличия экспериментов? Что показывает каждый из этих экспериментов?

**А.А. Назарова:** Аллостерические модуляторы, связываясь с определённым участком рецептора, вызывают его конформационные изменения и таким образом влияют на связывание субстрата в активном центре рецептора. В нашем случае эндогенным лигандом (субстратом) AMPA рецептора является глутамат - возбуждающий нейромедиатор, участвующий в передаче нервных импульсов между нейронами, так же он участвует в процессах обучения, формирования памяти. При взаимодействии глутамата с рецептором происходит раскрытие ионного канала, пропускающего ионы натрия внутрь клетки, деполяризация клеточной мембраны и передача сигнала. Действие положительных аллостерических модуляторов (ПAM) AMPA рецептора увеличивает проводимость ионного канала и время его пребывания в открытом состоянии. Действие ПAM AMPA ведёт к

улучшению памяти и когнитивных способностей, увеличению экспрессии факторов роста нервной ткани, они могут быть использованы для лечения нейродегенеративных заболеваний. Отрицательные модуляторы в свою очередь препятствуют активации рецептора, то есть действуют как антагонисты, блокируют таким образом передачу сигнала между нейронами, и могут быть использованы, как противосудорожные средства для лечения эпилепсии.

Что касается биологических испытаний, то для всех соединений были проведены электрофизиологические испытания методом patch-clamp (метод локальной фиксации потенциала). Так как AMPA-рецептор представляет из себя ионный канал, этот метод позволяет измерять проводимость содержащего рецептор фрагмента мембраны при внешних химических воздействиях. Трансмембранные токи в выделенных нейронах индуцировались активацией AMPA-рецептора каиновой кислотой, которая является агонистом этих рецепторов наряду с глутаматом и AMPA. Поскольку AMPA сама по себе вызывает сильную десенсibilизацию рецептора, в экспериментах используется именно каиновая кислота. Производилось измерение трансмембранного тока в присутствии раствора агониста. Затем фрагмент мембраны помещался в раствор исследуемого соединения определённой концентрации. Это влекло либо усиление (положительная модуляция), либо уменьшение (блокирующее действие - отрицательная модуляция) трансмембранных токов, либо ток оставался неизменным (неактивное соединение).