

В.Б. Сулимов: С1: (1) Какой смысл Вы вкладываете в понятие "Аллостерические модуляторы"? Положительные? Значит есть и отрицательные? (2) Как эта аллостеричность проявляется в случае рассматриваемых Вами рецепторов?

А.А. Назарова: 1-2. 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 от нейрона к нейрону. С точки зрения молекулярной фармакологии действие ПАМ проявляется за счет замедления процесса деактивации (диссоциации лиганд-рецепторного комплекса) и предотвращения десенситизации (изменения конформации лиганд-рецепторного комплекса, при котором агонист оказывается связанным, а ионный ток протекать не может). Действие ПАМ AMPA-ведёт к улучшению памяти и когнитивных способностей, увеличению экспрессии факторов роста нервной ткани, они могут быть использованы для лечения нейродегенеративных заболеваний. Таковыми, как показали биологические испытания *in vitro*, являются соединения 7a,b,d (слайд 8). 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. Отрицательными модуляторами являются соединения 4a,b (слайд 6) и 7c (слайд 8).

В.Б. Сулимов: С3, С8: Какой программой осуществлялся докинг и зачем? Какое силовое поле использовалось и как учитывалось влияние растворителя?

А.А. Назарова: С3, С8: Докинг осуществлялся в программе AutoDock Vina 1.1.2, модель рецептора GluA2 была подготовлена на основе известной рентгеновской структуры (код PDB 3RNN7). В нашем случае докинг использовался скорее для прогнозирования активности бис(тетрагидрохиназолинов). Насчёт силового поля и влияния растворителя я, с Вашего позволения, уточню подробнее у соавтора и напишу отдельным письмом. Так как моя часть работы состояла в синтезе целевых соединений и их предшественников, в том, что касалось молекулярного моделирования, могу ошибиться.

В.Б. Сулимов: С6: На каких принципах построена тестовая система для определения биологической активности?

А.А. Назарова: С6: 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. Транс-мембранные 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 десенситизацию рецептора, в экспериментах используется именно каиновая кислота. Производилось измерение трансмембранного тока в присутствии раствора агониста (каиновой кислоты). Затем фрагмент мембраны помещался в раствор исследуемого соединения определённой концентрации. Это влекло либо усиление (положительная модуляция), либо уменьшение (блокирующее действие - отрицательная

модуляция) транс-мембранных токов, либо ток оставался неизменным (неактивное соединение).

В.Б. Сулимов: С9: Непонятно что и как измерялось на мышах?

А.А. Назарова: С9: Данная работа ещё не доведена до стадии испытаний *in vivo*, картинка на слайде 9 могла ввести в недоумение, но ей я хотела просто проиллюстрировать общее действие положительных аллостерических модуляторов AMPA-рецептора – способность выступать в качестве нейропротекторных и ноотропных средств, улучшающих когнитивные функции. В дальнейшем планируются поведенческие эксперименты на мышах.

В.Б. Сулимов: С10: "показана их способность увеличивать каинат-индуцированные транс-мембранные токи в субнанолярных концентрациях". Что это означает? И зачем это нужно?

А.А. Назарова: С10: Данная фраза – вывод, сделанный на основе результатов биологических исследований *in vitro* методом patch-clamp. Принцип метода описан в ответе на предыдущий вопрос. Увеличение транс-мембранных токов – признак того, что вещество проявляет именно положительный модулирующий эффект по отношению к AMPA-рецептору. То, что такой эффект проявляется в концентрации меньше 1нМ, считается очень хорошим результатом, показывает высокую активность соединения в низких концентрациях.

Привожу ссылки на опубликованные работы, на основе которых была подготовлена данная презентация:

- 1) <http://dx.doi.org/10.1016/j.mencom.2018.07.028>
- 2) <http://dx.doi.org/10.1039/C9MD00262F>