

РОЛЬ КАЛЬЦИЙ-ЗАВИСИМОЙ ДЕСЕНСИТИЗАЦИИ В ПОТЕНЦИАЦИИ GNE-9278 ТОКОВ NMDA РЕЦЕПТОРОВ НЕЙРОНОВ КОРЫ КРЫС *IN VITRO*

© 2024 г. А. И. Федорина, С. М. Антонов, Д. А. Сибаров*

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

*e-mail: dsibarov@gmail.com

Поступила в редакцию 30.07.2024 г.

После доработки 30.08.2024 г.

Принята к публикации 02.09.2024 г.

Для компенсации недостатка функций NMDA рецепторов в ЦНС на фоне деменций большой интерес представляют положительные аллостерические модуляторы (ПАМ). Известные ПАМ увеличивают амплитуду интегральных ионных токов, переносимых NMDA рецепторами, однако не влияют на кальций-кальмодулин зависимую десенситизацию последних. Мы изучили возможность модуляции десенситизации NMDA рецепторов недавно синтезированным ПАМ GNE-9278, имеющим уникальный сайт связывания на трансмембранном домене. Эксперименты проводили на нативных NMDA рецепторах, экспрессированных в нейронах неокортекса крысы в первичной культуре ткани. Методом “patch-clamp” регистрации трансмембранных токов проведено сравнительное изучение влияния на десенситизацию NMDA рецепторов трех веществ, потенцирующих токи NMDA рецепторов: GNE-9278 (10 мкМ), дитиотреитола (1 мМ) и ионов меди (5 мкМ). Эти вещества увеличивали амплитуду токов, вызванных 100 мкМ NMDA, однако только GNE-9278 уменьшал разницу между равновесной и пиковой амплитудами токов на 15%. Кроме того, GNE-9278 вдвое увеличивал постоянную времени спада от пика к равновесному состоянию, т.е. ослаблял десенситизацию NMDA рецепторов. Поскольку GNE-9278 не изменял эффективную концентрацию внеклеточного кальция для генерации десенситизации, его эффект вероятно не мешает взаимодействию рецептора с кальмодулином. Анализ формы токов в рамках кинетической модели показал, что GNE-9278 уменьшает два кинетических параметра: скорость закрывания канала, определяющую время открытого состояния, а также скорости входа в и выхода рецептора из десенситизированного состояния, определяющие вероятность открытого состояния канала. Модуляция кальций-зависимой десенситизации NMDA рецепторов выделяет GNE-9278 среди других известных ПАМ, что вероятно определяется сайтом связывания GNE-9278 в сегменте пре-M1 GluN1 субъединицы.

Ключевые слова: ионные каналы, кальций, NMDA, десенситизация, GNE-9278

DOI: 10.31857/S0044452924050091, **EDN:** XOTJLT

ВВЕДЕНИЕ

NMDA (N-метил-D-аспартат) рецепторы принадлежат к одному из подтипов ионотропных рецепторов глутамата, выполняющих функции возбуждающей синаптической передачи в ЦНС млекопитающих. При активации через ионные каналы этих рецепторов в клетку наряду с ионами натрия входит кальций, что играет ключевую роль в механизмах синаптической пластичности. При этом NMDA рецепторы подвержены кальций-кальмодулин-зависимой десенситизации (КЗД), проявляющейся в постепенном уменьшении интегрального трансмембранного тока через каналы при постоянном действии агониста. Существует также глицин-зависимая десенситизация NMDA рецепторов, наблюдаемая при дефиците ко-агониста глу-

тамата глицина [см. обзор 1]. Однако, при насыщающих сайт связывания концентрациях глицина, ее эффект (вклад в падение амплитуды токов в экспериментальных условиях) многократно слабее, чем для КЗД. Поэтому при дальнейшем изложении под десенситизацией рецепторов мы будем подразумевать именно кальций-зависимый процесс десенситизации. Этот механизм ограничивает избыточное поступление ионов в нейроны, ограничивая нейротоксический эффект избыточной активации. КЗД возникает в результате связывания комплекса кальций-кальмодулин (CaCam) с внутриклеточным доменом GluN1 субъединицы рецептора [2], а её выраженность прямо пропорциональна входу ионов кальция через каналы активированных рецепторов и накоплению внутриклеточного кальция.

КЗД может модулироваться внешними факторами, влияющими на концентрацию свободного кальция в примембранной области цитоплазмы за счет буферизации, диффузии и локального транспорта соседними с рецептором белками [см. обзор 3]. В частности, натрий-кальциевый обменник модулирует КЗД за счет удаления кальция из примембранной области цитоплазмы [4, 5]. На процесс КЗД также влияют другие белки ассоциирующие кальмодулин [6]. К структурным детерминантам, влияющим на кинетику КЗД можно отнести мутации N-терминального домена GluN1 субъединицы [7], и разницу в субъединичном составе рецепторов [8].

Для компенсации дефицита функций NMDA рецепторов на фоне деменций большой интерес представляют положительные аллостерические модуляторы (ПАМ) [9]. Хорошо изучена положительная аллостерическая модуляция полиаминами [10, см. обзор 11] и нейростероидами [12, 13], которые являются эндогенными факторами, регулирующими синаптическую передачу. Токи, опосредуемые активацией NMDA рецепторов, возрастают в результате фосфорилирования [14, 15]. Потенцирование токов NMDA рецепторов происходит также при действии сероводорода, дитиотреитола (DTT) и ионов меди — редокс агентов, вызывающих химическое восстановление дисульфидных связей, что вызывает разрыв последних [16 — 19].

Несмотря на то, что известные ПАМ увеличивают токи через NMDA рецепторы, среди них обнаружено только одно вещество, потенцирующий эффект которого на токи связан с ослаблением КЗД [20]. Для остальных веществ, вызывающих потенцирование токов NMDA рецепторов такой эффект не выявлен. В частности, КЗД не ослабляется при действии таких редокс агентов, как дитиотреитол [19], сероводород [21], глутатион [16]. Причем два последних являются эндогенными модуляторами функций NMDA рецепторов [16, 22, 23]. Хотя действие редокс агентов неспецифично в отношении NMDA рецепторов, они проявляют свойства ПАМ последних, что имеет существенное физиологическое значение.

Известно, что большинство ПАМ действуют на лиганд-связывающий домен или другие структурные элементы NMDA рецепторов, не участвующие в КЗД. Например, прегненолон-сульфат [24] вызывает увеличение токов NMDA рецепторов, связываясь в области трансмембранного домена, и не ослабляет КЗД. Для многих других ПАМ этот аспект влияния на токи NMDA рецепторов не изучался.

Недавно синтезирован новый ПАМ GNE-9278 с уникальным сайтом связывания на внеклеточной поверхности трансмембранного домена NMDA рецептора [25]. Он не является специфичным в отношении определенного субъединичного состава

NMDA рецепторов. Структурные детерминанты (T550 и D552) на сегменте пре-M1 GluN1 субъединицы вероятно определяют связывание GNE-9278 [25], причем именно этот сегмент претерпевает существенные конформационные изменения в присутствии CaCam [26]. Это заставляет предполагать возможное влияние GNE-9278 на процесс КЗД.

Поскольку в настоящее время известен только один низкомолекулярный фармакологический агент, ослабляющий КЗД NMDA рецепторов [20], было решено исследовать, может ли и GNE-9278 влиять на этот процесс. Эксперименты проводили на нативных NMDA рецепторах, экспрессированных в нейронах коры головного мозга, и содержащих наряду с GluN1 только GluN2A и GluN2B субъединицы [27, 28]. Такой субъединичный состав определяет выраженную подверженность этих рецепторов КЗД [8]. На нейронах в первичной культуре коры большого мозга крыс мы провели сравнительное изучение влияния на КЗД NMDA рецепторов трех ПАМ: GNE-9278, дитиотреитола и ионов меди.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на первичной культуре нейронов коры большого мозга, полученного из эмбрионов крыс линии Вистар. Методика приготовления первичной культуры ткани нейронов коры мозга крыс детально была описана ранее [23]. На 16–17 дни пренатального развития (E16–E17) выделяли ткань неокортекса и культивировали при 37°C и 5% CO₂ в нейробазальной питательной среде (ПанЭко, Россия) с ростовой добавкой В-27 (ПанЭко, Россия) на покровных стеклах, покрытых поли-D-лизинном. Эксперименты на нейронах проводили на 10–14 дни культивирования.

В опытах применяли внеклеточный раствор следующего состава (мМ): NaCl 144, KCl 2.8, HEPES 10, (pH 7.2–7.4, доводили NaOH), осмолярность 310 мОсм. Если не указано иное, то концентрация CaCl₂ в базовом растворе составляла 1 мМ. Трансмембранные токи нейронов регистрировали методом “patch-clamp” в конфигурации целой клетки с использованием усилителя Multiclamp 700B (Molecular Devices, США) с включенным фильтром нижних частот 400 Гц и оцифровкой со скоростью сбора данных 20 тысяч измерений в секунду с использованием АЦП Digidata 1440A (Molecular Devices, США) и программного обеспечения pClamp v10.6 (Molecular Devices). Замену раствора осуществляли с помощью быстрой перфузионной системы, как описано ранее [4]. Внутриклеточный пипеточный раствор содержал (в мМ): 120 CsF, 10 CsCl, 10 EGTA и 10 HEPES, осмолярность 300 мОсм, pH доводили до 7.4 с помощью CsOH. Пипетки с сопротивлением 4–6 МОм

изготавливали из капилляров из боросиликатного стекла RWD B-15086-10F (Китай). Эксперименты проводили при комнатной температуре (22–25 °C). Мембранный потенциал фиксации устанавливали на –70 мВ. Данные представлены без поправок на величину жидкостного потенциала, который в наших экспериментах составлял –11 мВ. Токи NMDA рецепторов вызывали аппликацией 100 мкМ NMDA совместно с 30 мкМ глицина в качестве ко-агониста. Вещества NMDA (M3262), глицин (G7126) и дитиотреитол, DTT (D0632) приобретены в Sigma-Aldrich, США. GNE-9278 (кат. 6369) в Tocris Inc., США.

Для определения эффективной концентрации наружного кальция ($EC_{50}[Ca^{2+}]$), необходимой для развития процесса десенситизации NMDA рецепторов, измеряли соотношения равновесных токов рецептора (I_{ss}) к пиковым значениям (I_{ss}/I_{peak}) при различных концентрациях внеклеточного кальция ($[Ca^{2+}]$). Полученные данные аппроксимировали уравнением Хилла: $I_{ss}/I_{peak} = 1 + (m - 1) * [Ca^{2+}]^h / (EC_{50}^h + [Ca^{2+}]^h)$, где h – коэффициент Хилла, m – минимальная величина соотношения плато/пик.

Для подбора кинетических констант скоростей активации, деактивации, а также входа и выхода рецептора из десенситизации использовали макроскопический анализ токов в программе ChanneLab (Synaptosoft). В качестве базовой модели использовали набор констант, опубликованный для нативных NMDA рецепторов постоянно связанных с глицином [30]. Симуляцию токов на основании полученных констант выполняли в той же программе.

Данные показаны как репрезентативные записи и средние значения $\pm$ стандартная ошибка среднего, (n) относится к количеству исследованных нейронов. Пары данных сравнивались с использованием непарного двустороннего t-критерия Стьюдента. Несколько групп сравнивали с использованием однофакторного дисперсионного анализа с последующим применением критерия Тьюки. Статистическая значимость представлена на рисунках в соответствии со следующими символами * и ***, которые обозначают значения доверительной вероятности p менее 0.05 и 0.001, соответственно. Кроме того, указаны значения p для каждого сравнения. Аппроксимацию кривой проводили с использованием программного обеспечения OriginPro (OriginLab Corp.). Значения EC_{50} , полученные в результате отдельных экспериментов, проведенных в одних и тех же экспериментальных условиях, усредняли для получения средних значений $\pm$ стандартная ошибка.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изменение соотношения равновесного тока к пиковому при действии ПАМ

Для проверки предположения, что ПАМ могут влиять на процесс КЗД NMDA рецепторов, на каждом исследованном нейроне мы анализировали форму токового ответа нейронов на аппликацию 100 мкМ NMDA (+30 мкМ глицина) (рис 1a) в контроле, а затем на фоне действия одного из трех

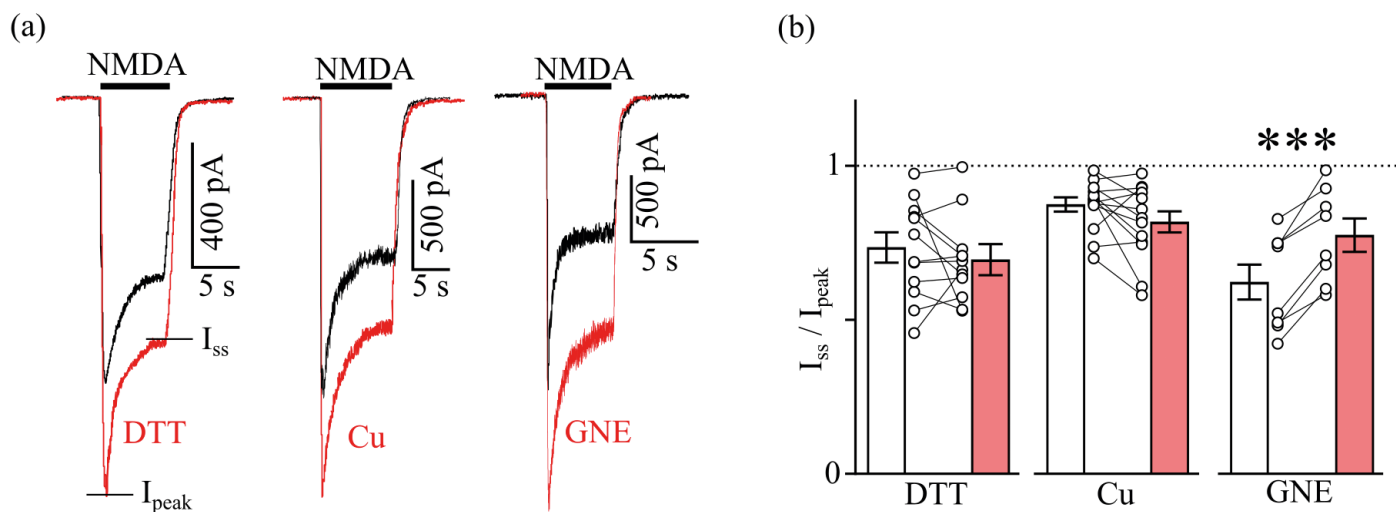


Рис. 1. Влияние положительных аллостерических модуляторов на степень кальций-зависимой десенситизации NMDA рецепторов. (a) – Примеры токов NMDA рецепторов, зарегистрированных в конфигурации целой клетки на нейронах при аппликации 100 мкМ NMDA в присутствии 30 мкМ глицина. $V_m = -70$ мВ при постоянной концентрации внеклеточного кальция 1 мМ. Черные кривые – токи в контроле. Красные кривые – на фоне действия дитиотреитола (DTT, 1 мМ), $CuSO_4$ (Cu, 5 мкМ) или GNE-9278 (GNE, 10 мкМ). Степень десенситизации оценивали по отношению амплитуд равновесного тока к пиковому (I_{ss}/I_{peak}). (b) – Средние значения отношения I_{ss}/I_{peak} в контроле (белые столбики) и на фоне действия аллостерических модуляторов (красные столбики). Кружки показывают результаты измерений в отдельных нейронах: DTT ($n = 14$), Cu ($n = 12$), GNE ($n = 8$). *** – отличие от контроля в присутствии GNE, $p = 0.0002$, парный t-критерий Стьюдента.

ПАМ. Опыты проводили в присутствии 1 мМ внеклеточного кальция. GNE-9278 (10 мкМ) и CuSO_4 (5 мкМ) апплицировали совместно с NMDA. Используемая концентрация ионов меди соответствовала максимальному потенцирующему эффекту на NMDA рецепторы, поскольку более высокие концентрации могут напротив вызывать ингибирование [18]. DTT (1 мМ) добавляли во внеклеточный раствор на 90 сек, отмывали 30 сек внеклеточным раствором, после чего апплицировали NMDA. Такой протокол воздействия DTT был разработан ранее [16] и позволяет модифицировать только наиболее доступные дисульфидные связи во внеклеточном домене рецептора, к которым относится связь C744–798, разрыв которой и вызывает потенцирующий эффект [31].

Соотношение амплитуд равновесного тока к пиковому (I_{ss} / I_{peak}) не изменялось на фоне действия DTT или ионов меди (рис. 1b). Однако добавление 10 мкМ GNE-9278 увеличивало это соотношение с 0.62 ± 0.06 в контроле до 0.77 ± 0.05 на фоне GNE-9278. Таким образом, в отличие от DTT и ионов меди, действующих на редокс сайты во внеклеточном домене рецептора, GNE-9278, связывающийся с трансмембранным доменом, ослаблял кальций-зависимую десенситизацию NMDA рецепторов.

Возрастание интегрального тока через NMDA рецепторы на фоне действия ПАМ гипотетически

могло бы влиять на выраженность КЗД за счет изменившегося входа кальция. В связи с этим, изучали возможную связь между эффективностью потенцирования пикового тока изучаемыми ПАМ и их влиянием на КЗД (рис. 2). Все три ПАМ ожидаемо достоверно увеличивали величину пикового тока в среднем на 16% для GNE-9278 и ионов меди (рис. 2a, b), и на 32% для DTT (рис. 2b). Поскольку при одинаковой выраженности потенцирования пикового ответа ионами меди и GNE-9278 только последний вызывал ослабление кальций-зависимой десенситизации, можно предположить, что эффективность потенцирования не связана с влиянием на КЗД. Кроме того, изменение концентрации внеклеточного кальция также не влияло на возрастание пиковой амплитуды токов при действии ПАМ.

Зависимость эффектов GNE-9278 от внеклеточного кальция

Эффективная концентрация внеклеточного кальция, необходимая для проявления КЗД NMDA рецепторов ($EC_{50}[\text{Ca}^{2+}]$), зависит от входа Ca^{2+} через рецептор, его буферизации, связывания с кальмодулином (Cam) и взаимодействия CaCam с внутриклеточным доменом рецептора. Мы предположили, что GNE-9278 мог бы влиять на процесс взаимодействия рецептора с CaCam. В этом случае

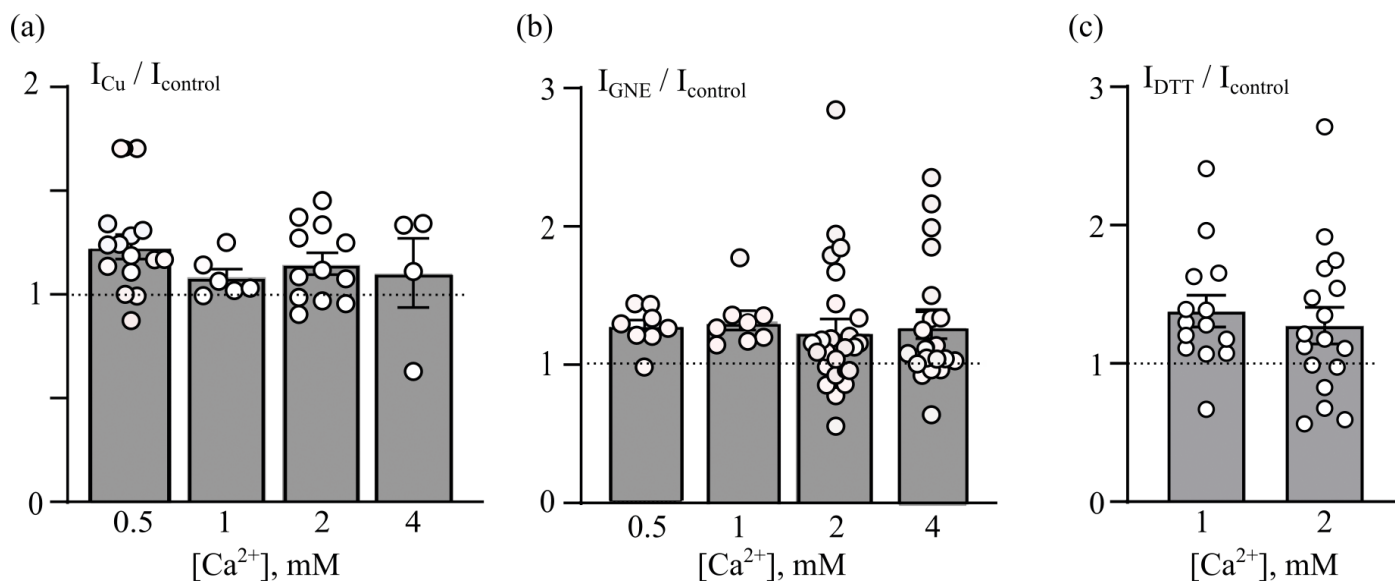


Рис. 2. Эффект положительных аллостерических модуляторов на пиковый ток, вызываемый аппликацией 100 мкМ NMDA в присутствии 30 мкМ глицина при различных экспериментальных условиях.

(a) — Отношение пикового в присутствии 5 мкМ CuSO_4 (Cu) к пиковому току в контроле. (b) — Отношение пикового тока в присутствии 10 мкМ GNE-9278 (GNE) к пиковому току в контроле. (c) — Отношение пикового тока после 90 сек обработки 1 мМ дитиотреитолом (DTT) к пиковому току в контроле. Круги показывают результаты измерений в отдельных нейронах. Во всех экспериментальных условиях наблюдали достоверное увеличение амплитуды пикового тока относительно контрольного на фоне модуляторов ($p < 0.05$, парный t-критерий Стьюдента). Потенцирование тока достоверно не изменяется в зависимости от типа использованного ПАМ, а также от концентрации внеклеточного кальция (ANOVA).

величина $EC_{50}[Ca^{2+}]$ изменялась бы под действием GNE-9278.

Для определения $EC_{50}[Ca^{2+}]$ в контроле и в присутствии 10 мкМ GNE-9278 нами были построены концентрационные кривые зависимости соотношения I_{ss}/I_{peak} от концентрации внеклеточного кальция в диапазоне от 0.5 до 4 мМ $[Ca^{2+}]$ (рис. 3а). В случае, если GNE-9278 влияет на десенситизацию путем изменения $EC_{50}[Ca^{2+}]$ наблюдался бы сдвиг кривой вправо в сторону больших $[Ca^{2+}]$ в присутствии GNE-9278. Однако, $EC_{50}[Ca^{2+}]$ в контроле (1.79 ± 0.20 мМ) достоверно не возрастала в присутствии GNE-9278 (1.7 ± 0.2 мМ). Таким образом, действие GNE-9278 вероятно связано только с изменением кинетики десенситизации самого рецептора, но не с его взаимодействием с CaCam.

Влияние GNE-9278 на постоянную времени КЗД

Оценка кинетики развития процесса кальций-зависимой десенситизации NMDA рецепторов возможна путем одноэкспоненциальной аппроксимации спада тока от пика к плато. Мы измерили постоянную времени (τ) спада тока в контроле и на фоне действия GNE-9278 при различных концентрациях внеклеточного кальция (рис 3б). В диапазоне концентраций Ca^{2+} от 0.5 до 2 мМ GNE-9278 вызывал достоверное увеличение τ приблизи-

тельно вдвое, что говорит о 2-кратном замедлении процесса десенситизации.

Таким образом, в отличие от DTT и ионов меди, GNE-9278 ослабляет кальций-зависимую десенситизацию NMDA рецепторов, что проявляется в уменьшении разницы между пиковым и равновесным током и замедлении КЗД, но не за счет влияния на эффективную концентрацию кальция, необходимую для развития десенситизации.

Моделирование токовых ответов NMDA рецепторов

Наблюдаемые изменения в кинетике интегрального тока, опосредуемого активацией NMDA рецепторов, при действии GNE-9278 могут быть проанализированы с использованием простой кинетической модели, которая описывает набор последовательных состояний рецептора от связывания лиганда до открытого состояния через константы скорости перехода между этими состояниями [25] (рис. 4а). Такая модель позволяет выполнить симуляцию интегральной формы тока через каналы множества рецепторов в ответ на аппликацию агониста. При симуляции мы подразумеваем, что оба коагониста – NMDA и глицин используются в насыщающих концентрациях, причем глицин постоянно присутствует в растворе. В таких усло-

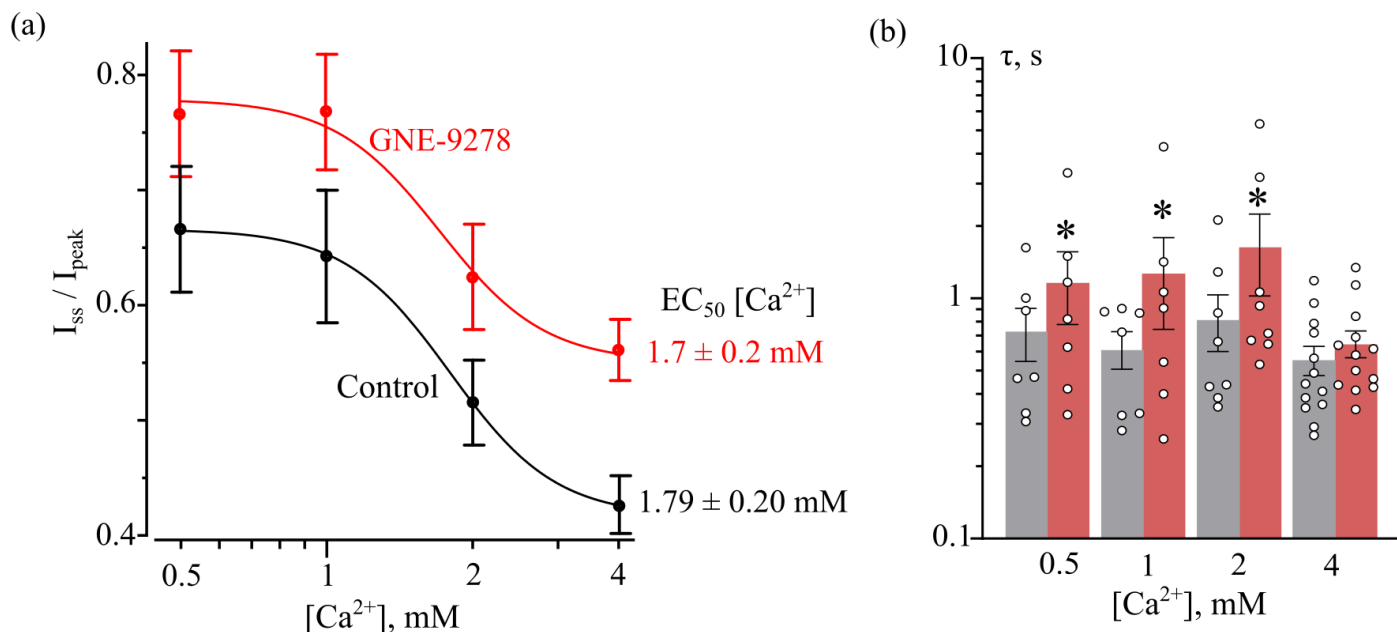


Рис. 3. Количественная зависимость влияния GNE-9278 на выраженность кальций-зависимой десенситизации NMDA рецепторов от концентрации внеклеточного кальция.

(а) – Зависимость соотношения плато/пик (I_{ss}/I_{peak}) от концентрации внеклеточного кальция. Кружки показывают средние значения по результатам 8–14 опытов. Аппроксимация при помощи уравнения Хилла (кривые) позволила определить эффективные концентрации кальция (EC_{50}), необходимые для развития кальций-зависимой десенситизации в контроле (черный) и на фоне 10 мкМ GNE-9278. (б) – Постоянная времени спада тока от пика к равновесному состоянию при различных концентрациях внеклеточного кальция. Серые столбцы – контроль. Красные – на фоне 10 мкМ GNE-9278. Кружки показывают результаты измерений в отдельных нейронах. * – достоверные отличия от контроля, $p < 0.05$, парный t-критерий Стьюдента.

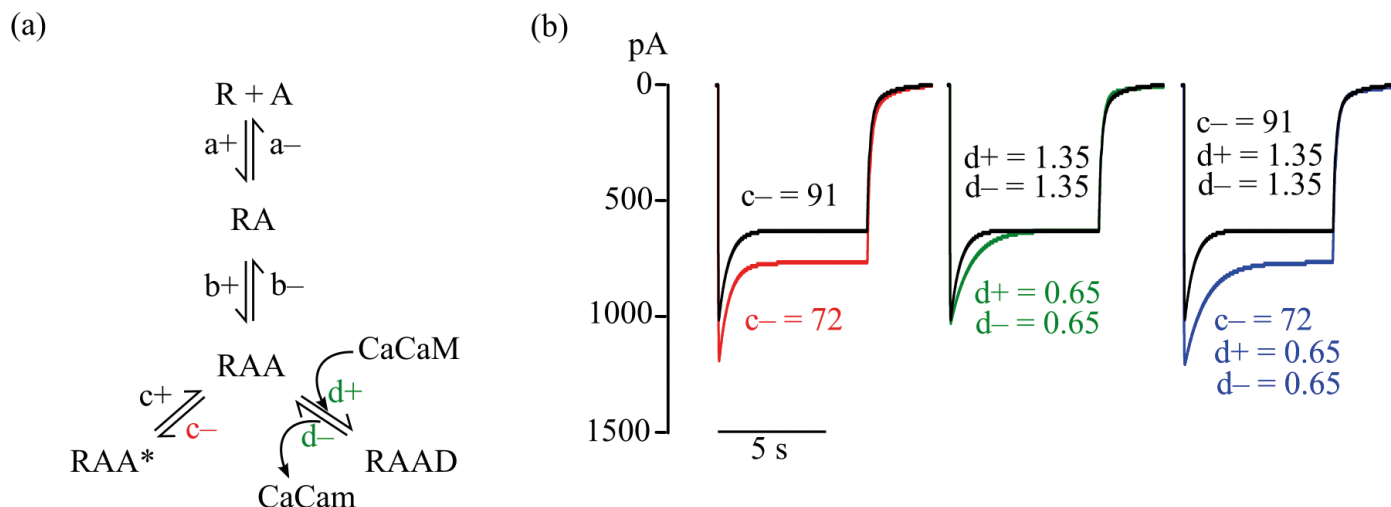


Рис. 4. Анализ возможного механизма действия GNE-9278 в рамках кинетической модели NMDA рецептора.

(a) — Математическая модель [25] использованная для симуляции и описывающая скорости перехода NMDA рецептора между состояниями: R + A — рецептор не связанный с агонистом, RA — связывание первой молекулы NMDA, RAA — связывание двух молекул NMDA, RAA* — лигандированный рецептор с открытым ионным каналом, RAAD — десенситизированный рецептор, ассоциированный с комплексом Ca^{2+} -кальмодулин (CaCaM). a, b, c и d — прямые (+) и обратные (-) скорости переходов между состояниями в s^{-1} (величины приведены в таблице 1). В модели подразумевается постоянное оккупирование GluN1 субъединицы глицином, поэтому связывание рецептора с глицином не показано. (b) — Симуляция формы токовых ответов NMDA рецепторов на 7-секундные аппликации NMDA с параметрами, наиболее соответствующими экспериментальным значениям при концентрации внеклеточного Ca^{2+} 1 mM (таблица 1). Черные кривые — Симуляция тока в контроле. Константы d+ и d- изменены, по сравнению с опубликованной моделью чтобы соответствовать нашим экспериментальным данным. Снижение скорости деактивации рецептора (c-) вызывает рост амплитуды тока и изменение соотношения плато-пик — красная кривая. Изменение c- не влияет на постоянную времени КЗД. Одновременное уменьшение скоростей входа (d+) и выхода (d-) рецептора из десенситизации влияет исключительно на постоянную времени десенситизации — зеленая кривая. Синяя кривая — Симуляция тока в присутствии GNE-9278. Сумма обоих эффектов изменения c-, d+ и d- позволяет воспроизвести форму токового ответа, полученного в экспериментах при действии GNE-9278.

виях, даже если ПАМ вызывает снижение константы связывания агониста, это не скажется на амплитуде и форме токов.

В принципе, увеличение токов ионотропных рецепторов может определяться только тремя причинами: увеличением их проводимости, увеличением времени открытого состояния и увеличением вероятности открытого состояния. Последнее может регулироваться за счет изменения КЗД. Наблюдаемые изменения токов NMDA рецепторов при действии GNE-9278 характеризуются тремя параметрами — соотношением равновесного тока к пиковому (I_{ss} / I_{peak}), возрастанием амплитуды пикового тока ($I / I_{control}$) и постоянной времени спада (таблица 1). Для экспериментально полученных данных о форме тока в контроле достаточно подобрать значения констант d+ и d-, определяющих скорости входа в десенситизацию и выхода рецептора из десенситизированного состояния (таблица 1). Значения остальных констант (a+, a-, b+, b-, c+, c-) были взяты из опубликованной ранее модели [30].

Мы предположили, что наблюдаемые эффекты GNE-9278 связаны с влиянием на прямые и/или обратные константы скорости активации рецептора (c+, c-), что может соответствовать изменению времени открытого состояния, и входа в десенси-

тизированное состояние (d+, d-), что может приводить к изменению вероятности открытого состояния. Т.е., неактивный рецептор, связанный с агонистами (RAA), может перейти либо в активированное состояние (RAA*) с открытым ионным каналом, либо в десенситизированное (RAAD) с закрытым каналом (рис 4a).

Наблюдаемое в эксперименте увеличение амплитуды пикового тока и изменение соотношения плато-пик в присутствии GNE-9278 (таблица 1) можно смоделировать, если уменьшить скорость закрывание канала (c-) (рис 4b, красная кривая). Подобная симуляция не оказывает влияние на постоянную времени КЗД. Одновременное уменьшение на половину констант скорости входа в десенситизацию и выхода из десенситизированного состояния (d+ и d-) объясняет 2-кратное замедление КЗД в присутствии GNE-9278 (рис 4b, зеленая линия), но не влияет на соотношение плато-пик. Сумма этих двух эффектов позволяет воспроизвести форму экспериментально полученного тока в присутствии GNE-9278 (рис 4b, синяя линия). Таким образом, GNE-9278 вероятно одновременно замедляет переход рецептора в десенситизированное состояние и выход из него, а также снижает вероятность его деактивации т.е. закрывания канала.

Таблица 1. Кинетические параметры токов NMDA рецепторов

	Экспериментальные значения			Результат подбора параметров							
	τ	Пиковый ток	τ	(c^{-1})							
	I_{ss}/I_{peak}	$I/I_{control}$	мс	a+	a-	b+	b-	c+	c-	d+	d-
Контроль	0.62	1	616	$1 \cdot 10^7$	4.7	$5 \cdot 10^6$	9.4	46.5	91	1.35	1.35
GNE-9278	0.78	1.16	1267	$1 \cdot 10^7$	4.7	$5 \cdot 10^6$	9.4	46.5	72	0.65	0.65

Экспериментальные значения включают выраженность десенситизации (τ), амплитуду пикового тока, нормализованную к контролю и постоянную времени десенситизации (τ).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Поскольку ПАМ вызывают увеличение амплитуды токов, вызываемых NMDA, мы можем ожидать связанный с этим рост входа кальция в нейроны, что, потенциально может оказать влияние на выраженность КЗД. В случае значительной разницы в эффективности ПАМ в отношении потенцирования токов эти вещества теоретически могли бы влиять на КЗД по-разному. Пиковый ток в ответ на аппликацию агониста не подвержен действию КЗД, и может быть использован для измерения эффективности потенцирования тока различными ПАМ. Поэтому мы сравнили степень увеличения пикового тока ионами меди, DTT и GNE-9278, чтобы выявить связан ли эффект этих ПАМ на КЗД со степенью потенцирования токов. Ионы меди и GNE-9278 вызывали одинаковое 16% увеличение амплитуды пиковых токов. Однако эти два ПАМ по-разному влияли на соотношение плато-пик. По-видимому, увеличение амплитуды токов не связано с особенностями действия GNE-9278 на КЗД.

Кроме того, эффективная концентрация внеклеточного кальция, необходимая для возникновения десенситизации NMDA рецепторов, не изменялась в присутствии GNE-9278. Вероятнее всего эффект GNE-9278 на КЗД ограничен влиянием на сам рецептор и не затрагивает кинетику взаимодействия рецептора с CaCam.

Анализ изменения формы токов, активируемых NMDA, показал, что GNE-9278 изменяет два кинетических параметра: снижает скорость закрывания канала ($c-$), что согласуется с предположениями других авторов [25], а также замедляет процессы входа в десенситизацию и выхода рецептора из десенситизированного состояния ($d+$, $d-$). Последнее вероятно связано с уникальным сайтом связывания GNE-9278 во внеклеточной части трансмембранного домена в области pre-M1 GluN1 субъединицы [25], изменения конформации которой происходит в процессе КЗД [26]. Этот сайт не перекрывается с областью связывания нейростероидов [32] и лишь частично совпадает с таковой для CIQ, который потенцирует токи GluN2C и GluN2D содержащих NMDA рецепторов [33]. Однако, токи GluN2C и GluN2D содержащих рецеп-

торов не подвержены КЗД, поэтому эффект CIQ на этот процесс выявить не удалось. В отличие от CIQ, GNE-9278 менее селективен в отношении GluN2 субъединицы NMDA рецепторов и может влиять на токи GluN2A и GluN2B содержащих рецепторов, обладающих выраженной КЗД.

Возможность существования низкомолекулярных соединений, влияющих на КЗД NMDA рецепторов, является интересным с точки зрения поиска безопасных фармакологических препаратов для компенсации дефицита функций NMDA рецепторов на фоне деменций и некоторых других неврологических нейродегенеративных заболеваний. Снижение КЗД NMDA рецепторов увеличивает интегральный вход кальция при синаптической передаче. Это теоретически может увеличивать эффективность формирования феномена долговременной потенциации, связанного с процессами обучения и памяти. В связи с этим нам представляется перспективным дальнейшим изучение этого вопроса.

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея работы и планирование эксперимента (Д.А.С.), сбор данных (А.И.Ф.), обработка данных (А.И.Ф., Д.А.С.), написание и редактирование манускрипта (Д.А.С., С.М.А.).

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при поддержке госзадания ИЭФБ РАН 075-00264-24-00.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все процедуры с использованием животных проводились в соответствии с рекомендациями Федерации ассоциаций по изучению лабораторных животных (FELASA) и одобрены Комитетами по содержанию и использованию животных Института имени И.М. Сеченова (Протокол 1-6/2022 заседания Комитета по биоэтике от 27 января 2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией данной статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hansen KB, Wollmuth LP, Bowie D, Furukawa H, Menniti FS, Sobolevsky AI, Swanson GT, Swanger SA, Greger IH, Nakagawa T, McBain CJ, Jayaraman V, Low CM, Dell'Acqua ML, Diamond JS, Camp CR, Perszyk RE, Yuan H, Traynelis SF (2015) Structure, function, and pharmacology of glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev* 73(4): 298–487. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000131>
2. Ehlers MD, Zhang S, Bernhardt JP, Huganir RL (1996) Inactivation of NMDA receptors by direct interaction of calmodulin with the NR1 subunit. *Cell* 84: 745–755. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81052-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81052-1)
3. Sibarov DA, Antonov SM (2018) Calcium-dependent desensitization of NMDA receptors. *Biochemistry (Moscow)* 83(10): 1173–1183. <https://doi.org/10.1134/S0006297918100036>
4. Sibarov DA, Abushik PA, Poguzhelskaya EE, Bolshakov KV, Antonov SM (2015) Inhibition of plasma membrane Na/Ca-exchanger by KB-R7943 or lithium reveals its role in Ca-dependent N-methyl-D-aspartate receptor inactivation. *J Pharmacol Exp Ther* 355(3): 484–495. <https://doi.org/10.1124/jpet.115.227173>
5. Boikov SI, Karelina TV, Sibarov DA, Antonov SM (2024) Selective inhibitor of sodium-calcium exchanger, SEA0400, affects NMDA receptor currents and abolishes their calcium-dependent block by tricyclic antidepressants. *Front Pharmacol* 15:1432718. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1432718>
6. Rycroft BK, Gibb AJ (2004) Regulation of single NMDA receptor channel activity by alpha-actinin and calmodulin in rat hippocampal granule cells. *J Physiol* 557(3): 795–808. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.059212>
7. Zhang S, Ehlers MD, Bernhardt JP, Su CT, Huganir RL (1998) Calmodulin mediates calcium-dependent inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuron* 21(2): 443–453.
8. Krupp JJ, Vissel B, Heinemann SF, Westbrook GL (1996) Calcium-dependent inactivation of recombinant N-methyl-D-aspartate receptors is NR2 subunit specific. *Mol Pharmacol* 50(6): 1680–1688.
9. Hill MD, Blanco M, Salituro FG, Bai Z, Beckley JT, Ackley MA, Dai J, Doherty JJ, Harrison BL, Hoffmann EC, Kazdoba TM, Lanzetta D, Lewis M, Quirk MC, Robichaud AJ (2022) SAGE-718: A first-in-class N-methyl-D-aspartate receptor positive allosteric modulator for the potential treatment of cognitive impairment. *J Med Chem* 65(13): 9063–9075. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.2c00313>
10. Rock DM, Macdonald RL (1995) Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 35: 463–482. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.35.040195.002335>
11. Skatchkov SN, Antonov SM, Eaton MJ (2016) Glia and glial polyamines. Role in brain function in health and disease. *Biochem (Mosc) Suppl Ser A Membr Cell Biol* 10: 73–98. <https://doi.org/10.1134/S1990747816010116>
12. Bowlby MR (1993) Pregnenolone sulfate potentiation of N-methyl-D-aspartate receptor channels in hippocampal neurons. *Mol Pharmacol* 43: 813e819.
13. Paul SM, Doherty JJ, Robichaud AJ, Belfort GM, Chow BY, Hammond RS, Crawford DC, Linsendardt AJ, Shu HJ, Izumi Y, Mennerick SJ (2013) The major brain cholesterol metabolite 24(S)-hydroxycholesterol is a potent allosteric modulator of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurosci* 33: 17290–17300. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2619-13.2013>
14. Skeberdis VA, Chevalleyre V, Lau CG, Goldberg JH, Pettit DL, Suadicani SO, Lin Y, Bennett MV, Yuste R, Castillo PE, Zukin RS (2006) Protein kinase A regulates calcium permeability of NMDA receptors. *Nat Neurosci* 9(4): 501–510. <https://doi.org/10.1038/nn1664>
15. Jackson MF, Konarski JZ, Weerapura M, Czerwinski W, MacDonald JF (2006) Protein kinase C enhances glycine-insensitive desensitization of NMDA receptors independently of previously identified protein kinase C sites. *J Neurochem* 96(6): 1509–1518. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03651.x>
16. Köhr G, Eckardt S, Lüddens H, Monyer H, Seeburg PH (1994) NMDA receptor channels: Subunit-specific potentiation by reducing agents. *Neuron* 12: 1031–1040. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90311-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90311-5)
17. Abe K, Kimura H (1996) The possible role of hydrogen sulfide as an endogenous neuromodulator. *J Neurosci* 16: 1066–1071. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-03-01066.1996>
18. Marchetti C, Baranowska-Bosiacka I, Gavazzo P (2014) Multiple effects of copper on NMDA receptor currents. *Brain Res* 1542: 20–31. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.10.029>
19. Sibarov DA, Boikov SI, Karelina TV, Antonov SM (2020) GluN2 Subunit-dependent redox modulation of NMDA receptor activation by homocysteine. *Biomolecules* 10: 1441. <https://doi.org/10.3390/biom10101441>
20. Zhang XL, Li YX, Berglund N, Burgdorf JS, Donello JE, Moskal JR, Stanton PK (2024) Zelquistinel acts at an extracellular binding domain to modulate intracellular calcium inactivation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Neuropharmacology* 6; 259:110100. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2024.110100>
21. Yakovlev AV, Kurmasheva E, Ishchenko Y, Giniatullin R, Sitdikova G (2017) Age-dependent, subunit specific action of hydrogen sulfide on GluN1/2A and GluN1/2B NMDA receptors. *Front Cell Neurosci* 11: 375. <https://doi.org/10.3389/FNCEL.2017.00375>
22. Chen CQ, Xin H, Zhu YZ (2007) Hydrogen sulfide: third gaseous transmitter, but with great pharmacological potential. *Acta Pharmacol Sin*. 28(11): 1709–1716. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2007.00629.x>. PMID: 17959020.
23. Varga V, Jenei Z, Jandky R, Saransaari P, Oja SS (1997) Glutathione is an endogenous ligand of rat brain N-methyl-D-aspartate (NMDA) and 2-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate (AMPA) receptors. *Neurochem Res* 22(9): 1165–1171. <https://doi.org/10.1023/a:1027377605054>. PMID: 9251108.

24. Horak M, Vlcek K, Petrovic M, Chodounska H, Vyklicky LJr (2004) Molecular mechanism of pregnenolone sulfate action at NR1/NR2B receptors. *J Neurosci* 24(46): 10318–10325.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2099-04.2004>
25. Wang TM, Brown BM, Deng L, Sellers BD, Lupardus PJ, Wallweber HJA, Gustafson A, Wong E, Volgraf M, Schwarz JB, Hackos DH, Hanson JE (2017) A novel NMDA receptor positive allosteric modulator that acts via the transmembrane domain. *Neuropharmacology*, 121: 204–218.
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2017.04.041>
26. Bhatia NK, Carrillo E, Durham RJ, Berka V, Jayaraman V (2020) Allosteric changes in the NMDA receptor associated with calcium-dependent inactivation. *Biophys J* 119(11): 2349–2359.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2020.08.045>.
27. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron* 12: 529–540.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90210-0](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90210-0)
28. Paoletti P, Bellone C, Zhou Q (2013) NMDA Receptor subunit diversity: impact on receptor properties, synaptic plasticity and disease. *Nat Rev Neurosci* 14: 383–400.
<https://doi.org/10.1038/nrn3504>
29. Mironova EV, Evstratova AA, Antonov SM (2007) A fluorescence vital assay for the recognition and quantification of excitotoxic cell death by necrosis and apoptosis using confocal microscopy on neurons in culture. *J Neurosci Meth* 163(1): 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2007.02.010>
30. Lester RA, Jahr CE (1992) NMDA channel behavior depends on agonist affinity. *J Neurosci* 12(2): 635–643.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.12-02-00635.1992>
31. Sullivan JM, Traynelis SF, Chen HS, Escobar W, Heinemann SF, Lipton SA (1994) Identification of two cysteine residues that are required for redox modulation of the NMDA subtype of glutamate receptor. *Neuron* 13(4): 929–936.
[https://doi.org/10.1016/0896-6273\(94\)90258-5](https://doi.org/10.1016/0896-6273(94)90258-5).
32. Jang MK, Mierke DF, Russek SJ, Farb DH (2004) A steroid modulatory domain on NR2B controls N-methyl-D-aspartate receptor proton sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(21): 8198–8203.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0401838101>
33. Ogden KK, Traynelis SF (2013) Contribution of the M1 transmembrane helix and pre-M1 region to positive allosteric modulation and gating of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol pharmacol* 83(5): 1045–1056.
<https://doi.org/10.1124/mol.113.085209>

THE ROLE OF CALCIUM-DEPENDENT DESENSITIZATION IN THE POTENTIATION BY GNE-9278 OF NMDA RECEPTOR CURRENTS IN RAT CORTAL NEURONS *IN VITRO*

A. I. Fedorina, S. M. Antonov and D. A. Sibarov[#]

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry
of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia*

[#]*e-mail: dsibarov@gmail.com*

To compensate for the lack of functions of NMDA receptors in the central nervous system against the background of dementia, positive allosteric modulators (PAMs) are of great interest. Known PAMs increase the amplitude of integral ion currents carried by NMDA receptors, but do not affect the calcium-calmodulin dependent desensitization of the latter. We studied the possibility of modulating NMDA receptor desensitization by the newly synthesized PAM GNE-9278, which has a unique binding site on the transmembrane domain. Experiments were performed on native NMDA receptors expressed in rat neocortical neurons in primary tissue culture. Using the “patch-clamp” method of recording transmembrane currents, a comparative study of the effect of three substances potentiating NMDA receptor currents on the desensitization of these receptors was carried out: GNE-9278 (10 μ M), dithiothreitol (1 mM) and copper ions (5 μ M). These substances increased the amplitude of currents evoked by 100 μ M NMDA, but only GNE-9278 reduced the difference between steady-state and peak current amplitudes by 15%. In addition, GNE-9278 doubled the decay time constant from peak to steady state, i.e., weakened the desensitization of NMDA receptors. Because GNE-9278 did not alter the effective extracellular calcium concentration to generate desensitization, its effect likely does not affect the receptor's interaction with calmodulin. Analysis of the shape of the currents within the framework of the kinetic model revealed that GNE-9278 reduces two kinetic parameters: the rate of channel closure, which determines the time of the open state, as well as the rates of entry into and exit of the receptor from the desensitized state, which determine the probability of the open state of the channel. Modulation of calcium-dependent NMDA receptor desensitization distinguishes GNE-9278 from other known PAMs, which is likely determined by the binding site of GNE-9278 in the pre-M1 domain of the GluN1 subunit.

Keywords: ion channels, calcium, NMDA, desensitization, GNE-9278