

Действие фармакологических препаратов на синаптическую активность гиппокампа

В.Г. Скребицкий, Н.А. Капай, В.И. Деревягин, Р.В. Кондратенко

Научный центр неврологии РАМН, Москва

Поиск физиологически активных веществ с прокогнитивным действием и изучение механизмов их влияния на мозг являются важнейшими задачами нейробиологии и нейрофармакологии. В статье рассматриваются научно-методические подходы к изучению эффектов лекарственных препаратов, способных улучшить память, на синаптическую активность области СА1 гиппокампа. Особое внимание уделено модуляции длительной потенциации, предварительно нарушенной в результате действия гипоксии или перфузии этанола, пептидными аналогами пирацетама. С помощью метода локальной фиксации мембранного потенциала (patch-clamp) показано, что один из этих пептидов (ноопепт) повышает ингибиторную синаптическую трансмиссию, вероятнее всего, посредством блока калиевых каналов в терминалях тормозных интернейронов.

Ключевые слова: гиппокамп, длительная потенциация, синаптическая активность, нейропептиды, ноопепт, метод patch-clamp, ионные токи.

Гиппокамп как тест-система

Многочисленными работами показано, что у высших животных гиппокамп является структурой, играющей существенную роль в организации когнитивных и эмоциональных процессов, таких как память, ориентация в пространстве, тревога и др. Показано также, что гиппокамп имеет низкий порог генерации эпилептической активности и за счет этого участвует в различных формах церебральной патологии [1]. Все эти соображения определяют интерес к гиппокампу как к структуре, которая может быть мишенью действия различных фармакологических веществ, применяемых для коррекции нарушений памяти в результате старения и при различных видах патологии (ноотропы), купирования тревожных состояний (анксиолитики), предотвращения и купирования эпилептических припадков (антиконвульсанты), а также нейропротекторов, предотвращающих раннюю гибель нервных клеток при гипоксии и перегрузке ионами кальция [5, 16].

Для проведения всех этих исследований гиппокамп, с морфологической точки зрения, является весьма удобной структурой. Его сегментарная организация дает возможность вычленить и сохранить в искусственных условиях отдельный срез, содержащий все внутригиппокампальные связи [1].

Ноотропные препараты

В настоящей статье анализируется действие на нейроны гиппокампа ряда ноотропных препаратов, применяемых в неврологической практике для коррекции разных форм церебральной патологии, и в частности, когнитивных нарушений, развивающихся после церебральной ишемии. К таким препаратам относятся и производные пирацетама (ноотропила), давно зарекомендовавшего себя как одно из основных мнемоторных фармакологических средств [12, 19].

В НИИ фармакологии РАМН было синтезировано несколько пептидных аналогов пирацетама, имеющих перед ним ряд преимуществ: они оказывают действие в значительно меньшей концентрации, лишены побочных эффектов, обладают нейропротективными свойствами и т. д. [2, 3]. Два нейропептида из этой группы, имеющие в своей основе аминокислоты пролин или пироглутамат, совмещают структурные характеристики пирацетама и концевой фрагмента вазопрессина, мнемоторные эффекты которого были многократно описаны [8–11, 13, 18].

На рис. 1 показано сопоставление структуры пирацетама и одного из его пептидных аналогов, в основе которого лежит аминокислота пролин. В лаборатории функциональной синаптологии НИИ мозга РАМН (в настоящее время отдел исследований мозга Научного центра неврологии РАМН) изучалось действие этих дипептидов на синаптическую пластичность и другие функциональные характеристики нейронов гиппокампа. Эксперименты проводились на срезах гиппокампа, методика приготовления которых, как и методика регистрации в них суммарных электрических ответов и отве-

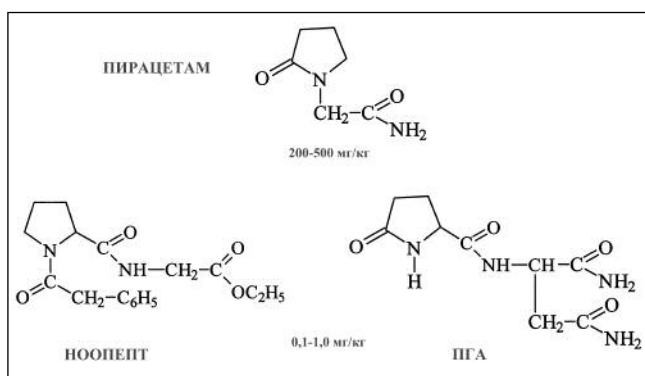


рис. 1: Сопоставление химической структуры и действующих концентраций пирацетама и дипептидов, сконструированных на его основе, – пироглутамил аспарагинамида (ПГА) и фенилацетилпролилглицина (ноопепта)

тов отдельных нейронов на синаптическую стимуляцию, были многократно описаны [5].

Длительная потенциация как синаптическая модель памяти и влияние на нее фармакологических веществ

Существенным этапом в понимании молекулярных механизмов синаптической пластичности было обнаружение феномена длительной потенциации (ДП) в гиппокампе. Суть феномена состоит в следующем: если раздражать толчками тока высокой частоты (100 Гц, 1 с) один из пучков волокон (например волокна, связывающие поле СА3 с полем СА1 – так называемые коллатерали Шаффера), то после этого ответ клеток поля СА1 на раздражение существенно увеличится, и, что самое главное, это увеличение сохранится в течение десятков минут, часов, дней, а при определенных условиях даже недель и месяцев, то есть интервалов времени, соответствующих памяти и обучению.

На рис. 2 представлена потенциация ответа пирамид поля СА1 на стимуляцию коллатералей Шаффера, длительность которой составляла около 2 часов; затем амплитуда ответа, как видно на графике, постепенно возвращалась к контрольному уровню.

Это явление было впервые описано английским физиологом Блиссом [7] и сразу же привлекло к себе внимание различных специалистов в области нейронаук (электрофизиологов, специалистов по электронной микроскопии, биохимиков и др.), увидевших в нем синаптическую модель памяти и обучения. С этой точки зрения представлялось привлекательным изучить влияние упомянутых ноотропных препаратов на ДП.

Известно, однако, что эффекты этих препаратов проявляются в тех случаях, когда память была нарушена в силу тех или иных обстоятельств. Поэтому ноотропные свойства разных соединений традиционно исследуются на поведен-

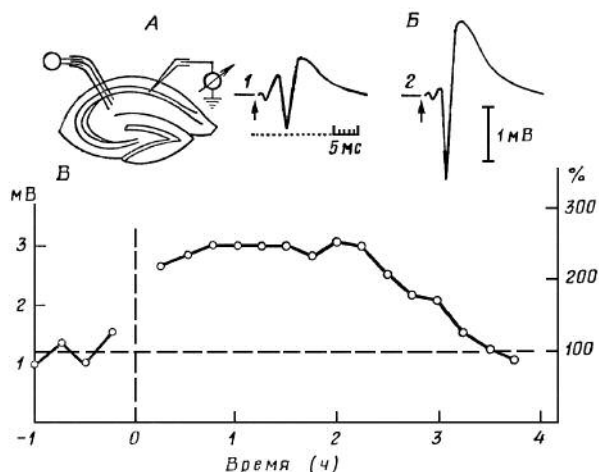


рис. 2: Длительная потенциация в срезе гиппокампа. А – схема расположения стимулирующего и регистрирующего электродов. Б – примеры ответов на одиночное раздражение коллатералей Шаффера до (1) и после (2) их высокочастотной (100 Гц, 1 с) стимуляции. В – график изменения ответа во времени; вертикальная штриховая линия – высокочастотная стимуляция (из статьи [5])

ческих моделях с "недоучиванием" животных или с нарушением процесса консолидации памяти фармакологическими (скополамин) или другими (электрошок, гипоксия) средствами [11]. В этой связи перед нами стояла задача разработать модели нарушенной ДП, которая могла бы подвергаться фармакологической коррекции. Такими моделями в наших опытах были: 1) угнетение развития ДП этанолом (модель нарушения); 2) использование относительно слабой стимуляции синаптического входа (модель "недообучения") [4].

Поскольку один из исследованных нами пептидов – пироглутамил-аланинамид (ПГА), как уже отмечалось, соответствует концевому фрагменту аргинин-вазопрессина (АВП), то нам представлялось целесообразным сравнить в одном эксперименте действие этих двух соединений.

Перфузия средой, содержащей 20–50 мМ этанола, значительно повреждает развитие ДП в срезах гиппокампа после стандартной высокочастотной стимуляции (ВЧС). В наших экспериментах введение этанола за 15 мин до ВЧС снижало вероятность развития ДП до 50% (6 срезов из 12), в результате средний прирост амплитуды популяционного спайка (ПС) к концу часового периода регистрации составлял лишь $111,4 \pm 9,7\%$, $n=12$.

Следует отметить, что в тех срезах, где ДП развивалась, ее амплитуда не отличалась от контрольной ($137,4 \pm 10,2\%$, $n=6$).

В срезах, перфузированных этанолом в сочетании с ПГА (0,2 мкМ), ВЧС вызывала ДП со средней амплитудой $151,8 \pm 10,3\%$ в 6 случаях из 6 (100%, $p<0,05$). Перфузия срезов этанолом в сочетании с 1 мкМ АВП (4–9) немного увеличивала вероятность развития ДП (6 срезов из 8 [75%], $p>0,1$) и существенно увеличивала ее амплитуду ($211 \pm 19,7$, $n=6$, $p<0,01$) (рис. 3).

Таким образом, оба пептида восстанавливали способность к развитию ДП в условиях перфузии этанолом, при этом ПГА существенно облегчал процесс индукции, а АВП (4–9), кроме того, значительно увеличивал ее амплитуду.

В данной серии экспериментов использовалась стандартная ВЧС (100 Гц, 1 с). Более короткая ВЧС (30 импульсов при частоте 100 Гц) была менее эффективна в отношении индукции ДП. Существенное увеличение амплитуды ПС ($163 \pm 10\%$, $n=8$), наблюдаемое в первые 5 мин после короткой ВЧС, постепенно ослабевало и сохранялось к концу часового периода наблюдения на уровне 130–140% ($142,9 \pm 5,3\%$) лишь в 4 из 7 срезов (57%), в то время как в остальных ответы возвращались к контрольному уровню ($102,9 \pm 1,4\%$, $n=3$). Такой протокол стимуляции создавал модель "недообучения". Было показано, что введение в перфузионную среду 0,2 мкМ ПГА устраняло этот дефицит и возвращало ДП к контрольному уровню. Интересно отметить, что более высокая концентрация пептида (1 мкМ) оказалась менее эффективной [6].

Таким образом, проведенные эксперименты продемонстрировали, что изученные пептиды, проявляющие свое мнемоторное действие в поведенческих экспериментах и в условиях клиники, способны на длительное время увеличивать эффективность синаптической передачи в внутригиппокампальной системе (коллатерали Шаффера – поле

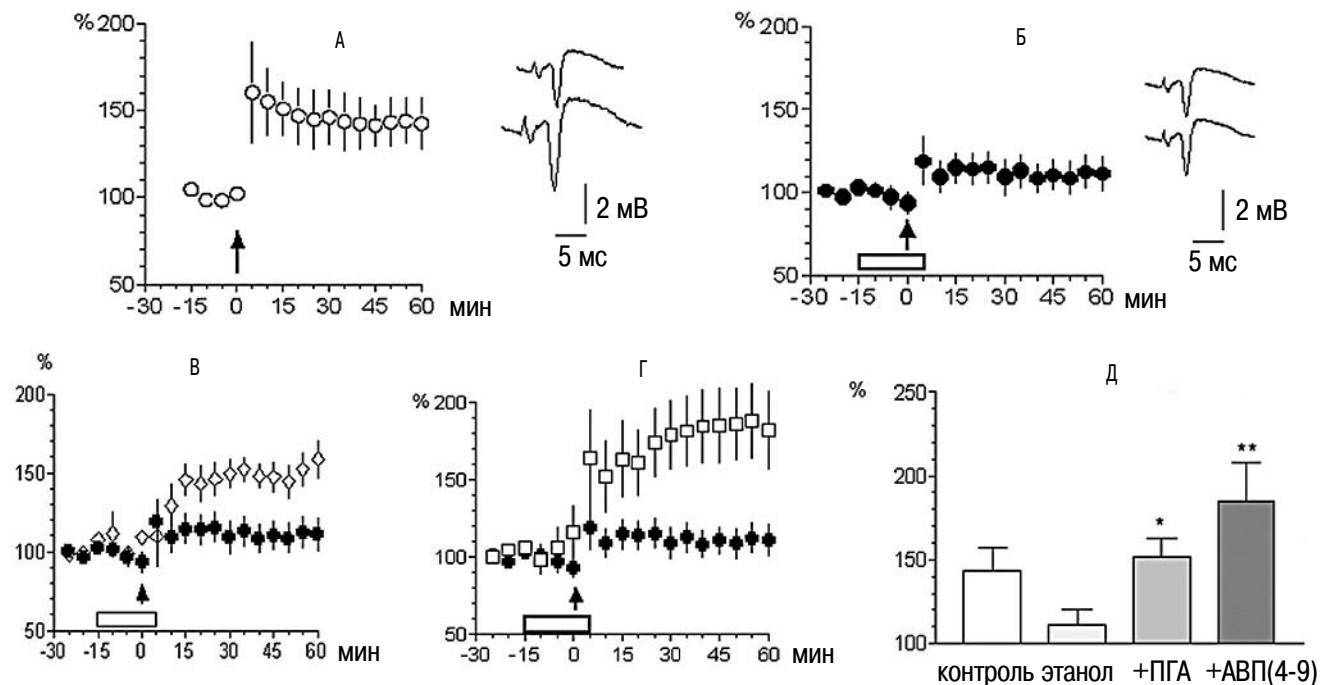


рис. 3: Нарушение длительной потенциации (ДП) под действием этанола и ее восстановление под влиянием исследуемых нейропептидов
 А – ДП в контроле; Б – ДП, нарушенная действием этанола; В – восстановление ДП при совместной аппликации этанола и ПГА; Г – восстановление ДП при совместной аппликации этанола и фрагмента вазопрессина; Д – суммарная гистограмма амплитуд ответов в контроле, после тетанизации и под действием веществ (из статьи [4]).

CA1), которая, согласно многим литературным данным, ответственна за перевод кратковременной памяти в долговременную [14].

Ионные механизмы действия ноотропных препаратов на синаптические процессы в гиппокампе

Для раскрытия рецепторных и молекулярных механизмов действия вышеуказанных пептидов требуется применение нанотехнологий, что успешно осуществляется в лаборатории в последние годы. Одной из форм технологий, оперирующих с наночастицами, является метод регистрации ионных токов в отдельных клетках, получивший название метода локальной фиксации мембранного потенциала (patch clamp). Этот метод детально описан в большом количестве статей (в том числе и наших) [15].

В настоящее время мы сконцентрировали внимание на первом из двух упомянутых выше нейропептидов, сконструированных на основе пирacetama. Этот дипептид, получивший название ноопепт, имеет в своей основе аминокислоту пролин (рис. 1), хорошо зарекомендовал себя в клинической практике как ноотропное и анксиолитическое средство, одобрен Фармкомитетом и продается в открытой аптечной сети [17]. Ноопепт не обладает столь выраженной способностью восстанавливать нарушенную ДП, как это было показано для ПГА и АВП, однако было отмечено (предварительное наблюдение), что он способен сам по себе вызывать увеличение эффективности синаптической передачи в системе коллатерали Шафера – поле CA1. Кроме того, в экспериментах на нейронах улиток было установлено, что ноопепт блокирует несколько видов калиевых токов, что также свидетельствует о его нейро-

Как уже было отмечено, в настоящее время наиболее совершенным методом изучения синаптической активности является регистрация ионных токов в отдельных клетках среза. На рис. 4 показана фотография пирамидной клетки поля CA1 гиппокампа вместе с регистрирующим микроэлектродом. На рис. 5А показана типичная запись спонтанных ионных токов в этом нейроне. Видно, что активность состоит из миниатюрных токов амплитудой от 10–15 до 300–400 пА, возникающих с частотой $3,27 \pm 0,45$ Гц. Эти



рис. 4: Фотография пирамиды поля CA1 с регистрирующей микропипеткой (объектив Н40)

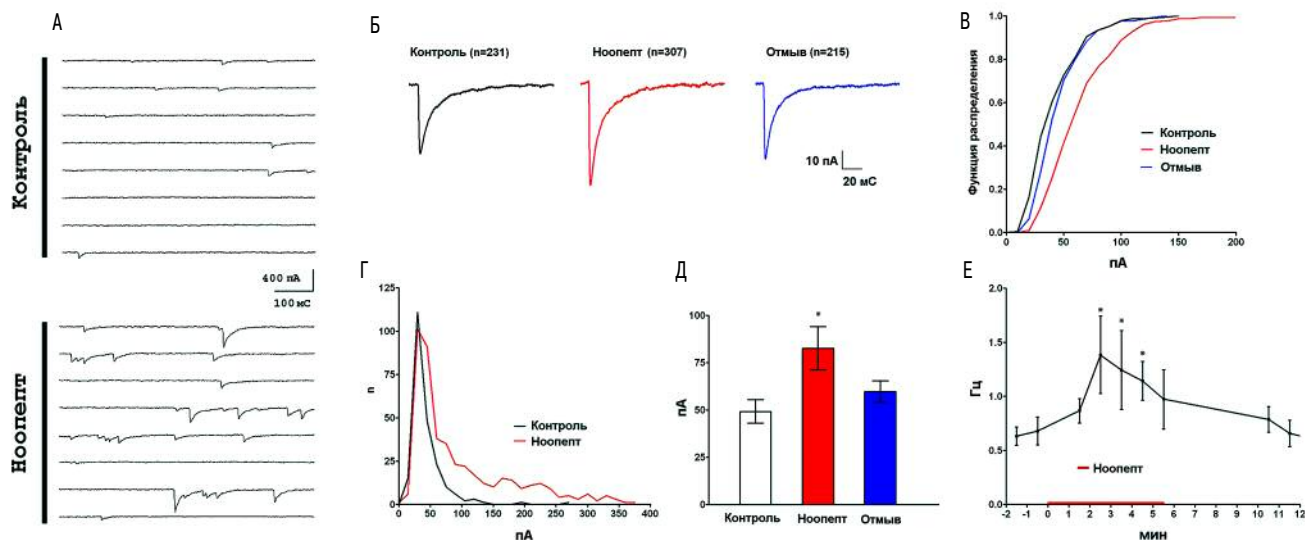


рис. 5: Увеличение амплитуды и частоты спонтанных токов в пирамидном нейроне поля CA1 под действием ноопепта (1 мкМ) А – непрерывная запись в контроле и под действием вещества; Б – суперпозиция одиночных постсинаптических токов (в скобках указано количество усреднений); В – кумулятивные функции распределения; Г – амплитудная гистограмма; Д – усредненная диаграмма для всех зарегистрированных клеток; Е – временной ход изменения частоты постсинаптических токов в эксперименте.

токи являются результатом воздействия на клеточную мембрану квантов ГАМК, спонтанно выделяющихся из терминалей тормозных интернейронов, расположенных в разных слоях поля CA1.

Введение в проточную жидкость 1 мкМ ноопепта приводит к существенному увеличению амплитуды ($82,63 \pm 11,65$ пА в сравнении с контролем – $56,33 \pm 2,73$ пА, $p < 0,01$) и частоты (примерно в два раза) миниатюрных токов. Эффект полностью отмывается и воспроизводится во всех зарегистрированных нейронах ($n=15$) (рис 5).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ноопепт оказывает свое мнемотропное действие не посредством улучшения кровоснабжения мозга, как это было показано для ряда ноотропных препаратов, но непосред-

ственно воздействуя на синаптические процессы, связанные с выделением медиатора. Физиологическое значение обнаруженного эффекта состоит в увеличении тонического торможения во внутренних гиппокампальных путях, что хорошо объясняет анксиолитическое действие препарата и возможность его использования как антиконвульсанта.

Вопрос о том, каким образом ноопепт и другие производные пирacetамы восстанавливают нарушенную длительную потенциацию и тем самым оказывают свое мнемотропное действие на системном уровне, является предметом дальнейших исследований.

Работа поддержана грантами РФФИ № 08-04-00978а и № 07-04-121220фи, грантом поддержки ведущих научных школ НШ-1150.2008.4.

Список литературы

1. Виноградова О.С. Гиппокамп и память. М.: Наука, 1975.
2. Гудашева Т.А., Островская Р.У., Максимова Ф.В. и др. О возможной структурно-функциональной связи пирacetамы и вазопрессина. Хим. фарм. журн. 1988; 3: 271–275.
3. Гудашева Т.А., Островская Р.У., Трофимов С.С. и др. Пептидные аналоги пирacetамы как лиганды предполагаемых ноотропных рецепторов. Хим. фарм. журн. 1985; 11: 1322–1328.
4. Канай Н.А., Чепкова А.Н., Гудашева Т.А. и др. Амид пироглутамиласпарагина нормализует развитие длительной потенциации в срезах гиппокампа крыс. Бюл. эксп. биол. и мед. 2004; 8: 176–179.
5. Скребицкий В.Г. Влияние нейрорегуляторов на синаптическую активность гиппокампа. Успехи физиол. наук 1985; 4: 35–48.
6. Чепкова А.Н., Канай Н.А., Дореули Н.В. и др. Влияние амида пироглутамиласпарагина на пластические свойства синаптической передачи в гиппокампе. Бюл. эксп. биол. мед. 2003; 7: 68–71.

7. Bliss T.V. P., Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J. Physiol. 1973; 232: 331–336.
8. Chepkova A.N., French P., De Wied D. et al. Long-lasting enhancement of synaptic excitability of CA1/subiculum neurons of the rat ventral hippocampus by vasopressin and vasopressin(4-8). Brain Res. 1995; 701: 255–266.
9. Chepkova A.N., Doreulee N.V., Trofimov S.S. et al. Nootropic compound L-pyroglutamyl-D-alanine-amide restores hippocampal long-term potentiation impaired by exposure to ethanol in rats. Neurosci. Lett. 1995; 188: 163–166.
10. Chepkova A.N., Kanai N.A., Skrebitskii V.G. Arginine vasopressin fragment AVP(4-9) facilitates induction of long-term potentiation in the hippocampus. Bull. Exp. Biol. Med. 2001; 131: 136–138.
11. Gavrilova S.A., Us K.S., Ostrovskaia R.U. et al. Neuroprotective activity of the proline-containing dipeptide noopept on the model of brain ischemia induced by the middle cerebral artery occlusion. Exp. Clin. Pharmacol. 2006; 69: 16–18.

12. *Giurgea C.* Vers une pharmacologie de l'active integrative du cerveau. Tentative du concept nootrope en psychopharmacologies. *Actualites Pharmacologiques* 1972; 25: 115–156.

13. *Gudasheva T.A., Boyko S.S., Ostrovskaya R.U. et al.* The major metabolite of dipeptide piracetam analogue GVS-111 in rat brain and its similarity to endogenous neuropeptide cyclo-L-prolylglycine. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 1997; 22: 245–252.

14. *Kinney G.G., Patino P., Mermet-Bouvier Y. et al.* Cognition-enhancing drugs increase stimulated hippocampal theta rhythm amplitude in the urethane-anesthetized rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 291: 99–106.

15. *Kozhemiakin M.B., Draguhn A., Skrebitsky V.G.* Layer-specific potentiation of evoked IPSCs in rat hippocampal CA1 pyramidal cells by lanthanum. *Brain Res. Bull.* 2004; 64: 97–101.

16. *McNaughton N., Kocsis B., Hajys M.* Elicited hippocampal theta rhythm: a screen for anxiolytic and procognitive drugs through changes in hippocampal function? *Behav. Pharmacol.* 2007; 18: 329–346.

17. *Ostrovskaya R.U., Gruden M.A., Bobkova N.A. et al.* The nootropic and neuroprotective proline-containing dipeptide noopept restores spatial memory and increases immunoreactivity to amyloid in an Alzheimer's disease model. *J. Psychopharmacol.* 2007; 21: 611–619.

18. *Rong X.W., Chen X.F., Du Y.C.* Potentiation of synaptic transmission by neuropeptide AVP4-8 (ZNC(C)PR) in rat hippocampal slices. *Neuroreport* 1993; 4: 1135–1138.

19. *Sara S.J., David-Remacle M., Weyers M. et al.* Piracetam facilitates retrieval but does not impair extinction of bar-pressing in rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 1979; 61: 71–75.

Effects of pharmacological drugs on synaptic activity of hippocampus

V.G. Skrebitsky, N.A. Kapay, V.I. Derevyagin, R.V. Kondratenko

Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

Key words: hippocampus, long-term potentiation, synaptic activity, neuropeptides, noopept, patch-clamp method, ionic currents.

The search for physiologically active drugs with precognitive action and the study of mechanisms of their influence on the brain represent important tasks of neurobiology and neuropharmacology. The paper considers methodical and scientific approaches to the study of effects of different memory-enhancing drugs on synaptic activity of area CA1 of hippocampus. Special attention was paid to the modulation of long-term

potentiation, previously disturbed by hypoxia or alcohol perfusion, by peptide analogues of piracetam. It was demonstrated using patch clamp technique that one of these peptides, Noopept, increases inhibitory synaptic transmission, probably due to blockade of potassium channels in the terminals of inhibitory interneurons.