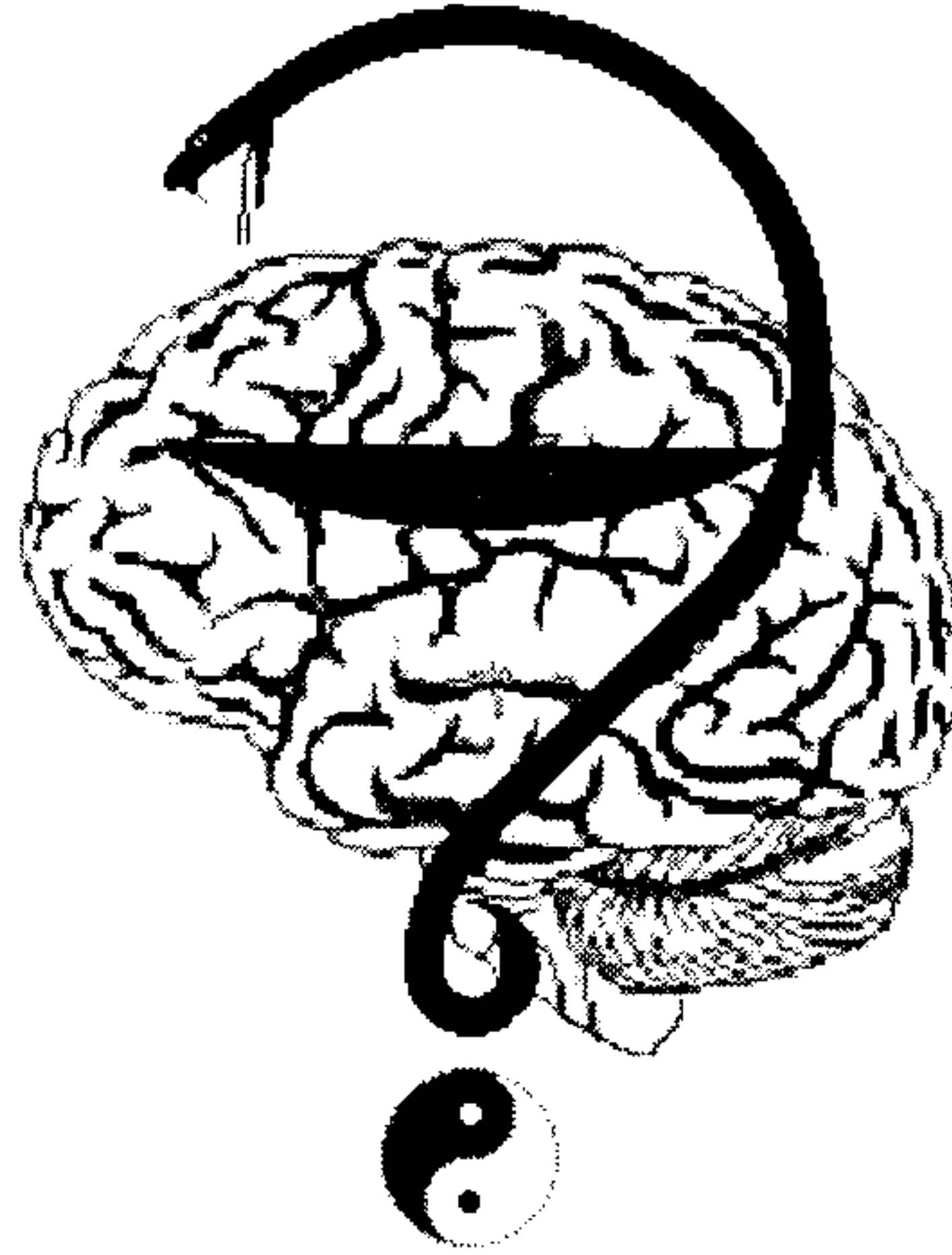


РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО ИМ. И.П. ПАВЛОВА  
УРАН ИНСТИТУТ ВЫСШЕЙ НЕРВНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ И НЕЙРОФИЗИОЛОГИИ РАН  
ГУ НИ ИНСТИТУТ НОРМАЛЬНОЙ ФИЗИОЛОГИИ ИМ. П.К. АНОХИНА РАМН  
УРАН ИНСТИТУТ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОФИЗИКИ РАН  
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ НАН УКРАИНЫ



Седьмой  
международный междисциплинарный конгресс  
**НЕЙРОНАУКА ДЛЯ МЕДИЦИНЫ И  
ПСИХОЛОГИИ**

Школа  
**МЕХАНИЗМЫ И ЭФФЕКТИВНЫЕ СПОСОБЫ КОРРЕКЦИИ  
ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ**

Школа-семинар  
**ВЫЧИСЛИТЕЛЬНЫЕ НЕЙРОИССЛЕДОВАНИЯ**

**Судак, Крым, Украина, 3-13 июня 2011 года**

difficult and unknown mechanisms of functioning of different human organism systems. We believe that this investigation should be continued, especially regarding development the adequate logical tasks. We hope, that the discussion with colleagues – physiologists, psychologists and specialists in the field of high nervous activity would be interesting and useful.

### **ИДЕНТИФИКАЦИЯ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ НЕЙРОНОВ В КУЛЬТУРЕ ПО ХАРАКТЕРУ КАЛЬЦИЕВЫХ ОТВЕТОВ НА АГОНИСТЫ ГЛУТАМАТНЫХ РЕЦЕПТОРОВ.**

**Зинченко В.П., Кононов А.В., Баль Н.В., Долгачева Л.П.**  
Институт биофизики клетки РАН, Пущино, Россия, [vpz@mail.ru](mailto:vpz@mail.ru)

Индивидуальные нейроны в культуре отличаются по характеру кальциевых ответов на агонисты глутаматных рецепторов. В настоящей работе исследованы причины варибельности и закономерности распределения амплитуд кальциевых ответов на агонисты ионотропных глутаматных рецепторов отдельных нейронов в культуре клеток гиппокампа. Изменения  $[Ca^{2+}]_i$  в нейронах в ответ на добавление агонистов глутаматных рецепторов регистрировали по интенсивности флуоресценции двухволнового  $Ca^{2+}$ -чувствительного зонда Fura-2 с помощью системы анализа изображения. В эксперименте измеряли амплитуды кальциевых ответов (выраженные как отношение интенсивностей флуоресценции Fura-2 при возбуждении 340 и 380 нм) на кратковременную аппликацию агонистов глутаматных рецепторов: N-метил-D-аспартата (NMDA), домоевой кислоты (DA),  $\alpha$ -амино-3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-пропионовой кислоты (AMPA) и фторвиллардина (FW). Индивидуальные кальциевые ответы клеток различались по форме и амплитуде и неизменно повторялись при повторной кратковременной аппликации агонистов. Для определения природы различий кальциевых ответов мы сравнивали распределения амплитуд кальциевого ответа на агонисты NMDA-, каинатных (KA-) и AMPA-рецепторов в культурах различного возраста, при действии ингибиторов десенситизации рецепторов и при различных концентрациях агонистов. Характерным для распределения амплитуд кальциевых ответов было их равномерное увеличение от 0.05 до 1.6 усл.ед. Тем не менее, в культуре встречаются нейроны (1–3% популяции), амплитуды ответов которых достигают более высоких значений. Обнаружено, что ингибиторы десенситизации увеличивают амплитуду и преобразуют форму кальциевых ответов (из импульсной, с острой вершиной, в ступенчатую), но не отменяют характера равномерного распределения амплитуд. Эффект ингибиторов десенситизации уменьшается с ростом амплитуды кальциевого ответа на агонисты AMPA- и KA-рецепторов в контроле и стремится к нулю в нейронах с исходно максимальной амплитудой ответа. Высокие концентрации агониста KA- и AMPA-рецепторов обладают свойством ингибиторов десенситизации и превращают транзиторный ответ в постоянный, который длится на протяжении всей аппликации агониста. Таким образом, амплитуда и форма кальциевого ответа на агонисты глутаматных рецепторов является характерным параметром индивидуальной клетки и позволяет разделить нейроны по количеству, гетерогенности и десенситизации рецепторов.

### **IDENTIFICATION OF INDIVIDUAL HIPPOCAMPAL NEURONS IN CULTURE IN ACCORDANCE WITH KIND OF CALCIUM RESPONSE ON GLUTAMATE RECEPTORS AGONISTS.**

**Zinchenko V.P., Kononov A.V., Bal N.V., Dolgacheva L.P.**  
Institute of Cell Biophysics RAS, Pushchino, Russia, [vpz@mail.ru](mailto:vpz@mail.ru)

Individual neurons in culture differ in character of calcium response to agonists of glutamate receptors. The reasons of the variability of the calcium response amplitudes in individual neurons of the hippocampal cell culture to agonists of ionotropic glutamate receptors and the regularities of the calcium response amplitude distribution were studied in this work. Changes of  $[Ca^{2+}]_i$  in the neurons in response to the NMDA-, AMPA-, and KA-receptor agonists were recorded using fluorescence probe Fura-2. The calcium response amplitudes (expressed as the ratio of fluorescence intensities of Fura-2 upon excitation at wavelengths 340 and 380 nm) to short-term application of glutamate receptor agonists N-methyl-D-aspartate (NMDA), domoic acid (DA),  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methylizoksazol-4-propionic acid (AMPA), and (S)-(-)-5-fluorowillardiine (FW) were measured. Calcium responses of individual cells differed in shape and amplitude but always reproduced upon the second application of the agonist. To elucidate the nature of calcium response variability, we compared distributions of calcium response amplitudes to the NMDA-, KA-, and AMPA-receptor agonists in cultures of various ages in the presence of receptor desensitization inhibitors and different agonist concentrations. An even increase from 0.05 to 1.6 was characteristic for distributions of calcium response amplitudes. Nevertheless, in 1–3 % neurons of the cell culture, calcium response amplitudes reached much higher values. However, this regularity varied with age and depended on the presence of the receptor desensitization inhibitor. Desensitization inhibitors transformed the response from pulse-like with a sharp peak into stepwise and increased the amplitude of calcium responses but did not abolish the character of even amplitude distribution. The effect of AMPA- and KA- receptor desensitization inhibitor decreased with calcium response amplitude growth in the control and approached zero in neurons with initially maximal amplitude. KA- and AMPA-receptor agonists at high concentrations possessed a property of desensitization inhibitors and transformed a transient response into a continuous one that lasted throughout the application time. Thus, the amplitude and shape of the calcium response to glutamate receptor agonists is a characteristic parameter of an individual cell and allow separating neurons according quantity, heterogeneity and receptor desensitization.

### **ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫЕ ИНГИБИТОРЫ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ И МИАСТЕНИЯ ГРАВИС**

**Зобов В.В.<sup>1,2</sup>, Петров К.А.<sup>1,3</sup>, Никиташина А.Д.<sup>1,2</sup>, Рогожин А.А.<sup>4</sup>, Никольский Е.Е.<sup>3</sup>, Резник В.С.<sup>1</sup>**  
<sup>1</sup>Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова КазНЦ РАН, <sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, <sup>3</sup>Казанский институт биохимии и биофизики КазНЦ РАН, <sup>4</sup>Казанская государственная медицинская академия, г. Казань, Россия, [zobov@iopc.ru](mailto:zobov@iopc.ru)

Ранее нами была показана принципиальная возможность разработки в классе четвертично-аммониевых ингибиторов холинэстераз (ХЭ) средств, действующих по механизму синапс-специфического

ингибирования ацетилхолинэстеразы (АХЭ; К.Ф.3.1.1.7) с минимумом поражающих эффектов на жизненно-важные функции. Как известно, основной проблемой, ограничивающей использование всех традиционных ингибиторов ХЭ, является отсутствие избирательности их действия на АХЭ из разных органов и тканей. Вследствие этого, одновременно с воздействием на орган, функционирование которого требует фармакоррекции, происходит инактивация ХЭ и в других органах, коррекции не требующих, что приводит к развитию множества токсических эффектов, связанных с гиперактивацией гладкой мускулатуры, ингибированием бутирилхолинэстеразы крови, фатальными нарушениями работы дыхания, сердца и мозга. Этих недостатков могли бы быть лишены селективные ингибиторы АХЭ, способные избирательно влиять на работу целевых биомишеней (локомоторных мышц или мозга). Однако до настоящего времени соединения с подобными свойствами описаны не были. Предпосылки возможности создания подобных соединений появились при исследовании нами более 300 четвертично-аммониевых производных урацила и ксантина, проявляющих необычно высокую для антихолинэстеразных веществ терапевтическую безопасность  $LD_{50}/ED_{50} \geq 50-100$  в тесте «бег на тротуаре». Было показано, что соотношение констант ингибирования АХЭ/бутирилхолинэстеразы для ряда соединений достигает 100 000 крат, а константа ингибирования очищенной АХЭ мозга на 4 порядка выше, чем для АХЭ мышц. С помощью мутантных животных без  $G_4$  изоформы АХЭ показано, что устойчивость к ингибированию коррелирует с присутствием именно данной изоформы АХЭ в мозге и в диафрагме. АХЭ сердца и гладкой мускулатуры также устойчива к ингибированию соединениями. Все это позволило начать проверку эффективности соединений для преодоления последствий экспериментальной модели миастении гравис (Baggi et al., 2003) с использованием электрофизиологических и биохимических методов. Полученные данные показывают, что наилучшие соединения могут быть рекомендованы для клинических испытаний как средства для лечения миастении гравис и миастеноподобных состояний.

*Работа поддержана грантом РФФИ №09-04-12047-офи м, грантом Президента РФ НШ-64631.2010.7, программой фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине» - «Мозг: фундаментальные и прикладные проблемы», программами фундаментальных исследований Отделения химии и наук о материалах РАН ОХНМ-5 и Президиума РАН № 3.*

#### **TISSUE-SPECIFIC ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORS AND MYASTHENIA GRAVIS**

**Zobov V.V.<sup>1,2</sup>, Petrov K.A.<sup>1,3</sup>, Nikitashina A.D.<sup>1,2</sup>, Rogozhin A.A.<sup>4</sup>, Nikolsky E.E.<sup>3</sup>, Reznik V.S.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>A.E. Arbuzov Institute of Organic and Physical Chemistry, Kazan Scientific Centre of RAS, <sup>2</sup>Kazan (Volga Region) Federal University, <sup>3</sup>Kazan Institute of Biochemistry and Biophysics of RAS, <sup>4</sup>Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia, zobov@iopc.ru

Earlier we have shown a basic possibility of development in a class of quarter-ammonium inhibitors of cholinesterase (ChE), operating by mechanism of synapse-specific inhibition of acetylcholinesterase (AChE), with minimum striking effects on the vital functions. As known, the basic problem limiting use of all traditional inhibitors of ChE is absence of selectivity of their action on AChE from different organs and tissues. Therefore, simultaneously with influence on the organ, which functioning demands treatment, there is an inactivation of ChE in other, healthy organs, that leads to set of the toxic effects related with hyperactivation of smooth muscles, inhibition of butyrylcholinesterase of the blood, fatal infringements of breath, heart and brain. These defects could be deprived the selective inhibitors of AChE capable to selectively influence targets (locomotory muscles or brain). However till now compounds with such properties haven't been described. Possibility of creation of suchlike compounds have appeared by our research of more than 300 quarter-ammonium derivatives of uracil and xanthine, showing unusually high for anticholinesterase substances therapeutic safety  $LD_{50}/ED_{50} \geq 50-100$  in the test «run on treadmill». It has been shown that the parity of constants of inhibition AChE/butyrylcholinesterase for a number of compounds is reached to 100 000 times, and an inhibition constant of purified AChE of brain is by 4 order above, than that for AChE of muscles. By means of mutant animals without  $G_4$  isoforms of AChE was shown that stability to inhibition correlates with presence of this isoform of AChE in brain and diaphragm. AChE of heart and smooth muscles is also steady against inhibiting compounds. All of this allowed to begin checking of efficiency of compounds to overcome consequences of experimental model of a myasthenia Gravis (Baggi et al., 2003) by means of electrophysiological and biochemical methods. Data obtained shows that the best compounds can be recommended for clinical tests as means for treatment of myasthenia Gravis and myasthenia-like conditions.

*The research is supported with grant RFBR No. 09-04-12047-ofi m, grant of Russian Federation President NSh-64631.2010.7, program of fundamental research of Presidium RAS "Fundamental science for medicine" – "Brain: fundamental and applied problems", programs of the fundamental research of department of chemistry and stuff science RAS OChNM-5 and of Presidium RAS No. 3.*

#### **ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ КАК ФАКТОР ФОРМИРОВАНИЯ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ В РАННЕМ ОНТОГЕНЕЗЕ**

**Зубарева О.Е.<sup>1</sup>, Шварц А.П.<sup>1</sup>, Трофимов А.Н.<sup>1</sup>, Симбирцев А.С.<sup>2</sup>, Клименко В.М.<sup>1</sup>**

1-НИИ Экспериментальной медицины СЗО РАМН, 2-ГНЦ НИИ особо чистых биопрепаратов, Санкт-Петербург, Россия, [ZubarevaOE@mail.ru](mailto:ZubarevaOE@mail.ru)

Провоспалительные цитокины интерлейкин-1 $\beta$ , (ИЛ-1 $\beta$ ) и фактор некроза опухоли  $\alpha$  (ФНО $\alpha$ ), являются общим патологическим звеном различных видов перинатальной патологии, приводящих к тяжелым неврологическим и психическим заболеваниям. Экспрессия ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  и их рецепторов в клетках мозга имеет место уже в пренатальном периоде при нормальных и патологических условиях. Показано их влияние на развитие и созревание различных типов глиальных клеток и нейронов. Предполагается, что повышение уровня ИЛ-1 $\beta$  и ФНО $\alpha$  в раннем возрасте является одним из факторов формирования тяжелых когнитивных расстройств, наблюдаемых, в частности при шизофрении. В