

М. В. Копаниця

Вплив метаболіту феназепаму 2-аміно-5-бром-2'-хлорбензофенону на гліцинові та глутаматні НМДА-рецептори пірамідних нейронів гіпокампа щура

Исследовано влияние метаболита анксиолитического препарата феназепам 2-амино-5-бром-2'-хлорбензофенона (АВРН) на токи, вызванные активацией глициновых и глутаматных НМДА-рецепторов в изолированных пирамидных нейронах гиппокампа крыс. Показано, что в концентрации 3 – 10 мкмоль/л АВРН оказывал ингибирующее действие на глициновые рецепторы, которое было более выраженным при предварительной инкубации с АВРН. Пиковая амплитуда токов через НМДА-рецепторы слабо увеличивалась после продолжительной (4-6 мин) инкубации с 10 мкмоль/л АВРН. Данные эффекты метаболита следует учитывать при анализе действия феназепам и других бензодиазепиновых препаратов.

ВСТУП

Численні сполуки 1,4-бенздіазепінової структури належать до найуживаніших лікарських засобів [9, 10]. В Україні в 1970-х роках було розроблено вітчизняний бенздіазепіновий препарат феназепам, що мав виражені седативний, протисудомний, міорелаксантий і снодійний ефекти [1]. В організмі ссавців він, подібно до інших бенздіазепінів, метаболізується з утворенням низки метаболітів, у тому числі таких, що мають бензофенонову структуру [1]. У наших попередніх дослідженнях зауважено, що 2-аміно-5-бром-2'-хлорбензофенон (АВРН), один з основних бензофенонових метаболітів феназепаму, значно модифікує хлорні струми крізь рецептори γ -аміномасляної кислоти типу А (ГАМК_A), прискорюючи активацію та десенситизацію цих струмів та уповільнюючи їх деактивацію [7, 8]. В експериментах на рекомбінантних ГАМК_A-

рецепторах, експресованих у ооцитах жаби *Xenopus laevis*, нами було показано, що АВРН однаково впливав на рецептори, що склалися з комбінацій субодиниць $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ та $\alpha_6\beta_2\gamma_{2L}$ [6]. Отже, можна припустити, що бензофеноновий метаболіт феназепаму не взаємодіє з високоафінним бенздіазепіновим сайтом, адже бенздіазепіноподібні сполуки не здатні впливати на ГАМК_A-рецептори, що з усіх можливих α -субодиниць містять лише α_6 -субодиницю (так звані бенздіазепінівчутливі рецептори [12]).

Таким чином, було вирішено дослідити чи фармакологічний вплив АВРН обмежується лише ГАМК_A-рецепторами. Зокрема видавалося цікавим вивчити вплив АВРН на рецептори гліцину, котрі є еволюційно спорідненими до ГАМК_A-рецепторів і також містять хлорний канал, та на глутаматні рецептори типу НМДА, що їх структура значно відрізняється від такої ГАМК_A-рецепторів.

МЕТОДИКА

Експерименти здійснювалися на ферментативно ізольованих нейронах гіпокампа щурів віком 14–16 діб, які отримували за описаною методикою [5]. Іонні струми крізь мембрани поодиноких ізольованих нейронів реєстрували за допомогою стандартної методики фіксації потенціалу в модифікації “від цілої клітини” в зовнішньоклітинному розчині, що містив (у ммоль/л): NaCl – 130, KCl – 2,7, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 1,5, D-глюкоза – 10, NEPES – 10 (рН розчину доводили до 7,4 за допомогою NaOH). В експериментах із вивчення НМДА-рецепторів зі згаданого розчину вилучали MgCl₂ та додавали до нього гліцин у концентрації 10 мкмоль/л. Patch-піпетки витягали зі стандартних заготовок борсилікатного скла (зовнішній діаметр 1,6 мм) за допомогою кузні P97 (“Sutter Instrument Co.”, США). Внутрішньопіпетковий розчин містив (у ммоль/л): CsF – 70, NaCl – 30, тріс-Cl – 20, ЕГТА – 0,5, MgATФ – 4, ГТФ – 0,5 (рН розчину доводили до 7,25 за допомогою NaOH). При заповненні цим розчином patch-піпетки мали опір 2 – 5 МОм. Струми реєстрували за допомогою підсилювача RK-400 (“BioLogic, Claix”, Франція) та записували на жорсткий диск IBM-сумісного комп’ютера після апаратної нейтралізації ємності та компенсації (на 90 – 95%) послідовного опору. Експерименти проводилися при підтримуваному потенціалі – 80 мВ за кімнатної температури (19 – 25 °С).

Швидко прикладення та відмивання розчинів, що містили агоністи здійснювали за описаною раніше методикою [2]. Інтервал між прикладеннями був 90 – 120 с.

АВРН синтезовано у Фізико-хімічному інституті ім. О.В. Богатського НАН України (Одеса) Л.М.Якубовською. Маточний 40 ммоль/л розчин АВРН готували в диметилсульфоксиді.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Інкубація з 3 – 10 мкмоль/л АВРН значно зменшувала пікову амплітуду струмів, що

активувалися в ізольованих нейронах гіпокампа у відповідь на прикладення 100 мкмоль/л гліцину (рис.1). Слід зауважити, що максимальний пригнічувальний ефект АВРН спостерігався за умов принаймні 10-15-секундної попередньої інкубації нейрона з АВРН перед прикладенням агоніста (див. рис. 1, а), в той час, як подальша інкубація з похідною бензофенону на амплітуду залишкового струму вже істотно не впливала, адже рівень пригнічення майже не відрізнявся після 15 і 135 с інкубації з АВРН (див. рис. 1,б,в). Ці спостереження дещо відрізняються від даних, отриманих нами при дослідженні впливу АВРН на ГАМК_A-рецептори [7]. Зокрема, якщо концентрація ГАМК дорівнювала 20 мкмоль/л, тобто була приблизно напівнефективною, прикладення 10 мкмоль/л АВРН спочатку викликало збільшення пікової амплітуди хлорного струму, а згодом упродовж 5–6 хв, навпаки, поступово призводило до його пригнічення порівняно з контролем [7]. Якщо ж концентрація ГАМК була майже насичуючою (500 мкмоль/л), відмічалася лише пригнічувальна фаза дії АВРН, яка розвивалася повільно. Концентрація гліцину, використана нами (100 мкмоль/л), викликає струм, що дорівнює приблизно 60% від максимального можливого [5]. На відміну від випадку з ГАМК_A-рецепторами [7] істотне зниження пікової амплітуди гліцинактивованого струму в цій роботі спостерігалось вже після короткотривалої 10 – 15-секундної інкубації з АВРН (див.рис. 1,а).

Якщо АВРН додавали без попередньої інкубації, а лише разом із агоністом гліцином, пригнічення струму було відчутно меншим (див. рис. 1,а – останні чотири струми). Це свідчить про те, що для розвитку пригнічувальної дії АВРН на гліцинові рецептори потрібний певний час (принаймні декілька секунд). Втім, десенситизація гліцинактивованого струму при наявності АВРН значно прискорювалася. Схожі результати отримано нами й у випадку ГАМК_A-рецеп-

торів, адже одночасне прикладання 500 мкмоль/л ГАМК та 10 мкмоль/л АВРН не призводило до помітного зменшення амплітуди струму [7].

На відміну від рецепторів ГАМК і гліцину, глутаматні НМДА-рецептори, які активувалися в нашій роботі прикладанням 100 мкмоль/л L-аспартату, не пригнічувалися при наявності АВРН (рис. 2). Навпаки, за 4–6 хв після початку інкубації з 10 мкмоль/л АВРН, пікова амплітуда струмів крізь НМДА-рецептори була достовірно більшою, порівняно з контрольними умовами ($P < 0,05$, тест Тьюкі для повторних вимірювань). Як уже відзначалося, збільшення

пікової амплітуди ГАМК-активованого струму під час інкубації з АВРН спостерігалось протягом короткого (а не тривалого, як у випадку НМДА-рецепторів) проміжку часу, якщо застосовувалися субмаксимальні концентрації ГАМК. Іншим характерним впливом АВРН на ГАМК_A-рецептори було вповільнення деактивації струму, тобто його релаксації після швидкого видалення агоніста. Можливо, що ці явища (збільшення амплітуди та уповільнення деактивації) взаємопов'язані та пояснюються підвищеною спорідненістю рецепторів до агоніста. Втім, для НМДА-рецепторів збільшення амплітуди не супроводжувалося пригальмо-

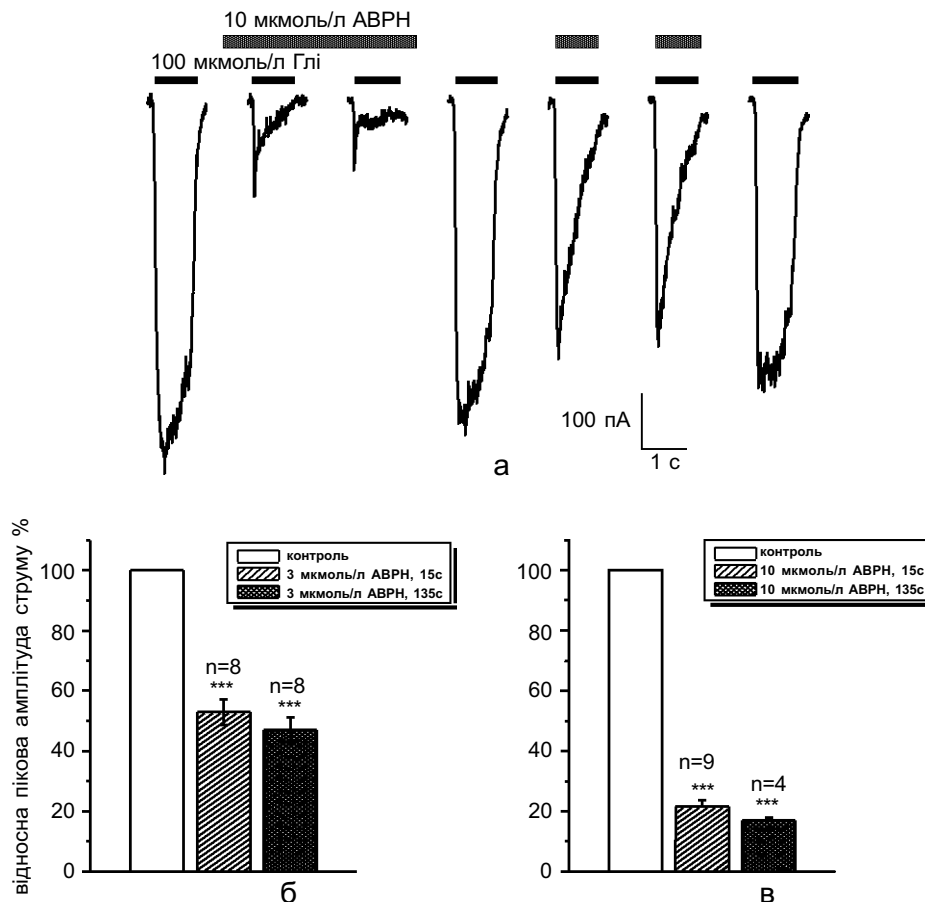


Рис. 1. Вплив 2-аміно-5-бром-2'-хлорбензофенолу (АВРН) на гліцинактивовані струми в пірамідних нейронах щура: а – залежність пригнічувальної дії від способу інкубації з 10 мкмоль/л АВРН; б і в – усереднений рівень пригнічення гліцин-активованих струмів при наявності 3 та 10 мкмоль/л відповідно АВРН після 15 та 135 с інкубації. *** $P < 0,001$ порівняно з контролем за post hoc тестом Тьюкі (б) чи тестом t Стьюдента (в); n – кількість експериментів.

вуванням процесу деактивації, адже після 6 хв інкубації з АВРН показник загальної деактивації, вимірюваний за методом, наведеним раніше [7], становив $87,9 \text{ мс} \pm 24,6 \text{ мс}$ ($n = 8$), що спричинило незначну зміну порівняно з контрольним рівнем ($82,8 \text{ мс} \pm 17,3 \text{ мс}$).

Таким чином, на підставі експериментів, проведених у цій роботі, слід зауважити, що метаболіт феназепаму, АВРН, здатний модулювати іонні струми крізь канали гліцинових рецепторів та глутаматних НМДА-рецепторів. Пригнічення гліцинактивованих струмів нейронів гіпокампа при наявності АВРН нагадувало вплив цієї та споріднених сполук на ГАМК_A-рецептори

[3, 7], проте блокування гліцинактивованих струмів відбувалося швидше (див.рис. 1). Зважаючи на певну спорідненість будови гліцинових та ГАМК_A-рецепторів [11] можна припустити, що механізм цього пригнічення схожий. Імовірно, він полягає в тому, що рецептори швидко десенситизуються при інкубації з АВРН [7]. Натомість, глутаматні рецептори типу НМДА не блокувалися, а навпаки слабо потенціювалися під впливом АВРН. Цей ефект набував статистичної достовірності лише за 4-6 хв від початку інкубації. Цікаво, що ГАМК_A-рецептори на ізольованих нейронах за такий період часу сильно блокувалися, отже механізм впливу

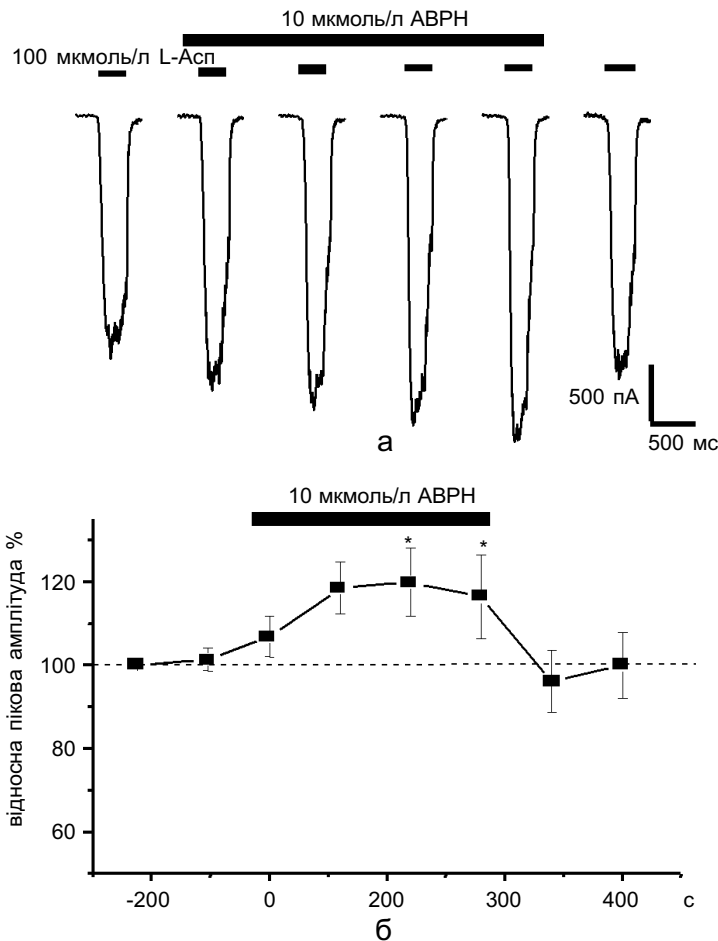


Рис. 2. Вплив 2-аміно-5-бром-2'-хлорбензофенолу (АВРН) на L-аспартатактивовані струми крізь НМДА-рецептори в пірамідних нейронах щура: а – приклад повільного підвищення пікової амплітуди L-аспартат-активованого струму при наявності 10 мкмоль/л АВРН; б – усереднені результати ($n = 8$) щодо впливу 10 мкмоль/л АВРН на струми, зумовлені активацією НМДА-глутаматних рецепторів. * $P < 0,05$ порівняно з контролем за post hoc тестом Тьюкі.

АВРН на НМДА-рецептори є відмінним.

Спостережена нами різноманітність впливів бензофенонового метаболіту феназепаму на рецепторно-каналні комплекси нейрональних мембран зумовлює необхідність подальшого вивчення біологічної активності похідних бензофенону. За умов застосування терапевтичних доз бенздіазепінових препаратів концентрація бензофенонових метаболітів у плазмі крові навряд чи сягає мікромолярного рівня [4]. Проте при передозуванні або при тривалому прийомі 1,4-бенздіазепінів вона може значно збільшуватись, а, отже, дані про впливи метаболітів на іонні канали є вкрай необхідними для розуміння відповідних реакцій організму.

M.V. Kopanitsa

ACTION OF A PHENAZEPAM METABOLITE, 2-AMINO-5-BROMO-2'-CHLOROBENZOPHENONE, ON GLYCINE AND NMDA RECEPTORS OF RAT HIPPOCAMPAL PYRAMIDAL NEURONES

Action of 2-amino-5-bromo-2'-chlorobenzophenone (ABPH), a metabolite of phenazepam, on currents evoked by the activation of glycine and glutamate NMDA receptors has been investigated in enzymatically isolated hippocampal rat pyramidal neurones. It is demonstrated that 3 – 10 μ M ABPH caused an inhibitory effect on glycine receptors which was more prominent after pre-incubation with the drug. Peak amplitude of NMDA receptor-mediated currents was weakly potentiated after prolonged (4-6 min) incubation with 10 μ M ABPH. Thus, the effects of the benzophenone metabolites should be taken into account when analysing the action of phenazepam and other benzodiazepine drugs.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андронати С.А., Авруцкий А.В., Богатский А.В., и др. Феназепам – К.: Наук. думка, 1982. – 288 с.
2. Врублевский С.В., Валеев А.Е., Черневская Н.И. Метод быстрой смены тестирующих растворов при исследованиях изолированных клеток // Физиол. журн. – 1985. – **31**, № 2. – С. 241 – 242.
3. Копаниця М.В., Руденко О.П. Похідні N-заміщених 2-аміно-5-галогенбензофенонів прискорюють десенситизацію ГАМК-активованих струмів в ізольованих нейронах Пуркін'є шурів // Арх. клін. експерим. медицини. – 2002. – **11**, № 1. – С. 22 – 25.
4. Bond A.J., Hailey D.M., Lader M.H. Plasma concentrations of benzodiazepines // Br. J. Clin. Pharmacol. – 1977. – **4**, № 1. – P. 51 – 56.
5. Kondratskaya E.L., Lishko P.V., Chatterjee S.S., Krishtal O.A. BN52021, a platelet activating factor antagonist, is a selective blocker of glycine-gated chloride channel // Neurochem. Int. – 2002. – **40**, № 7. – P. 647 – 653.
6. Kopanitsa M.V., Lambert, J.J. Modulation of GABA_A receptors by 5-bromobenzophenone derivatives depends on the presence of γ -subunit. In: Abstr. 2nd Bogomoletz-Nenci Symposium «Intracellular Signalling in Excitable Cells», 1-3 September Kyiv. – 2002. – P. 9.
7. Kopanitsa M.V., Yakubovska L.M., Rudenko O.P., Krishtal O.A. Modulation of GABA_A receptor-mediated currents by benzophenone derivatives in isolated rat Purkinje neurones // Neuropharmacology. – 2002. – **43**, № 4. – P. 764 – 777.
8. Kopanitsa M.V., Zhuk O.V., Zinkovsky V.G., Krishtal O.A. Modulation of GABA_A receptor-mediated currents by phenazepam and its metabolites // Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. – 2001. – **364**, № 1. – P. 1 – 8.
9. Olfson M., Pincus H.A. Use of benzodiazepines in the community // Arch. Intern. Med. – 1994. – **154**, № 11. – P. 1235 – 1240.
10. Olivier H., Fitz-Gerald M.J., Babiak B. Benzodiazepines revisited // J. La. State. Med. Soc. – 1998. – **150**, № 10. – P. 483 – 485.
11. Olsen R.W., Tobin A.J. Molecular biology of GABA_A receptors // FASEB J. – 1990. – **4**, № 5. – P. 1469 – 1480.
12. Turner D.M., Sapp D.W., Olsen R.W. The benzodiazepine/alcohol antagonist Ro 15-4513: binding to a GABA_A receptor subtype that is insensitive to diazepam // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 1991. – **257**, № 3. – P. 1236 – 1242.

Ин-т фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 5.12.2002