

Технологии изучения механизмов действия препаратов для коррекции когнитивных расстройств

В.Г. Скребицкий, И.Н. Шаронова

ФГБНУ “Научный центр неврологии” (Москва)

Дефицит когнитивных функций, включающих память, внимание, способность к анализу ситуаций, ориентацию в пространстве, сопровождается развитием многих неврологических заболеваний, в том числе относящихся к группе расстройств движений, и часто служит наиболее ранним их проявлением. Когнитивные расстройства наблюдаются при болезнях Паркинсона, Гентингтона, Альцгеймера и других нейродегенеративных патологиях, а также сопровождают процессы нормального старения мозга [1]. Расстройства когнитивных функций у пациентов с болезнью Паркинсона при детальном нейропсихологическом тестировании выявляются в 90–95% случаев [2, 3]. Для коррекции когнитивных расстройств используют фармакологические препараты, объединяемые под общим названием “ноотропы” (от греч. “ноос” – разум и “тропос” – стремление, средство). Под термином “ноотропы” или “cognitive enhancers”, “smart drugs” понимают довольно большой круг соединений, воздействующих на когнитивные функции, с поливалентным механизмом действия.

Первым ноотропным препаратом, введенным в клиническую практику, был пирацетам. Он был синтезирован в 1963 г. румынским химиком и психиатром С. Giurgea как структурный аналог основного тормозного медиатора нервной системы – γ -аминомасляной кислоты (ГАМК). Первоначально предполагалось, что этот препарат можно будет использовать как средство против укачивания. Однако в ходе исследований, проведенных в 1972 г., было обнаружено, что пирацетам улучшает когнитивные функции и память подобно

психостимуляторам, но в отличие от них не оказывает характерных побочных эффектов. Тогда же был предложен и сам термин “ноотропы” для обозначения класса препаратов, улучшающих высшие функции головного мозга и не имеющих побочных эффектов, присущих психомоторным стимуляторам. В настоящее время к этому классу относятся средства с самыми разными фармакологическими свойствами и эффектами. В самом общем смысле ноотропами называют средства, которые “оказывают прямое активирующее действие на обучение, улучшают память и умственную деятельность, повышают устойчивость мозга к агрессивным воздействиям окружающей среды” (определение Всемирной организации здравоохранения).

С открытия пирацетама (ноотропила) и началась история применения ноотропных препаратов, синтез новых лекарственных средств этого класса и внедрение их в лечебную практику. Однако для многих препаратов, используемых в коррекции когнитивных расстройств, механизмы действия зачастую неясны, отбор их осуществляется главным образом на основании эмпирических наблюдений и поведенческих экспериментов на животных, что может затруднять их эффективное использование и обуславливает необходимость изучения мишеней и механизмов их действия. Понимание нейрональных механизмов действия этих препаратов, включая данные об изменениях эффективности синапсов, модуляции рецепторов и ионных каналов, может также способствовать созданию новых соединений с ноотропными свойствами.

Ниже мы рассматриваем некоторые технологии, применяемые в настоящее время для изучения клеточных механизмов действия ноотропов. Акцент будет сделан на электрофизиологических методах, широко применяемых в лабораториях и дающих значительную часть информации по изучаемому вопросу, хотя ими и не исчерпывается арсенал современных технологий в данной области нейронауки.

Динамика спонтанной и вызванной активности, регистрируемой микроэлектродом

Эта технология, будучи методически относительно простой, дает возможность быстро оценить, оказывает ли препарат какое-либо действие, и если да, то в чем оно состоит — в усилении или ослаблении возбуждения либо торможения. Регистрация может проводиться вне- или внутриклеточным микроэлектродом как на мозге целого животного, так и на срезе той или иной церебральной структуры. Метод изготовления и применения срезов мозга для решения различных нейрофизиологических задач был неоднократно детально описан и апробирован [4]. Эта технология, созданная в 1950-х годах, была впервые применена и развита в России сотрудником лаборатории функциональной синаптологии Института мозга В.С. Воробьевым и в дальнейшем постоянно совершенствовалась [5]. Для изучения механизмов действия препаратов она имеет ряд достоинств: вещество вводится непосредственно в проточную жидкость, омывающую срез, в точно известной концентрации; исследователь видит ту группу нейронов (или даже нейрон), от которых производится регистрация и др. Типичный пример такой записи показан на рис. 1, где внутриклеточным электродом регистрировались ответы пирамидного нейрона поля CA3 гиппокампа на стимуляцию мшистых волокон — синаптического входа к этим клеткам. Ответы записывались до (A1), во время введения эндогенного пептида — энкефалина (A2) и после его “отмыва”. Хорошо видно, что энкефалин заметно

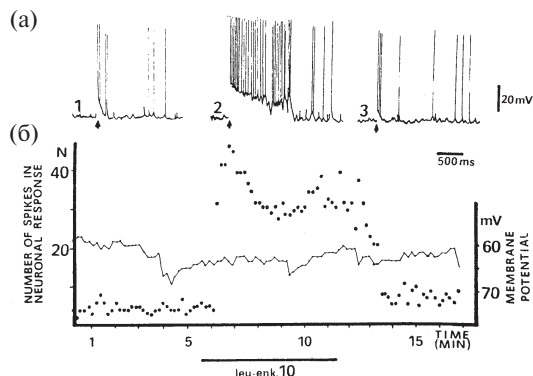


Рис. 1. Внутриклеточная регистрация изменений ответов нейрона поля CA3 в срезе гиппокампа под действием лей-энкефалина (10 мкМ). а — примеры ответов до (1), во время (2) и после (3) аппликации энкефалина. б — графики изменений мембранного потенциала (сплошная линия) и числа спайков в ответе (точки) в контроле и при действии энкефалина.

усиливает разряд пирамидного нейрона. Однако эта технология имеет ряд ограничений: она не дает возможности ответить на вопрос, обусловлено ли усиление ответов увеличением выделения медиатора из окончаний мшистых волокон, перестройками в пирамидных клетках или еще какими-то факторами. Для решения этих вопросов требуются другие технологии, о которых речь пойдет ниже.

Технология микроэлектродной регистрации нашла свое применение и в качестве инструмента нейрофизиологического картирования при выполнении нейрохирургических стереотаксических операций, в частности хирургической модуляции при болезни Паркинсона [6]. Эта методика используется также для изучения механизмов действия лекарственных препаратов у пациентов с болезнью Паркинсона [7].

Регистрация ионных токов с помощью метода пэтч-кламп

Регистрация ионных токов в срезах мозга

Развитием технологии внутриклеточной регистрации активности отдельных нервных клеток с помощью “острых” микроэлектродов

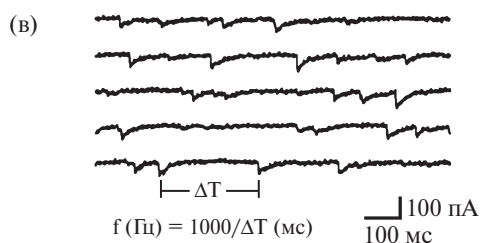
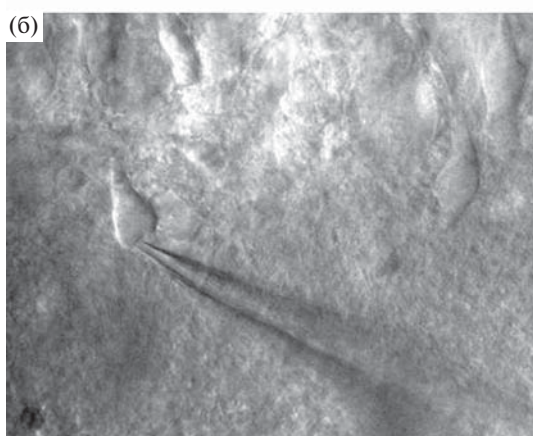
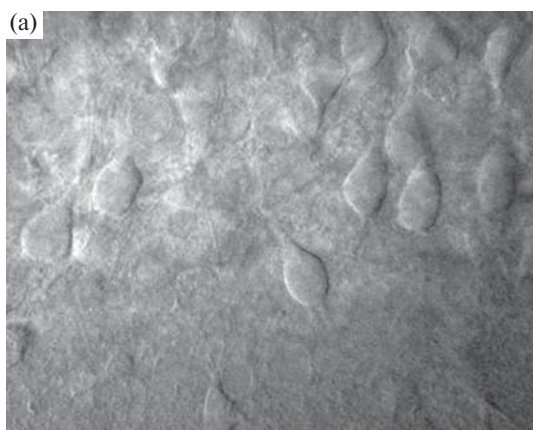


Рис. 2. Фотографии пирамидных клеток в слое stratum pyramidale поля CA1 гиппокампа (а) и отдельной клетки с регистрирующей микропипеткой (б); спонтанные тормозные токи, зарегистрированные в этой клетке (в).

очень плотный (гигаомный) контакт, не проникая в клетку. Этот метод получил название “patch-clamp” (от англ. “patch” (заплата, фрагмент) – участок мембраны под пипеткой и “clamp” – фиксация трансмембранного потенциала этого фрагмента или целой клетки) [8]. Существует несколько конфигураций метода пэтч-кламп, одна из которых – регистрация от целой клетки (“whole-cell recording”) – наиболее часто применяется как для нейронов в срезах мозга, сохраняющих синаптические связи с другими клетками, так и для нейронов, изолированных из срезов мозга, о которых будет сказано в следующем разделе. С момента введения метода пэтч-кламп в 1981 г. и последующего развития рынка коммерческих усилителей этот метод фактически вытеснил метод внутриклеточной регистрации с помощью “острых” электродов.

Преимущество данной технологии по сравнению с методом внутриклеточной регистрации состоит в возможности фиксировать определенную разность потенциалов между сторонами мембраны и осуществлять контроль за химическим составом вне- и внутриклеточной среды. В этих хорошо контролируемых условиях измеряют ионные токи, проходящие через мембрану, что в конечном счете позволяет делать выводы о том, как рецепторы и ионные каналы реагируют на электрическое и химическое воздействие.

На рис. 2 даны микрофотографии расположения клеток в пирамидном слое поля CA1 гиппокампа (см. рис. 2а) и пирамидной клетки вместе с регистрирующей микропипеткой (см. рис. 2б). На том же рисунке дана типичная запись спонтанных ионных токов в нейроне, показанном на фотографии (см. рис. 2в). Видно, что активность осуществляется миниатюрными токами амплитудой от 10–15 до 300–400 пА, которые являются результатом воздействия на клеточную мембрану квантов ГАМК, спонтанно выделяющихся из терминалей тормозных интернейронов в разных слоях поля CA1.

Технология регистрации ионных токов в срезах позволяет получить информацию о

является разработка техники **пэтч-кламп регистрации** (метод фиксации потенциала). Кардинальное отличие этого метода состоит в использовании пипеток с относительно широким (около 1 мкм) отверстием, которые способны формировать с мембраной клетки

механизмах действия физиологически активных веществ, включая вещества с ноотропными свойствами. К настоящему времени нами получены данные о синаптических механизмах действия одного из новых ноотропных препаратов — ноопепта. Этот препарат был создан на основе первого ноотропного препарата пирацетама и представляет собой дипептид, имеющий в своей основе аминокислоту пролин. Показано, что ноопепт обладает ноотропным, нейропротекторным и анксиолитическим действием, он улучшает способность к обучению, память, препятствует развитию амнезии, вызванной блокадой центральных холинергических структур [9].

В опытах на срезах гиппокампа мы обнаружили, что введение в проточную среду 1 мкМ ноопепта приводит к существенному увеличению амплитуды и частоты (примерно в два раза) миниатюрных токов, связанных с активацией ГАМК_A-рецепторов. При блокаде синаптической передачи с помощью тетродотоксина изменений спонтанных тормозных токов под действием ноопепта не наблюдалось, что позволило предположить, что мишенью ноопепта являются не сами пирамидные нейроны, а тормозные интернейроны, заканчивающиеся на пирамидах. Это предположение нашло подтверждение в экспериментах с регистрацией активности интернейронов радиального слоя поля СА1, в которых было обнаружено, что спонтанная активность этих нейронов значительно усиливается в присутствии ноопепта (рис. 3).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что одним из механизмов действия ноопепта является усиление тормозных процессов в гиппокампе. Физиологическое значение обнаруженного эффекта состоит в увеличении тонического торможения во внутригиппокампальных путях, что может лежать в основе анксиолитического действия препарата.

К числу ноотропных препаратов пептидной природы относится селанк. Название препарата означает “селективный анксиолитик”. Селанк — это регуляторный пептид, синтетический аналог короткого фрагмента тяжелой

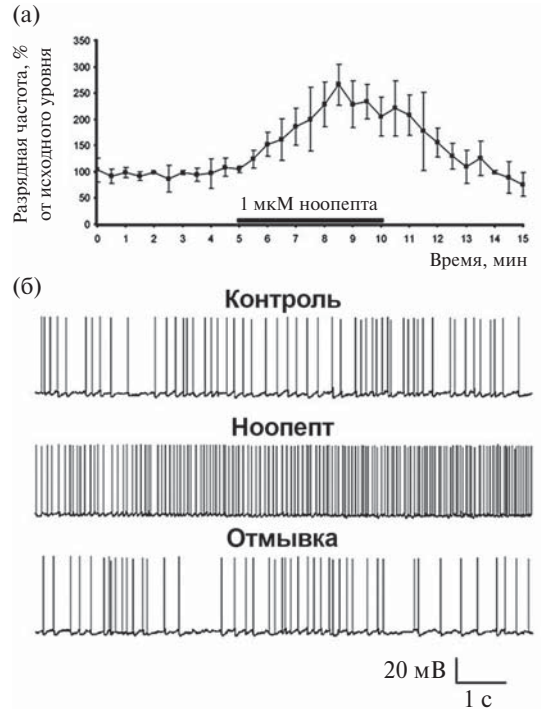


Рис. 3. Регистрация влияния ноопепта (1 мкМ) на активность интернейрона в stratum radiatum поля СА1 (регистрация в режиме фиксации тока). а — временной ход изменений частоты разрядов интернейронов под действием ноопепта (усреднение по 5 клеткам \pm SEM). б — типичный пример влияния ноопепта на спонтанные разряды интернейрона [10].

цепи иммуноглобулина G человека (тетрапептид тафтсин), удлиненный трипептидом Pro-Gly-Pro ноотропного действия. Селанк разработан в Институте молекулярной генетики РАН совместно с НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН. При экспериментальном изучении этого препарата выявлено сочетание анксиолитического эффекта со стимулирующим и активирующим влиянием на мнестические и когнитивные функции [11, 12]. В 2009 г. этот препарат вошел в клиническую практику и используется в качестве анксиолитика, не обладающего седативным и миорелаксирующим действием. Кроме того, селанк может применяться как дополнитель-

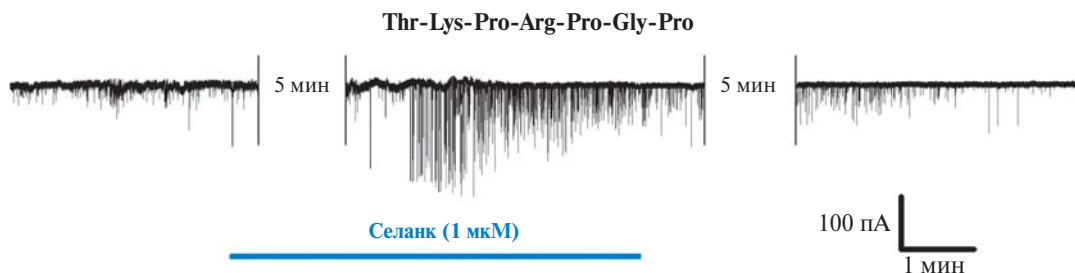


Рис. 4. Действие селанка на амплитуду и частоту тормозных постсинаптических токов в пирамидных нейронах поля CA1.

ное средство в лечении некоторых экстрапирамидных заболеваний [13]. Нами были проведены исследования влияния селанка на синаптическую активность в срезах гиппокампа, которые позволили выявить увеличение амплитуды и частоты спонтанных тормозных постсинаптических токов в пирамидных нейронах поля CA1 гиппокампа под действием этого пептида (рис. 4). Таким образом, ноотропные препараты ноопепт и селанк способствуют поддержанию определенного уровня торможения в гиппокампе – структуре, играющей ключевую роль в регуляции уровня бодрствования и осуществлении мнестических функций.

Регистрация ионных токов в изолированных нейронах

Существенный прогресс в изучении рецепторных и молекулярных механизмов действия физиологически активных веществ, включая лекарственные препараты, улучшающие когнитивные функции, был достигнут благодаря внедрению в практику экспериментальных исследований технологии регистрации ионных токов в изолированных нейронах. Как уже упоминалось выше, метод основан на регистрации токов в условиях фиксации напряжения – пэтч-кламп, он позволяет регистрировать токи, связанные с активацией определенного типа рецепторов или ионных каналов. Именно с помощью этого метода были получены основные данные о свойствах как потенциал-, так и лигандуправляемых ионных каналов [14].

Преимущество регистрации с помощью метода пэтч-кламп от изолированных нейронов по сравнению со срезами мозга состоит в возможности проведения исследований на нейронах, изолированных от синаптических воздействий со стороны других нейронов, а также в исключении других неконтролируемых влияний. Помимо возможности контролировать разность потенциалов между сторонами мембраны экспериментатор может помещать клетку в среду с определенным химическим составом, что обеспечивает возможность активировать определенный тип рецепторов и потенциалуправляемых ионных каналов, точно контролировать концентрацию исследуемых веществ и измерять кинетику активации рецепторов.

Наиболее частыми объектами, используемыми в экспериментах подобного рода, являются нейроны, выделенные из срезов мозга после энзиматической обработки, и трансфектированные клетки. Однако перечисленные объекты имеют ряд ограничений и недостатков. Так, применение энзиматической обработки при выделении нейронов из срезов мозга не гарантирует сохранности рецепторных и электрических свойств ионных каналов. При трансфекции рецепторов в гетерологических системах могут отсутствовать белковые комплексы и другие внутриклеточные системы, закрепляющие рецепторы в мембране и поддерживающие их функции. Избежать этих ограничений метода позволяет впервые разработанная в нашей лаборатории В.С. Воробьевым оригинальная методика изо-

ляции клеток из срезов с помощью вибродиссоциации [15]. Достоинство метода вибродиссоциации состоит в том, что клетки изолируются без применения протеолитических ферментов, которые неизбежно влияют на физиологическую активность клетки. Эта техника позволяет получить изолированные нейроны из любой части мозга, а сама процедура занимает несколько минут. Кроме того, при таком методе изоляции нейронов на них сохраняются синаптические бутоны, что дает возможность исследовать спонтанные постсинаптические токи.

В.С. Воробьев разработал также методику быстрого подведения к клетке изучаемых веществ в нужной концентрации [16]. На рис. 5 показаны основные принципы технологии регистрации токов от изолированных клеток и подведения к ним изучаемых веществ.

С использованием этой технологии нами были проведены исследования влияния на активность лигандуправляемых каналов ряда препаратов, обладающих нейропротекторными и антиамнестическими свойствами. Одним из них является семакс. Несмотря на то что семакс уже в 1994 г. был зарегистрирован как лекарственный препарат и в настоящее время широко используется в неврологической практике при острой и хронической недостаточности мозгового кровообращения, а также в качестве ноотропного и потенциально нейропротекторного лекарственного средства при нейродегенеративных заболеваниях и расстройствах движений, механизм его действия и специфические рецепторы в настоящее время недостаточно ясны. Широкий спектр эффектов, вызываемых этим препаратом, позволяет предполагать и множественность мишеней и рецепторных систем, взаимодействие с которыми обеспечивает эти эффекты. Используя технологию регистрации токов с помощью метода пэтч-кламп, мы выявили способность семакса модулировать активность ГАМК_A-рецепторов центральных нейронов.

Мы обнаружили, что при регистрации ГАМК-активируемых токов в изолированных

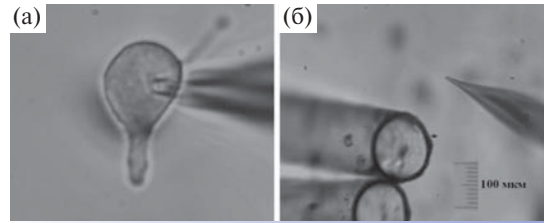


Рис. 5. Метод регистрации токов от изолированных нейронов. а – изолированная клетка Пуркинью мозжечка, находящаяся на регистрирующей пипетке. б – апплицирующая система.

клетках Пуркинью мозжечка введение семакса в перфузирующий раствор вызывает постепенный рост амплитуды ответов, достигавший максимальной величины (до 250% от контроля) на 5–7-й минуте после начала аппликации пептида (рис. 6). При отмывании семакса из перфузирующего раствора в большинстве случаев не происходило полного возврата к исходной амплитуде тока. В тех случаях, когда наблюдали частичный возврат ответа к контролю, повторная аппликация семакса также вызывала рост амплитуды ответа (см. рис. 6).

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что семакс способен модулировать активность ГАМК_A-рецепторов. Относительно медленное развитие эффектов и слабая их обратимость позволяют предположить участие систем вторичных посредников в их реализации. Исходя из того факта, что семакс является производным АКТГ (4–10), можно предположить, что этот пептид, так же как и его прототип, взаимодействует с одним из типов меланокортиновых рецепторов (MCR), функционально связанных с аденилатциклазой и опосредующих свои эффекты путем активации цАМФ-зависимого сигнального пути [18]. Эти данные позволяют считать, что потенциация ГАМК-активируемых токов в нейронах Пуркинью под действием семакса связана с активацией протеинкиназы А, вызванной взаимодействием пептида с каким-либо из типов MCR. Обнаруженная модуляция активности ГАМК_A-рецепторов

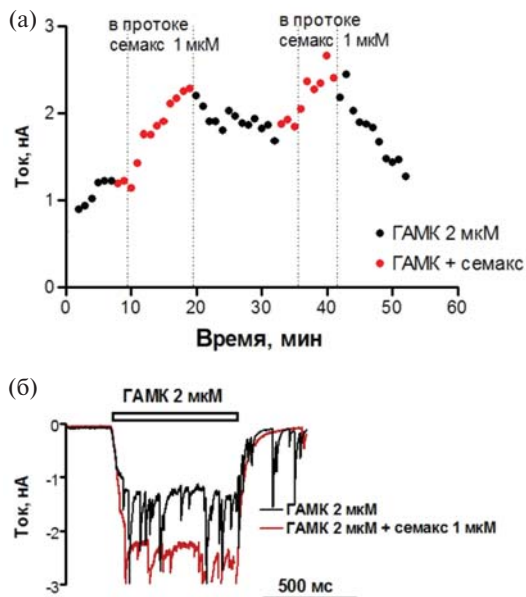


Рис. 6. Потенциация ГАМК-активируемых токов в клетках Пуркинье мозжечка под действием семакса. а – график, иллюстрирующий временной ход изменений амплитуды токов, вызываемых аппликацией 2 мкМ ГАМК, при введении в перфузирующий раствор семакса в концентрации 1 мкМ (время присутствия семакса в растворе указано вертикальными линиями). По оси ординат – амплитуда ГАМК-активируемого тока в нА, по оси абсцисс – время. Поддерживаемый потенциал – 70 мВ. б – примеры записи токов в контроле (черная кривая) и в присутствии семакса в перфузирующем растворе (красная кривая) [17].

может быть одним из механизмов, обеспечивающих нейропротекторные и ноотропные эффекты семакса.

Длительная потенциация ответов гиппокампа

Обнаружение феномена длительной потенциации (ДП) в гиппокампе открыло широкие возможности для изучения молекулярных механизмов синаптической пластичности, лежащей в основе обучения и памяти. Суть этого явления состоит в длительном

повышении эффективности синаптической передачи после высокочастотной стимуляции синаптических входов. Одной из основных современных технологий исследования ДП является использование переживающих срезов гиппокампа. Модель ДП используется не только для изучения механизмов синаптической пластичности, но и для выявления возможных способов фармакологической коррекции нарушений ДП, вызываемых различными воздействиями, имитирующими патологические процессы в центральной нервной системе (гипоксия, алкогольная интоксикация и др.). Модель повреждения ДП под действием β -амилоидного пептида (А-бета) была использована нами с целью выявления возможности коррекции этих нарушений антиоксидантами и ноотропами [19]. Одним из препаратов, широко применяемых в настоящее время для лечения болезни Альцгеймера, является антиамнестический препарат донепезил. В наших экспериментах на срезах гиппокампа впервые была обнаружена способность донепезила устранять подавление ДП, вызываемое А-бета [20]. Описано несколько мишеней для донепезила, с которыми может быть связан его терапевтический эффект, включая σ_1 -рецепторы (Sig1-Rs) [21]. Показано, что Sig1-Rs участвуют в патогенезе таких заболеваний нервной системы, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, шизофрения и др., а агонисты этих рецепторов проявляют свойства нейропротекторов и антиамнестиков на различных моделях нарушения когнитивных функций, в том числе при введении А-бета [22, 23].

С использованием технологии работы на срезах гиппокампа мы показали, что ДП, блокированная А-бета (1–42), восстанавливается, если вместе с А-бета апплицируется донепезил в низких концентрациях (0,1; 0,5 или 1 мкМ) (рис. 7). В то же время если совместно с А-бета и донепезилом вводили неселективный блокатор Sig1-Rs галоперидол, то донепезил терял способность восстанавливать ДП (см. рис. 7). Это наблюдение подтверждает

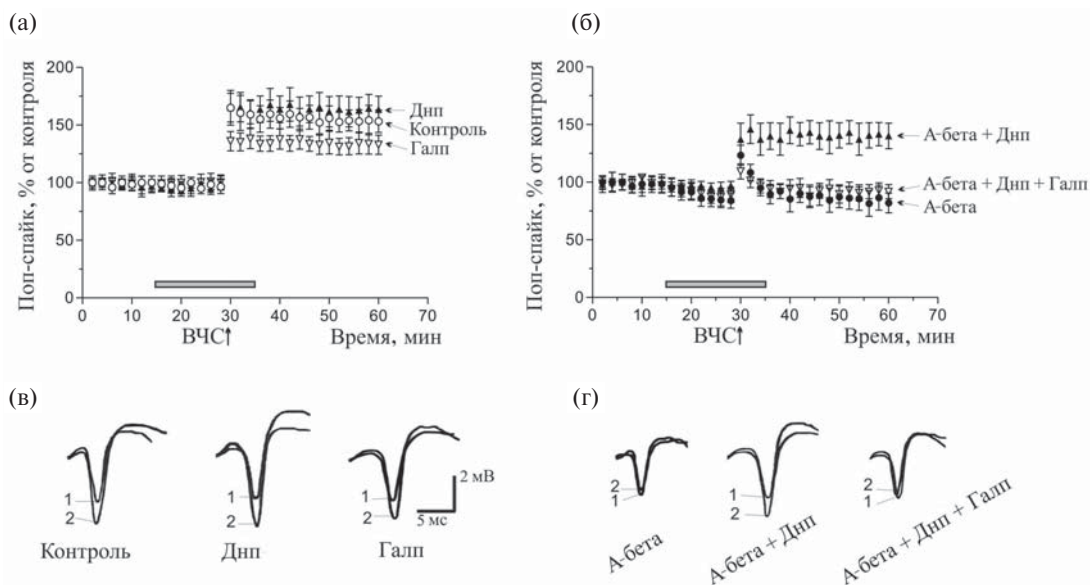


Рис. 7. Влияние донепезила на контрольную (а) и угнетенную пептидом А-бета (б) ДП. а, б – изменение амплитуды поп-спайка в ходе эксперимента, вызванное добавлением в перфузат донепезила (Днп), галоперидола (Галп) в контрольных срезах (а) и в срезах, обработанных 200 нМ А-бета (б). Прямоугольник над горизонтальной осью показывает длительность аппликации препаратов. в, г – записи фокальных ответов до (1) и через 30 мин после высокочастотной стимуляции (ВЧС) (2) в контроле (в) и от срезов, обработанных А-бета (г) [24].

участие Sig1-Rs в нейропротекторных эффектах донепезила.

Оптические технологии

Для выявления клеточных мишеней и механизмов действия ноотропных препаратов используется также технология оптической регистрации активности нейронов, в частности метод оптической регистрации Ca^{2+} -сигнала. Он позволяет количественно оценить влияние препарата на динамику изменений концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , а также определить региональное распределение и клеточную специфичность действия этих веществ. Такая информация также важна для понимания механизмов действия исследуемых препаратов, поскольку изменение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} является начальным звеном многих сигнальных каскадов, запускаемых внутри

нейрона при действии физиологически активных веществ.

С использованием метода оптической регистрации Ca^{2+} -сигнала нами было исследовано влияние ноопепта на спонтанную активность нейронов в органотипических культурах гиппокампа, сохраняющих анатомически черты этой структуры. Для регистрации активности использовали чувствительный к уровню $[Ca^{2+}]_i$ флуоресцентный краситель Fluo-4, который окрашивал нейроны, не проникая в астроглиальные клетки, выявляемые с помощью сульфородамина (рис. 8). Обнаружили, что под действием ноопепта возрастают частота, амплитуда и длительность кальциевых сигналов в stratum radiatum (область локализации тормозных интернейронов), в слое же пирамидных нейронов значимого изменения этих параметров не происходит. Эти наблюдения коррелируют с полученными ранее данными об усилении активности тормозных интер-

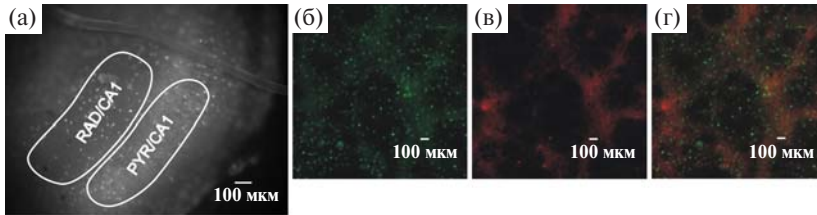


Рис. 8. Источники Ca^{2+} -сигнала. а – области пирамидного (PYR) и радиального (RAD) слоев гиппокампа. б – окраска клеток с помощью Fluor-4. в – окраска клеток с помощью сульфородамина 101. г – суперпозиция изображений, представленных на рис. 8б, 8в.

нейронов радиального слоя и подтверждают сделанное ранее предположение о том, что первичной мишенью ноопепта являются ГАМКергические интернейроны области stratum radiatum.

Технология молекулярного моделирования структуры и функции ионных каналов

Важной технологией, позволяющей раскрывать механизмы взаимодействия лекарственных средств с нейрональными рецепторами и ионными каналами, является молекулярное моделирование, которое стало одной из наиболее интенсивно развивающихся областей науки. Гомологическое моделирование в сочетании с электрофизиологическими и биохимическими подходами позволяет эффективно исследовать активность различ-

ных биологически важных веществ и прогнозировать локализацию их сайтов связывания.

При исследовании молекулярных мишеней ноопепта мы обнаружили, что этот дипептид в наномолярных концентрациях ингибирует активность одного из типов калиевых каналов [25]. Использование метода молекулярного моделирования позволило показать, что молекула ноопепта в энергетически наиболее выгодной конформации может взаимодействовать с наружным устьем калиевого канала (рис. 9).

Таким образом, технология молекулярного моделирования дает возможность получить дополнительную информацию о рецепторных сайтах, с которыми могут взаимодействовать ноотропные препараты, что имеет первостепенное значение для синтеза новых лекарственных средств с заданными свойствами.

Заключение

Когнитивные расстройства разной степени тяжести сопровождают развитие большого числа неврологических заболеваний и процессы нормального старения организма, что определяет актуальность исследования механизмов действия препаратов, способствующих нормализации когнитивных процессов. Использование поведенческих моделей для оценки эффективности таких препаратов не позволяет выявить клеточные и молекулярные мишени их действия. Применение современных технологий исследования нейрональной активности мозга открывает возможности

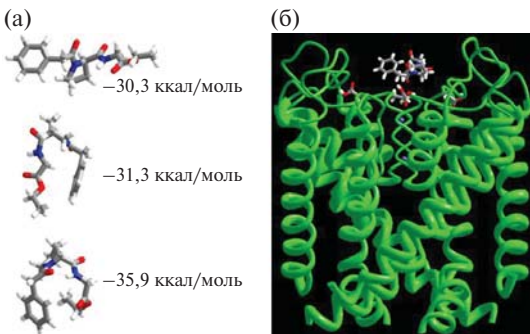


Рис. 9. Модель калиевого канала Kv1.2. а – различные конформации молекулы ноопепта. б – комплекс ноопепта с калиевым каналом, соответствующий минимуму энергии лиганд-рецепторных взаимодействий.

для анализа нарушений синаптической пластичности, лежащих в основе когнитивного дефицита, а также позволяет идентифицировать клеточные и молекулярные мишени действия изучаемых фармакологических средств, а именно типы нейронов, вовлеченных в реализацию эффектов, и рецепторные системы и ионные каналы, с которыми взаимодействуют эти препараты.

Список литературы

1. Bishop N.A., Lu T., Yankner B.A. Neural mechanisms of ageing and cognitive decline. *Nature*. 2010;464(7288):529-35.
2. Захаров В.В., Ахутина Е.В., Яхно Н.Н. Нарушение памяти при болезни Паркинсона. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 1999;4:17-22.
3. Скоромец А.А., Тимофеева А.А., Алиев К.Т. и др. Когнитивные функции при болезни Паркинсона и паркинсонизме, их коррекция пронораном. *Эффективная фармакотерапия. Медфорум*. 2014;17:6-14.
4. Schwartzkroin P.A. To slice or not to slice. In: *Electrophysiology of isolated Mammalian CNS Preparation* (eds. G.A. Kerkut, H.V. Wheal). London: Acad. Press, 1981: 15-50.
5. Скребицкий В.Г., Воробьев В.С. Переживающие срезы мозга как модель для изучения локализации и организации церебральных функций. В кн.: *Локализация и организация церебральных функций*. М., 1978: 148-9.
6. Низаметдинова Д.М., Тюрников В.М., Федоренко И.И. и др. Микроэлектродная регистрация нейрональной активности в хирургии болезни Паркинсона. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии*. 2016;2:42-5.
7. Lozano A.M., Snyder B.J., Hamani C. et al. Basal ganglia physiology and deep brain stimulation. *Mov. Disord*. 2010;25:S71-5.
8. Hamill O.P., Marty A., Neher E. et al. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch*. 1981;391:85-100.
9. Радионова К.С., Бельник А.П., Островская Р.У. Оригинальный ноотропный препарат "Ноопепт" устраняет дефицит памяти, вызванный блокадой M- и H-холинорецепторов у крыс. *Бюлл. эксперим. биологии и медицины*. 2008;7:65-8.
10. Kondratenko R.V., Derevyagin V.I., Skrebitsky V.G. Novel nootropic dipeptide Noopept increases inhibitory synaptic transmission in CA1 pyramidal cells. *Neurosci. Lett*. 2010;476:70-3.
11. Козловская М.М., Саркисова К.Ю., Козловский И.И. Влияние гептапептида селанка на депрессию поведения высоко- и низкотрещивных мышей Balb/c и C57Bl/6 и крыс с наследуемой депрессивностью поведения WAG/Rij. *Психофармакол. биол. наркол*. 2005;2:939-45.
12. Зозуля А.А., Незнамов Г.Г., Сюнякова Т.С. и др. Эффективность и возможные механизмы действия нового пептидного анксиолитика Селанка при терапии генерализованного тревожного расстройства и неврастении. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. 2008;4:38-48.
13. Иллариошкин С.Н., Веревитина И.А., Журавлева Е.Ю. и др. Применение гептапептида для лечения эссенциального тремора и способ лечения такого тремора. Патент РФ на изобретение № 2155065. М., 2011.
14. Hille D. *Ionic channels of excitable membrane*. 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2001. 814 p.
15. Vorobjev V.S. Vibrodissociation of sliced mammalian tissue. *J. Neurosci. Methods*. 1991;38:145-51.
16. Vorobjev V.S., Sharonova I.N., Haas H.L. A simple perfusion system for patch-clamp studies. *J. Neurosci. Methods*. 1996;68:303-7.
17. Шаронова И.Н., Буканова Ю.В., Мясоедов Н.Ф., Скребицкий В.Г. Модуляция ГАМК- и глицинактивируемых токов препаратом "Семакс" в изолированных нейронах мозга. *Бюлл. эксперим. биологии и медицины*. 2017;11:564-9.
18. Catania A., Gatti S., Colombo G., Lipton J.M. Targeting melanocortin receptors as a novel strategy to control inflammation. *Pharmacol. Rev*. 2004;56:1-29.
19. Kapay N.A., Popova O.V., Isaev N.K. et al. Mitochondria-targeted plastoquinone antioxidant SkQ1 prevents amyloid- β -induced impairment of long-term potentiation in rat hippocampal slices. *J. Alzheimers Dis*. 2013;36:377-83.
20. Kapay N.A., Bukanova J.V., Solntseva E.I., Skrebitsky V.G. Donepezil in a narrow concentration range augments control and impaired by beta-amyloid peptide hippocampal LTP in NMDAR-independent manner. *Cell Mol. Neurobiol*. 2012;32:219-26.



21. Meunier J., Ieni J., Maurice T. The anti-amnesic and neuroprotective effects of donepezil against amyloid β_{25-35} peptide-induced toxicity in mice involve an interaction with the sigma1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 2006;149:998-1012.
22. Collina S., Gaggeri R., Marra A. et al. Sigma receptor modulators: a patent review. *Expert. Opin. Ther. Pat.* 2013;23:597-613.
23. van Waarde A., Ramakrishnan N.K., Rybczynska A.A. et al. The cholinergic system, sigma-1 receptors and cognition. *Behav. Brain. Res.* 2011;221:543-54.
24. Solntseva E.I., Kapai N.A., Popova O.V. et al. The involvement of sigma1 receptors in donepezil-induced rescue of hippocampal LTP impaired by beta-amyloid peptide. *Brain Res. Bull.* 2014;105:56-61.
25. Bukanova J.V., Solntseva E.I., Skrebitsky V.G. Selective suppression of the slow-inactivating potassium currents by nootropics in molluscan neurons. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2002;5:229-37.