

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова
Российской Академии Наук

Научный доклад об основных результатах подготовленной научно-
квалификационной работы (диссертации)

**Анализ механизмов внутриклеточной трансдукции, обеспечивающих
нейропротекцию при гиперактивации рецепторов глутамата**

Иванова Мария Андреевна

06.06.01 Биологические науки
03.03.01 Физиология

Научный руководитель
д.б.н. Антонов Сергей Михайлович

Санкт-Петербург
2022

Общая характеристика работы **Актуальность темы исследования**

Одной из важнейшей проблемой фундаментальной науки и трансляционной медицины являются структурно-функциональные изменения мозга, вызванные потерей нейронов - нейродегенеративные заболевания. По данным Всемирной Организации Здравоохранения, только для деменции, во всем мире было подтверждено около 55 миллионов диагнозов, из них более 60% проживают в странах с низким и средним уровнем дохода. Поскольку доля пожилых людей в населении увеличивается почти во всех странах, ожидается, что это число вырастет до 78 миллионов в 2030 году и 139 миллионов в 2050 году (WHO report, 2021). Несмотря на многочисленные исследования в этой области, исследования на клинической стадии имеют небольшой прогресс и не разработан подход к лечению, только купирование отдельных симптомов [3, 39]. Основной преградой является отсутствие единого представления о молекулярных и клеточных механизмах играющих роль при нейродегенерации и нейропластичности [11, 26, 27, 30].

Одним из механизмов развития патологического состояния при нейродегенерации является гиперактивация глутаматных рецепторов нейронов центральной нервной системы или эксайтотоксичность. Этот процесс вовлечен в патогенез многих нейродегенеративных заболеваний, таких как спинно-мозжечковая атрофия, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, ишемические инсульты и повреждение мозга при физической травме [16-19, 34]. Причиной эксайтотоксичности могут являться большое количество медиатора глутамата в межклеточном пространстве, а так же системное повышение уровня аминокислоты L-гомоцистеина [8, 15, 21, 23]. Патологическое накопление агонистов рецепторов глутамата приводит к нарушению клеточного баланса ионов, ухудшение работы других субклеточных систем, приводящее к гибели нейронов [6, 7, 9, 38].

Существуют механизмы, поддерживающие ионный баланс и обеспечивающие своевременное восстановление уровня вторичных мессенжеров в условиях кратковременного нейротоксического воздействия и все они частично зависят от циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) [24]. Известно, что передача сигналов цАМФ имеет решающее значение для выживания нейронов и роста аксонов [4, 5]. Стимуляция синтеза цАМФ аденилатциклазой при патологии глутаматергической системы рассматривается как потенциальный нейропротекторный механизм [28].

Однако, вопрос о выявлении участников и механизмов, вовлеченных в нейропротекторный сигнальный каскад в нейронах ЦНС, остается актуальным. Понимание этих процессов позволит в дальнейшем применить полученные данные для разработки подхода в терапии и повышения качества жизни, как больного человека, так и здорового человека.

Цель и задачи исследования

Цель исследования:

Исследовать эффект активации аденилатциклазы форсколином в условиях нейротоксического действия глутамата или гомоцистеина, и провести сравнительный анализ нейропротекторных механизмов в нейронах мозжечка и коры головного мозга.

Задачи исследования:

1. Оценить роль активации аденилатциклазы 1 мкМ форсколином на выживаемость нейронов коры головного мозга и мозжечка при нейротоксическом стрессе, вызванном 100 мкМ глутаматом или 100 мкМ L-гомоцистеином;
2. Определить участие ключевых цАМФ- и кальций-зависимых протеинкиназ на эффект действия форсколина (краткосрочный, 4 часа и долгосрочный, 24 часа);
3. Оценить изменения экспрессии проапоптотических белков Cas-3, p53, BAX, AIF и антиапоптотического белка Bcl-2 в условиях эксайтотоксичности и при активации аденилатциклазного каскада в кортикальных нейронах и нейронах мозжечка;
4. Проанализировать динамику изменений внутриклеточного кальция при глутамат-опосредованном нейротоксическом стрессе и на фоне действия форсколина на нейроны коры головного мозга и мозжечка.

Положения, выносимые на защиту

1. В условиях гиперактивации рецепторов глутамата активация аденилатциклазы форсколином предотвращает гибель нейронов коры головного мозга и мозжечка крыс при кратковременном эксайтотоксическом стрессе. В условиях долговременной эксайтотоксичности активация аденилатциклазы форсколином поддерживает жизнеспособность нейронов, за счет уменьшения доли апоптотических и некротических нейронов коры головного мозга и мозжечка крыс.
3. Протеинкиназа А и СаМКII являются ключевыми участниками в реализации нейропротекторного механизма активации аденилатциклазы на фоне долговременного эксайтотоксического стресса в нейронах коры головного мозга крыс.
4. Протеинкиназа А и протеинкиназа С являются ключевыми участниками в реализации нейропротекторного механизма активации аденилатциклазы на

фоне кратковременного и долговременного эксайтотоксического стресса в нейронах мозжечка крыс.

5. Моделирование условий кратковременного нейротоксического стресса приводит к увеличению уровней экспрессии проапоптотических белков p53, Cas-3, Вах, АIF и снижению для антиапоптотического белка Bcl-2. Активация аденилатциклазного каскада в условиях кратковременного эксайтотоксического стресса нивелирует данные эффекты за счет снижения количества белков p53, Cas-3, Вах, АIF и увеличению экспрессии белка Bcl-1 в кортикальных нейронах и нейронах мозжечка.

6. Амплитуды глутамат-опосредованных кальциевых ответов в нейронах коры головного мозга и нейронах мозжечка уменьшаются при предварительной обработке клеток форсколином в течении времени, достаточном для инициации аденилатциклазных каскадов.

Научная новизна исследования

В данной работе были впервые определены ключевые участники нейропротекторного эффекта активации аденилатциклазы и увеличения синтеза цАМФ форсколином против длительного токсического действия агонистов рецепторов глутамата. Определено положительного модулирующее действия форсколина на кальциевый гомеостаз и жизнеспособность нейронов ЦНС. Проведен сравнительный анализ нейропротекторного эффекта активации аденилатциклазы на нейронах двух отделов мозга, подверженных различным нейродегенеративным заболеваниям и выявлены сходные защитные молекулярные механизмы против глутаматной нейротоксичности и гипергомоцистеинемии.

Теоретическое и практическое значение работы

Основываясь на анализе современной научной литературы, результатах проводимых клинических испытаниях, направленных на лечение и нивелирование симптоматики различных нейродегенеративных болезней, изучение внутриклеточных процессов остается актуальным направлением. Результаты данной работы имеют главным образом теоретическое значение и применение. Полученные данные исследования вносят вклад в понимание внутриклеточной сигнализации при активации «дополнительных защитных» путей и предотвращении кальциевой перегрузки на моделях гиперактивации глутаматных рецепторов нейронов ЦНС.

Результаты и выводы исследований могут быть применены для создания методов лечения, основанных на исследуемом эффекте, и применены в разработке клинических исследований.

Апробация результатов исследования

Основные результаты диссертационного исследования были доложены на Международной конференции «Актуальные проблемы нейробиологии» и X Всероссийской школе молодых ученых, посвященной памяти академика РАН Евгения Евгеньевича Никольского (Казань, 2019), Международном молодежном научном форуме «ЛОМОНОСОВ-2019» (Москва, 2019), XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2022).

Публикации

По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Материалы и методы

1. Объект исследования. Приготовление первичной культуры нейронов мозжечка и коры головного мозга.

Для получения первичной культуры использовали мозжечки эмбрионов на 20 - 21 день пренатального развития (E20-E21) и кору головного мозга на 15-16 день (E15-16). Выделение эмбрионов проводилось с предварительной ингаляцией беременных самок крыс линии Wistar диоксидом углерода. Работа с животными проведена в соответствии с внутренним регламентом ЭБК ИЭФБ РАН.

Для ферментативной обработке ткани, с целью получения суспензии клеток мозжечка, выделенную ткань помещали в раствор трипсина (0.04 мг/мл, Sigma-Aldrich, США), а затем клетки обрабатывали раствором ДНКазы (0.04 мг/мл Sigma, США), ингибитором трипсина (0.4 мг/мл, Sigma-Aldrich, США) и бычьей сывороткой (10%, Gibco, США). После центрифугирования производили диспергирование клеток путем пипетирования в ростовой питательной среде, содержащей среду Neurobasal™ (Gibco, США) совместно с бессывороточной добавкой B-27© (2%, Gibco, США) и антибиотиком пенициллин-стрептомицин (1%, Gibco, США), L-глутамином (200 мМ, Gibco, США) для кортикальных нейронов. Для нейронов мозжечка к ростовой среде дополнительно добавляли 20 мМ KCl для увеличения выживаемости клеток [32]. Подсчет клеток проводили в камере Фукса-Розенталя и для оценки живых клеток использовали раствор трипаного синего (концентрация 0,2 %). Эти данные необходимы для подсчета количества ростовой среды, необходимого для получения культуры клеток нужной плотности (80'000 клеток на стекло). Диспергированные клетки в ростовой среде высевали на обработанные поли-D-лизином покровные стекла, диаметром 7 мм в 35 мм чашки Петри и

культивировали 10 – 12 суток (days in vitro, DIV10-12) при температуре +37°C и содержании CO₂ 5%. Смену среды проводили каждые вторые сутки.

2. Порядок проведения экспериментов.

В качестве контроля использовали воздействие ростовой среды (для экспериментов на выживаемость клеток и иммуноцитохимического исследования) или физиологического раствора, не содержащего агонистов (для флуориметрической регистрации изменений внутриклеточного Ca²⁺ или $\Delta\psi_{mit}$ митохондриального потенциала).

Физиологический раствор для всех опытов был следующего состава: 140 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 10 mM Hepes, 2 mM CaCl₂, (pH 7.3 – 7.4). Отсутствие Mg²⁺ в растворе предотвращало блокировку рецепторов глутамата NMDA-типа, так как в нейронах внеклеточный Mg²⁺ блокирует данные каналы [35].

Для индукции нейротоксического стресса были использованы следующие концентрации агонистов рецепторов глутамата: 100 мкМ HCY и 100 мкМ Glu (Sigma-Aldrich, США). В экспериментах с использованием агонистов всегда добавляли аминокислоту глицин (30 мкМ) – ко-агонист NMDA рецепторов в концентрации, присутствующей в ростовой среде [2, 12]. Для исследования нейропротекторного эффекта, предметные стекла с культивируемыми клетками помещали в среду, содержащую агонист и 1 мкМ форсколина.

В экспериментах для выявления внутриклеточных сигнальных каскадов к инкубационному раствору добавляли следующие ингибиторы насыщающих концентраций: 0,6 мкМ ингибитор протеинкиназы А (PKAi, PKA inhibitor fragment 14-22, Sigma), 1 мкМ хелеритрин (Chel, Chelerythrine, Sigma), 3 мкМ KN93 (Sigma).

3. Витальный флуоресцентный тест на выживаемость нейронов

Для определения состояния нейрональных клеток в контрольных точках (4 и 24 часа) - выявление живых, некротических и апоптотических нейронов проводилось с использованием конфокальной сканирующей микроскопии. Клетки последовательно окрашивали растворами флуоресцентных красителей: акридиновым оранжевым (АО, 10 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США) и бромистым этидием (БЭ, 40 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США).

Ядра нейронов с деструктурированной мембраной, характерной для некроза, окрашивались БЭ и светились красным светом. Ядра живых нейронов окрашивались АО и светились зеленым. При апоптозе, когда происходит закисление цитоплазмы клеток и эмиссия АО смещается в желтую область спектра, ядра светились оранжевым цветом [25].

Флуоресценцию красителей регистрировали двумя независимыми каналами в диапазонах 510-550 нм и свыше 610 нм на конфокальном сканирующем микроскопе Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия) при длине волны возбуждения 488 нм.

Результирующие изображения получали путем наложения двух изображений зарегистрированных в разных (зеленой и красной) областях

спектра (Рис.1). Анализировали изображения программой с открытым исходным кодом ImageJ с помощью плагина «Apoptosis Correlator» [25].

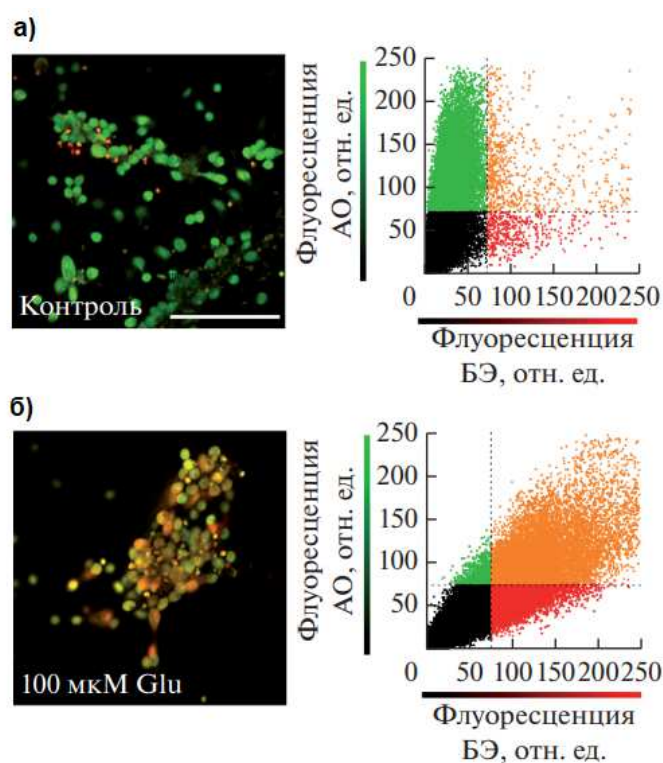


Рис. 1. Нейротоксический эффект кратковременного (4 ч) действия L-глутамата (100 мкМ) на нейроны мозжечка крыс *in vitro*. а – Контроль; б – после 4-х часового действия 100 мкМ L-глутамата. На каждой из частей рисунка (а,б) показаны флуоресцентные изображения нейронов мозжечка (справа) и корреляционные распределения зеленых (флуоресценция акридинового оранжевого, АО) и красных (флуоресценция бромистого этидия, БЭ) пикселей, позволяющие оценить соотношение живых (зеленый), апоптотических (оранжевый) и некротических (красный) нейронов (слева). Масштабная линейка соответствует 150 мкм.

Количественные значения доли живых, некротических и апоптотических клеток, полученные по 3-5 изображениям клеток с одного стекла усредняли и принимали за единичное измерение - *n*.

4. Иммуноцитохимический анализ белкового распределения.

Для идентификации белков в культуре, в контрольной точке – 4 часа, проводили иммуноцитохимические реакции с поликлональными кроличьими антителами к проапоптотическому белку – Caspase 3 (разведение 1:100, Abcam), к антиапоптотическому белку – Bcl-2 (разведение 1:100, Abcam). Так же использовались моноклональные антитела мыши к проапоптотическому белку – p53 (разведение 1:100, Sigma-Aldrich), кроличьи к проапоптотическим белкам - Bax (разведение 1:500, Abcam), AIF (разведение 1:500, Abcam). В качестве маркера нейрональных клеток использовались моноклональные антитела к белку цитоскелета – β -тубулину III (кроличьи и мышьиные, разведение 1:1000, Abcam).

Для визуализации связавшихся антител использовались вторичные антитела, конъюгированные с флуорохромами Alexa488 и Alexa633 (разведение 1:500, Invitrogen). Для получения изображений использовали

микроскоп Leica SP5 MP (Leica Microsystem). Возбуждение флуорохромов производили длинами волн 488 нм и 633 нм.

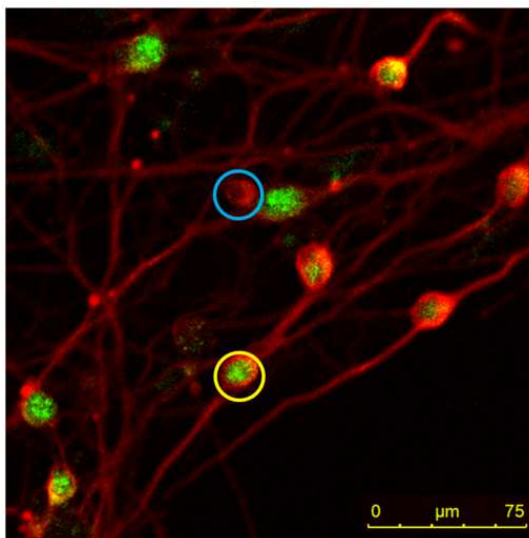


Рис. 1. Пример флуоресцентного изображения нейронов коры головного мозга DIV11, окрашенных антителами к белку BAX (зеленый) и белку цитоскелета β -тубулину III (красный). Пример иммунопозитивной клетки к целевому белку (желтый) и клетки с отсутствием целевого белка (синий). Масштабная линейка соответствует 75 мкм.

С каждого стекла получали по 3-5 изображений, с которых происходит визуальный подсчёт всех видимых клеток и клеток, экспрессирующих белок (Рис.2). Процент иммунопозитивных клеток определялся как отношение клеток, экспрессирующих белок интереса к общему числу клеток в видимом поле.

5. Измерение внутриклеточных Ca^{2+} ответов.

Определение относительных значений концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в микромолярном диапазоне проводили с использованием флуоресцентного зонда Fluo-3 AM (Invitrogen, США). Гидролиз Fluo-3 AM внутриклеточными эстеразами обеспечивал загрузку клеток мембранно-непроницающим Ca^{2+} -зондом Fluo-3.

На протяжении всего эксперимента (18 – 20 мин) камеру перфузировали физиологическим раствором со скоростью 1 мл/мин. Действующие вещества апплицировались на клетки с помощью быстрой локальной перфузии с аналогичной скоростью.

Для проведения флуориметрических экспериментов с Fluo-3 на инвертированном сканирующем конфокальном микроскопе Leica SP5 MP (Leica Microsystems, Германия). Возбуждение флуорохрома или Fluo-3 осуществляли светом аргонового лазера с длиной волны 488 нм.

Полученные конфокальные изображения анализировали с помощью программного обеспечения Leica LAS AF (Leica Microsystems, Германия) и строили графики зависимости интенсивности свечения отдельных клеток, выбранных как зоны интереса (ROI, regions of interest), от времени.

Действие каждого из агонистов исследовали с использованием не менее, чем 3 стекол по 20-30 нейронов в каждом.

6. Статистическая обработка экспериментальных результатов.

Статистическая обработка производилась при помощи GraphPad Prism 9.0 для системы Windows.

Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Выбросы в выборке определяли с помощью критерия Граббса с достоверностью $\alpha=0.05$. При установлении достоверности различий трех и более групп с контрольным значением использовали дисперсионный анализ (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с использованием критерия Даннета), для сравнения средних данных по двум независимым группам – двухфакторный t-критерий Стьюдента.

Статистически значимыми считали отличия при уровне вероятности $p<0.05$.

Результаты и обсуждение

1. Роль активации аденилатциклазы форсколином на выживаемость нейронов коры головного мозга и мозжечка при кратковременном нейротоксическом стрессе, вызванном глутаматом или L-гомоцистеином.

Нейропротекторный эффект 1мкМ форсколина оценивали на модели эксайтотоксического стресса, вызванного 4-часовой инкубацией нейронов в растворе, содержащем 100 мкМ глутамата или 100 мкМ гомоцистеина. В контрольных условиях (240 минут в ростовой среде) выживаемость кортикальных нейронов составляла 90.13 ± 0.76 %, для нейронов мозжечка – 89.77 ± 1.96 %, (Рис.3). Эти данные соответствуют нормальным значениям в первичной культуре нейронов [1, 14].

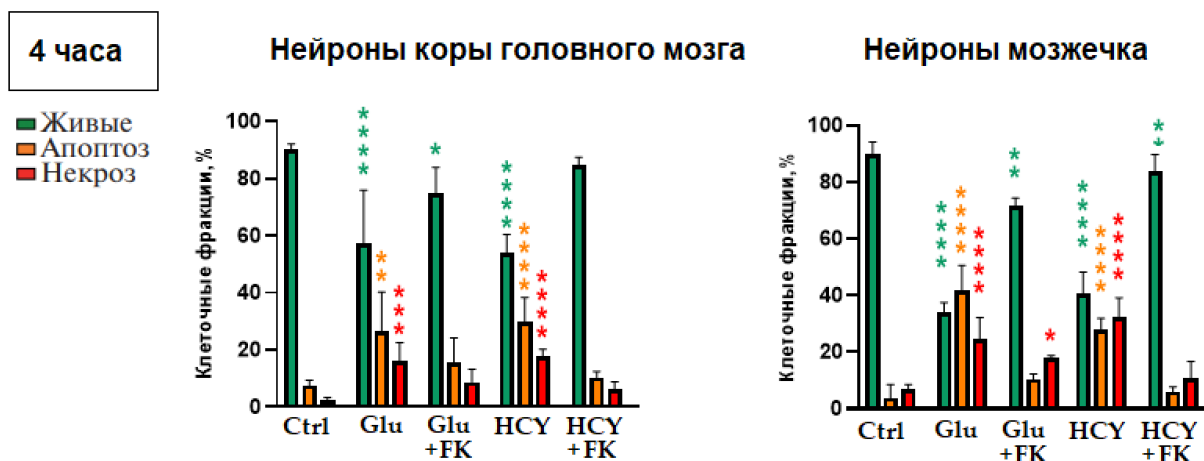


Рис.3. Нейропротекторное действие форсколина (FK) на нейроны коры головного мозга и мозжечка на фоне нейротоксического действия глутамата (Glu) и гомоцистеина (HCY), 4 часа. Зелёным представлена фракция живых нейронов, желтым – апоптотических и красным – некротических. На гистограмме распределения живых клеток представлены средние данные со стандартной ошибкой по 3-7 экспериментам ($n=3-7$), * - достоверное отличие от значений в контроле (Ctrl) (* - $p<0,05$).

4-часовая обработка 100 мкМ глутамата снижала долю живых клеток коры головного мозга и мозжечка – 57.28 ± 7.62 %, и 33.70 ± 1.48 %, и

соответственно (Рис. 3). Было обнаружено, что совместная инкубация 1 мкМ форсколина и агониста рецепторов глутамата не приводила к уменьшению жизнеспособности клеток относительно контрольных значений. На фоне действия форсколина и глутамата доля живых нейронов составляла $74.92 \pm 4.0 \%$ для коры головного мозга, для мозжечковых нейронов – $71.41 \pm 3.45 \%$.

Аналогичный нейротоксический эффект был вызван 4-часовой инкубацией в растворе для купания со 100 мкМ гомоцистеина, в то время как добавление 1 мкМ форсколина предотвращало некроз и апоптоз нейронов (Рис. 3). Доля живых клеток была значительно снижена до $53.61 \pm 2.65 \%$ в кортикальных нейронах и $40.38 \pm 3.33 \%$ в нейронах мозжечка после инкубации в растворе, содержащем 100 мкМ гомоцистеин. После совместного применения гомоцистеина и форсколина значения доли живых нейронов была значительно выше: для коры и мозжечка – $84.35 \pm 1.24 \%$ и $83.49 \pm 2.36 \%$, соответственно. Стоит отметить, что культура нейронов из мозжечкового отдела отличалась большей чувствительностью к воздействию обоих агонистов глутаматных рецепторов на 20 - 40 %, что согласуется с литературными данными исследованиями [31].

4 часа

Нейроны коры головного мозга		Живые, %	Апоптоз, %	Некроз, %
Контроль	n = 7	$90,12 \pm 0,75$	$7,58 \pm 0,68$	$2,28 \pm 0,39$
100мкМ Глутамата	n = 6	$57,28 \pm 7,62$	$26,49 \pm 5,62$	$16,22 \pm 2,58$
+ 1мкМ Форсколина	n = 5	$74,92 \pm 4$	$15,66 \pm 3,82$	$8,67 \pm 2,06$
100мкМ Гомоцистеина	n = 6	$53,61 \pm 2,65$	$29,26 \pm 3,54$	$17,12 \pm 1,04$
+ 1мкМ Форсколина	n = 6	$84,35 \pm 1,24$	$9,83 \pm 0,85$	$5,81 \pm 1,03$
Нейроны мозжечка		Живые, %	Апоптоз, %	Некроз, %
Контроль	n = 5	$89,76 \pm 1,96$	$3,59 \pm 2,15$	$6,63 \pm 0,79$
100мкМ Глутамата	n = 6	$33,7 \pm 1,48$	$41,75 \pm 3,59$	$24,54 \pm 3,1$
+ 1мкМ Форсколина	n = 4	$71,41 \pm 1,44$	$10,23 \pm 0,93$	$17,85 \pm 0,37$
100мкМ Гомоцистеина	n = 5	$40,38 \pm 3,33$	$27,77 \pm 1,72$	$31,83 \pm 3,15$
+ 1мкМ Форсколина	n = 6	$83,49 \pm 2,36$	$5,78 \pm 0,7$	$10,6 \pm 2,39$

Табл.1. Нейропротекторное действие форсколина на нейроны коры головного мозга и мозжечка на фоне кратковременного нейротоксического действия агонистов рецепторов глутамата, 4 часа. Данные представлены как среднее со стандартной ошибкой по 5-7 экспериментам (n=5-7).

Из этих экспериментов мы можем сделать вывод, что 4-часовая обработка концентрациями либо глутамата, либо гомоцистеина, соответствующие патологическим состояниям, приводила к апоптозу и некрозу (Таблица 1). Однако форсколин в концентрации 1 мкМ предотвращал нейротоксические эффекты этих соединений. Форсколин-опосредованная активация аденилатциклазы повышает жизнеспособность нейронов при кратковременном эксайтотоксическом стрессе.

Длительная 24-часовая инкубация нейронов в присутствии 100 мкМ глутамата, а также 100 мкМ гомоцистеина приводила к увеличению апоптоза нейронов (Рис. 4).

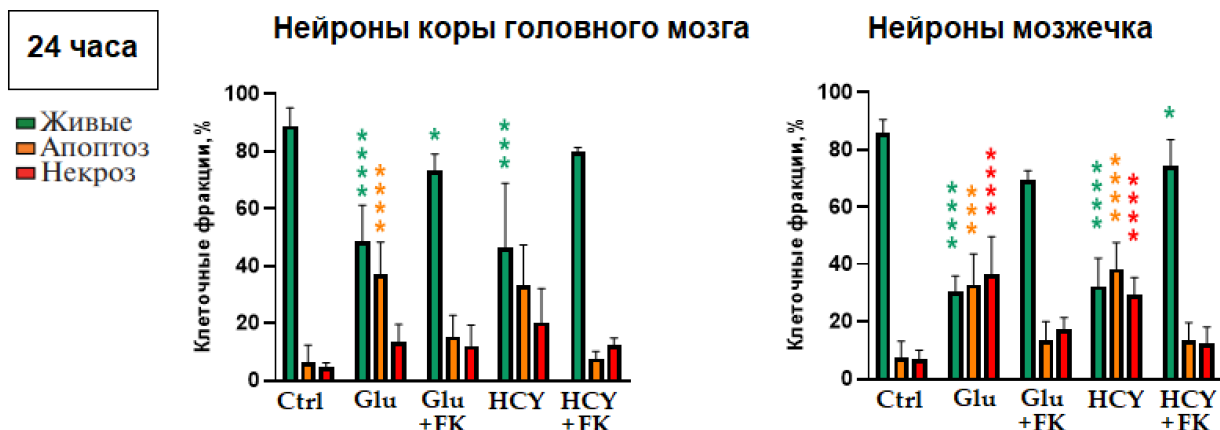


Рис.4. Нейропротекторное действие форсколина (FK) на нейроны коры головного мозга и мозжечка на фоне нейротоксического действия глутамата (Glu) и гомоцистеина (HCY), 4 часа. Зелёным представлена фракция живых нейронов, желтым – апоптотических и красным – некротических. На гистограмме распределения живых клеток представлены средние данные со стандартной ошибкой по 3-7 экспериментам (n=3-7), * - достоверное отличие от значений в контроле (Ctrl) (* - p<0,05).

При действии глутамата, для нейронов коры головного мозга данный показатель составлял 48.36 ± 4.85 %, при аппликации гомоцистеина доля живых кортикальных нейронов - 46.36 ± 10.11 %. Как и при кратковременном действии, так и долговременном, результаты по нейронам мозжечка были значительно ниже. Выживаемость достигла 30.46 ± 2.42 % и глутаматной нейротоксичности и 32.27 ± 4.04 % при гипергомоцистеинемии.

Комбинированное применение 1 мкМ форсколина с агонистами не предотвращало апоптоз полностью, но поддерживало достаточно большой процент живых клеток на фоне долговременного эксайтотоксического стресса (Таблица 2).

24 часа

Нейроны коры головного мозга		Живые, %	Апоптоз, %	Некроз, %
Контроль	n = 4	88,8 ± 3,16	6,42 ± 2,98	4,78 ± 0,72
100мкМ Глутамата	n = 6	48,36 ± 4,85	37,1 ± 4,23	13,38 ± 2,32
+ 1мкМ Форсколина	n = 5	73,02 ± 2,47	15,28 ± 3,03	12,07 ± 2,94
100мкМ Гомоцистеина	n = 5	46,36 ± 10,11	33,25 ± 6,3	20,38 ± 5,29
+ 1мкМ Форсколина	n = 6	79,95 ± 0,66	7,73 ± 1,15	12,32 ± 1,19

Нейроны мозжечка		Живые, %	Апоптоз, %	Некроз, %
Контроль	n = 6	85,85 ± 1,87	7,34 ± 2,32	6,81 ± 1,27
100мкМ Глутамата	n = 5	30,46 ± 2,42	32,87 ± 4,81	36,66 ± 5,82
+ 1мкМ Форсколина	n = 5	69,5 ± 1,41	13,3 ± 2,97	17,21 ± 1,84
100мкМ Гомоцистеина	n = 6	32,27 ± 4,04	38,41 ± 3,78	29,33 ± 2,48
+ 1мкМ Форсколина	n = 7	74,33 ± 3,45	13,57 ± 2,29	12,16 ± 2,25

Табл.2. Нейропротекторное действие форсколина на нейроны коры головного мозга и мозжечка на фоне долговременного нейротоксического действия агонистов рецепторов глутамата, 24 часа. Данные представлены как среднее со стандартной ошибкой по 4-7 экспериментам (n=4-7).

Сохранение нейропротекции после 24-х часового действия агонистов в токсичной для нейронов концентрации при добавлении форсколина говорит о сохранение эффекта активации аденилатциклазы и наличие длительных внутриклеточных сигнальных каскадов, обеспечивающих защитные компенсаторные механизмы при нарушенном энергетическом и ионном балансе нейронов ЦНС.

Поскольку после кратковременного эксайтотоксического стресса апоптоз и некроз были явно выражены при воздействии обеих аминокислот, мы дополнительно проанализировали влияние форсколина на экспрессию про- и антиапоптотических белков в нейронах.

2. Изменение экспрессии проапоптотических и антиапоптотического белков в условиях эксайтотоксичности и при активации аденилатциклазного каскада.

Поскольку было выявлено, что активация аденилатциклазного внутриклеточного каскада обладает защитным эффектом против нейротоксичности агонистов рецепторов глутамата, было интересно исследовать внутриклеточные белковые каскады нейронов при коротком (4 часа) действии форсколина иммуноцитохимическим анализом.

Была изучена экспрессия таких белков, как каспаза-3 (Caspase-3), p53 и Вах, которые участвуют в каспазо-зависимом пути апоптоза [10, 13, 33]. Экспрессию фактора, индуцирующего апоптоз (AIF), также оценивали вместе с Bcl-2, который противодействует высвобождению AIF из митохондрий клетки [13, 20].

Нейроны коры головного мозга

4 часа

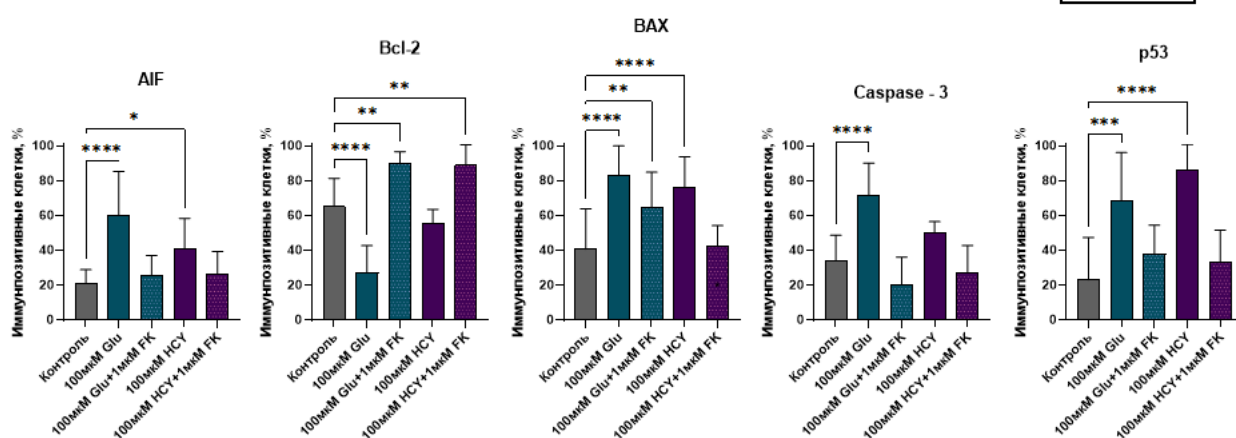


Рис.5. Изменение экспрессии проапоптотических белков (AIF, Вах, Caspase-3 и p53) и антиапоптотического белка Bcl-2 на фоне гиперактивации рецепторов глутамата и при совместной инкубации с форсколином в кортикальных нейронах, 4 часа. На гистограмме процент иммунопозитивных клеток представлен средними данными со стандартной ошибкой по 6-11 экспериментам (n=6-11), * - достоверное отличие от значений в контроле (* - p<0,05).

Иммуноцитохимический анализ подтвердил, что экспрессия AIF, Cas-3, p53 и BAX была повышена после инкубации в растворе 100мкМ глутамата или 100мкМ гомоцистеина в нейронах коры головного мозга (Рис.5) и мозжечка (Рис. 6). Экспрессия Bcl-2 подавлялась после 4-часовой инкубации в растворе, содержащем один из агонистов в культурах обоих отделов ЦНС.

При добавлении 1 мкМ форсколина в агонист-содержащий раствор наблюдалась противоположная картина – уменьшение количества иммунопозитивных клеток на проапоптотические белки и увеличение уровня белка Bcl-2 (Рис. 5 и Рис.6).

Белок p53 регулирует исход апоптотического состояния клетки, а так же регулирует процессы деградации ДНК. При глутаматной токсичности и уровни данного белка схожи и в нейронах коры головного мозга, и в нейронах мозжечка. Однако для модели гипергомоцистеинемии результаты показывают увеличение экспрессии белка p53 в нейронах коры головного мозга больше, чем в нейронах мозжечка. Действие форсколина проявлялось в снижении уровней данного белка до контрольных значений в нейрональных культурах.

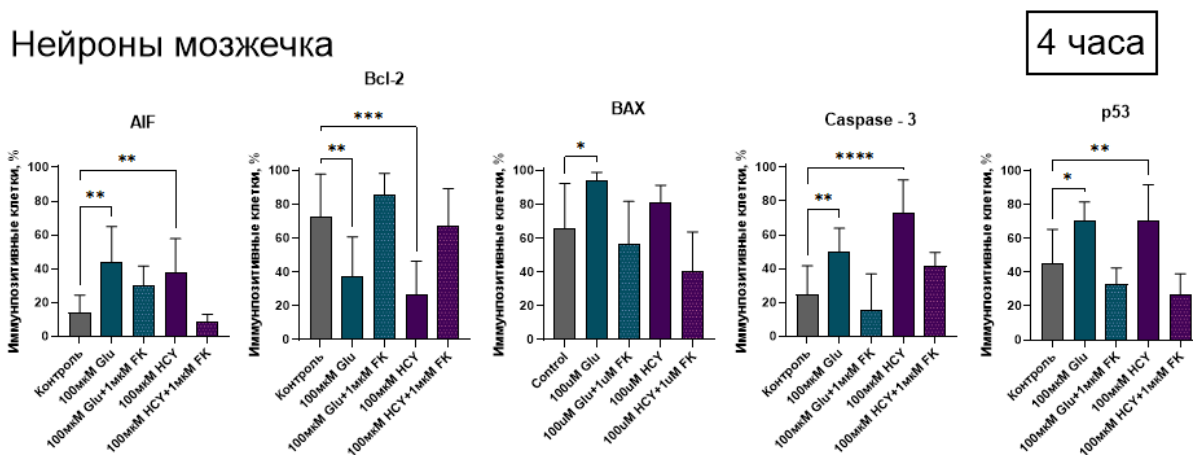


Рис.6. Изменение экспрессии проапоптотических белков (AIF, Bax, Caspase-3 и p53) и антиапоптотического белка Bcl-2 на фоне гиперактивации рецепторов глутамата и при совместной инкубации с форсколином в мозжечковых нейронах, 4 часа. На гистограмме процент иммунопозитивных клеток представлен средними данными со стандартной ошибкой по 6-10 экспериментам (n=6-11), * - достоверное отличие от значений в контроле (* - p<0,05).

Отличный от нейронов мозжечка паттерн экспрессии отмечен и для белка Caspase-3 – при действии гомоцистеина не наблюдалось достоверно отличного от контрольных значений уровня экспрессии. Возможно, при данной модели гипергомоцистеинемии в кортикальных нейронах апоптотические процессы развиваются не по каспазо-зависимому пути ли при участии других эффекторных каспаз. Несмотря на некоторые различия, действие 1мкМ форсколина снижало уровни Caspase-3 до уровней в контроле, как в нейронах коры головного мозга, так и в мозжечковых нейронах.

Белки семейства Bcl-2 – BAX и Bcl-2 принято рассматривать в совокупности для оценки возможного повреждения митохондриальной мембраны проапоптотическими гетеродимерами белков данного семейства [10, 13]. Статистически достоверное агонист-опосредованное увеличение

экспрессии белка ВАХ как при действии глутамата, так и при действии гомоцистеина нивелировалось в экспериментах при совместном применении одного из агонистов с форсколином.

Для белка Bcl-2 была выявлена пониженная экспрессия на фоне нейротоксического действия глутамата и гомоцистеина. Принимая во внимание, что белок p53 способен подавлять экспрессию антиапоптотических генов bcl-2 семейства и повышенные уровни p53 при тех же экспериментальных условиях – было бы в дальнейшем провести эксперименты по выявлению корреляционной зависимости и взаимодействию данных белков. Роль белка Bcl-2, как ингибитора апоптоза, так же зависит от баланса про- и антиапоптотических белков в клетке. Довольно интересный тренд был получен для белка Bcl-2. Совместная инкубация агониста и форсколина оказывало положительный эффект на уровень экспрессии белка - для кортикальных нейронов уровни достоверно выше контрольных значений на 15-20%. Исследования о работе белка Bcl-2 показывают, что эффективность данного белка как «защитного форпоста» падает в зависимости от степени апоптотического состояния и/или действия эндо- и экзогенных стимулов, приводящих к гибели клетки [36]. Другими словами, белок Bcl-2 не способен нивелировать механизмы уже запущенных процессов гибели клетки и апоптоза на последних стадиях. Совокупность результатов о выживаемости нейронов и увеличенной экспрессии данного белка позволяет предположить, что форсколин-опосредованная активация аденилатциклазного каскада происходит достаточно быстро и эффект сохраняется на протяжении кратковременного действия одного из агонистов глутаматных рецепторов как в нейронах мозжечка, так и в кортикальных нейронах.

Интересно, что белок AIF участвует во внутреннем или митохондриальном пути апоптоза. Так же стоит отметить, что данный путь развивается без участия каспаз. Апоптоз-индуцирующий фактор или AIF в норме локализован в клеточных митохондриях. Выход фактора AIF в цитозольное пространство и транслокация его в клеточное ядро сопровождается конденсацией хроматина и последующей фрагментацией ДНК [20]. Достоверное увеличение уровня данного белка в условиях эксайтотоксичности соответствуют данным о развитии апоптоза после кратковременного действия глутамата или гомоцистеина, полученным в этой работе. Однако эффект уменьшения экспрессии фактора AIF при совместном действии форсколина на фоне одного из агонистов наводит на ряд вопросов: активация аденилатциклазы уменьшает уровень экспрессии данного фактора в целом и/или уменьшает его выход из митохондрий? Возможно ли наличие механизмов «аварийной» утилизации данного белка в цитозоле, которые контролируется участниками аденилатциклазного каскада?

Подводя промежуточный итог данного раздела, из результатов этих экспериментов можно заключить, что форсколин в концентрации 1 нМ может противодействовать развитию апоптотической передачи сигналов и некрозу клеток. Количественное сравнение данных, полученных для глутамата и гомоцистеина, и в присутствии 1 мкМ форсколина, представлено в Таблице 3.

4 часа

Нейроны коры головного мозга		Caspase-3	AIF	p53	BAX	Bcl-2				
Контроль	n = 8	33,89 ± 5,24	n = 8	20,9 ± 2,83	n = 9	23,01 ± 8,59	n = 8	36,66 ± 7,22	n = 9	65,17 ± 6,13
100мкМ Глутамата	n = 7	71,97 ± 6,9	n = 9	55,5 ± 9,11	n = 7	68,43 ± 9,77	n = 9	90,59 ± 1,78	n = 9	27,22 ± 5,18
+ 1мкМ Форсколина	n = 9	20,47 ± 5,2	n = 8	25,89 ± 3,91	n = 6	37,85 ± 6,22	n = 9	58,12 ± 5,81	n = 9	89,65 ± 2,66
100мкМ Гомоцистеина	n = 6	50,04 ± 2,66	n = 9	40,89 ± 5,82	n = 8	90,02 ± 3,16	n = 11	75,89 ± 5,32	n = 8	55,55 ± 3
+ 1мкМ Форсколина	n = 7	27,48 ± 5,78	n = 8	26,79 ± 4,45	n = 7	36,63 ± 4,83	n = 7	39,85 ± 4,69	n = 7	92,63 ± 2,18
Нейроны мозжечка		Caspase-3	AIF	p53	BAX	Bcl-2				
Контроль	n = 9	24,63 ± 5,69	n = 8	14 ± 3,7	n = 9	45,01 ± 7,2	n = 7	62,69 ± 8,86	n = 9	72,95 ± 8,31
100мкМ Глутамата	n = 7	50,19 ± 4,87	n = 8	44,26 ± 7,81	n = 8	70,38 ± 3,94	n = 9	93,53 ± 1,56	n = 8	37,59 ± 8,22
+ 1мкМ Форсколина	n = 6	15,29 ± 7,21	n = 7	29,87 ± 4,83	n = 7	32,74 ± 3,46	n = 7	59,22 ± 8,49	n = 6	85,38 ± 5,3
100мкМ Гомоцистеина	n = 8	73,05 ± 6,86	n = 8	37,7 ± 7,14	n = 8	70,59 ± 7,46	n = 7	80,1 ± 2,72	n = 8	26,5 ± 7,04
+ 1мкМ Форсколина	n = 7	29,74 ± 8,79	n = 10	8,43 ± 1,8	n = 9	25,76 ± 3,93	n = 7	38,57 ± 8,3	n = 6	67,1 ± 9,04

Табл.3. Действие форсколина на экспрессию про- и антиапоптотических белков в нейронах коры головного мозга и мозжечка на фоне кратковременного нейротоксического действия агонистов рецепторов глутамата, 4 часа. Данные представлены как среднее со стандартной ошибкой по 5-7 экспериментам (n=6-11).

Стоит отметить, что для данных сигнальных путей существенных отличий для нейронов коры головного мозга и нейронов мозжечка не обнаружилось. Сходство механизмов гибели и форсколин-опосредованных защитных механизмов на молекулярную машинерию позволяет предполагать о наличие целевых молекул для разработки лекарственных средств против нейродегенеративных заболеваний.

2. Определение участия ключевых цАМФ- и кальций-зависимых протеинкиназ на эффект действия форсколина (краткосрочный, 4 часа и долгосрочный, 24 часа).

Чтобы оценить внутриклеточные антиапоптотические каскады, запускаемые форсколином, мы дополнительно изучили участие протеинкиназ в этих процессах с помощью их селективных ингибиторов.

Эффекты ингибирования проинкиназы А с помощью ингибитора протеинкиназы А (PKAi), ингибирования протеинкиназы С с помощью хелеритрина (Chel) или ингибирования кальмодулин-зависимой протеинкиназы II типа (CaMKII) с помощью соединения KN93 изучали в краткосрочных и долгосрочных инкубациях на фоне эксайтотоксического стресса, индуцированного гомоцистеином или глутаматом.

В нейронах коры голы головного мозга кратковременная 4-часовая инкубация нейронов с агонистами + 1мкМ форсколина и в сочетании с ингибиторами киназ существенно не изменила выживаемость клеток по сравнению с контрольными значениями, однако и не уменьшило долю апоптотических клеток по сравнению с действием только агониста (Рис.7 и Рис.8).

4 часа

Живые
Апоптоз
Некротиз

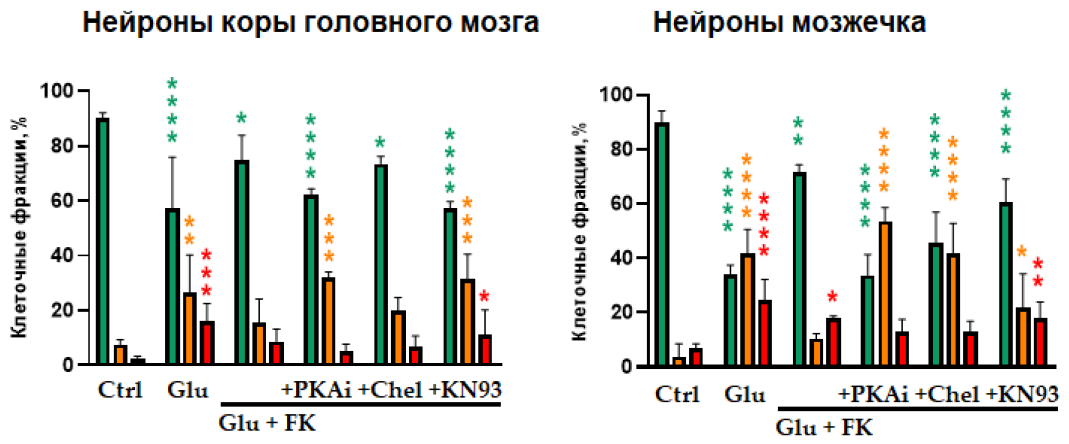


Рис.7. Нейропротекторное действие форсколина (FK) на нейроны коры головного мозга и мозжечка на фоне нейротоксического действия глутамата (Glu), 4 часа. Зелёным представлена фракция живых нейронов, желтым – апоптотических и красным – некротических. На гистограмме распределения живых клеток представлены средние данные со стандартной ошибкой по 3-7 экспериментам (n=3-7), * - достоверное отличие от значений в контроле (Ctrl) (* - p<0,05).

Однако для нейрональных клеток мозжечка при 4-х часовой глутаматной и гомоцистеиновой нейротоксичности одними из участников оказались протеинкиназа А и протеинкиназа С - их ингибирование приводило к резкому снижению выживаемости нейронов (Рис.7 и Рис.8). При сравнении этих результатов с данными по блокированию СаМКП – применение KN93 снизило выживаемость клеток меньше всего. При действии глутамата и форсколина в сочетании с ингибитором протеинкиназы А наблюдалось преобладание апоптоза в клеточной фракции, что делает протеинкиназу А одной из ключевых регуляторов в быстрых «аварийных» механизмах в нейронах мозжечка при активации аденилатциклазы и каскада синтеза цАМФ.

4 часа

Живые
Апоптоз
Некротиз

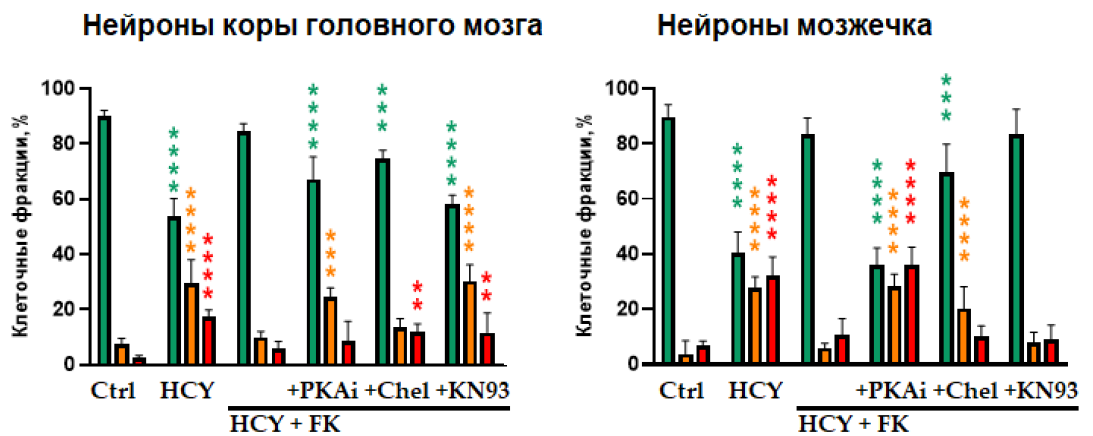


Рис.8. Нейропротекторное действие форсколина (FK) на нейроны коры головного мозга и мозжечка на фоне нейротоксического действия L-гомоцистеина (НСУ), 4 часа. Зелёным представлена фракция живых нейронов, желтым – апоптотических и красным – некротических. На гистограмме распределения живых клеток представлены средние данные со стандартной ошибкой по 3-7 экспериментам (n=3-7), * - достоверное отличие от значений в контроле (Ctrl) (* - p<0,05).

При 24-часовой обработке нейронов агонистами были обнаружены некоторые различия между эффектами глутамата и гомоцистеина в нейронах

мозжечка и коры головного мозга (Рис. 9 и Рис. 10). Например, ингибирование всех исследованных киназ в кортикальных нейронах оказало усиление тренда, который наблюдался в 4-х часовой экспериментальной точке. Паттерн «живые-апоптоз-некроз» достиг значений при действии только глутамата, если сравнивать эти гистограммы на Рис. 9. Напротив, применение PKAi или KN93 предотвращало антиапоптотические эффекты форсколина в течение 24 часов при действии гомоцистеина (Рис. 10). Использование Chel не приводило к резкому уменьшению эффективности форсколина как нейропротектора в экспериментах с гомоцистеином. Этот результат позволяет предположить, что протеинкиназа С вовлечена в данный процесс меньше чем другие исследуемые протеинкиназы. Из этих наблюдений мы можем заключить, что в условиях гипергомоцистеинемии как протеинкиназа А, так и кальмодулин-зависимая протеинкиназа II типа необходимы для антиапоптотических сигнальных путей, запускаемых форсколином в кортикальных нейронах.

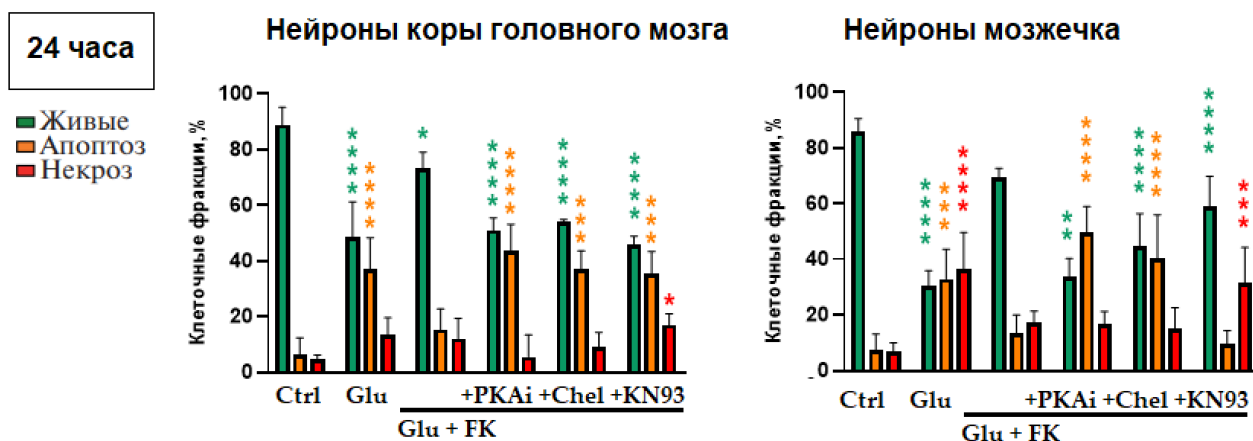


Рис.9. Нейропротекторное действие форсколина (FK) на нейроны коры головного мозга и мозжечка на фоне нейротоксического действия глутамата (Glu), 24 часа. Зелёным представлена фракция живых нейронов, желтым – апоптотических и красным – некротических. На гистограмме распределения живых клеток представлены средние данные со стандартной ошибкой по 3-7 экспериментам (n=3-7), * - достоверное отличие от значений в контроле (Ctrl) (* - p<0,05).

При 24-часовой обработке нейронов мозжечка, в экспериментах с использованием глутамата и гомоцистеина не обнаружено больших различий в выживаемости (Рис. 9 и Рис.10). Однако, одним из примечательных наблюдений является большая вариабельность в апоптозе и некрозе нейронов при использовании ингибиторов исследуемых киназ.

При долговременном действии агонистов на нейроны мозжечка механизм частично схож – «выключение» протеинкиназы А и протеинкиназы С из сигнального каскада полностью блокировало нейропротекцию форсколина, которая проявилась в снижении доли живых клеток (Рис.9 и Рис.10).

Ингибиторный агент KN93 не был эффективен в нейронах мозжечка, что указывает на то, что СаМКII не принимает участия в нейропротекции форсколина против гипергомоцистеинемии (Рис. 10), однако ее блокада увеличивает долю некротизированных клеток на фоне глутаматной нейротоксичности (Рис.9).

Таким образом, в нейропротекторный эффект форсколина длительного (24 часа) нейротоксического действия глутамата и гомоцистеина в нейронах коры головного мозга вовлечены протеинкиназа А и СаМКII в большей степени, чем протеинкиназа С. В нейропротекторный эффект форсколина против кратковременного (4 часа) и длительного (24 часа) нейротоксического действия глутамата и гомоцистеина в нейронах мозжечка вовлечены такие регуляторные киназы как протеинкиназа А и протеинкиназа С. Эти результаты хорошо согласуются с данными о том, что цАМФ может индуцировать нейропротекцию [24, 28]. Одна из гипотез предполагает, что Ca^{2+} , попадая в клетку через экстраинаптические NMDA-рецепторы, запускает проапоптотические сигнальные каскады, а Ca^{2+} , попадая через синаптические NMDA-рецепторы, запускает нейропротекторные каскады путем активации цАМФ, протеинкиназы А, кальмодулинзависимые киназы II и IV подтипов (СаМКII и СаМКIV) [1, 3].

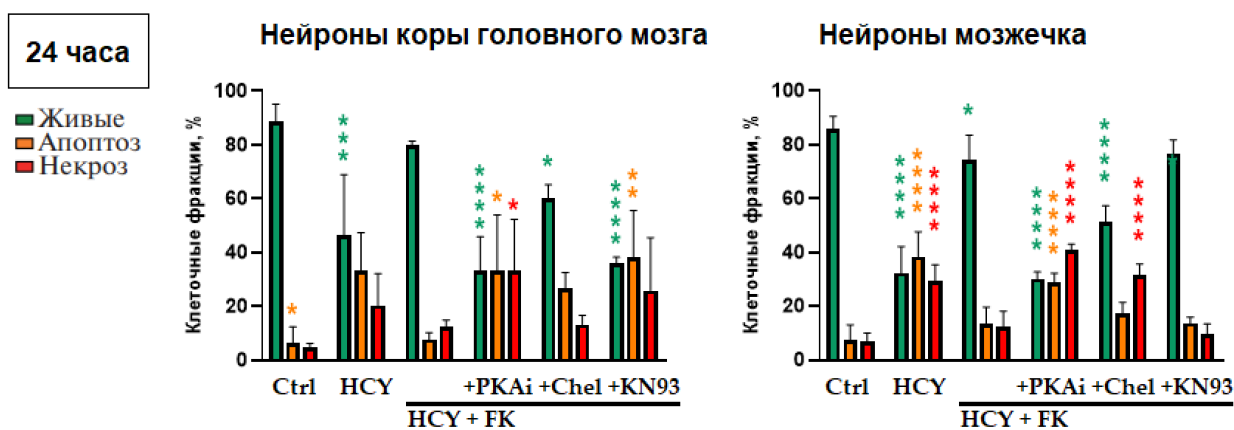


Рис.10. Нейропротекторное действие форсколина (FK) на нейроны коры головного мозга и мозжечка на фоне нейротоксического действия L-гомоцистеина (НСУ), 24 часа. Зелёным представлена фракция живых нейронов, желтым – апоптотических и красным – некротических. На гистограмме распределения живых клеток представлены средние данные со стандартной ошибкой по 3-7 экспериментам (n=3-7), * - достоверное отличие от значений в контроле (Ctrl) (* - p<0,05).

Изучение сигнальных каскадов довольно сложная и многогранная задача в связи с существованием большого пула регулярных белков, протеинкиназ, транскрипторных фактор и др. Однако, несмотря на различие действия нейротоксичных агентов и проводя экспериментальную работу на нейрональных культурах двух совершенно отличных друг от друга отделов ЦНС, можно вычленил общий механизм. Из полученных результатов можно определить протеинкиназу А как обязательный компонент сигнального каскада, обеспечивающего нейропротекцию форсколина в условиях чрезмерной активации глутаматных рецепторов.

4. Анализ динамики изменений внутриклеточного кальция при глутаматопосредованном нейротоксическом стрессе и при нейропротекторном действии форсколина.

По литературным данным, уровни белком ВАХ и Bcl-2 положительно коррелируют с нормальным функционированием митохондрий и энергетическим обменом [10, 13, 22]. Снижение уровня Bcl-2 широко используется в качестве маркера апоптоза [36, 37]. Учитывая, что форсколин достоверно увеличивает экспрессию Bcl-2 при эксайтотоксических повреждениях, в дальнейших экспериментах мы использовали флуоресцентную визуализацию для мониторинга концентрации свободного внутриклеточного Ca^{2+} при аппликациях глутамата в отсутствие и после преинкубации с 1 мкМ форсколина (10 минут). Примеры кальциевых ответов на нейронах коры головного мозга представлены на Рис.7.

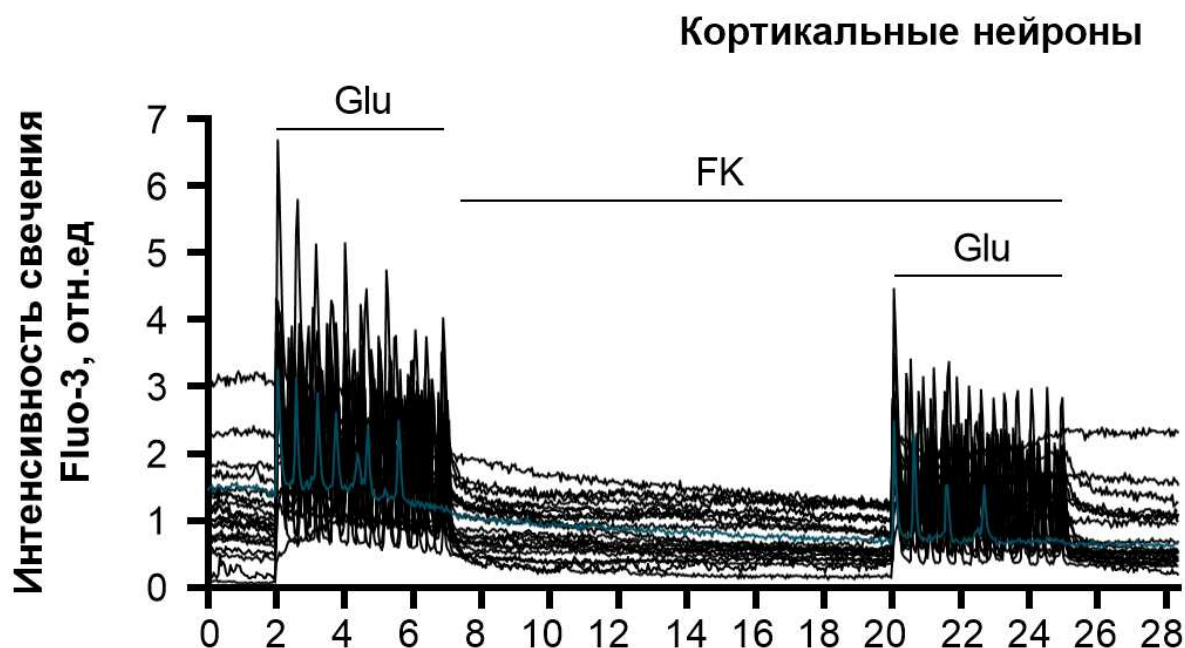


Рис.11. Репрезентативные кальциевые ответы нейронов на 100 мкМ глутамата (Glu), 1мкМ форсколин (FK) и глутамат с форсколином. Данные на графике представлены как относительные значения интенсивности свечения красителя Fluo-3 по 20 клеткам (n=20).

Внутриклеточные ответы Ca^{2+} , вызванные применением глутамата (Рис.11), продемонстрировали постоянное повышение уровня Ca^{2+} до тех пор, пока присутствовал глутамат в перфузионном растворе. Тем не менее, применение 1 мкМ форсколина снижало вызванное глутаматом увеличение внутриклеточного $[Ca^{2+}]$, что предотвращало его накопление в клетке.

Во всех экспериментах, где использовались кортикальные нейроны или нейроны мозжечка, аппликация 100мкМ глутамата вызывала сильное увеличение флуоресцентного сигнала Ca^{2+} (амплитуды кальциевых ответов), который достоверно снижался в случае действия форсколина. Интегральное количество Ca^{2+} , поступающее в цитоплазму при аппликации глутамата, оценивали по площади под кривой, описывающей изменение интенсивности флуоресценции во времени (Рис.12).

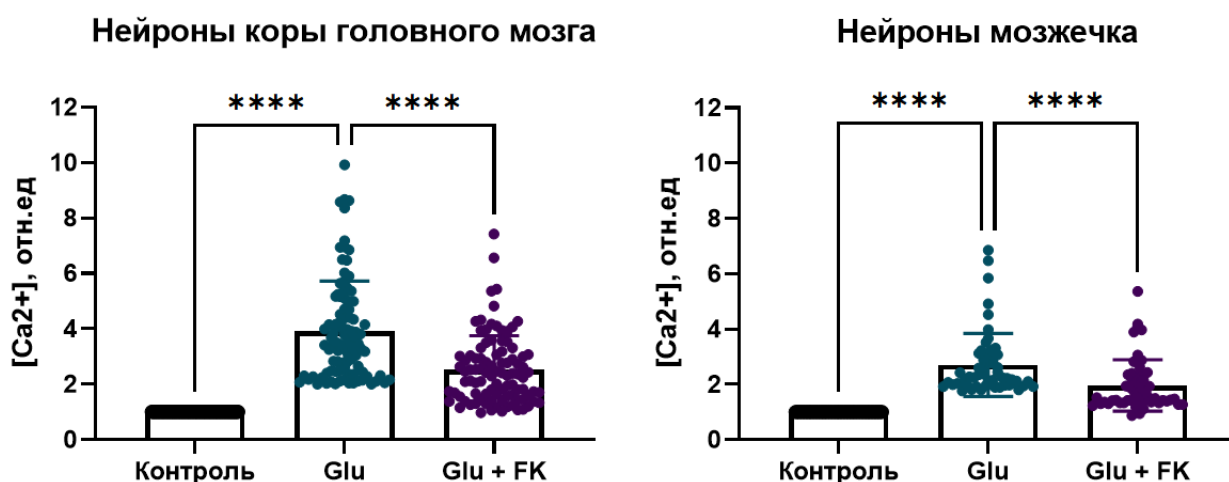


Рис.12. Количественное сравнение амплитуд кальциевых ответов ($[Ca^{2+}]_i$) нейронов на 100 мкМ глутамата (Glu), и глутамата с 1мкМ форсколином (Glu+FK). Данные на графике представлены как относительные значения по 95 клеткам ($n=4$) культуры коры головного мозга и по 54 клеткам мозжечка ($n=3$).

Ограничение кальциевого ответа нейронов на глутамат может быть связано с цАМФ-зависимым подавлением высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо – митохондрий и/или эндоплазматического ретикулума [3, 24]. В свою очередь, данные события могут влиять на примембранные процессы – уменьшение медленного деполяризационного тока, индуцированного активацией метаботропных рецепторов глутамата. цАМФ-зависимая активация протеинкиназы-А в нейронах приводит к фосфорилированию фактора, ингибирующего митохондриальную протонную АТФазу [2, 20, 29]. Это, в свою очередь, увеличивает продукцию АТФ, необходимую для опосредованного Na^+/K^+ -АТФазой поддержания градиента натрия, необходимого для обменника Na^+/Ca^{2+} , который вытесняет кальций из клетки. Однако, для проверки данной гипотезы требуются эксперименты с использованием агентов, модулирующих процессы на нейрональной мембране, чтобы проследить быстротечные процессы. Однако, результаты по кортикальным нейронам и нейронам мозжечка подтверждают участие протеинкиназы А в кратковременных и долговременных экспериментах с участием форсколина и одного из агонистов рецептора глутамата. Полученные данные предполагают как одну из ролей участников аденилатциклазного каскада - поддержка функционирования митохондрий и своевременная активация систем выравнивания ионного гомеостаза в клетке.

Таким образом, дополнительная активация форсколином цАМФ-зависимых сигнальных каскадов может предотвратить гибель нейронов крыс *in vitro* при длительном нейротоксическом действии глутамата.

Выводы

1. Активация аденилатциклазы 1мкМ форсколина предотвращает гибель нейронов коры головного мозга и мозжечка крыс при кратковременном (4 часа) действии 100 мкМ глутамата и 100 мкМ гомоцистеина. Доля живых клеток не отличается от контрольных

значений для совместной аппликации форсколина с глутаматом или с гомоцистеином.

2. Активация аденилатциклазы 1мкМ форсколина уменьшает долю апоптотических и некротических нейронов коры головного мозга и мозжечка крыс при долговременном (24 часа) действии 100 мкМ глутамата и 100 мкМ гомоцистеина. Доля живых клеток не отличается от контрольных значений для совместной аппликации форсколина с глутаматом или с гомоцистеином.
3. В нейропротекторный эффект форсколина на фоне долговременного (24 часа) нейротоксического действия глутамата и гомоцистеина в нейронах коры головного мозга вовлечены протеинкиназа А и СаМКII.
4. В нейропротекторный эффект форсколина против кратковременного (4 часа) и долговременного (24 часа) нейротоксического действия глутамата и гомоцистеина в нейронах мозжечка вовлечены протеинкиназа А и протеинкиназа С.
5. В условиях 4-х часового нейротоксического действия агонистов глутаматных рецепторов, 1 мкМ форсколина достоверно снижал уровень экспрессии проапоптотических белков p53, Cas-3, Вах, АIF и увеличивал уровень экспрессии антиапоптотического белка Bcl-2 в кортикальных нейронах и нейронах мозжечка.
6. Преинкубация нейронов коры головного мозга в растворе 1 мкМ форсколина предотвращает глутамат-опосредованную кальциевую перегрузку клеток.

Список публикаций по теме диссертации

Статьи

1. Ivanova, M.A., Sitnikova, L.S., Karelina, T.V. et al. The Neuroprotective Effect of Forskolin and Its Influence of Mitochondrial Dysfunction in Neurons in Primary Rat Cerebellum Cultures. *Neurosci Behav Physiol* 49, 1096–1099 (2019).
2. Ivanova, M.A., Sitnikova, L.S., Stepanenko, Y.D. et al. Forskolin As a Neuroprotector and Modulator of Glutamate-Evoked Ca²⁺ Entry into Cerebellar Neurons. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A* 12, 390–393 (2018).
3. Sitnikova, L.S., Ivanova, M.A., Stepanenko, Y.D. et al. Collapse of Neuronal Energy Balance As a Basis of L-Homocysteine Neurotoxicity. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. A* 12, 360–368 (2018).

Тезисы

1. Иванова М.А., Абушик П.А., Сибаров Д.А., Антонов С.М. Нейропротекторная роль активации цАМФ на кальциевую регуляцию и внутриклеточные сигнальные каскады при

- гипергомоцистеинемии. *RUSNEUROCHEM 2022: Всероссийская с международным участием конференция Российского нейрохимического общества*, г. Санкт-Петербург (22-24 мая 2022 г.). – Тезисы докладов. – СПб.: Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М.Сеченова РАН, 2022. — С. 121-122.
2. Иванова М.А., Абушик П.А. НЕЙРОПРОТЕКТОРНАЯ РОЛЬ АКТИВАЦИИ ЦАМФ НА КАЛЬЦИВУЮ РЕГУЛЯЦИЮ И ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ КАСАДЫ ПРИ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ. / С.М. Антонов // *Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье: материалы XXV Международной медико-биологической конференции молодых исследователей*, Санкт-Петербург, 16 апреля 2022 года. — Санкт-Петербург: Сциентиа, 2022. — С. 701-702.
 3. Иванова М. А., Абушик П. А. Нейропротекторный эффект форсколина против нейротоксического действия гомоцистеина в нейронах мозжечка и коры головного мозга крыс *in vitro*. *Материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии*. — СПб, 2019 — С. 137-138.
 4. Иванова М.А., Абушик П.А. Нейропротекторный эффект форсколина против нейротоксического действия гомоцистеина в нейронах мозжечка и коры головного мозга крыс *in vitro*. *Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2019»* / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов. [Электронный ресурс]. – М: МАКС Пресс, 2019 – URL: https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2019/data/section_1_15628.htm
 5. Иванова М.А., Абушик П.А. Нейропротекторный эффект форсколина против нейротоксического действия гомоцистеина в нейронах мозжечка и коры головного мозга крыс *in vitro*. *Фундаментальная наука и клиническая медицина — Человек и его здоровье: тезисы XXII Международной медико -биологической конференции молодых исследователей*. — СПб.: Изд-во СПбГУ, 2019. — С. 152.
 6. Иванова М.А., Абушик П.А., Антонов С.М. Анализ экспрессии проапоптотических и антиапоптотических белков при нейропротекторном действии форсколина в условиях эксайтотоксичности в нейронах мозжечка и коры головного мозга крыс. *Актуальные проблемы нейробиологии: Международная конференция «Актуальные проблемы нейробиологии»; X*

Всероссийская школа молодых ученых, посвященная памяти академика РАН Евгения Евгеньевича Никольского; сателитный симпозиум «От нейрона к мозгу» (Казань 9-12 сентября 2019 г.). Тезисы докладов / под общ. ред.: Э.А. Бухараевой, А.Л. Зефирова. – Казань: Издательство Казанского университета, 2019 – С. 60-61.

Список цитируемой литературы

1. Abushik, P.A.; Bart, G.; Korhonen, P.; Leinonen, H.; Giniatullina, R.; Sibarov, D.A.; Levonen, A.L.; Malm, T.; Antonov, S.M.; Giniatullin, R. Pro-nociceptive migraine mediator CGRP provides neuroprotection of sensory, cortical and cerebellar neurons via multi-kinase signaling. *Cephalalgia* 2017, 37, 1373–1383.
2. Abushik, P.A.; Niittykoski, M.; Giniatullina, R.; Shakirzyanova, A.; Bart, G.; Fayuk, D.; Sibarov, D.A.; Antonov, S.M.; Giniatullin, R. The role of NMDA and mGluR5 receptors in calcium mobilization and neurotoxicity of homocysteine in trigeminal and cortical neurons and glial cells. *J. Neurochem.* 2014, 129, 264–274.
3. Bergantin LB, Caricati-Neto A. Challenges for the pharmacological treatment of neurological and psychiatric disorders: Implications of the Ca(2+)/cAMP intracellular signalling interaction. *Eur J Pharmacol.* 2016 Oct 5;788:255-260.
4. Boczek T. et al. Regulation of Neuronal Survival and Axon Growth by a Perinuclear cAMP Compartment. *Journal of Neuroscience* 10 July 2019, 39 (28) 5466-5480.
5. Chang JY, Korolev W, Wang JZ. Cyclic AMP and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) prevent programmed cell death of cultured rat cerebellar granule cells. *Neurosci Lett* 1996; 206(2-3):181-184.
6. Choi D.W. Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* 1992; 23: 1261–1276.
7. Deep, S.N.; Mitra, S.; Rajagopal, S.; Paul, S.; Poddar, R. GluN2A-NMDA receptor-mediated sustained Ca²⁺ influx leads to homocysteine-induced neuronal cell death. *J. Biol. Chem.* 2019, 294, 11154–11165.
8. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF. The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev.* 1999; 51(1): 7-61.
9. Duchen, M.R. Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. *Pflügers Arch.* 2012, 464, 111–121.
10. D'Orsi B, Mateyka J, Prehn JHM. Control of mitochondrial physiology and cell death by the Bcl-2 family proteins Bax and Bok. *Neurochem Int.* 2017 Oct;109:162-170.
11. Erekat NS. Apoptosis and its therapeutic implications in neurodegenerative diseases. *Clin Anat.* 2022 Jan;35(1):65-78.
12. Evstratova AA, Mironova EV, Dvoretzkova EA, Antonov SM. Apoptosis and the receptor specificity of its mechanisms during the neurotoxic action of glutamate. *Neurosci Behav Physiol.* 2009 May; 39(4):353-62.

13. Gillies LA, Du H, Peters B, Knudson CM, Newmeyer DD, Kuwana T. Visual and functional demonstration of growing Bax-induced pores in mitochondrial outer membranes. *Mol Biol Cell*. 2015 Jan 15; 26(2):339-49.
14. Hockberger PE, Tseng HY, Connor JA. Development of rat cerebellar Purkinje cells: electrophysiological properties following acute isolation and in long-term culture. *J. Neurosci*. 1989, 9(7): 2258–2271.
15. Hu, X.W.; Qin, S.M.; Li, D.; Hu, L.F.; Liu, C.F. Elevated homocysteine levels in levodopa-treated idiopathic Parkinson's disease: A meta-analysis. *Acta Neurol. Scand*. 2013, 128, 73e82.
16. Jindal, A.; Rajagopal, S.; Winter, L.; Miller, J.W.; Jacobsen, D.W.; Brigman, J.; Allan, A.M.; Paul, S.; Poddar, R. Hyperhomocysteinemia leads to exacerbation of ischemic brain damage: Role of GluN2A NMDA receptors. *Neurobiol. Dis*. 2019, 127, 287–302.
17. Kaneko Y, Tuazon JP, Ji X, Borlongan CV. Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide Elicits Neuroprotection Against Acute Ischemic Neuronal Cell Death Associated with NMDA Receptors. *Cell Physiol Biochem*. 2018;51(4):1982-1995.
18. Kostandy BB. The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurol Sci*. 2012; 33(2): 223-37.
19. Kostic M, Zivkovic N, Stojanovic I. Multiple sclerosis and glutamate excitotoxicity. *Rev Neurosci*. 2013; 24(1): 71-88.
20. Kroemer G. Introduction: mitochondrial control of apoptosis. *Biochimie* 84: 103–104, 2002
21. Lau A, Tymianski M. Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch*. 2010; 460(2): 525-42.
22. Lauf, P.K.; Alqahtani, T.; Flues, K.; Meller, J.; Adragna, N.C. Interaction between Na-K-ATPase and Bcl-2 proteins BclXL and Bak. *Am. J. Physiol. Cell Physiol*. 2015, 308, C51–C60.
23. Liu W, Zhang L, Li S, Liu C, Tong Y, Fang H, Zhang R, Song B, Xia Z and Xu Y (2021) A Mendelian Randomization Study of Plasma Homocysteine Levels and Cerebrovascular and Neurodegenerative Diseases. *Front. Genet*. 12:653032
24. Ma C-L, Li L, Yang G-M, et al. Neuroprotective effect of gastrodin in methamphetamine-induced apoptosis through regulating cAMP/PKA/CREB pathway in cortical neuron. *Human & Experimental Toxicology*. August 2020:1118-1129.
25. Mironova EV, Evstratova AA, Antonov SM. 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 Methods*. 2007 Jun 15; 163(1):1-8.
26. Montecinos-Oliva, C.; Arrázola, M.S.; Jara, C.; Tapia-Rojas, C.; Inestrosa, N.C. Hormetic-like effects of l-homocysteine on synaptic structure, function, and A β aggregation. *Pharmaceuticals* 2020, 13, 24.

27. Moretto E, Murru L, Martano G, Sassone J, Passafaro M. Glutamatergic synapses in neurodevelopmental disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2018; 84(Pt B): 328-342
28. Neves-Zaph SR, Song RS. Development of computational models of cAMP signaling. *Methods Mol Biol*. 2015;1294:203-17
29. Plotegher N, Filadi R, Pizzo P, Duchen MR. Excitotoxicity Revisited: Mitochondria on the Verge of a Nervous Breakdown. *Trends Neurosci*. 2021 May;44(5):342-351.
30. Ribeiro FM, Paquet M, Cregan SP, Ferguson SS. Group I metabotropic glutamate receptor signalling and its implication in neurological disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2010; 9(5): 574-95.
31. Sibarov, D.A.; Giniatullin, R.; Antonov, S.M. High sensitivity of cerebellar neurons to homocysteine is determined by expression of GluN2C and GluN2D subunits of NMDA receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2018, 506, 648–652.
32. Stepanenko, Y.D., Karelina, T.V., Abushik, P.A. et al. The Importance of Extracellular Potassium for Differentiation of Cerebellar Purkinje Cells in Tissue Cultures. *Neurosci Behav Physi* 50, 115–118 (2020).
33. Szychowski, K.A., Wnuk, A., Rzemieniec, J. et al. Triclosan-Evoked Neurotoxicity Involves NMDAR Subunits with the Specific Role of GluN2A in Caspase-3-Dependent Apoptosis. *Mol Neurobiol* 56, 1–12 (2019).
34. Tan, B.; Venketasubramanian, N.; Vrooman, H.; Cheng, C.Y.; Wong, T.Y.; Ikram, M.K.; Chen, C.; Hilal, S. Homocysteine and Cerebral Atrophy: The Epidemiology of Dementia in Singapore Study. *J. Alzheimers Dis*. 2018, 62, 877–885.
35. Tanaka K. Role of glutamate transporters in the pathophysiology of major mental illnesses. *Nihon Yakurigaku Zasshi*. 2013; 142(6): 291-6.
36. Wang H, Zhao P, Huang Q, Chi Y, Dong S, Fan J. Bisphenol-A induces neurodegeneration through disturbance of intracellular calcium homeostasis in human embryonic stem cells-derived cortical neurons. *Chemosphere*. 2019 Aug;229:618-630.
37. Vervliet T, Parys JB, Bultynck G. Bcl-2 proteins and calcium signaling: complexity beneath the surface. *Oncogene*. 2016 Sep 29; 35(39):5079-92.
38. Vogel MW, Cell death, Bcl-2, Bax, and the cerebellum. *Cerebellum*. 2002 Dec; 1(4):277-87.
39. Yakovlev, A.V.; Kurmashova, E.; Zakharov, A.; Sitdikova, G.F. Network-driven activity and neuronal excitability in hippocampus of neonatal rats with prenatal hyperhomocysteinemia. *Bionanoscience* 2018, 8, 304–309.
40. Zádori D, Veres G, Szalárdy L, Klivényi P, Toldi J, Vécsei L. Glutamatergic dysfunctioning in Alzheimer's disease and related therapeutic targets. *J Alzheimers Dis*. 2014; 42 Suppl 3: S177-87.