

На правах рукописи



Абушик Полина Александровна

**МЕХАНИЗМЫ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ,
ВЫЗВАННОЙ АКТИВАЦИЕЙ РЕЦЕПТОРОВ ГЛУТАМАТА
В ЦЕНТРАЛЬНЫХ И ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕЙРОНАХ КРЫС**

Специальность 03.03.01 – физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2014

Работа выполнена в лаборатории сравнительной физиологии мозжечка Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (г. Санкт-Петербург) и в лаборатории клеточной биологии Института молекулярных исследований им. А.И. Виртанена Университета восточной Финляндии – A.I. Virtanen Institute for Molecular Sciences University of Eastern Finland (г. Куопио).

Научный руководитель: **Антонов Сергей Михайлович**
доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Марков Александр Георгиевич**
доктор биологических наук, профессор
(СПбГУ)

Негуляев Юрий Алексеевич
доктор биологических наук (ЦИН РАН)

Ведущее научное учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН)

Защита диссертации состоится «10» июня 2014 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д.002.127.01 по присуждению ученой степени доктора наук при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук по адресу: 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ИЭФБ РАН (Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44), с авторефератом – на сайте ВАК РФ.

Автореферат разослан « » апреля 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, профессор



Маслова Марина Николаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. L-глутамат (Глу) является основным возбуждающим медиатором центральной нервной системы (ЦНС) млекопитающих (Curtis et al., 1959), который обеспечивает проведение возбуждения от нейрона к нейрону в глутаматергических синапсах. Благодаря участию постсинаптических рецепторов Глу в синаптической пластичности, сам Глу вовлечен в такие когнитивные функции, как обучение и память. Однако в условиях гиперактивации различных типов рецепторов Глу в нейронах могут развиваться нейродегенеративные процессы, связанные с нарушением Ca^{2+} регуляции, которые запускают внутриклеточные сигнальные каскады, приводящие к гибели нейронов (Khodorov, 2004). Известно, что нейротоксичность Глу участвует в патогенезе таких социально значимых неврологических заболеваний как эпилепсия, ишемический инсульт, мигрень, боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона. В связи с этим, изучение механизмов нейротоксического действия Глу и агонистов его рецепторов является одним из наиболее актуальных направлений в современной нейробиологии.

Известно, что в первую очередь, нейротоксическое действие Глу реализуется в глутамат-чувствительных нейронах ЦНС. Однако часть нейродегенеративных заболеваний, сопряженных с гиперактивацией рецепторов Глу, развивается на периферии, в нейронах неглутаматергической природы. Тем не менее, вопрос экспрессии рецепторов Глу и механизмов нейротоксического действия Глу в тканях периферической нервной системы (ПНС) остается мало изученным.

Исследование механизмов развития патологических процессов на целом мозге и ПНС, затруднено из-за их сложной структурной организации и ограничений в применимости современных методов исследований. Большой прогресс в изучении многих аспектов нейродегенерации был достигнут в экспериментах на первичных культурах ткани различных отделов мозга (Bading et al., 1995; Kim, Paе, 1996; Kim et al., 1999), так как данный экспериментальный подход позволяет контролировать внеклеточную среду и рост клеток, дает возможность для исследования внутриклеточных механизмов и межнейронных взаимодействий в нейронной сети. Тем не менее, остается открытым вопрос о сохранности структурно-функциональной специализации нейронов, выделенных из эмбриональной ткани и подверженных культивированию в течение нескольких дней. Являются ли нейроны, выращенные в искусственных условиях гомогенными по своим

функциональным свойствам? Исследование данного вопроса представляется весьма актуальным для правильной интерпретации результатов, полученных на первичной культуре нейронов, и их сопоставления с процессами, происходящими в нейронах мозга взрослых животных.

На сегодняшний день известно, что патогенез многих нейродегенеративных заболеваний сопряжен с увеличением концентрации гомоцистеина (ГЦ) в кровотоке и цереброспинальной жидкости (Krupan et al., 2002; Sachdev, 2005). Данная аминокислота может накапливаться в результате нарушения синтеза метионина и цистеина, вызванного недостатком фолиевой кислоты и витаминов группы В, или вследствие, генетически обусловленного полиморфизма – точечной мутации, заключающейся в замене с цитозина (С) на тимин (Т) в нуклеотиде (С677Т) гена 5'-10'-метилентетрагидрофолат редуктазы (Rozen 1997; Sachdev, 2005; Isobe, Terayama, 2010). Исследования последних лет показали, что ГЦ может взаимодействовать с сайтом связывания Глу или глицина NMDA рецептора (Poddar, Paul, 2013), а значит может быть рассмотрен как новый эндогенный активатор рецепторов Глу (Lipton et al., 1997). Известно, что чрезмерная активация NMDA рецепторов вызывает сильный окислительный стресс, и как следствие, сильную деполяризацию митохондрий (Reyes et al., 2012). Наряду с этим было показано, что в одних экспериментальных моделях, например в эпителиальных клетках, ГЦ вызывал окислительный эффект (Outinen et al., 1998), а в других, таких как нейроны и астроциты, оказывал восстанавливающий эффект (Loureiro et al., 2010). В связи с этим, вопрос вовлеченности ГЦ в индукцию окислительного стресса пока остается открытым.

Несмотря на то, что из-за актуальности для практической медицины изучение цитотоксического действия ГЦ является активно развивающимся направлением нейробиологии, нейротоксическое действие ГЦ, его вовлеченность в окислительный стресс и роль ГЦ в Ca^{2+} сигнализации в центральных и периферических нейронах остаются мало изученными.

Цель исследования. В центральных и периферических нейронах крыс исследовать рецепторные механизмы нейротоксического действия агонистов рецепторов глутамата, вызывающие накопление Ca^{2+} и изменение митохондриального мембранного потенциала.

Для достижения указанной цели были поставлены следующие ***конкретные задачи исследования.***

1. Изучить динамику увеличения концентрации кальция, вызванного активацией NMDA и АМПА рецепторов в нейронах коры мозга крыс *in vitro*.
2. С использованием избирательных блокаторов, изучить субъединичный состав NMDA и АМПА рецепторов, вовлеченных в генерацию кальциевых ответов в нейронах коры мозга крыс *in vitro*.
3. В нейронах коры мозга и тригеминального ганглия крыс в первичной культуре ткани исследовать нейротоксический эффект длительного действия гомоцистеина.
4. В нейронах коры мозга и тригеминального ганглия крыс в первичной культуре сопоставить амплитудно-временные характеристики внутриклеточных кальциевых ответов на гомоцистеин, NMDA и глутамат.
5. Изучить изменения митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Phi_{mit}$), вызванные кратковременным действием гомоцистеина, NMDA и глутамата в нейронах первичной культуры коры мозга и тригеминального ганглия крыс.

Научная новизна. Исследованы Ca^{2+} ответы нейронов коры мозга крыс на каинат, который является сильным нейротоксическим агентом и избирательным агонистом рецепторов АМПА типа (Abushik et al., 2013). Впервые обнаружено, что Ca^{2+} ответы при действии каината развивались гораздо медленнее, чем при активации NMDA рецепторов в нейронах коры мозга. Это обусловлено наличием АМПА рецепторов, которые обладают различной проводимостью для Ca^{2+} в зависимости от экспрессии GluA2 субъединицы, что отражает функциональные характеристики нейрона. Таким образом, было впервые показано, что нейроны в первичной культуре являются гетерогенными и обладают морфофункциональной специализацией, характерной для нейронов коры мозга крыс.

Впервые показано, что нейротоксический эффект ГЦ определяется синергизмом активации NMDA рецепторов и метаботропных рецепторов глутамата, так как избирательные антагонисты каждого из этих рецепторов предотвращали гибель глутамат-чувствительных центральных нейронов, а также пуриnergических и пептидергических периферических нейронов. Были впервые зарегистрированы интегральные трансмембранные токи, вызванные ГЦ в нейронах коры мозга и тригеминального ганглия крыс, и продемонстрировано, что они генерируются в результате активации NMDA рецепторов. Впервые было показано, что в отличие от Глу и NMDA, ГЦ индуцирует кратковременные быстрые кальциевые ответы осцилляторного

типа. Также в отличие от NMDA и Глу, ГЦ не вызывает деполяризацию мембраны митохондрий на начальных этапах нейротоксического действия в нейронах коры мозга и тригеминального ганглия крыс в первичной культуре ткани.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Нейроны коры мозга крыс в первичной культуре ткани, по экспрессии Ca^{2+} -проницаемых и Ca^{2+} -непроницаемых АМПА рецепторов различного субъединичного состава, являются гетерогенными и обладают морфофункциональной специализацией, характерной для нейронов коры мозга крыс.

2. Несмотря на различную медиаторную природу синаптических сигналов нейронов коры мозга и тригеминального ганглия крыс, нейротоксический эффект гомоцистеина в обоих типах нейронов развивается через активацию ионотропных NMDA рецепторов и метаботропных рецепторов глутамата 5 типа.

3. Гомоцистеин, в отличие от NMDA и глутамата, вызывает кратковременные быстрые кальциевые ответы осцилляторного типа и не вызывает падения митохондриального мембранного потенциала в нейронах коры мозга и тригеминального ганглия крыс в первичной культуре, а следовательно, не вызывает окислительный стресс на начальных этапах нейротоксического действия.

Теоретическая и практическая значимость. Работа имеет фундаментальное значение для науки в области исследования нейродегенеративных процессов, участвующих в патогенезе таких социально значимых заболеваний, как инсульт, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и мигрень с аурой. Теоретическое значение работы состоит в расширении представлений о механизмах нейродегенерации, вызванной чрезмерной активацией рецепторов Глу. Результаты исследования могут быть полезны для понимания механизмов возникновения и развития нейродегенеративных состояний, неврологических расстройств в ЦНС и ПНС, а также для выявления возможных механизмов защиты нейронов от гибели.

Результаты работы могут быть использованы в курсах лекций для студентов биологических и медицинских факультетов университетов и медицинских институтов.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 14 печатных работ, 4 из которых статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ для

размещения материалов кандидатских диссертаций (в том числе 3 статьи в международных журналах), 10 тезисов докладов.

Апробация работы. Результаты исследования представлены на XXI и XII съезде физиологического общества им. И.М. Павлова (Калуга, 2010; Волгоград, 2013), на XVIII международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2011» (Москва, 2011), на четырнадцатом международном совещании и седьмой школе по эволюционной физиологии (Санкт-Петербург, 2011) на III Съезде Физиологов СНГ «Физиология и здоровье человека» (Украина, Ялта, 2011), на восьмом форуме европейской федерации нейробиологов 8th FENS Forum of Neuroscience 2012 (Испания, Барселона, 2012), на седьмом и восьмом ежегодном симпозиуме Университета восточной Финляндии The Annual Post-Graduate Symposium of the Doctoral Program in Molecular Medicine: Winter School (Финляндия, Нильсия, 2013, 2014) и на ежегодной встрече общества нейробиологов Neuroscience 2013 (США, Сан-Диего, 2013).

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 113 страницах машинописного текста и состоит из общей характеристики работы, обзора литературы по исследуемой проблеме – глава 1, описания методики экспериментов – глава 2, результатов исследования – глава 3, обсуждения результатов экспериментов – глава 4, выводов и списка литературы, включающего 184 источника (из них 164 иностранных). Работа иллюстрирована 26 рисунками и 1 таблицей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Приготовление первичных культур нейронов. Исследования проводили на первичной культуре нейронов коры головного мозга крыс линии Вистар, развивающихся *in vitro* 7 – 10 суток. Культуру приготавливали из эмбрионов на 16 – 17 день пренатального развития. Детально методика культивирования нейронов коры мозга была описана в Mironova et al., 2007 и Han, Stevens, 2009.

Первичную культуру нейронов тригеминального ганглия крыс линии Вистар, приготавливали из крысят на 10 день постнатального развития, когда ганглий полностью сформирован. Клетки культивировались в течение 3 – 5 дней. Детально методика культивирования нейронов тригеминального ганглия крыс была описана ранее (Malin et al., 2007; Abushik et al., 2013).

Культивирование нейронов коры мозга и тригеминального ганглия крыс осуществляли при температуре 37⁰С и содержании CO₂ 5 %.

Выявление апоптотических и некротических клеток путем последовательного окрашивания акридиновым оранжевым и бромистым этидием. Для выявления живых, некротических и апоптотических нейронов методом конфокальной микроскопии клетки в культуре последовательно окрашивали флуорохромами акридиновым оранжевым (АО, 5 мкг/мл) и бромистым этидием (БЭ, 5 мкг/мл). Флуоресценцию красителей измеряли на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MF ($\lambda_{\text{ex}}=488$ нм, $\lambda_{\text{em}}=525, 610$ нм). Ядра нейронов с деструктурированной мембраной окрашивались БЭ и светились красным светом, ядра живых нейронов окрашивались АО и светились зеленым или оранжевым. Полученные изображения анализировали в программе ImageJ, как описано в работе Sibarov et al. (2012).

Флуориметрическая регистрация внутриклеточного Ca^{2+} . Для визуализации внутриклеточного Ca^{2+} в нейроны загружали флуоресцентный зонд Fluo-3 AM (4 мкМ), который позволяет получить относительные значения концентрации $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в микромолярном диапазоне. Покровные стекла с нейронами переносили в регистрационную/перфузионную камеру. Флуоресценцию нейронов измеряли на инвертированном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP или флуоресцентном микроскопе Olympus IX-70 ($\lambda_{\text{ex}}=488$ нм, $\lambda_{\text{em}}=525$ нм) с частотой сканирования от 0,03 до 2 кадр/с, в зависимости от времени эксперимента. Флуоресцентное изображение оцифровывали при помощи программного обеспечения Leica LAS AF и при помощи программы TILL Photonics.

Флуориметрическое определение митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\varphi_{\text{mit}}$). Для измерения митохондриального мембранного потенциала в нейроны загружали флуоресцентный зонд родамин 123 (Rho123, 5 мкМ). Покровные стекла с нейронами переносили в регистрационную/перфузионную камеру. Флуоресценцию нейронов измеряли на инвертированном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP ($\lambda_{\text{ex}}=488$ нм, $\lambda_{\text{em}}=530$ нм) с частотой сканирования 0,03 кадр/с. Полученные конфокальные изображения с флуоресценцией Rho123 оцифровывали при помощи программного обеспечения Leica LAS AF.

В качестве контроля для измерения $\Delta\varphi_{\text{mit}}$ использовали протонофор carbonyl cyanide *p*-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP, 4 мкМ), который приводил к полному разобщению дыхательной цепи – падению $\Delta\varphi_{\text{mit}}$, вызывая тем самым максимум эмиссии Rho123 (Vergun et al., 2003; Duchon 2012).

Регистрация токов нейронов культуры методом локальной фиксации потенциала. Регистрацию интегральных токов проводили в

конфигурации «целая клетка» (Hamill et al., 1981). Внутриклеточный раствор для заполнения микроэлектрода имел следующий состав: 9 мМ NaCl, 17,5 мМ KCl, 121,5 мМ К-глюконат, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ HEPES, 0,2 мМ EGTA, 2 мМ MgATP, 0,5 мМ NaGTP (Han, Stevens, 2009). Для регистрации токов применяли усилитель MultiClamp 700B с системой сбора данных Digidata 1440A и программное обеспечение pClamp v10.2

Порядок проведения экспериментов. В опытах с нейронами коры мозга использовали физиологический раствор следующего состава: 140 мМ NaCl, 2,8 мМ KCl, 10 мМ Hepes, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂. В опытах с нейронами тригеминального ганглия использовали физиологический раствор следующего состава: 152 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 10 мМ Hepes, 10 мМ глюкоза, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ Mg Cl₂. Уровень pH = 7.2 – 7.4. Во всех экспериментах при измерении трансмембранных токов, внутриклеточных Ca²⁺ ответов и при измерении $\Delta\phi_{mit}$ из наружного раствора был исключен Mg²⁺.

Для анализа долговременного действия высоких концентраций ГЦ нейроны в первичной культуре инкубировали при 37⁰С в течение 24 часов в ростовой среде (контрольные условия) или ростовой среде, содержащей агонисты или агонисты в комбинации с антагонистами. Ростковая среда для первичных культур клеток содержит в своем составе 100 мкМ глицина (Гли). В связи с этим, в экспериментах по исследованию Ca²⁺ ответов и измерению $\Delta\phi_{mit}$ ГЦ всегда добавляли совместно со 100 мкМ Гли, как ко-агониста NMDA рецепторов.

Определение выживаемости клеток, регистрацию интегральных токов, флуориметрическое измерение внутриклеточной концентрации Ca²⁺ и измерение $\Delta\phi_{mit}$ проводили при комнатной температуре (21-23⁰С). Покровное стекло с культурой клеток для проведения опытов помещали в регистрационную/перфузионную камеру, которую устанавливали на предметный столик микроскопа. Камеру подключали к системе общей и быстрой локальной перфузии. На протяжении всего эксперимента (10 – 60 мин) клетки перфузировали с помощью общей перфузии физиологическим раствором со скоростью 1 мл/мин. Действующие вещества апплицировались на клетки с помощью быстрой локальной перфузии с аналогичной скоростью. Полное замещение раствора вокруг нейронов происходило менее чем за 1 сек.

Для индукции нейротоксического стресса были выбраны насыщающие концентрации агонистов, коагонистов и антагонистов рецепторов Глу: 30 мкМ NMDA, 30 мкМ КА, 100 или 500 мкМ D,L-ГЦ, 300 мкМ Глу, 30 или 100 мкМ Гли, 10

мкМ α ВТФ, 200 нМ капсаицина, 10 мкМ МТЕР, 50 мкМ L-AP-5, 10 мкМ ифенпродила и 3 мкМ ИЭМ-1460.

Статистическая обработка результатов. Полученные данные подвергались статистической обработке с использованием компьютерных программ Origin 6.1, SigmaPlot 8 и GraphPad Prizm 5. При установлении достоверности различий данных использовали t -критерий Стьюдента и U -критерий Манна-Уитни (ANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Состав рецепторов глутамата, обеспечивающих вход Ca^{2+} при действии агонистов рецепторов глутамата в нейронах первичной культуры коры мозга крыс.

Нормальная синаптическая функция Глу и нейродегенерация, вызванная его длительным действием (эксайтотоксичность), реализуются за счет активации ионотропных рецепторов Глу. В нейронах коры мозга в основном экспрессируются NMDA и АМПА рецепторы.

Роль NMDA и АМПА рецепторов в «эксайтотоксичности» общеизвестна. Длительное действие NMDA и КА – избирательных синтетических агонистов соответственно, NMDA и АМПА/КА рецепторов (Dingledine et al., 1999), вызывает гибель нейронов путем некроза и апоптоза, причем нейротоксическое действие КА сильнее, чем NMDA (Евстратова и др., 2008; Mironova et al., 2007; Sibarov et al., 2012). При действии NMDA и КА в нейронах развивается Ca^{2+} -сигнал, сопровождающийся отсроченной кальциевой дисрегуляцией. Динамики повышения $[Ca^{2+}]_i$ при действии NMDA и КА заметно различаются (рис. 1). При аппликации NMDA нейроны отвечали резким повышением интенсивности флуоресценции, которое является результатом увеличения $[Ca^{2+}]_i$. Достигнув максимума, интенсивность флуоресценции оставалась на стационарном уровне (рис. 1а). В присутствии КА, в отличие от NMDA, динамика роста флуоресцентного Ca^{2+} сигнала значительно варьировала: в отдельных нейронах наблюдалось резкое повышение, сходное по кинетике с NMDA, а в большинстве нейронов происходило медленное градуальное нарастание флуоресценции, достигавшее максимума после 30 мин воздействия КА (рис. 1б). При этом известно, что источником Ca^{2+} в обоих случаях является внеклеточная среда (Абушик и др., 2011; Abushik et al., 2013).

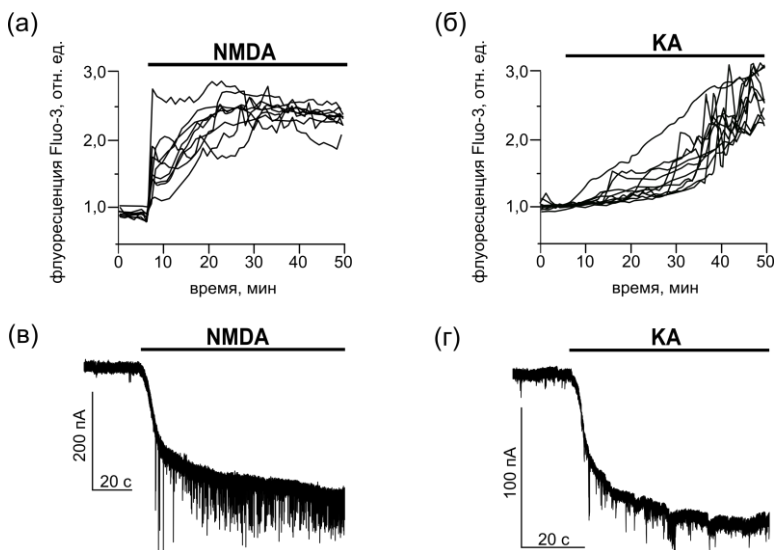


Рис. 1. Сопоставление динамики внутриклеточных Ca^{2+} ответов и токов в нейронах при действии 30 мкМ NMDA и 30 мкМ KA. **(а)** Динамика увеличения интенсивности флуоресценции Ca^{2+} в нейронах при действии 30 мкМ NMDA и 30 мкМ KA **(б)** Каждая из кривых представляет собой зарегистрированный в соме флуоресцентный Ca^{2+} ответ одного нейрона. **(в)** Ток в нейронах первичной культуры коры мозга крыс, демонстрирующий ответ на 30 мкМ NMDA и 30 мкМ KA **(г)**, при мембранном потенциале -70 мВ. Момент аппликации и длительность действия NMDA и KA показаны линией над графиками. Представлены данные из одного эксперимента. Число опытов 4 – 5.

При регистрации токов методом локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» было выявлено, что входящие токи при действии 30 мкМ NMDA или 30 мкМ KA быстро достигают своего максимума и остаются на неизменном уровне на протяжении всего времени действия агонистов (рис. 1в и рис. 1г). В отличие от NMDA динамики нарастания токов и Ca^{2+} ответов на KA существенно различались.

Если пути проникновения Ca^{2+} в цитоплазму нейронов для NMDA понятны - канал NMDA рецептора обладает высокой проводимостью для Ca^{2+} (Burnashev et al., 1995), то для KA, судя по различию динамики Ca^{2+} ответа, они остаются не ясными и, по-видимому, могут варьировать.

Одним из основных путей входа Ca^{2+} в нейроны при активации рецепторов Глу являются NMDA рецепторы. Другим путем проникновения Ca^{2+} в нейроны коры могут являться Ca^{2+} -проницаемые АМПА рецепторы. Ca^{2+} проводимость канала АМПА рецептора определяется наличием в его

структуре GluA2 субъединицы (Burnashev et al., 1992). В экспериментах с ИЭМ-1460, который является избирательным блокатором каналов АМПА рецепторов, не имеющих GluA2 субъединицу, нейроны по типу Ca^{2+} ответов разделились на три группы (рис. 2):

1) сочетанная аппликация КА и ИЭМ-1460 вызывала кратковременное повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, которое затем, блокировалось; отмывка ИЭМ-1460 приводила к значительному увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 2а, выделены зеленым цветом);

2) сочетанная аппликация КА и ИЭМ-1460 вызывала повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, сопровождавшееся Ca^{2+} осцилляциями; отмывка от ИЭМ-1460 не приводила к каким-либо изменениям (рис. 2а, выделены синим цветом);

3) сочетанная аппликация КА и ИЭМ-1460 вызывала повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, сопровождавшееся существенными Ca^{2+} осцилляциями, отмывка ИЭМ-1460 приводила к значительному увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 2а, выделены красным цветом).

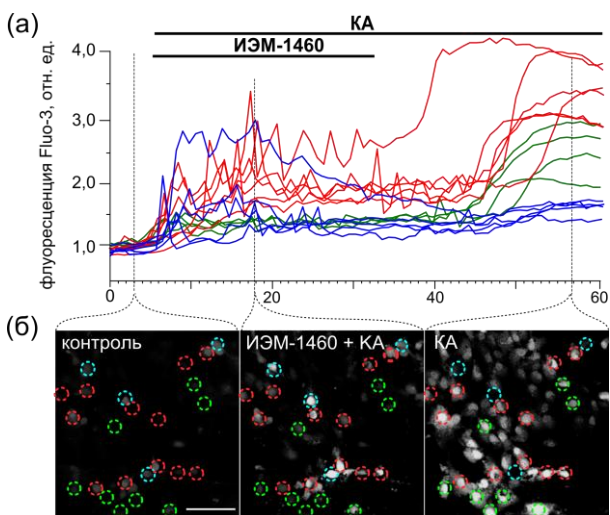


Рис. 2. Три типа внутриклеточных Ca^{2+} ответов в нейронах на сочетанную аппликацию 30 мкМ КА и 3 мкМ ИЭМ-1460. Представлены данные из одного опыта.

На (а) каждая из кривых представляет собой зарегистрированный в some флуоресцентный Ca^{2+} -ответ одного нейрона.

Подробное описание типов ответов дано в тексте. Линии над графиками показывают момент

аппликации КА и ИЭМ-1460. В части (б) рисунка находятся три флуоресцентных изображения нейронов, зарегистрированных в моменты, отмеченные пунктирными линиями над соответствующими регистрациями. Нейроны отмечены в соответствии с цветом их ответа на ИЭМ-1460. Масштабная линия – 100 мкм. Число опытов – 3.

Известно, что разные типы нейронов коры и гиппокампа экспрессируют АМПА рецепторы различного субъединичного состава. В частности, пирамидные нейроны коры и гиппокампа экспрессируют АМПА рецепторы,

содержащие GluA2, а вставочные нейроны – АМПА рецепторы, не содержащие GluA2 (Samoilova et al., 1999). Это позволяет соотнести типы действия ИЭМ-1460 на внутриклеточный Ca^{2+} сигнал, вызванный гиперактивацией АМПА рецепторов с морфофункциональными типами нейронов коры (Angulo et al., 1997; Kondo et al., 1997; Kumar et al., 2002).

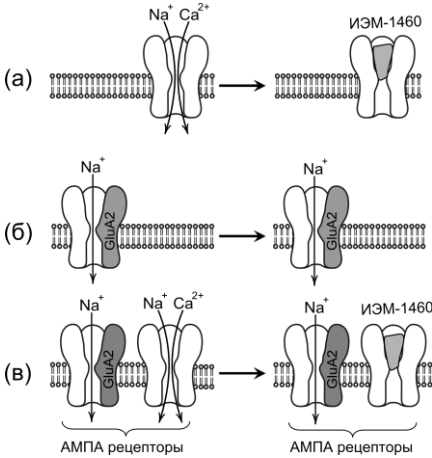


Рис. 3. Схема, интерпретирующая различные типы Ca^{2+} реакции нейронов на КА, выявленные с использованием ИЭМ-1460. Подробное объяснение приведено в тексте. **(а)** Нейрон, экспрессирующий на мембране АМПА рецепторы, не содержащие GluA2 субъединицу; **(б)** нейрон, экспрессирующий на мембране АМПА рецептор с GluA2 субъединицей; и **(в)** нейрон, экспрессирующий на мембране оба типа АМПА рецепторов.

В этом случае на рис. 3 схемы, отмеченные буквой (а) и (в), описывают ситуацию, характеризующую для вставочных нейронов, так как их мембраны обладают Ca^{2+} -проницаемыми АМПА рецепторами, не содержащими GluA2 субъединицу; схема, отмеченная буквой (б), представляют собой ситуацию характерную для пирамидных нейронов, так как в их мембране экспрессируются Ca^{2+} -непроницаемые АМПА рецепторы, содержащие GluA2 субъединицу. Очевидно, в первичной культуре коры имеются морфофункциональные типы нейронов, характерные для коры мозга крыс.

Нейротоксический эффект гомоцистеина на нейроны коры мозга крыс и на нейроны тригеминального ганглия крыс in vitro

Все больше исследований говорят о вовлеченности в развитие нейродегенеративных процессов не только Глу, но и других аминокислот. Считается общепризнанным, что при таких нейродегенеративных заболеваниях как болезнь Альцгеймера (Agnati et al., 2005), болезнь Паркинсона (Kuhn et al., 2001; Kruman et al., 2002; Sachdev, 2005), боковой амиотрофический склероз (Zoccolella et al., 2012) и мигрень (Lea et al., 2009; Oterino et al., 2010) в плазме крови и цереброспинальной жидкости пациентов повышена не только концентрация Глу, но и наблюдается гипергомоцистеинемия - увеличение концентрации ГЦ.

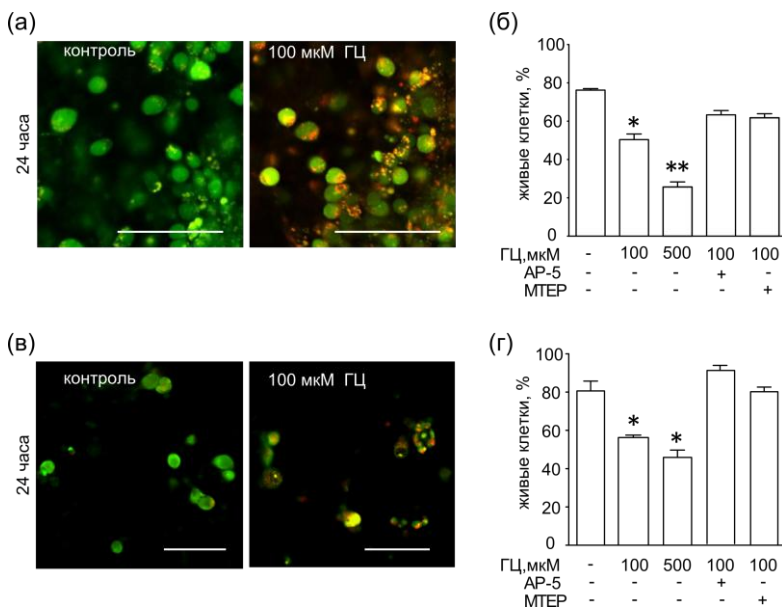


Рис. 4. Нейротоксическое действие гомоцистеина (ГЦ) на нейроны коры мозга и тригеминального ганглия крыс *in vitro*. **(а)** Флуоресцентное изображение нейронов в первичной культуре коры мозга и **(в)** тригеминального ганглия крыс после 24 часов в контрольных условиях («контроль») и после действия 100 мкМ ГЦ, полученное с помощью окрашивания АО и БЭ. Масштабная линейка 100 мкм. **(б)** Гистограмма процента живых клеток после 24 ч действия в контроле, после действия только 100 мкМ или 500 мкМ ГЦ, или 100 мкМ ГЦ совместно с 50 мкМ AP-5 или 10 мкМ МТЕР в нейронах коры мозга и **(г)** тригеминального ганглия крыс. Представлены данные со стандартной ошибкой (* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$) по 3-5 экспериментам.

Нейротоксичность Глу на первичной культуре нейронов коры мозга крыс исследована достаточно хорошо (Евстратова и др., 2008; Mironova et al., 2007; Sibarov et al., 2012). Механизм действия высоких концентраций ГЦ на клетки первичной культуры нейронов коры практически не изучены. Известно, что L-гомоцистеиновая кислота, которая является ближайшим по строению к L-Глу соединением и ближайшим к L-ГЦ, может взаимодействовать с NMDA рецепторами и метаботропными рецепторами Глу I группы сильнее, чем сам ГЦ (Shi et al., 2003). Однако гипергомоцистеинемия связана с увеличением концентрации самого ГЦ в плазме и цереброспинальной жидкости (Surtees et al., 1997). В связи с этим, для исследования механизмов действия ГЦ на клетки ЦНС (нейроны коры мозга крыс *in vitro*) и ПНС (нейроны тригеминального ганглия крыс *in vitro*) был использован D,L-ГЦ.

Было выявлено, что при долговременном действии ГЦ на нейроны коры и нейроны тригеминального ганглия он вызывает гибель нейронов по механизму апоптоза, иными словами, оказывает цитотоксический эффект (рис. 4). Селективные антагонисты рецепторов NMDA и мГлуP5 типа - AP-5 и МТЕР, соответственно, предотвращали развитие клеточной гибели при долговременном действии ГЦ как в клетках коры, так и в клетках тригеминального ганглия крыс *in vitro* (рис. 4). Эти результаты подтвердили, что механизм действия ГЦ в клетках ЦНС и ПНС реализуется через NMDA и мГлуP5 рецепторы (Lipton et al., 1997; Shi et al., 2003; Poddar, Paul, 2009, 2013; Yeganeh et al., 2013).

Внутриклеточные Ca^{2+} ответы, интегральные токи и митохондриальный мембранный потенциал в нейронах коры мозга и тригеминального ганглия крыс *in vitro*.

В связи с тем, что ГЦ оказывает нейротоксический эффект на нейроны ЦНС и ПНС было интересно исследовать внутриклеточные Ca^{2+} ответы, вызванные самим ГЦ, и сопоставить их с ответами на NMDA и Глу.

Кратковременное действие ГЦ вызывает в нейронах Ca^{2+} ответы, которые различаются по своей динамике в нейронах коры (рис. 5) и нейронах тригеминального ганглия (рис. 6). Однако в обоих случаях Ca^{2+} ответы блокируются AP-5 и/или МТЕР, подтверждая вовлеченность NMDA рецепторов и мГлуP5 (рис. 5б, рис. 6б). Ca^{2+} -ответ в нейронах коры мозга крыс представлял собой Ca^{2+} осцилляции (рис. 5а), отличные от характерной Ca^{2+} динамики, вызванной действием NMDA или Глу (рис. 5в). Это можно объяснить тем, что параметры активации рецепторов Глу ГЦ отличны от параметров действия Глу и NMDA.

Известно, что нейроны в тригеминальном ганглии крыс в основном экспрессируют P_2X_3 и TRPV₁ рецепторы, участвующие в ноцицепции, при этом существуют нейроны, которые имеют на мембране один тип рецепторов, оба типа рецепторов, и небольшая доля нейронов не имеющая ноцицептивных рецепторов вовсе. При сопоставлении Ca^{2+} ответов, вызванных ГЦ в нейронах тригеминального ганглия, с экспрессией P_2X_3 и TRPV₁ рецепторов не было выявлено какой-либо зависимости типов Ca^{2+} ответов на ГЦ от фенотипа нейрона (рис. 6в).

Нейронах тригеминального ганглия крыс обладали большой гетерогенностью в отношении амплитудно-временных характеристик Ca^{2+} ответов на кратковременное действие ГЦ. Наблюдались Ca^{2+} ответы с одиночным пиком (рис. 6а, рис. 7б), ответы с множественными осцилляциями

(аналогичные ответам в нейронах коры) или постепенно нарастающие Ca^{2+} ответы (рис. 6а, рис. 7а). Такое разнообразие Ca^{2+} ответов может быть опосредовано различным составом рецепторов Глу на плазматической мембране нейронов тригеминального ганглия.

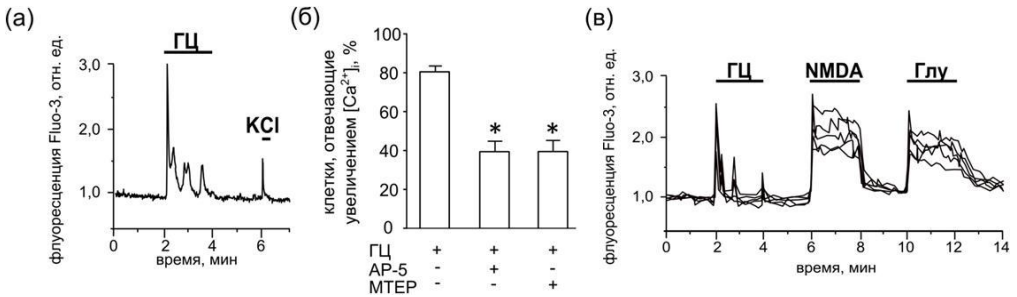


Рис. 5. Внутриклеточные Ca^{2+} ответы, вызванные кратковременным действием 100 мкМ гомоистеина (ГЦ) на нейроны коры мозга крыс. **(а)** Ca^{2+} ответ одиночного нейрона, вызванный аппликацией 100 мкМ ГЦ на 2 мин, 50 мкМ KCl использованы в качестве маркера нейрона. **(б)** Процентное соотношение нейронов, дающих Ca^{2+} ответ на кратковременную аппликацию (2 мин) 100 мкМ ГЦ одного, или в комбинации с 50 мкМ AP-5 или 10 мкМ MTEP. Представлены данные со стандартной ошибкой (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$) по 3 – 5 экспериментам. **(в)** Внутриклеточные Ca^{2+} ответы при действии 100 мкМ ГЦ, 30 мкМ NMDA и 300 мкМ глутамата (Глу) на нейроны первичной культуры коры мозга крыс. Для части а и в каждая из кривых представляет собой зарегистрированный в соме флуоресцентный Ca^{2+} ответ одного нейрона. Момент аппликации и длительность действия ГЦ, KCl, NMDA и Глу показаны жирной линией над графиком. Представлены данные из одного эксперимента. Число опытов 3 – 4.

Сопоставление Ca^{2+} ответов, вызванных ГЦ, с ответами вызванными NMDA и Глу в тригеминальном ганглии (рис. 7), выявило не только различия в механизмах действия данных агонистов, но и две группы клеток: отвечающие на все агонисты (рис. 7а) и не отвечающие увеличением Ca^{2+} на действие NMDA и Глу (рис. 7б). В первой группе клеток Ca^{2+} ответы на ГЦ имели в основном динамику с множественными осцилляциями и постепенным нарастающим увеличением Ca^{2+} . Вторая группа клеток давала сильный Ca^{2+} ответ в форме одиночного пика только на ГЦ. Это связано с тем, что данный тип нейронов тригеминального ганглия экспрессирует только мГлуР5 и выход Ca^{2+} здесь происходит только за счет внутриклеточных Ca^{2+} депо в ЭПР.

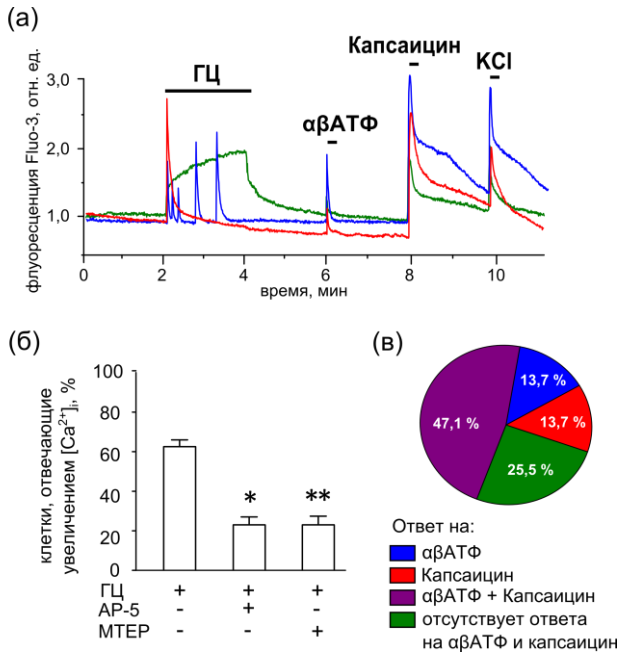


Рис. 6. Внутриклеточные Ca^{2+} ответы нейронов тригеминального ганглия крыс *in vitro* на кратковременную аппликацию 100 мкМ гомоцистеина (ГЦ). **(а)** Три типа Ca^{2+} ответов нейронов на действие 100 мкМ ГЦ в течение 2 мин: быстрый одиночный ответ (красный), осцилляторный ответ (синий) и нарастающий ответ (зеленый). Момент аппликации и длительность действия ГЦ, 10 мкМ αβАТФ, 200 нМ капсаицина и 50 мМ КСl показаны линиями над графиками. Каждая из кривых представляет собой зарегистрированный в соме флуоресцентный Ca^{2+} ответ одного нейрона. Представлены данные из одного эксперимента. **(б)** Процентное соотношение нейронов, генерирующих Ca^{2+} ответ на кратковременную аппликацию (2 мин) 100 мкМ ГЦ одного, или в комбинации с 50 мкМ АР-5 или 10 мкМ МТЕР. Представлены данные со стандартной ошибкой (* – $p < 0.05$, ** – $p < 0.01$). **(в)** Круговая гистограмма фенотипа нейронов, дающих Ca^{2+} ответ на кратковременную аппликацию (2 мин) 100 мкМ ГЦ. Нейроны, экспрессирующие P_2X_3 рецепторы (отвечают на αβАТФ; синий и фиолетовый), нейроны, экспрессирующие $TRPV_1$ рецепторы (отвечают на капсаицин; красный и фиолетовый), нейроны не имеющие в составе мембраны P_2X_3 и $TRPV_1$ рецепторы (зеленый). На всех частях представлены данные по 5 экспериментам.

Данные по изучению внутриклеточных Ca^{2+} ответов согласуются с результатами электрофизиологических экспериментов. Было обнаружено, что в нейронах тригеминального ганглия кратковременная аппликация 50 мкМ АР-5 вызвала полное блокирование интегрального тока, вызванного 100 мкМ ГЦ (совместно с 100 мкМ Гли) (рис. 7в), подтверждая, что в механизм

действия ГЦ в нейронах тригеминального ганглия вовлечены рецепторы NMDA типа.

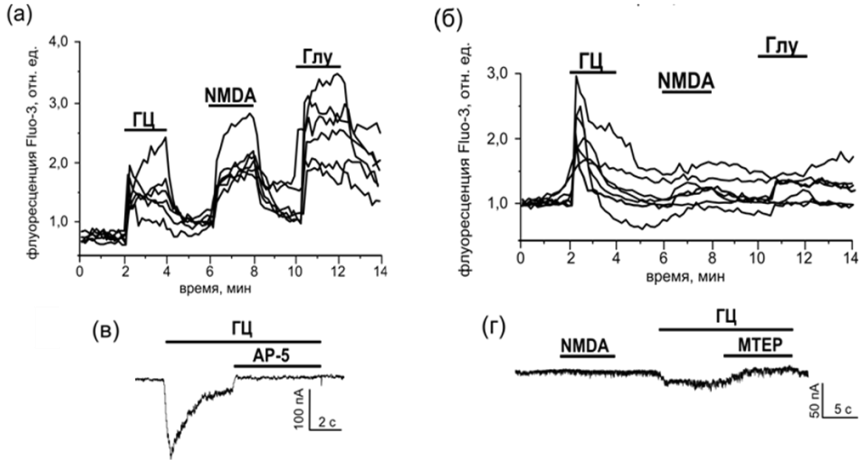


Рис. 7. Внутриклеточные Ca^{2+} ответы и интегральные токи при действии 100 мкМ гомоцистеина (ГЦ), 30 мкМ NMDA или 300 мкМ глутамата (Глу) на нейроны первичной культуры тригеминального ганглия крыс. (а) Нейронов, дающие Ca^{2+} ответ на ГЦ, NMDA и Глу. (б) Нейроны, дающие Ca^{2+} ответы только на ГЦ. Момент аппликации и длительность действия ГЦ, NMDA и Глу показаны линией над графиками. Каждая из кривых представляет собой зарегистрированный в соме флуоресцентный Ca^{2+} ответ одного нейрона. Представлены данные из одного эксперимента. Число опытов – 3. (в) Входящие интегральные токи, вызванные 100 мкМ ГЦ, с последующей аппликацией 50 мкМ AP-5, блокирующего ток в одиночном нейроне. (г) Интегральный ток в NMDA-нечувствительном нейроне, вызванный 100 мкМ ГЦ и полностью блокируемый 10 мкМ MTEP. Представлены данные из одного эксперимента. Число клеток – 38.

Однако в части тригеминальных нейронов 30 мкМ NMDA (совместно с Гли) не вызывало интегральных токов, в то время как 100 мкМ ГЦ вызывал небольшой ток, полностью блокируемый 10 мкМ MTEP (рис. 7г). Также была выявлена популяция клеток (не представлены на рисунке), в мембране которой имелись NMDA и мГлуP5 рецепторы, где MTEP вызывал небольшое изменение входящего тока.

Таким образом, в культуре нейронов тригеминального ганглия, в отличие от культуры нейронов коры мозга, существуют нейроны, экспрессирующие на мембране только мГлуP5 рецепторы. Данный тип клеток будет давать Ca^{2+} ответы, отличные от ответов в нейронах коры (предполагаем, что это одиночный Ca^{2+} ответ) на действие 100 мкМ ГЦ.

В связи с тем, что ГЦ, NMDA и Глу могут оказывать нейротоксический эффект на нейроны ЦНС и ПНС было интересно исследовать влияние данных агонистов рецепторов Глу на $\Delta\phi_{mit}$, как маркер состояния митохондрий.

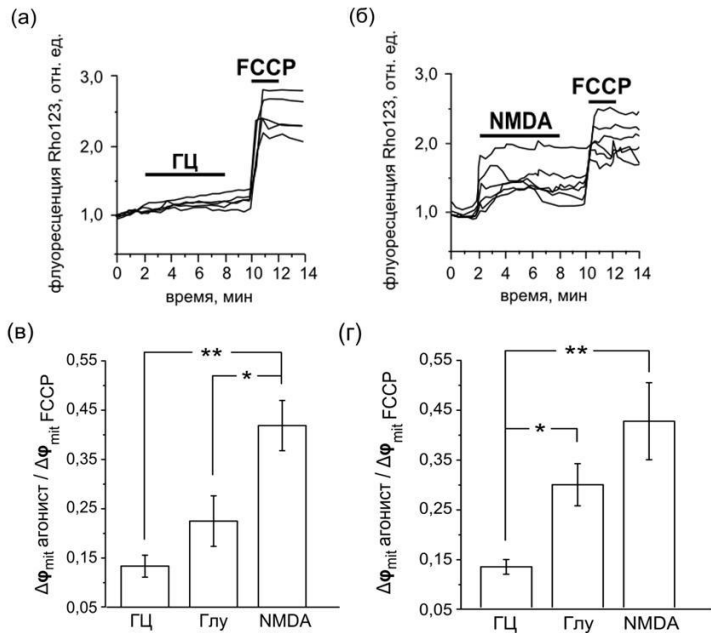


Рис. 8. Изменение митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\phi_{mit}$) в нейронах тригеминального ганглия и коры мозга крыс *in vitro*. **(а)** Падение $\Delta\phi_{mit}$, вызванное в течение 6 мин действия 100 мкМ гомоцистеина (ГЦ) и 30 мкМ NMDA **(б)** в нейронах тригеминального ганглия крыс. В качестве контроля полного падения $\Delta\phi_{mit}$ в нейроне на 2 мин подавали 4 мкМ FCCP. Отношение падения митохондриального мембранного потенциала, вызванного агонистами рецепторов глутамата (Глу), к полному падению при разобщении дыхательной цепи - $\Delta\phi_{mit}^{\text{агонист}} / \Delta\phi_{mit}^{\text{FCCP}}$ в нейронах тригеминального ганглия **(в)** и нейронах коры мозга крыс **(г)**. Представлены данные со стандартной ошибкой (* - $p < 0.05$, ** - $p < 0.01$) по 3 экспериментам.

В экспериментах с измерением $\Delta\phi_{mit}$ не было выявлено падения митохондриального потенциала при кратковременном действии 100 мкМ ГЦ в нейронах тригеминального ганглия (рис. 8а, рис. 8в) и нейронах коры мозга (рис. 8г). По сравнению с ГЦ (рис. 8а), NMDA вызывал большее смещение $\Delta\phi_{mit}$ в нейронах тригеминального ганглия (рис. 8б) и в нейронах коры мозга (рис. 8г). Кинетика активации рецепторов Глу при действии агонистов разная, а следовательно, входящие токи и вход Ca^{2+} в нейроны могут быть отличными. По-видимому, при действии ГЦ параметры активации являются

недостаточными для запуска окислительного стресса в данной временной шкале.

Таким образом, цитотоксический эффект ГЦ, в отличие от Глу, реализуется только через ионотропные рецепторы Глу NMDA типа и мГлуP5, вызывая в первые минуты действия внутриклеточную Ca^{2+} мобилизацию в нейронах ЦНС и ПНС, которая впоследствии может запускать необратимые изменения в клетки приводящие к гибели нейронов, детектируемой спустя 24 часа действия ГЦ.

ВЫВОДЫ

1. Динамика кальциевых ответов на каинат в нейронах коры мозга крыс *in vitro* определяется соотношением экспрессии Ca^{2+} -проницаемых (не содержащих GluA2 субъединицу) и Ca^{2+} -непроницаемых (содержащих GluA2 субъединицу) АМПА рецепторов, что отражает функциональную специализацию нейронов, характерную для нейронов коры мозга взрослых крыс.

2. Долговременное действие гомоцистеина вызывает гибель нейронов коры мозга и тригеминального ганглия крыс в первичной культуре ткани и определяется синергизмом активации NMDA и метаботропных рецепторов глутамата 5 типа, так как избирательные антагонисты каждого из этих рецепторов предотвращают апоптоз.

3. Нейроны коры мозга крыс *in vitro* проявляют сходную реакцию на действие агонистов рецепторов глутамата. NMDA и глутамат вызывают быстрое увеличение концентрации внутриклеточного кальция, достигающее стационарного уровня, который сохраняется на протяжении всего времени действия агониста. Гомоцистеин, в отличие от NMDA и глутамата, вызывает быстро спадающие кальциевые ответы осцилляторного типа.

4. Нейроны тригеминального ганглия крыс *in vitro* различаются по реакции на действие агонистов рецепторов глутамата. В части нейронов гомоцистеин вызывает одиночные быстро спадающие кальциевые ответы, при этом отсутствуют ответы на NMDA и глутамат. В нейронах генерирующих типичный ответ на NMDA и глутамат, гомоцистеин вызывает либо постепенно нарастающие ответы, либо кальциевые ответы осцилляторного типа. Гетерогенность нейронов обусловлена различным соотношением экспрессии NMDA и метаботропных рецепторов глутамата 5 типа в плазматической мембране периферических нейронов.

5. Гомоцистеин, в отличие от NMDA и глутамата, не вызывает падение митохондриального мембранного потенциала в нейронах коры мозга и тригеминального ганглия крыс в первичной культуре ткани, а следовательно, не вызывает окислительный стресс на начальных этапах нейротоксического действия.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах

1. **Abushik P.A.**, Niitykoski 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 // *Journal of Neurochemistry*. 2014. V. 129. № 2. P. 264 – 274.

2. **Abushik P.A.**, Sibarov D.A., Eaton M.J., Skatchkov S.N., Antonov S.M. Kainate-induced calcium overload of cortical neurons in vitro: dependence on expression of AMPAR GluA2-subunit and down-regulation by subnanomolar ouabain // *Cell Calcium*. 2013. V. 54. № 2. P. 95 – 104.

3. Sibarov D.A., Bolshakov A.E., **Abushik P.A.**, Krivoi I.I., Antonov S.M. Na⁺,K⁺-ATPase functionally interacts with the plasma membrane Na⁺,Ca²⁺-exchanger to prevent Ca²⁺ overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2012. V. 343. № 3. P. 596 – 607.

4. **Абушик П.А.**, Большаков А.Е., Сибаров Д.А., Антонов С.М. Гетерогенность механизмов кальциевого ответа на каинат и типы нейронов в первичной культуре коры мозга крыс // *Биологические мембраны*. 2011. Т. 28. № 1. С. 25 – 34.

Тезисы докладов

1. **Abushik P.A.**, Sibarov D.A., Antonov S.M., Giniatullin R.A. Mechanisms of homocysteine neurotoxicity in central and peripheral nervous systems // 9th FENS Forum of Neuroscience. Milan, Italy, July 5–9, 2014. в печати.

2. **Abushik P.A.**, Sibarov D.A., Niitykoski M., Giniatullina R., Antonov S.M., Giniatullin R.A. Intracellular Ca²⁺ and secondary mitochondrial responses induced by homocysteine in central and peripheral neurons // the Eight Annual Post-Graduate Symposium of the Doctoral Program in Molecular Medicine: Winter School 2014. Nilsjö, Finland, March 11–12, 2014. Abstracts. P. 38.

3. **Abushik P.A.**, Sibarov D.A., Eaton M.J., Skatchkov S.N., Antonov S.M. Protective role of Na/K-ATPase against kainate induced GluN2B dependent

calcium overload of cortical neurons in primary culture // Society for neuroscience. Annual Meeting Neuroscience 2013, 9-13 November 2013, San-Diego Abstract Number: 2013-S-4748-SfN.

4. Сибаров Д.А., **Абушик П.А.**, Антонов С.М. Субъединичный состав АМРА-рецепторов определяет гетерогенность кальциевого сигнала кортикальных нейронов в ответ на каинат // XXII Съезд Физиологического общества им.И. П. Павлова. 16–20 сентября 2013 г., Волгоград. Тезисы докладов. С. 479.

5. **Abushik P.A.**, Niitykoski M., Sibarov D.A, Antonov S.M., Giniatullin R.A. Neurotoxicity of homocysteine in trigeminal ganglion cells is mediated by NMDA and mGluR5 receptors // the Seventh Annual Post-Graduate Symposium of the Doctoral Program in Molecular Medicine: Winter School 2013. Nilsia, Finland, March 12–13, 2013. Abstracts. P. 17.

6. **Abushik P.A.**, Bolshakov A.E., Sibarov D.A., Antonov S.M. Intracellular calcium responses and different types of glutamate receptors in rat cortical primary culture // 8th FENS Forum of Neuroscience. Barcelona, Spain, July 14–18, 2012. Abstract Number: 2104.

7. Большаков А.Е., **Абушик П.А.**, Кривой И.И., Антонов С.М. Вызываемый NMDA внутриклеточный кальциевый ответ модулируется наномолярными концентрациями убаина // Четырнадцатое международное совещание и седьмая школа по эволюционной физиологии. Тезисы докладов и лекций. Санкт-Петербург, 24–29 октября 2011г. Спб.:ВВМ. С. 36.

8. **Абушик П.А.**, Сибаров Д.А., Большаков А.Е., Антонов С.М. Особенности внутриклеточного кальциевого сигнала при избирательной активации различных типов рецепторов глутамата в нейронах коры *in vitro* // Научные труды III Съезда Физиологов СНГ «Физиология и здоровье человека» Ялта, Украина. 1–6 октября 2011. Тезисы докладов. С.47

9. **Абушик П.А.** Динамика внутриклеточного кальциевого сигнала в условиях воздействия агонистов рецепторов глутамата в первичной культуре нейронов коры мозга // Ломоносов-2011: XVIII Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых. 11–15 апреля 2011 г. Москва, МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет: Тезисы докладов. С. 201.

10. Большаков А.Е., **Абушик П.А.**, Сибаров Д.А., Антонов С.М. Динамика изменения внутриклеточного кальция при нейротоксическом стрессе агонистами рецепторов глутамата нейронов коры головного мозга крыс // XXI Съезд Физиологического общества им. И.М. Павлова. 19–25 сентября 2010г., Калуга. Тезисы докладов. С. 76.