

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ОТДЕЛЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
ОТДЕЛЕНИЕ ФИЗИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ КЛЕТКИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ

РЕЦЕПТОРЫ И ВНУТРИКЛЕТОЧНАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

22–25 мая 2017 г.



СБОРНИК СТАТЕЙ

Том 1

Под редакцией
В.П. Зинченко, А.В. Бережнова

Пушино
2017

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ НЕЙРОНОВ В СА3 ОБЛАСТИ ГИППОКАМПА НОВОРОЖДЕННЫХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ПРЕНАТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

Курмашова Е.Д., Гатаулина Э.Д., Ситдикова Г.Ф., Яковлев А.В.

Казанский Федеральный Университет, Казань, РФ

Гомоцистеин является продуктом деметилирования метионина и его повышенный уровень представляет фактор риска для развития различных нейродегенеративных, метаболических и сердечно-сосудистых заболеваний [1]. Известно, что гомоцистеин является агонистом NMDA-рецепторов, являясь конкурентом глутамата при взаимодействии с лиганд-связывающим участком NMDA-рецепторов. Повышение уровня гомоцистеина вызывает их гиперактивацию [2]. Имеются данные о способности гомоцистеина вызывать тоническую стимуляцию NMDA-глутаматных рецепторов головного мозга, что приводит к оксидативному стрессу, митохондриальной дисфункции, эксайтотоксичности и дефициту нейротрофических факторов [3]. Гомоцистеин способен беспрепятственно проникать через плаценту и оказывать токсическое влияние на плод. Установлено, что повышенный уровень гомоцистеина положительно коррелирует со степенью кортикальной церебральной атрофии, выраженностью атрофических изменений в гиппокампе [4] и количеством гиперинтенсивных очагов в белом веществе головного мозга [5, 6], вызывает функциональные нарушения, дефицит обучения у потомства на ранних и поздних стадиях постнатального развития [7]. При использовании модели пренатальной гипергомоцистеинемии *in vivo* обнаружена десенсibilизация NMDA-рецепторов глутамата гранулярных клеток мозжечка [3]. Показано, что хроническая активация NMDA-рецепторов в клетках верхнего четверохолмия приводила к уменьшению количества AMPA/ каинатных рецепторов и вызывала долговременную синаптическую депрессию [8], а 24 часовая инкубация культуры нейронов гиппокампа в гомоцистеине снижала входное сопротивление мембраны клеток и адаптацию потенциалов действия в ответ на инъекцию тока [9]. Цель данного исследования было исследовать электрофизиологические свойства нейронов СА3 области гиппокампа в первую постнатальную неделю в условиях пренатальной модели гипергомоцистеинемии.

Эксперименты проводились на новорождённых крысятах в первую постнатальную неделю развития (P3-P7, где P0– день рождения). Все экспериментальные протоколы соответствовали этическим нормам по гуманному обращению с животными, принятым в Казанском Федеральном Университете (одобрены этической комиссией Казанского

медицинского университета N9–2013). Перед экспериментом животные анестезировались изофлураном (4%). После выделения головной мозг крысят помещался в охлажденный оксигенированный искусственный цереброспинальный раствор (ИЦСР) следующего состава (в мМ): 126 NaCl, 3,5 KCl, 2,0 CaCl₂, 1,3 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1,2 NaH₂PO₄, 11 глюкоза (pH 7,4, 310 мОсм). Горизонтальные срезы мозга толщиной 400 мкм нарезались с использованием виброслайсера HM 650 V (MicromInternational, Germany). Срезы перемещались в оксигенированный ИЦСР и выдерживались не менее 1 часа при комнатной температуре до начала эксперимента. Пэтч-кламп регистрация осуществлялась с использованием усилителя Axopatch 200B (AxonInstruments, UnionCity, CA, USA). Мембранный потенциал пирамидных клеток CA3 области гиппокампа измерялся в конфигурации «на клетке» в условиях фиксации тока с помощью стеклянных электродов имеющих сопротивление от 4 до 8 МОм. Пэтч пипетки изготавливались из боросиликатных стеклянных капилляров BF150-86-10 (SutterInstrument, USA). Внутрипипеточный раствор имел следующий состав (в мМ): 135 K-gluconate, 2 MgCl₂, 0,1 CaCl₂, 1 EGTA, 10 HEPES (pH 7,3, 290 мОсм). Все вещества фирмы Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Анализировались следующие параметры: мембранный потенциал нейронов, порог возникновения потенциалов действия, входное сопротивление клетки. Порог возникновения определялся как значение мембранного потенциала при котором dU/dt превышало величину 10 В/С. Входное сопротивление клеток (R_{in}) определялось в соответствии с законом Ома в ходе в ответ на гиперполяризующий стимул длительностью 1 с [10]. Пирамидный нейроны гиппокампа с мембранным потенциалом выше – 55 мВ и с амплитудой <50 pA использовались для дальнейшего анализа данных. Электрические сигналы записывались в оцифрованном виде с частотой дискретизации 10 кГц с использованием АЦП Digidata 1440 (AxonInstruments, UnionCity, CA, USA) и анализировались спомощью программ Axonsoftwarepackage, MiniAnalysis (SynaptsoftInc, NJ) и Origin 8.5 (MicrocalSoftware, Northampton, MA).

Повышенный уровень гомоцистеина создавали в крови самок в период беременности, используя ранее описанную пренатальную экспериментальную модель гипергомоцистеинемии [2,7]. Данная модель заключается во введении в кормовой рацион крыс метионина в концентрации $7 \pm 0,01$ г/кг еды два раза в неделю. Нагрузку метионином начинали при констатации у животных беременности и продолжали после появления потомства, которое получало метионин с молоком матери в течение двух недель постнатального развития (до P14). Уровень гомоцистеина в крови животных определяли на основе вольтамперометрические измерений продуктов его реакции с *o*-хиноном [7, 11]. Анализ концентрации гомоцистеина в крови самок выявил

достоверное увеличение его уровня в 3-5 раза относительно контрольных значений (с $7,1 \pm 0,3$ до 30 ± 5 ммоль/л, $n = 14$). В потомстве с пренатальной гипергомоцистеинемией оценивался коэффициент энцефализации, как соотношение веса мозга к массе тела животного. Групповые данные представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка. Для статистического анализа параметрических данных использовался t-тест Стьюдента, для непараметрического распределения данных – критерий Манна-Уитни с уровнем достоверности $p < 0,05$.

Повышенный уровень гомоцистеина у самок в период беременности вызывал уменьшение массы тела потомства [7]. Анализ соотношения массы мозга к массе тела для крыс к 6 дню постнатального развития (P6) в контрольной группе показал индекс $17,1 \pm 5,1$ ($n = 13$) при средней массе тела $13,2 \pm 0,8$ г ($n = 16$), в тоже время у потомства от крыс с экспериментальной моделью гипергомоцистеинемии наблюдалось достоверное снижение индекса энцефализации до $8,9 \pm 1,0$ ($n = 7$, $p < 0,05$) при средней массе тела $9,6 \pm 0,9$ г ($n = 7$).

Известно, что первые две постнатальные недели являются важным этапом формирования и созревание синаптических связей и нейрональных сетей головного мозга крысенка [12]. Анализ электрофизиологических данных показал, что при регистрации в конфигурации «целая клетка» мембранный потенциал пирамидных нейронов СА3 области гиппокампа в первую постнатальную неделю составил -61 ± 2 мВ (в диапазоне от -73 до -55 мВ; $n = 30$). В нейронах новорождённых крысят с пренатальной гипергомоцистеинемией подвигавшихся хроническому воздействию гомоцистеина мембранный потенциал клеток достоверно не отличался от контрольных значений и составил -64 ± 1 мВ (в диапазоне от -71 до -55 мВ; $n = 28$; $p > 0,05$). Исследования влияния хронического воздействия гомоцистеина на свойства потенциала действия (ПД) нейронов показали отсутствие достоверных изменений как в амплитуде, так в полуширине первого ПД в ответ на 500 мсек инъекцию тока. Так средняя амплитуда ПД в контроле составила 93 ± 12 рА, полуширина ПД – $1,1 \pm 0,04$ мс ($n = 28$), а в тоже время группе с пренатальной гипергомоцистеинемией средняя амплитуда была 89 ± 14 рА и полуширина ПД $1,4 \pm 0,2$ мс ($n = 17$; $p > 0,05$). В тоже время в нейронах экспериментальной группы крысят наблюдалось небольшое снижение порога генерации ПД и количества ПД. В контрольной группе порог составил $-39,7 \pm 0,61$ мВ ($n = 28$) и количество ПД в среднем 5-7, а в срезах, полученных от потомства самок с метиониновой диетой порог генерации потенциала действия уменьшился до $-41 \pm 0,7$ мВ ($n = 17$) и количество ПД составило в среднем 2-4 ($n = 17$; рис. 1). Анализ входного сопротивления мембраны нейронов в экспериментальной группе показал снижение R_{in} клетках СА3 области гиппокампа в первую неделю постнатального развития с $1,5 \pm 0,2$ ГОм до $1,2 \pm 0,18$ ГОм ($n = 17$; $p < 0,05$).

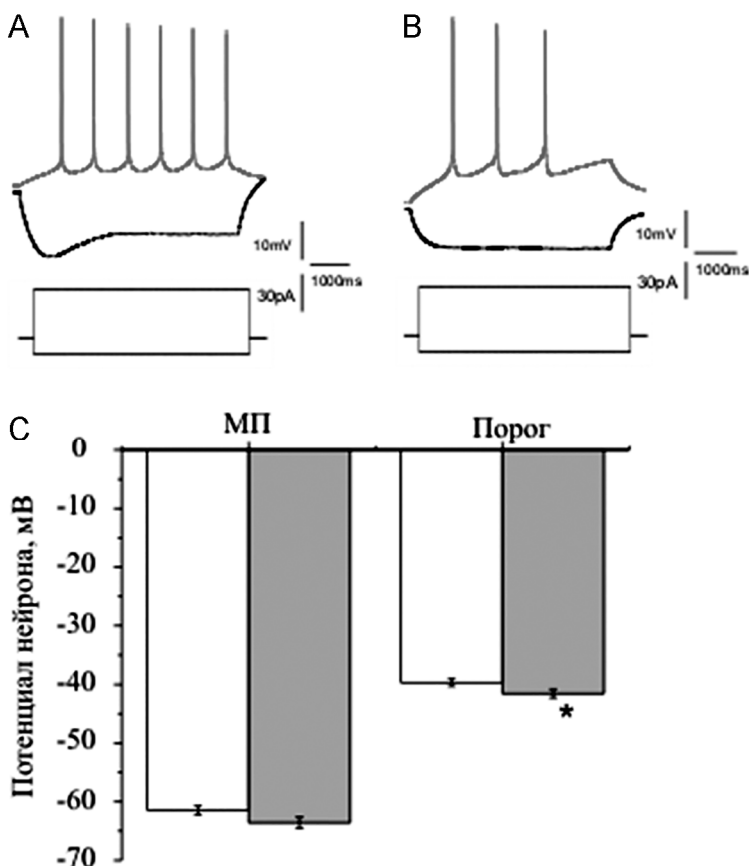


Рис. 1. Примеры потенциалов действия зарегистрированных в среза гиппокампа Р6 в ответ на 30 pA инъекцию деполяризующий ток в контрольной группе (А) и в группе с пренатальной гипергомоцистеинемии (В). (С) Гистограмма изменения мембранного потенциала и порога генерации потенциалов действия в контроле (белые колонки) и в экспериментальной группе (серые колонки).

Таким образом, в данной работе было показано, что у крыс с пренатальной гипергомоцистеинемии наблюдалось снижение, как общего веса тела, так и уменьшение массы мозга в первую постнатальную неделю. Хроническое воздействие гомоцистеина приводило к изменению возбудимости нейронов за счет снижения порога потенциала действия и входного сопротивления мембраны. Известно, что основной механизм действия высоких доз гомоцистеина связан с гиперактивацией NMDA-рецепторов, увеличением концентрации ионов Ca^{2+} в цитоплазме клетки, что ведет к оксидативному стрессу, что в итоге оказывает токсический эффект на нейроны [13]. Показано, что гомоцистеин способен влиять на

биофизические свойства клеток [14]. Так, в культуре гиппокампальных нейронов продолжительная инкубация гомоцистеина не вызывала изменение свойств одиночных потенциалов действия, но снижалась адаптация и ширина потенциалов действия в ответ на ритмическую активность [9]. Таким образом, можно предположить, что пренатальное воздействие высоких доз гомоцистеина может приводить к увеличению возбудимости клеток и нейрональной сети гиппокампа в целом. Так, например, у больных с гипергомоцистеинемией показано увеличение возбудимости центральной нервной системы и повышение вероятности возникновения эпилепсии [15, 16].

Работа поддержана грантом РФФ № 14-15-00618.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Boldyrev A.A.* // *Neurochemical J.* 2007. V. 1. P. 14-20.
2. *Beltowski J. et al.* // *Adipobiology.* 2012. V. 4. P. 77-84.
3. *Arutjunyan A. et al.* // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2012. V. 5. No 2. P. 179-85.
4. *DenHeijer T. et al.* // *Brain.* 2003. V. 126. No 1. P. 170-5.
5. *Dufouil C. et al.* // *Ann. Neurol.* 2003. V. 53. No 2. P. 214-35.
6. *Wright C.B. et al.* // *Stroke.* 2005. V. 36. P. 1207-11.
7. *Gerasimova E. et al.* // *BioNanoScience.* 2016. DOI 10.1007/s12668-016-0326-6.
8. *Shi J., Aamodt S.M., Townsend M., Constantine-Paton M.* // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. No 16. P. 6233-44.
9. *Schaub C. et al.* // *Exp. Brain Res.* 2013. V. 225. P. 527-34.
10. *Tamagnini F., Novelia J., Kerrigan T.L. et al.* // *Front. Cell. Neurosci.* 2015. V. 9. 372.
11. *Lee P.T. et al.* // *Electroanalysis.* 2014. V. 26. P. 1488-96.
12. *Ben Ari Y.* // *Nat. Rev. Neurosci.* 2002. V. 3. P. 728-39.
13. *Lipton S.A. et al.* // *PNAS.* 1997. V. 94. P. 5923-8.
14. *Ganapathy P.S. et al.* // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011. V. 52. No 8. P. 5515-24.
15. *Bleich S et al.* // *Epilepsia.* 2006. V. 47. P. 934-8.

ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК НЕЙТРОФИЛОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СТЕАРИЛАМИН-СОДЕРЖАЩИХ ЛИПОСОМ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА КИСЛОРОДНЫЙ ВЗРЫВ

*Лотош Н.Ю.¹, Тимохина С.О.², Малащенко И.К.³, Сорокоумова Г.М.²,
Василов Р.Г.³, Селищева А.А.^{1,3}*

¹МГУ имени М.А. Ломоносова, биологический факультет, Москва, РФ

²Московский технологический университет (МИТХТ), Москва, РФ

³Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, РФ

Введение. Липосомы используются как лекарственная форма для направленной доставки лекарственных препаратов [1]. Введение в состав