

Исследование методом ЭПР-спектроскопии изменений содержания оксида азота при долговременной сенситизации у виноградной улитки

Х. Л. Гайнутдинов, В. В. Андрианов, В. С. Июдин, С. В. Юртаева, Г. Г. Яфарова

Отдел химической физики, лаборатория спиновой физики и спиновой химии, лаборатория молекулярной радиоспектроскопии

Исследовалось влияние антител к Ca^{2+} -связывающему белку S100 на формирование у виноградной улитки долговременной сенситизации – нейробиологической модели тревожно-депрессивного состояния. Методом ЭПР спектроскопии показано, что содержание NO в нервной системе улитки после долговременной сенситизации снижается. Найдено, что введение антител к Ca^{2+} -связывающему белку S100 не влияет на содержание NO. В то же время процедура выработки долговременной сенситизации у животных, получивших инъекцию антител к белку S100, вызывает не такое радикальное снижение продукции NO как у контрольных животных.

Введение

Ионы кальция (Ca^{2+}) участвуют в регуляции разнообразных нейрональных процессов, что обусловлено их специфическими физико-химическими характеристиками, благодаря которым они являются наиболее универсальными внутриклеточными посредниками [1–3]. Ионы кальция, поступающие внутрь клетки во время ее возбуждения, с одной стороны, приводят к изменению свойств ионных каналов мембраны. С другой стороны, они служат сигналами для активации различных биохимических реакций [4, 5], участвующих в таких процессах, как инициация освобождения медиаторов или активация систем внутриклеточной сигнализации, что играет важную роль в процессах кратковременной и долговременной памяти [6–8]. Таким образом, ионы Ca^{2+} , осуществляя связь между электрическими явлениями, происходящими в поверхностной мембране клетки, и реакциями, протекающими внутри нейрона, принимают непосредственное участие в интегративной деятельности нервной клетки [1, 5, 9]. Это обуславливает участие ионов Ca^{2+} в механизмах обучения [7, 8, 10]. Так, ранее нами было найдено, что повышение внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} в командных нейронах за счет инъекций кофеина ускоряет обучение [11].

Система оксида азота (NO) является одной из наиболее изучаемых систем организма. NO является одним из наиболее важных посредников, который участвует в функционировании разнообразных систем организма. NO играет роль внутри- и межклеточного посредника, выполняет различные сигнальные функции, участвует также в нейромодуляции [12–15]. Эффекты NO связаны с его влиянием на ионные каналы, секрецию медиатора, обмен ионов кальция [13]. Имеются данные, что NO может служить внутриклеточным модулятором нейрональной возбудимости [16]. Кроме того, известно, что NO необходим как для обучения [17–19], так и для стирания памяти [20].

Исходя из имеющихся данных литературы, мы в данной работе провели исследование роли ионов кальция и NO в формировании такой формы пластичности, как долговременная сенситизация оборонительного рефлекса у виноградной улитки. Эти исследования проводились совместно с коллегами из Казанского федерального университета Т.Х. Богодвид, А.Х. Винарской, И.Б. Дерягиной, Л.Н. Мурановой, Д.И. Силантьевой.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали взрослых особей виноградной улитки *Helix lucorum* одинакового веса и размера, находившихся до эксперимента не менее 2-х недель в активном состоянии. У них вырабатывали долговременную сенситизацию (ДС) оборонительного рефлекса согласно схеме, использованной нами ранее у виноградной улитки [21]. Животные получали электрический стимул – прямоугольные импульсы тока амплитудой 6–8 мА, длительностью 10 мс, частотой 50 Гц – в область головы 4 раза в день в течение 4-х дней с интервалом в 1.5-2 ч. Длительность каждого стимула составляла 0.5 с. Животные контрольных групп проходили те же процедуры, что и опытные, но без предъявления электрической стимуляции. Критерием выработки ДС служило значительное увеличение времени закрытого состояния пневмостома в ответ на предъявление тестирующего раздражения по сравнению с исходной реакцией [22, 23]. Тесты в обеих группах проводились ежедневно до начала предъявления серии электрических раздражений.

Изучали содержание NO в нервной системе (комплекс ганглиев) и сердце улитки. Трудность определения содержания свободного NO в тканях организма заключается в коротком времени его жизни, что проявляется в его низкой концентрации в тканях. В последнее время одним из наиболее эффективных методов обнаружения и количественного определения NO в биологических тканях стал

метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [24] с использованием методики спиновых ловушек, которая позволяет детектировать NO в малых концентрациях [25]. Нами в качестве спиновой ловушки был применен комплекс Fe^{2+} с диэтилдитиокарбаматом – $(ДЭТК)_2-Fe^{2+}$. Комплекс спиновой ловушки с NO ($(ДЭТК)_2-Fe^{2+}-NO$) в таком состоянии сохраняется, и сигнал от комплекса не изменяется в течение не менее месяца [24, 25]. Подробности эксперимента и методики описаны ранее [26, 27]. Основные измерения проводились на спектрометре ЭПР ER 200E SRC фирмы “Bruker” X-диапазона (9.50 ГГц). Амплитуда модуляции, усиление и мощность СВЧ были подобраны таким образом, чтобы избежать перемодуляции и насыщения сигнала ЭПР, и сохранялись одинаковыми на протяжении всех измерений.

При статистической обработке получали среднее значение измеряемой величины и стандартную ошибку среднего $M \pm SEM$. С применением t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна-Уитни [28] проверяли достоверность отличия средних значений уровней NO в разных тканях контрольных крыс и крыс после моделирования инсульта. Различия считали значимыми при $p < 0.05$.

Результаты исследования и их обсуждение

При предъявлении в течение 4-х дней электрических стимулов время закрытого состояния пневмостома улитки в ответ на тестирующий стимул значительно увеличивается, т.е. происходит формирование ДС (рис. 1). Этот результат был получен нами ранее [22]. В то же время двигательные функции (тестируемые по скорости локомоции) не изменяются. Этот результат также был получен нами ранее [23].

Для исследования роли ионов кальция в формировании ДС мы воспользовались Ca^{2+} -связывающим белком S100, который характеризуется присутствием Ca^{2+} -связывающих доменов, наличием таких фундаментальных свойств как ткане- (мозго-)специфичность, эволюционная стабильность

и способность связывать ионы Ca^{2+} , взаимодействуя с ними [29, 30]. Имеющиеся результаты предполагают, что для нормального функционирования нейрона белок S100B должен удерживаться внутри клетки на физиологическом уровне экспрессии, в то время как повышение или понижение его концентрации будут нарушать нормальную регуляцию клеточных функций и взаимодействие с внутриклеточными сигнальными системами [31]. Применение антител к S100 (AS100) является одним из методических подходов изучения свойств кальциевых систем [32, 33].

Во всех измеренных спектрах ЭПР регистрировали характерный триплетный сигнал от комплекса на основе спиновой ловушки $(ДЭТК)_2-Fe^{2+}-NO$ [14, 26], интегральная интенсивность которого прямо пропорциональна содержанию NO в образце. На рис. 2 показаны суммарные результаты по относительному содержанию NO в нервной системе улитки в контроле, после ДС, при внутривенной инъекции AS100, а также при внутривенной инъекции AS100 перед формированием ДС. Полученные результаты показывают, что формирование ДС у виноградной улитки сопровождается снижением продукции оксида азота (рис. 2). Дальнейший анализ содержания оксида азота у улиток, получивших инъекции антител к Ca^{2+} -связывающему белку S100, а также сенситизированных улиток, получивших и не получивших инъекции антител к Ca^{2+} -связывающему белку S100, показал, что инъекции AS100 вызывают незначительное увеличение содержания NO в тканях нервной системы улитки. В то же время процедура выработки ДС у животных, получивших инъекцию AS100, вызывает не такое радикальное снижение продукции NO как у контрольных животных (рис. 2).

Модель ДС нами была выбрана потому, что сублетальная травма вызывает длительную сенситизацию защитных реакций у большинства изученных видов животных, предполагая вовлечение мощных эволюционных селекционных давлений [34]. У человека эта стойкая ноцицептивная сенситизация часто сопровождается повышенными ощущениями боли и тревоги [35]. Стойкая повышенная сенситизация может являться

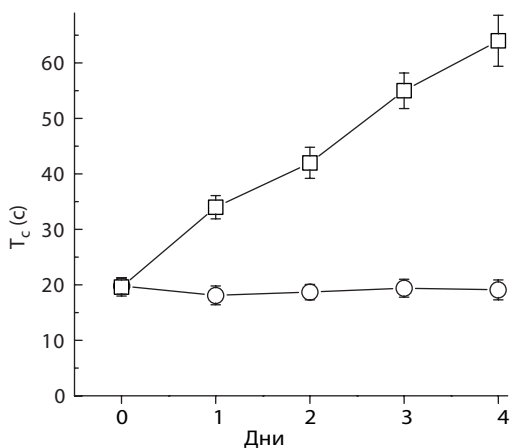


Рис. 1. Динамика формирования долговременной сенситизации. Квадраты – контроль, кружки – ДС.

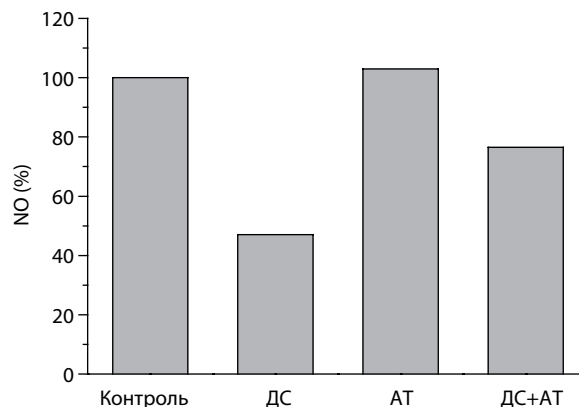


Рис. 2. Содержание NO в ганглиях улитки: контроль – контрольные улитки, ДС – улитки после формирования ДС, АТ – улитки после инъекции антител, ДС + АТ – улитки, сенситизированные после инъекции антител.

адаптивной формой к различного рода повреждениям, которая позволяет значительно быстрее реагировать на опасные сигналы [36, 37]. Таким образом, ДС является нейробиологической моделью состояния тревожности. а продукция NO, которая радикально снижается после выработки ДС, уменьшается не так сильно в случае предварительной инъекции AS100.

Авторы благодарят сотрудников Казанского федерального университета Т.Х. Богодвид, А.Х. Винарскую, И.Б. Дерягину, Л.Н. Муранову, Д.И. Силантьеву за проведенные эксперименты по формированию долговременной сенситизации.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 18-015-00274).

Литература

- Berridge M.J.: *Neuron* **2**, 13–26 (1998)
- Catterall W.A., Few A.P.: *Neuron* **59**, 882–901 (2008)
- Balaban P.M., Korshunova T.A., Bravarenko N.I.: *Eur. J. Neurosci.* **19**, 227–233 (2004)
- Rizzuto R., Pozzan T.: *Physiol. Rev.* **86**, 369–408 (2006)
- Rusakov D.A.: *The Neuroscientist* **12**, 317–326 (2006)
- Neher E., Sakaba T.: *Neuron* **59**, 861–72 (2008)
- Гайнутдинова Т.Х., Силантьева Д.И., Андрианов В.В., Тимошенко А.Х., Гайнутдинов Х.Л.: *Ученые записки КГУ* **152**, кн. 2, 29–40 (2010)
- Мальшев А.Ю., Балабан П.М.: *Росс. физиол. журнал им. И.М. Сеченова* **98**, 1298–1306 (2012)
- Костюк П.Г.: *Кальций и клеточная возбудимость*. – М.: Наука. – 255 с. (1986)
- Силантьева Д.И., Андрианов В.В., Гайнутдинова Т.Х., Гайнутдинов Х.Л., Плещинский И.Н.: *Журн. высш. нервн. деят.* **54**, 801–805 (2004)
- Силантьева Д.И., Андрианов В.В., Гайнутдинова Т.Х., Гайнутдинов Х.Л.: *Журн. высш. нервн. деят.* **58**, 183–189 (2008)
- Ванин А.Ф.: *Биохимия* **63**, 924–938 (1998)
- Steinert J.R., Chernova T., Forsythe I.D.: *Neuroscientist* **16**, 435–452 (2010)
- Gainutdinov Kh.L., Gavrilova S.A., Iyudin V.S., Golubeva A.V., Davydova M.P., Jafarova G.G., Andrianov V.V., Koshelev V.B.: *Appl. Magn. Reson.* **40**, 267–278 (2011)
- Andrianov V.V., Pashkevich S.G., Yafarova G.G., Denisov A.A., Iyudin V.S., Bogodvid T.Kh., Dosina M.O., Kulchitsky V.A., Gainutdinov Kh.L.: *Appl. Magn. Reson.* **47**, 965–976 (2016)
- Artinian L., Zhong L., Yang H., Rehder V.: *Eur. J. Neurosci.* **36**, 3333–3343 (2012)
- Malyshev A.Y., Balaban P.M.: *Neurosci. Lett.* **261**, 65–68 (1999)
- Susswein A.J., Katzoff A., Miller N., Hurwitz I.: *Neuroscientist* **10**, 153–162 (2004)
- Muranova L.N., Bogodvid T.Kh., Andrianov V.V., Gainutdinov Kh.L.: *Bull. Experim. Biol. Med.* **160**, 414–416 (2016)
- Balaban P.M., Roshchin M.V., Timoshenko A.Kh., Gainutdinov Kh.L., Bogodvid T.Kh., Muranova L.N., Zuzina A.B., Korshunova T.A.: *Eur. J. Neurosci.* **40**, 2963–2970 (2014)
- Гайнутдинов Х.Л., Береговой Н.А.: *Журн. высш. нерв. деят.* **44**, 307–315 (1994)
- Гайнутдинов Х.Л., Андрианов В.В., Гайнутдинова Т.Х.: *Журн. высш. нерв. деят.* **49**, 48–58 (1999)
- Эпштейн О.И., Штарк М.Б., Тимошенко А.Х., Гайнутдинова Т.Х., Гайнутдинов Х.Л.: *Бюлл. exper. биол. мед.* № 5, 490–493 (2007)
- Vanin A.F., Huisman A., Van Faassen E.E.: *Methods in Enzymology* **359**, 27–42 (2003)
- Микоян В.Д., Кубрина Л.Н., Ванин А.Ф.: *Биофизика* **39**, 915–918 (1994)
- Гайнутдинов Х.Л., Андрианов В.В., Июдин В.С., Юртаева С.В., Яфарова Г.Г., Файзуллина Р.И., Ситдииков Ф.Г.: *Биофизика* **58**, 276–280 (2013)
- Андрианов В.В., Яфарова Г.Г., Июдин В.С., Гайнутдинов Х.Л.: *Казанский физико-технический институт им. Е.К.Завойского – Ежегодник 2016, 2017. С. 44–46.*
- Лакин Г.Ф.: *Биометрия. М.: Высшая школа 1990. 113 с.*
- Zimmer D.B., Eubanks J.O., Ramakrishnan D., Criscitiello M.F.: *Cell Calcium.* **53**, 170–179 (2013)
- Гайнутдинов Х.Л., Андрианов В.В., Береговой Н.А., Гайнутдинова Т.Х., Исмаилова А.И., Муранова Л.Н., Силантьева Д.И., Штарк М.Б., Эпштейн О.И.: *Журн. эволюц. биохим. физиол.* **42**, 225–230 (2006)
- Donato R., Cannon B.R., Sorci G., Riuzzi F., Hsu K., Weber D.J., Geczy C.L.: *Current Molecular Medicine* **13**, 24–57 (2013)
- Rebaudo R., Melani R., Balestrino M., Cupello A., Haglid K., Hyden N.: *Neurochem Res.* **25**, 541–545 (2000)
- Андрианов В.В., Гайнутдинов Х.Л., Гайнутдинова Т.Х., Мухамедшина Д.И., Штарк М.Б., Эпштейн О.И.: *Бюлл. exper. биол. мед. ПРИЛОЖЕНИЕ № 1*, 24–27 (2003)
- Walters E.T.: *Int. Rev. Neurobiol.* **36**, 325–427 (1994)
- Crook R.J., Dickson K., Hanlon R.T., Walters E.T.: *Curr. Biol.* **24**, 1121–1125 (2014)
- Oshima M., di Pauli von Treuheim T., Carroll J., Hanlon R.T., Walters E.T., Crook R.J.: *Behavioural Processes* **128**, 89–95 (2016)
- Береговой Н.А., Гайнутдинов Х.Л.: *Докл. АН СССР.* **301**, 989–992 (1988)