

УДК 612.822

Т. Н. ПИТЛИК¹, П. М. БУЛАЙ¹, А. А. ДЕНИСОВ¹,
академик С. Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ¹, член-корреспондент В. А. КУЛЬЧИЦКИЙ²

**РЕГУЛЯЦИЯ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ
В ГИППОКАМПЕ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА
ПРИ ИЗМЕНЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ И СТЕПЕНИ ОКСИГЕНАЦИИ**

¹Белорусский государственный университет, Минск²Институт физиологии НАН Беларуси, Минск

Поступило 14.10.2009

Введение. Одним из активно развивающихся направлений клеточной биофизики является изучение механизмов редокс-регуляции клеточных процессов. В настоящее время проводятся исследования окислительно-восстановительных процессов в норме и при патологии в различных типах тканей, в том числе и нервной [1]. Данные работы призваны установить причины и механизмы развития некоторых нейродегенеративных заболеваний, а полученные результаты могут стать основой для разработки эффективных методик их профилактики и лечения.

Термин «активные формы кислорода» (АФК) объединяет целый ряд промежуточных метаболитов кислорода, обладающих высокой реакционной способностью. АФК способны окислять различные биомолекулы, поэтому их роль в биологических системах первоначально связывалась прежде всего с токсическим действием. При различных нарушениях кислородного обмена в тканях мозга велика вероятность развития так называемого окислительного стресса. Повышенная чувствительность нейронов к окислительному стрессу обусловлена рядом причин, а именно увеличенным содержанием в плазматической мембране полиненасыщенных жирных кислот, а также низкой активностью некоторых антиоксидантных ферментов [2].

Наряду с этим показано, что АФК также выполняют регуляторные функции в клетках [3]. Установлено, что АФК могут регулировать электрическую активность нейронов путем изменения мембранного потенциала и параметров генерации электрических сигналов [4]. Кроме того, АФК участвуют в индуцировании длительной потенциации, лежащей в основе таких важнейших когнитивных функций мозга, как память и обучение. Показано, что регуляция синаптической пластичности активными формами кислорода может быть связана как с изменением внутриклеточной концентрации несвязанных ионов кальция в результате окислительной модификации кальциевых каналов внутриклеточных кальциевых депо, так и с непосредственным влиянием АФК на активность целого ряда ферментов, принимающих участие в индукции длительной потенциации [5; 6].

Таким образом, АФК могут рассматриваться не только как побочные продукты аэробного метаболизма, но и как универсальные вторичные посредники во внутриклеточной сигнализации. Однако проводимые в настоящее время исследования, направленные на изучение окислительно-восстановительных процессов в тканях головного мозга, охватывают только некоторые отдельные аспекты комплексного влияния АФК на функции нервных клеток. Остаются малоизученными механизмы действия АФК на клеточном уровне, а также влияние АФК на интегральные функции мозга.

Ранее на срезах гиппокампа крысы нами показано, что при температуре 37 °С пероксид водорода в концентрациях 0,5–5 ммоль/л вызывает зависимое от концентрации обратимое увеличение амплитуды полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (пВПСП) пирамидальных нейронов области СА1 [7]. Максимальное увеличение амплитуды пВПСП наблюдалось при концентрации пероксида водорода 2 ммоль/л. При увеличении концентрации пероксида выше

3 ммоль/л амплитуда пВПСП практически не изменялась. Кроме того, согласно литературным сведениям, при температуре 28 °С пероксид водорода в концентрациях 1–2 ммоль/л вызывает обратимое уменьшение популяционных спайков, регистрируемых в слое *str. pyramidale* области CA1 гиппокампа при надпороговой электрической стимуляции коллатералей Шаффера [8].

На основании приведенных данных можно предположить, что изменение характера действия пероксида водорода связано с изменением температуры инкубации срезов. Температура инкубации 37 °С соответствует физиологическому значению температуры. Однако в ряде случаев исследования на срезах мозга проводят при температуре инкубации 28–32 °С, так как в данном интервале температур срезы более длительное время сохраняют жизнеспособность, что особенно важно при изучении форм длительной синаптической пластичности.

Цель работы – изучение обратимого влияния пероксида водорода на амплитуду пВПСП пирамидальных клеток области CA1 гиппокампа при изменении температуры и степени оксигенации.

Материалы и методы исследования. Исследования проведены на поперечных срезах гиппокампа крысы с использованием микроэлектродной техники. Для регистрации пВПСП в CA1 области гиппокампа использовали внеклеточный металлический микроэлектрод в слое *str. radiatum* (рис. 1). Стимулирующий электрод помещали в область коллатералей Шаффера, представляющих собой пучок идущих параллельно аксонов пирамидальных клеток области CA3.

При таком расположении электродов области стимуляции и регистрации связаны моносинаптически. В условиях подпороговой стимуляции и отсутствия потенциации в синаптической передаче участвуют АМРА-рецепторы [9], а амплитуда пВПСП пропорциональна синаптическому току и отражает эффективность синаптической передачи [9]. Стимуляцию осуществляли одиночными импульсами с интервалом 20 с, чтобы исключить возникновение длительной потенциации.

Экспериментальная установка состояла из термостатируемой перфузионной камеры для срезов гиппокампа, а также системы стимуляции и регистрации внеклеточных электрических сигналов нейронов. Управление стимуляцией и регистрацией осуществляли на программном уровне. Программное обеспечение, контролирующее работу системы, было реализовано для работы в операционной системе реального времени QNX Neutrino [10].

Поперечные срезы гиппокампа получали следующим образом: после декапитации 4-недельной крысы головной мозг извлекали и помещали в охлажденную до температуры 2–4 °С искусственную цереброспинальную жидкость (ИЦСЖ), содержащую (в ммоль/л): NaCl (124), KCl (3), KH_2PO_4 (1,25), MgCl_2 (1), NaHCO_3 (26), CaCl_2 (2), глюкозу (10). Затем удаляли мозжечок, а также области мозга, прилежащие к гиппокампам. Поперечные срезы гиппокампа толщиной 400–450 мкм получали при помощи вибротома. Непосредственно после выделения срезы инкубировали не менее 45 мин при комнатной температуре в ИЦСЖ, через которую пропускали газовую смесь,

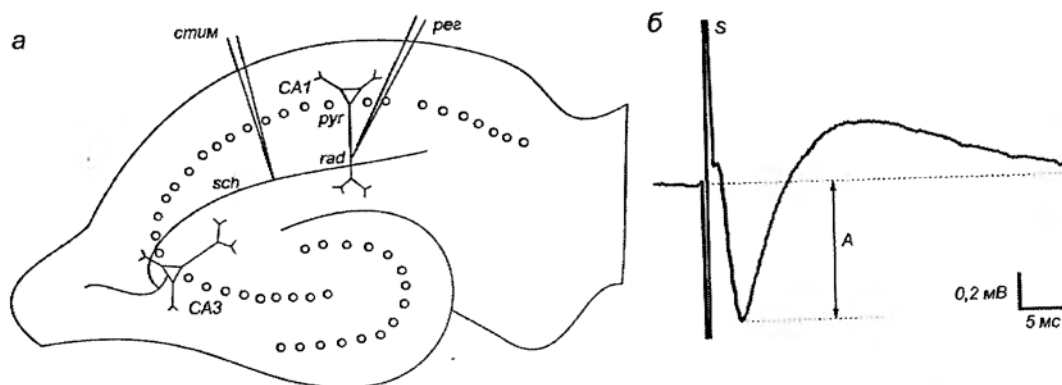


Рис. 1. Схема расположения стимулирующего и регистрирующего электродов в срезе (а) и полевой возбуждающий постсинаптический потенциал, регистрируемый в слое *str. radiatum* области CA1 (б): стим – стимулирующий электрод; рег – регистрирующий электрод; sch – коллатерали Шаффера; pyr – слой *str. pyramidale*; rad – слой *str. radiatum*; S – артефакт стимуляции, A – амплитуда пВПСП

содержащую 95 % O_2 и 5 % CO_2 . Затем срезы помещали в перфузионную камеру для проведения измерений, в которую поступала ИЦСЖ, подогретая до рабочей температуры.

Для изучения влияния АФК на параметры синаптической передачи использовали пероксид водорода в миллимолярных концентрациях. При проведении измерений в камеру подавали ИЦСЖ, содержащую необходимую концентрацию пероксида водорода, в течение 10 мин. После проведения измерений срезы в течение 20 мин отмывали в ИЦСЖ, не содержащей пероксид водорода.

Максимальная концентрация пероксида водорода в растворе не превышала 5 ммоль/л. Установлено, что при более высоких концентрациях пероксида водорода происходят необратимые повреждения пирамидальных нейронов и при отмывке срезов параметры постсинаптического сигнала не возвращаются к контрольным значениям.

Каждая серия опытов выполнена на 3–5 срезах мозга, взятых от разных животных. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с использованием программного пакета GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, San Diego California, США, www.graphpad.com). Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартная ошибка среднего значения.

Результаты и их обсуждение. В работе исследовано влияние пероксида водорода на эффективность синаптической передачи в гиппокампе при температуре инкубации срезов 29 °С. Обнаружено, что пероксид водорода в диапазоне концентраций 1–5 ммоль/л вызывает зависимое от концентрации обратимое уменьшение амплитуды пВПСП. Зависимость амплитуды пВПСП от концентрации пероксида водорода в ИЦСЖ показана на рис. 2.

На рис. 2 видно, что при температуре 29 °С пероксид водорода в концентрациях 1–5 ммоль/л вызывает существенное снижение эффективности синаптической передачи в гиппокампе. Зависимость амплитуды пВПСП от концентрации пероксида водорода имеет приблизительно линейный характер.

Для сравнения результатов, полученных при различных рабочих температурах, на рис. 2 также приведена зависимость амплитуды пВПСП от концентрации пероксида водорода при температуре 37 °С. В качестве базового уровня использовалась амплитуда пВПСП, измеренная при температуре 29 °С [7].

Полученные данные свидетельствуют о том, что характер действия пероксида водорода на эффективность синаптической передачи зависит от температуры. В литературе показано, что при увеличении температуры инкубации срезов происходит увеличение внеклеточной концентрации аденозина, который оказывает ингибирующий эффект на синаптическую передачу [11]. Зависимость внеклеточной концентрации аденозина от температуры инкубации срезов может быть обусловлена особенностями доставки кислорода в ткань срезов. Известно, что при увеличении температуры инкубации возрастает интенсивность дыхания среза. Кроме того, при увеличении температуры растворимость кислорода в ИЦСЖ уменьшается. Таким образом, при высоких температурах инкубации находящиеся в толще среза нейроны могут испытывать недостаток кислорода. При развивающейся гипоксии наблюдается увеличение концентрации аденозина во внеклеточном пространстве. Взаимодействие аденозина с A_1 -аденозиновыми рецепторами вызывает гиперполяризацию постсинаптической мембраны, а также уменьшение выброса глутамата из пресинаптической терминали, что приводит к уменьшению амплитуды пВПСП [12].

Ингибирующее действие пероксида водорода на эффективность синаптической передачи в гиппокампе при температуре инкубации 29 °С, видимо, не связано с окислительным повреждением пирамидальных нейронов области CA1, так как изменение амплитуды пВПСП при действии пероксида водорода было обратимым. Ввиду того, что уменьшение амплитуды пВПСП при действии пероксида водорода происходит при низких температурах инкубации срезов, т. е. при низких концентрациях внеклеточного аденозина, можно предположить, что на-

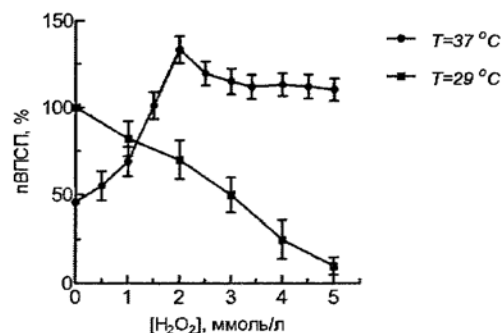


Рис. 2. Влияние пероксида водорода на амплитуду пВПСП

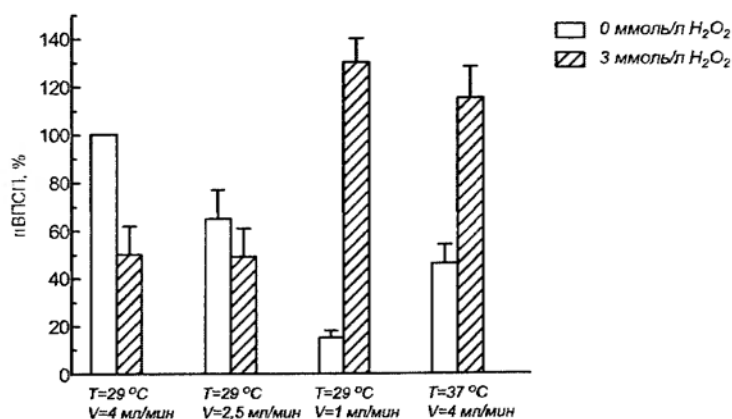


Рис. 3. Влияние пероксида водорода на амплитуду пВПСП при различной температуре и степени гипоксии (T — температура ИЦСЖ, V — скорость прокачки ИЦСЖ)

скорости прокачки ИЦСЖ, действие пероксида водорода на эффективность синаптической передачи зависит от степени гипоксии. На рис. 3 приведены данные о действии пероксида водорода в концентрации 3 ммоль/л на эффективность синаптической передачи при различных температурах и степени гипоксии.

В условиях нормальной оксигенации (при скорости прокачки ИЦСЖ 4 мл/мин) при температуре 29 °С пероксид водорода вызывал снижение эффективности синаптической передачи.

В условиях умеренной гипоксии, вызванной уменьшением скорости прокачки ИЦСЖ до 2,5 мл/мин, происходило уменьшение амплитуды пВПСП. Последующее добавление пероксида водорода вызывало незначительное снижение эффективности синаптической передачи. При уменьшении скорости прокачки ИЦСЖ до 1 мл/мин наблюдалось существенное снижение амплитуды пВПСП, что свидетельствовало о тяжелой степени гипоксии. При последующем добавлении пероксида водорода синаптическая передача полностью восстанавливалась. При увеличении температуры ИЦСЖ до 37 °С наблюдалось уменьшение амплитуды пВПСП. Последующее добавление пероксида водорода вызывало полное восстановление эффективности синаптической передачи.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о том, что при температуре 37 °С пероксид водорода вызывает такое же увеличение амплитуды пВПСП, как и в случае гипоксии. Рост амплитуды пВПСП при действии пероксида водорода в случае увеличения температуры инкубации срезов, также как и при моделировании экзогенной гипоксии может быть связан с наличием в клетках фермента каталазы. Известно, что активность каталазы в тканях мозга ниже, чем в других органах, например, в печени [2]. Тем не менее, при миллимолярных концентрациях экзогенного пероксида водорода количество молекулярного кислорода, выделяемого при разложении пероксида, может быть достаточным для того, чтобы компенсировать недостаток растворенного кислорода в ИЦСЖ. Таким образом, в данном случае можно говорить о нейропротекторном действии пероксида водорода при гипоксии.

Заключение. Показано, что при температуре 29 °С и нормальной оксигенации пероксид водорода в миллимолярном диапазоне концентраций ингибирует синаптическую передачу в гиппокампе. При температуре 37 °С, а также при гипоксии пероксид водорода в тех же концентрациях вызывает рост амплитуды постсинаптических сигналов. Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что пероксид водорода восстанавливает эффективность синаптической передачи при гипоксии или при повышении температуры в тканях мозга.

Результаты работы могут быть полезны при изучении механизмов регуляции синаптической передачи, моделировании патологических процессов в ЦНС, а также для разработки новых методов нейропротекции.

блюдаемый ингибирующий эффект пероксида водорода на синаптическую передачу опосредован активацией аденозиновых рецепторов.

Для установления возможной роли гипоксии при температуре 37 °С было исследовано влияние пероксида водорода (в концентрации 3 ммоль/л) на амплитуду пВПСП при температуре 29 °С в условиях экзогенной гипоксии.

Моделирование условий экзогенной гипоксии осуществляли уменьшением скорости перфузии ИЦСЖ. Установлено, что во время эпизодов гипоксии, вызванных уменьшением

Литература

1. Emerit J., Edeas M., Bricaire F. // *Biomed. Pharmacother.* 2004. Vol. 58. P. 39–46.
2. Eichel B., Swanson A. A. // *J. Dent Res.* 1957. Vol. 36, N 4. P. 581–594.
3. Dröge W. // *Physiol. Rev.* 2002. Vol. 82. P. 47–95.
4. Питлик Т. Н., Булай П. М., Денисов А. А. и др. // *Нейрохимия.* 2009. Т. 26. № 2. С. 104–110.
5. Kishida K. T., Klann E. // *Antioxid. Redox Signal.* 2007. Vol. 9, N 2. P. 233–244.
6. Maher P. // *Antioxid. Redox Signal.* 2006. Vol. 8, N 11–12. P. 1941–1970.
7. Питлик Т. Н., Булай П. М., Афанасенков Д. С. и др. // *Сб. ст. междунар. науч. конф. «Молекулярные мембранные и клеточные основы функционирования биосистем».* Минск, 2006. С. 298–300.
8. Avshalomov M. V., Chen B. T., Rice M. E. // *Brain Res.* 2000. Vol. 882. P. 86–94.
9. Malenka R. C., Bear M. F. // *Neuron.* 2004. Vol. 44. P. 5–21.
10. Денисов А. А., Гаркун Ю. С., Молчанов П. Г. и др. // *Юбилейная конференция, посвященная 50-летию со дня основания Института физиологии НАН Беларуси.* Минск, 2003. С. 51.
11. Masino S. A., Latini S., Bordonì F. et al. // *Synapse.* 2001. Vol. 41, N 1. P. 58–64.
12. Dunwiddie T. V., Masino S. A. // *Annu. Rev. Neurosci.* 2001. Vol. 24. P. 31–55.

PITLIK T. N., BULAY P. M., DENISOV A. A., CHERENKEVICH S. N., KULCHITSKY V. A.

tpitlik@mail.ru

HYDROGEN PEROXIDE REGULATION OF SYNAPTIC TRANSMISSION IN HIPPOCAMPUS DURING CHANGE OF TEMPERATURE AND OXYGENATION DEGREE

Summary

The action of hydrogen peroxide in the concentration range 0.5–5 mmol/l on the amplitude of field excitatory postsynaptic potentials in the CA1 region of rat hippocampus during change of temperature and oxygenation degree was investigated. The investigation was carried out on transverse slices of rat hippocampus by using the microelectrode technique. Under normal oxygen conditions and incubation temperature of 29 °C hydrogen peroxide caused inhibition of synaptic transmission in hippocampus and depression of field excitatory postsynaptic potentials. During hypoxia or temperature increase up to 37 °C hydrogen peroxide caused the augmentation of field excitatory postsynaptic potentials.