

8. V. de Lorenzo, Herrero M., Timmis K. // J. Bacteriol. 1990. Vol. 172. № 11. P. 6557.
 9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М., 1984.
 10. Levitch M.E., Stadtman E.R. // Arch. Biochem. Biophys. 1964. Vol. 106. P. 194.
 11. Миллер Дж. Эксперименты в молекулярной генетике. М., 1976.
 12. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. // Вопр. мед. химии. 1990. Т. 36. № 2. С. 88.
 13. Aebi H. // Methods in Enzymol. 1984. Vol. 105. P. 121.
 14. Lopez F., Kleerebezem M., Hugenholtz J. // J. Bacteriol. 1998. Vol. 180. № 15. P. 3804.
 15. Senft A., Dalton T., Shertzer H. // Analyt. Biochem. 2000. Vol. 280. P. 80.
 16. Li Y., Hugenholtz J., Abbe T., Molenaar D. // Appl. Environ. Microbiol. 2003. Vol. 69. № 10. P. 5739.
 17. Bradford J.K. // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248.
 18. Hiroshi T., Kazuaki I., Satoshi O. // Biochim Biophys Acta. 1987. Vol. 921. P. 595.
 19. Blosser R.S., Gray K.M. // J. Microbiol Methods. 2000. Vol. 40. P. 47.
 20. Феклистов И.Н. Синтез антибиотиков ароматической природы у бактерий *Pseudomonas aurantiaca* B-162: Автограф. дис. ... канд. биол. наук. Мн., 2006.
 21. Moustafa Hassan H., Fridovich I. // J. Bacteriol. 1980. Vol. 141. № 1. P. 156.
 22. Vance C.K., Miller A. // Biochem. 2001. № 40. P. 13079.
 23. Miller A. Handbook of Metalloproteins: Fe superoxide dismutase. Chichester, 2001. P. 668.
 24. Vergauwen B., Pauwels F., Van Beeumen J. // J. Bacteriol. 2003. Vol. 185. № 18. P. 5555.
 25. Hultberg M. // Current Microbiol. 1998. Vol. 37. P. 301.
 26. Веремеенко Е.Г., Максимова Н.П. // Труды Белорусского государственного университета. 2009. Т. 4. Ч. 1. С. 161.
 27. Miyoshi A., Rochat T., Gratadoux J. et al. // Gen. Mol. Res. 2003. Vol. 2. № 4. P. 348.
 28. Kyoungh-Ja K. // J. Biochem Mol. Biol. 2000. Vol. 33. № 4. P. 332.

Поступила в редакцию 02.03.10.

Екатерина Геннадьевна Веремеенко – аспирант кафедры генетики. Научный руководитель – Н.П. Максимова.

Владимир Васильевич Лысак – кандидат биологических наук, доцент, декан биологического факультета.

Наталья Павловна Максимова – доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой генетики.

УДК 612.822

Т.Н. ПИТЛИК, П.М. БУЛАЙ, А.А. ДЕНИСОВ, С.Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ

КАЛЬЦИЙЗАВИСИМЫЙ МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ПЕРОКСИДОМ ВОДОРОДА СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ В ГИППОКАМПЕ*

The action of hydrogen peroxide in the micromolar concentration range on the efficacy of synaptic transmission in the CA1 region of rat hippocampus was investigated. Recordings of field excitatory postsynaptic potentials in rat hippocampal slices were made using extracellular microelectrodes. Hydrogen peroxide ($50\pm200 \mu\text{M}$) was shown to increase amplitude of field excitatory postsynaptic potentials in the CA1 area of hippocampus. Results of inhibitory analysis suggest that hydrogen peroxide modifies ryanodine-sensitive calcium channels of endoplasmic reticulum. Augmentation of synaptic transmission by hydrogen peroxide is mediated by calcium-dependent protein kinase C activation.

Активные формы кислорода (АФК) представляют собой промежуточные метаболиты, образующиеся в результате неполного восстановления кислорода в электрон-транспортных цепях митохондрий, а также продуцируемые некоторыми ферментами. АФК являются высокореакционными соединениями и вызывают окислительные повреждения биомолекул, поэтому их роль в биологических системах первоначально связывалась с токсическим действием. Увеличение внутриклеточной концентрации АФК или снижение эффективности антиокислительной системы клетки приводят к развитию окислительного стресса. В головном мозге окислительный стресс может возникать в результате ишемических нарушений мозгового кровообращения, а также при некоторых других патологических состояниях. Повышенная вероятность развития окислительного стресса в тканях мозга обусловлена рядом причин: большим количеством потребляемого кислорода, повышенным содержанием в плазматической мембране нервных клеток полиненасыщенных жирных кислот, а также низкой активностью некоторых антиоксидантных ферментов [1]. В настоящее время окислительный стресс рассматривается как один из наиболее значительных факторов патогенеза некоторых нейродегенеративных заболеваний.

Помимо токсического действия, такие АФК, как супероксид анион-радикал и пероксид водорода, могут выполнять сигнальные функции в различных типах клеток, в том числе и нервных. Установле-

* Авторы статьи – сотрудники кафедры биофизики.

но, что АФК способны регулировать электрическую активность нейронов путем изменения мембранного потенциала и параметров генерации электрических сигналов. Кроме того, показано участие АФК в индуцировании долговременной потенциации, которая представляет собой увеличение эффективности синаптической передачи в течение длительного времени [2, 3].

Механизмы регуляции синаптической передачи активными формами кислорода могут быть определены как изменением внутриклеточной концентрации несвязанных ионов кальция в результате окислительной модификации кальциевых каналов внутриклеточных кальциевых депо, так и непосредственным влиянием АФК на активность ферментов, участвующих в реализации механизмов синаптической передачи и индуцирования долговременной потенциации [2].

Ранее нами было исследовано влияние пероксида водорода в миллимолярных концентрациях на амплитуду полевых возбуждающих постсинаптических потенциалов (пВПСП) в срезах гиппокампа крысы [4]. Также установлено, что АФК могут оказывать регуляторное действие на функциональную активность нейронов при более низких концентрациях [5]. В настоящей работе исследовано влияние пероксида водорода в микромолярных концентрациях на амплитуду пВПСП, регистрируемых в области CA1 гиппокампа крысы. С целью установления механизмов регуляции синаптической передачи пероксидом водорода был проведен ингибиторный анализ с использованием ингибиторов кальциевых каналов внутриклеточных кальциевых депо, а также ингибитора фосфолипазы С.

Материал и методика

Исследования проведены на поперечных срезах гиппокампа крысы с использованием микроэлектродной техники. Для регистрации пВПСП в области CA1 гиппокампа использовали внеклеточный металлический микроэлектрод, помещенный в слое *str. radiatum*. Стимулирующий электрод помещали в области коллатералей Шаффера, представляющих собой пучок параллельно расположенных аксонов пирамидальных клеток области CA3 [4]. При таком введении электродов осуществляется моносинаптическая передача между окончаниями аксонов коллатералей Шаффера и апикальными дендритами пирамидальных нейронов, находящихся в области CA1. Амплитуда пВПСП, регистрируемая электродом, помещенным в слое дендритов пирамидальных нейронов, пропорциональна синаптическому току и отражает эффективность синаптической передачи. Электрическую стимуляцию коллатералей Шаффера осуществляли одиночными биполярными импульсами прямоугольной формы с интервалом 20 с.

Экспериментальная установка состояла из терmostатируемой перфузационной камеры для срезов гиппокампа, а также систем стимуляции и регистрации внеклеточных электрических сигналов нейронов. Управление стимуляцией и регистрацией проводили на программном уровне. Программное обеспечение, контролирующее работу экспериментальной установки, было реализовано для работы в операционной системе реального времени QNX Neutrino [6].

Срезы гиппокампа получали следующим образом: после декапитации 4-недельной крысы головной мозг извлекали и помещали в охлажденную до температуры 2–4 °C искусственную цереброспинальную жидкость (ИЦСЖ), содержащую (в ммоль/л): NaCl – 124, KCl – 3, KH₂PO₄ – 1,25, MgCl₂ – 1,2, NaHCO₃ – 26, CaCl₂ – 2, глюкозу – 10. Затем удаляли мозжечок и области мозга, прилежащие к гиппокампу. 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, содержащую 95 % O₂ и 5 % CO₂. Для проведения измерений срезы помещали в перфузционную камеру, куда поступала подогретая до 29 °C ИЦСЖ.

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

Для ингибиторного анализа были использованы следующие ингибиторы: для рианодных чувствительных рецепторов – дантролен (Sigma-Aldrich), инозитол-1,4,5-трифосфат-чувствительных рецепторов – 2-аминоэтилдифенил борат (Sigma-Aldrich), фосфолипазы С – 4-бромфенацил бромидом (Sigma-Aldrich). Обработку срезов дантроленом, 2-аминоэтилдифенил боратом и 4-бромфенацил бромидом начинали проводить за 10 мин до перфузии срезов пероксидом водорода и продолжали в течение всего времени действия пероксида водорода.

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). Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего. Достоверность различия сравниваемых средних значений оценивалась с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В работе исследовали влияние пероксида водорода в диапазоне концентраций 1–200 мкмоль/л на эффективность синаптической передачи в гиппокампе. Установлено, что в данном диапазоне концентраций пероксид водорода вызывает увеличение амплитуды пВПСП, причем ее зависимость от концентрации пероксида имеет сигмоидальный вид (рис. 1). При концентрациях пероксида водорода от 1 до 200 мкмоль/л относительное увеличение амплитуды пВПСП по сравнению с контролем составляет от $8,3 \pm 3,5\%$ до $30,0 \pm 4,5\%$ соответственно (см. рис. 1).

Увеличение эффективности синаптической передачи при действии пероксида водорода может быть обусловлено несколькими причинами. Предполагается, что физиологическое действие АФК связано главным образом с модификацией кальциевого гомеостаза клеток [7, 8]. Для клеток различных типов пероксид водорода в концентрации 0,01–10 мкмоль/л индуцирует высвобождение ионов кальция из внутриклеточных кальциевых депо и увеличение концентрации свободных ионов кальция в цитозоле [9, 10].

В нейронах за выход ионов кальция из эндоплазматического ретикулума отвечают два типа рецепторов: рианодин-чувствительные и инозитол-1,4,5-трифосфат-чувствительные [11]. Известно, что основной мишенью пероксида водорода являются SH-группы цистеина, входящего в состав белков [12]. В субъединицах рианодиновых рецепторов находятся цистeinовые остатки, для которых значение pK_a равно 7,4. Таким образом, при физиологических значениях pH именно рианодиновые рецепторы в первую очередь подвергаются окислительно-модификации под действием пероксида водорода [7]. Показано, что пероксид водорода влияет на свойства рианодин-чувствительных кальциевых каналов, увеличивая вероятность их открытия [13]. Кроме того, установлена зависимость свойств как рианодин-чувствительных, так и инозитол-1,4,5-трифосфат-чувствительных кальциевых каналов от внутриклеточного редокс-потенциала [14, 15].

Предполагается, что в нейронах редокс-регуляция может выступать в качестве дополнительного механизма регуляции внутриклеточной концентрации ионов кальция. При этом АФК-индуцированное высвобождение ионов кальция из внутриклеточных кальциевых депо приводит к изменению мембранныго потенциала, параметров электрических сигналов, генерируемых нейронами, а также параметров синаптической передачи. Эти изменения обусловлены несколькими причинами.

Во-первых, изменение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция может приводить к активации кальцийзависимых калиевых каналов плазматической мембраны, что является причиной сдвига мембранныго потенциала, изменения порога генерации и формы потенциалов действия, а также частоты разрядов при пачечной электрической активности [16, 17].

Во-вторых, увеличение внутриклеточной концентрации несвязанного кальция стимулирует активность различных, участвующих в механизмах долговременной синаптической пластичности кальцийзависимых ферментов, среди которых протеинкиназы, фосфатазы, факторы пропагандации и трансляции, ГТФазы и др. [18].

На рис. 2 представлены данные об индуцированных пероксидом водорода в концентрации 100 мкмоль/л изменениях амплитуды пВПСП в присутствии дантролена, 2-аминотиофенил бората и 4-бромфенацил бромида.

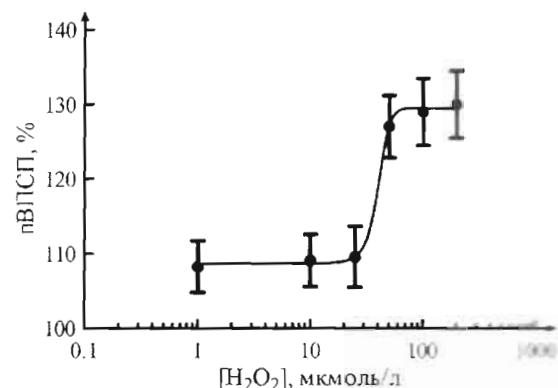


Рис. 1. Зависимость амплитуды пВПСП от концентрации пероксида водорода

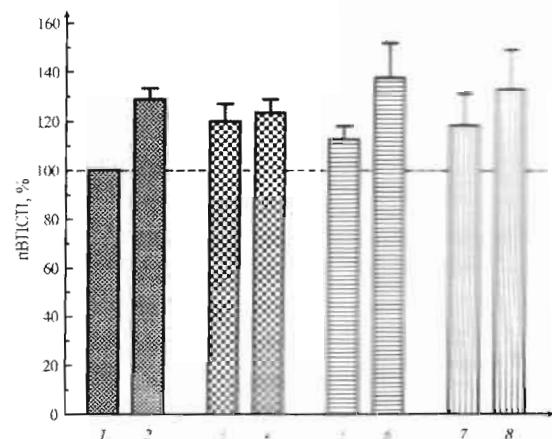


Рис. 2. Влияние ингибиторов внутриклеточных кальциевых каналов и ингибитора фосфолипазы С на индуцированное пероксидом водорода изменение амплитуды пВПСП
1 – контроль; 2 – пероксид водорода 100 мкмоль/л; 3 – дантролен 25 мкмоль/л; 4 – дантролен 25 мкмоль/л + пероксид водорода 100 мкмоль/л; 5 – 2-аминотиофенил борат 25 мкмоль/л; 6 – 2-аминотиофенил борат 25 мкмоль/л + пероксид водорода 100 мкмоль/л; 7 – 4-бромфенацил бромид 20 мкмоль/л; 8 – 4-бромфенацил бромид 20 мкмоль/л + пероксид водорода 100 мкмоль/л (различия между 1 и 2 достоверны при Р<0,05, между 5 и 6 – при Р<0,05)

После предварительной перфузии срезов ИЦСЖ, содержащей 25 мкмоль/л дантролена, пероксид водорода в концентрации 100 мкмоль/л не вызывал увеличения амплитуды пВПСП (см. рис. столбцы 3 и 4). Предварительная обработка срезов ингибитором инозитол-1,4,5-трифосфатчувствительных рецепторов 2,4-аминоэтилдифенил боратом в концентрации 25 мкмоль/л не оказывала существенного влияния на индуцированное пероксидом водорода увеличение амплитуды пВПСП (столбцы 5 и 6). В то же время пероксид водорода не вызывал достоверного изменения амплитуды пВПСП после обработки срезов ингибитором фосфолипазы С, участвующей в образовании инозита 1,4,5-трифосфата, 4-бромфенацил бромидом в концентрации 20 мкмоль/л (столбцы 7 и 8).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что возрастание эффективности синаптической передачи при действии пероксида водорода в концентрации 50–200 мкмоль/л обусловлено увеличением цитозольной концентрации свободных ионов кальция в результате окислительной модификации рианодин-чувствительных рецепторов внутриклеточных кальциевых депо. Пероксид водорода способен индуцировать увеличение амплитуды пВПСП при наличии активной фосфолипазы С. Эти факты указывают на то, что наблюдаемый эффект увеличения амплитуды пВПСП при действии пероксида водорода может быть следствием активации протеинкиназы С (рис. 3).

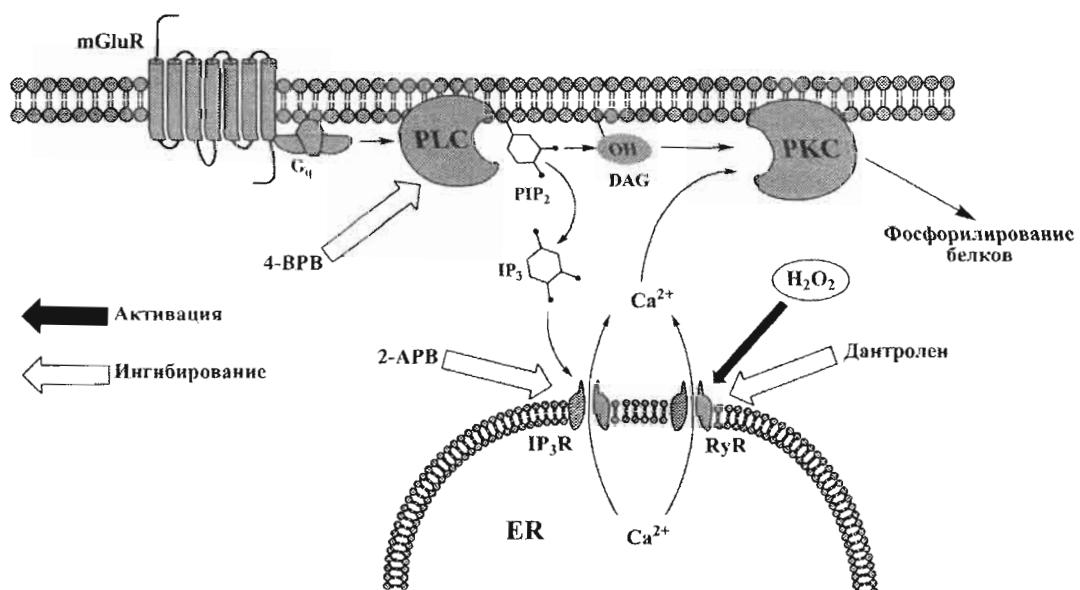


Рис. 3. Механизм регуляции синаптической передачи пероксидом водорода:

RyR – рианодин-чувствительные кальциевые каналы; IP₃R – инозитол-1,4,5-трифосфат-чувствительные кальциевые каналы; PLC – фосфолипаза С; PKC – протеинкиназа С; PIP₂ – фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат; DAG – диацилглицерол; 2-APB – 2,4-аминоэтилдифенил борат; 4-BPB – 4-бромфенацил бромид; G_q – G-белок; mGluR – метаботропные глутаматные рецепторы; ER – эндоплазматический ретикулум

В настоящее время установлено участие протеинкиназы С в модуляции синаптической передачи также в процессах индуцирования долговременной синаптической пластичности и формировании долговременной памяти [19, 20]. Для активации протеинкиназы С необходимы ионы кальция, фосфолипиды (фосфатидилсерин), а также диацилглицерол, который образуется при гидролизе фосфат-линозитол-4,5-бифосфата фосфолипазой С (см. рис. 3). Протеинкиназа С, в свою очередь, фосфорилирует серин и треонин на белках-мишениях (ионные каналы, ферменты), что приводит к изменению эффективности синаптической передачи. Механизмы, лежащие в основе модуляции синаптической передачи протеинкиназой С, на сегодняшний день до конца не выяснены. Однако имеются экспериментальные доказательства того, что в нейронах протеинкиназа С регулирует процессы, протекающие как в пресинаптических, так и в постсинаптических окончаниях [20, 21].

Таким образом, установлено, что пероксид водорода в диапазоне концентраций 50–200 мкмоль/л вызывает увеличение амплитуды пВПСП в области CA1 гиппокампа. Показано, что пероксид водорода модифицирует рианодин-чувствительные кальциевые каналы внутриклеточных кальциевого депо с последующим высвобождением ионов кальция в цитозоль. Усиление синаптической передачи при действии пероксида водорода опосредовано активацией кальцийзависимой протеинкиназы С.

[1] Eichel B., Swanson A. A. // J. Dent Res. 1957. 36 (4). P. 581.

[2] Kishida K. T., Klann E. // Antioxid. Redox Signal. 2007. 9 (2). P. 233.

3. Kourie J.I. // Am. J. Physiol. Cell Physiol. 1998. 275. P. 1.
4. Питлик Т.Н., Булаг П.М., Денисов А.А. и др. // Вестн. БГУ. Сер. 2. 2009. № 2. С. 40.
5. Kamsler A., Segal M. // J. Neurosci. 2003. 23 (1). P. 269.
6. Гаркун Ю.С., Денисов А.А., Черенкевич С.Н. и др. // Новости мед.-биол. наук. 2004. № 4. С. 70.
7. Hidalgo C. // Phil. Trans. R. Soc. 2005. 360. P. 2237.
8. Hidalgo C., Carrasco M.A., Muñoz P., Núñez M.T. // Antiox. Redox Signal. 2007. 9 (2). P. 245.
9. Takahashi A., Mikami M., Yang J. // Eur. J. Neurosci. 2007. 25. P. 705.
10. Gerich F.J., Funke F., Hildebrandt B., Fabhauer M., Müller M. // Eur. J. Physiol. 2009. 458. P. 937.
11. Berridge M.J. // Neuron. 1998. 21. P. 13.
12. Maher P. // Antioxid. Redox Signal. 2006. 8 (11-12). P. 1941.
13. Yan Y., Wei C.-L., Zhang W.-R. et al. // Acta Pharmacol. Sin. 2006. 27 (7). P. 821.
14. Renard-Rooney D.C., Joseph S.K., Seitz M.B., Thomas A.P. // Biochem. J. 1995. 310. P. 185.
15. Xia R., Stangler T., Abramson J.J. // J. Biol. Chem. 2000. 275 (47). P. 36556.
16. Aoki T., Baraban S.C. // J. Neurophysiol. 2000. 83. P. 3453.
17. Tegnér J., Lansner A., Grillner S. // J. Comput. Neurosci. 1998. 5 (2). P. 121.
18. Citri A., Malenka R.C. // Neuropsychopharmacol. Rev. 2007. P. 1.
19. Chen H.-X., Roper S.N. // J. Neurophysiol. 2003. 89. P. 2482.
20. Wang J.H., Feng D.P. // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1992. 89 (7). P. 2576.
21. Carroll R., Nicoll R., Malenka R. // J. Neurophysiol. 1998. 80 (5). P. 2797.

Поступила в редакцию 22.01.10.

Тарас Николаевич Питлик – младший научный сотрудник.

Павел Михайлович Булаг – старший преподаватель.

Андрей Анатольевич Денисов – кандидат биологических наук, научный сотрудник.

Сергей Николаевич Черенкевич – академик НАН Беларусь, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой.

ISSN 17.576.342.632.951

Е.Н. КРЫТИНСКАЯ, О.Г. ЯКОВЕЦ, В.М. ЮРИН

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ ПИРЕТРОИДНЫХ ИНСЕКТИЦИДОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ H^+ -АТФАЗНОЙ ПОМПЫ ПЛАЗМАЛЕММЫ КЛЕТОК *NITELLA FLEXILIS**

Laws of changes functional activity of H^+ -ATPase pump at action various pyretroid insecticides are presented. It was shown that cypermethrin and deltamethrin can change activity of a pump through updating lipid bilaer, esphenvalerate – by direct action on H^+ -ATPase.

H^+ -АТФаза плазматической мембраны играет центральную роль в поглощении растениями питательных веществ и их росте. Путем генерации градиента электрохимического потенциала фермент обеспечивает работу систем вторичного активного транспорта, а также выполняет ключевую роль в адаптации растений к разнообразным неблагоприятным факторам. Изменение активности данного фермента может вызвать определенные сдвиги в ионном гомеостазе клетки, что приводит к дальнейшим необратимым для клетки и всего организма последствиям.

По механизму избирательной токсичности, определяемой различной чувствительностью к ним на триевых каналов, пиретроидные инсектициды подразделяются на два типа [1, 2]. Отмечается, что для пиретроидов типа II характерны еще и такие мембранотропные эффекты, как влияние на кальциевые и хлорные каналы [3, 4]. На животных клетках установлено, что пиретроиды способны ингибиовать и АТФазы [5].

Тестируемые инсектициды – циперметрин, дельтаметрин и эсфенвалерат – отличаются по своей структуре, однако по характеру действия традиционно относятся к пиретроидам типа II [1, 2]. Циперметрин представляет собой (RS)- α -циано-3-феноксибензил (1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(2,2-дихлорванил)-2,2-диметилциклогексанкарбоксилат (ИЮПАК); дельтаметрин – (S)- α -циано-3-феноксибензил (1R,3R)-цис-3-(2,2-дигромванил)-2,2-диметилциклогексанкарбоксилат; эсфенвалерат – (S)- α -циано-3-феноксибензил (S)-2-(4-хлорфенил)-3-метилбутират [6].

В настоящее время актуально изучение воздействия применяемых пестицидов, в частности инсектицидов, на нецелевые, растительные, организмы. Исследования в этом направлении позволяют оце-

* Авторы статьи – сотрудники кафедры физиологии и биохимии растений.