

УДК 612.822

Т.Н. ПИТЛИК, П.М. БУЛАЙ, А.А. ДЕНИСОВ, Ю.С. ГАРКУН, С.Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ, В.А. КУЛЬЧИЦКИЙ

ВЛИЯНИЕ ПЕРОКСИДА ВОДОРОДА НА ПОЛЕВОЙ ПОСТСИНАПТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ ОБЛАСТИ CA1 ГИППОКАМПА КРЫСЫ

The action of hydrogen peroxide in the concentration range 0,5÷5 mM on the amplitude of excitatory postsynaptic potentials in the CA1 region of rat hippocampus was investigated. The observed changes of the amplitude of excitatory postsynaptic potentials under the action of hydrogen peroxide were concerned with the increase of synaptic current and current of cell-surface calcium-dependent potassium channels. The changes of synaptic and transmembrane currents resulted from the modification of calcium homeostasis of pyramidal cells by hydrogen peroxide.

Активные формы кислорода (АФК), образующиеся при функционировании электрон-транспортных цепей митохондрий, а также продуцируемые некоторыми ферментами, выполняют важные физиологические функции [1]. АФК необходимы для нормального функционирования большого числа внутриклеточных сигнальных и исполнительных систем клеток. Увеличение скорости образования АФК в клетке или снижение способности клетки к их нейтрализации создают условия так называемого окислительного стресса. Нейроны головного мозга наиболее чувствительны к окислительному стрессу в силу специфических особенностей строения центральной нервной системы. Известно, что в некоторых случаях окислительные реакции с участием АФК могут выступать основным патогенетическим фактором в развитии нейродеструктивных и нейродегенеративных процессов [2, 3].

Одной из «мишеней» действия АФК в мозге являются синаптические контакты, причем АФК способны проявлять как регуляторное, так и деструктивное действие [4–6]. В то же время функциональное состояние и пластичность синапсов в некоторых отделах головного мозга обуславливают в значительной степени такие функции, как память и обучение, т. е. АФК при определенных концентрациях в тканях мозга могут оказывать непосредственное влияние на когнитивные функции. Проводимые в настоящее время исследования, направленные на изучение окислительно-восстановительных процессов в нервных тканях в норме и при патологии, охватывают только отдельные аспекты комплексного влияния АФК на функции нервных тканей. Недостаточно изучены молекулярные основы окислительных процессов, а также воздействие АФК на интегративные функции мозга.

Предполагается, что одним из механизмов физиологического действия АФК является модификация кальциевого гомеостаза клеток [7]. Концентрация свободных ионов кальция в клетках частично определяется его входом через лиганд- или потенциалзависимые каналы и активностью кальциевых насосов и ионных обменников. Помимо этого ионы кальция могут высвобождаться из внутриклеточных кальциевых депо [8]. В регуляции кальциевого гомеостаза нейронов принимают участие внутриклеточные рецепторы двух типов: рианодин-чувствительные и инозитол-1,4,5-трифосфат-чувствительные. Данные рецепторы локализованы на поверхности гладкого эндоплазматического ре-

тикулума, однако их распределение в соме, пре- и постсинаптических окончаниях неоднородно и в значительной степени зависит от типа нервной клетки [9, 10].

Цель данной работы заключалась в исследовании параметров внеклеточных электрических сигналов нейронов гиппокампа при действии окислительных факторов, а также в установлении взаимосвязи изменений данных параметров с модификацией кальциевого гомеостаза нейронов.

Материал и методика

Объектом исследования являлся поперечный срез гиппокампа крысы, в котором сохраняются нейроны и связи между ними, в силу чего он используется в качестве общепринятой модели целого отдела мозга – гиппокампа.

С помощью микроэлектродной техники регистрировали полевой возбуждающий постсинаптический потенциал области CA1. Стимулирующий электрод помещали в области коллатералей Шаффера, представляющих собой аксоны пирамидальных клеток области CA3 гиппокампа. Регистрирующий электрод находился в слое дендритов пирамидальных нейронов области CA1 (рис. 1).

Стимуляцию осуществляли одиночными импульсами с интервалом 10 с, чтобы исключить возникновение долговременной потенциации. Ток стимуляции подбирали таким образом, чтобы развивался только возбуждающий постсинаптический потенциал без генерации потенциала действия (подпороговый стимул).

Установка для проведения измерений включала термостатируемую перфузионную камеру для срезов гиппокампа, а также систему стимуляции и регистрации внешних электрических сигналов нейронов [11, 12]. Программное обеспечение, контролирующее систему, реализовано для работы в операционной системе реального времени QNX Neutrino и обеспечивает управление мультиплексированием, частотой дискретизации и коэффициентами усиления, а также амплитудой и длительностью стимулирующих импульсов.

Срезы гиппокампа получали следующим образом: 3–4-недельную крысу декапитировали, мозг извлекали и помещали в охлажденную до температуры 3 °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 гиппокампу. Поперечные срезы гиппокампа толщиной 400–450 мкм получали при помощи вибротома (WPI, США). Для восстановления физиологических функций непосредственно после выделения срезы инкубировали при температуре 28 °С в ИЦСЖ, через которую пропускали газовую смесь, содержащую 95 % O_2 и 5 % CO_2 . Время предварительной инкубации составляло от 45 до 60 мин. После инкубации срезы помещали в камеру для проведения измерений, куда подавали ИЦСЖ, температура которой составляла 37 °С, содержащую необходимую концентрацию пероксида водорода в качестве окислителя. Во всех экспериментах максимальная концентрация пероксида водорода в растворе не превышала 5 ммоль/л. Такое ограничение максимальной концентрации пероксида водорода было выбрано ввиду того, что при более высоких его концентрациях происходят необратимые повреждения пирамидальных нейронов, вследствие чего параметры постсинаптического сигнала не возвращаются к контрольным значениям при отмывке срезов ИЦСЖ, не содержащей пероксид водорода.

Срезы инкубировали в растворе с пероксидом водорода в течение 12 мин. За это время устанавливалась постоянная величина амплитуды постсинаптического потенциала. После проведения измерений срезы в течение 20 мин отмывали в ИЦСЖ, не содержащей пероксид водорода. После каждой отмывки измеряли параметры постсинаптического сигнала для сравнения их с контрольными значениями.

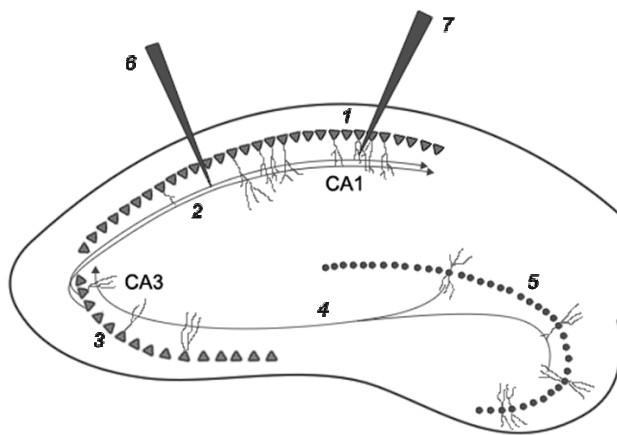


Рис. 1. Схема расположения электродов в поперечном срезе гиппокампа крысы: 1 – пирамидальные клетки области CA1, 2 – коллатерали Шаффера, 3 – пирамидальные клетки области CA3, 4 – мшистые волокна, 5 – гранулярные клетки зубчатой фасции, 6 – стимулирующий электрод, 7 – регистрирующий электрод

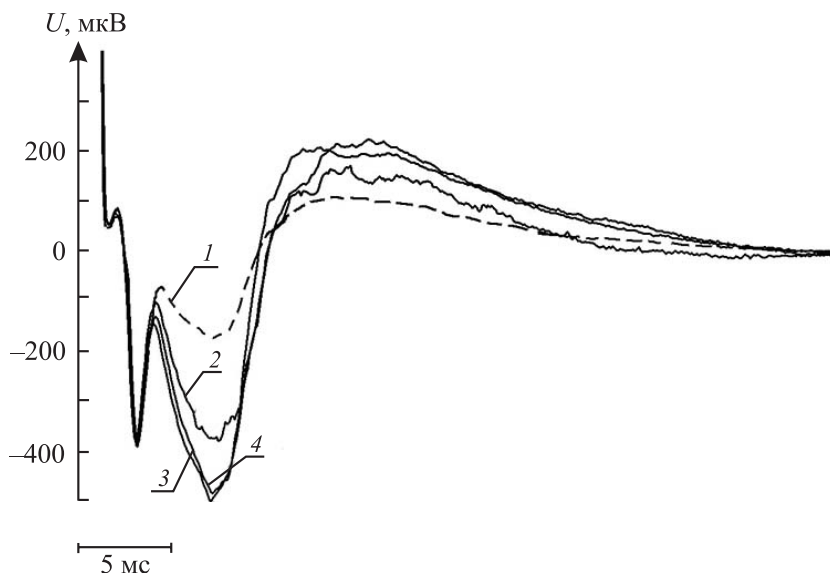


Рис. 2. Влияние пероксида водорода на полевой постсинаптический потенциал области CA1 гиппокампа: 1 – сигнал в отсутствие пероксида водорода, 2 – 1,5 ммоль/л H_2O_2 , 3 – 2,5 ммоль/л H_2O_2 , 4 – 3,5 ммоль/л H_2O_2

Синаптический ответ включает потенциал волокон (артефакт стимуляции) длительностью около 1 мс, а также постсинаптический сигнал длительностью около 25 мс, представляющий внеклеточный полевой возбуждающий постсинаптический потенциал пирамидальных нейронов области CA1.

В постсинаптическом сигнале при подпороговом уровне возбуждения, как видно из рис. 2, можно выделить две фазы: быструю отрицательную и медленную положительную. Быстрая фаза сигнала определяется входящим током потенциалзависимых натриевых каналов плазматической мембраны и синаптическим током ионов натрия через каналы ионотропных глутаматных рецепторов (подтип AMPA). Медленная фаза обусловлена выходящим током через потенциалзависимые калиевые каналы плазматической мембраны пирамидальных клеток [13].

Контрольные значения амплитуд обеих фаз постсинаптического сигнала измеряли относительно нулевого уровня электрического потенциала U при отсутствии пероксида водорода в перфузируемой ИЦСЖ.

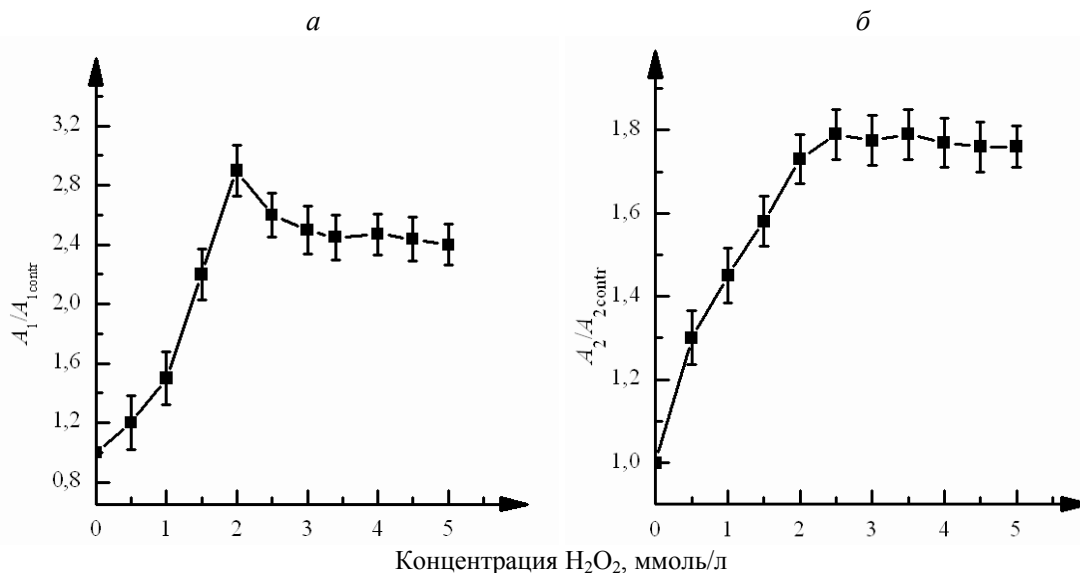


Рис. 3. Относительное изменение амплитуды постсинаптического сигнала при действии пероксида водорода: а – относительное изменение амплитуды отрицательной фазы ($A_1/A_{1\text{contr}}$), б – положительной фазы ($A_2/A_{2\text{contr}}$); A_1 – амплитуда отрицательной фазы сигнала при действии пероксида водорода, $A_{1\text{contr}}$ – контрольное значение амплитуды отрицательной фазы, A_2 – амплитуда положительной фазы сигнала при действии пероксида водорода, $A_{2\text{contr}}$ – контрольное значение амплитуды положительной фазы

Для того чтобы определить, связаны ли наблюдаемые изменения параметров постсинаптического сигнала с модификацией кальциевого гомеостаза пирамидальных клеток, использовали рианодин, который в концентрациях порядка 10 мкмоль/л индуцирует выход кальция из внутриклеточных кальциевых депо эндоплазматического ретикулума, а при концентрациях выше 100 мкмоль/л приводит к блокаде рианодиновых рецепторов.

Результаты и их обсуждение

Синаптический ответ на стимуляцию коллатералей Шаффера и его изменение при действии пероксида водорода показаны на рис. 2.

Пероксид водорода вызывал изменение амплитуд обеих фаз постсинаптического потенциала. Наиболее значительное увеличение амплитуды отрицательной фазы (в среднем в 3 раза по сравнению с контролем) наблюдалось при концентрации пероксида водорода, равной 2 ммоль/л. При дальнейшем ее увеличении амплитуда отрицательной фазы уменьшалась, но начиная с концентрации пероксида водорода 3 ммоль/л оставалась постоянной и больше контрольного значения в 2,5 раза (рис. 3 а).

При концентрациях пероксида водорода до 2 ммоль/л выявлен рост амплитуды положительной фазы постсинаптического сигнала, а при увеличении концентрации выше 2 ммоль/л амплитуда положительной фазы постсинаптического сигнала не изменялась и оставалась на 80 % больше контрольного значения (рис. 3 б).

Высказано предположение, что такое изменение постсинаптического сигнала связано с действием пероксида водорода на рецепторы внутриклеточных кальциевых депо с последующим изменением (в большинстве случаев с увеличением) внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция в цитозоле [14, 15]. Внутриклеточная концентрация свободных ионов кальция зависит от содержания экзогенного пероксида водорода, а также от скорости трансмембранного переноса и скорости утилизации пероксида водорода в клетке [16].

Увеличение концентрации свободных ионов кальция в постсинаптических окончаниях приводит к активации кальций/кальмодулин зависимой киназы II (CaMKII) [17]. Активированная CaMKII оказывает двойной эффект на синаптическую передачу: 1) фосфорилируются AMPA-рецепторы в постсинаптической мембране с увеличением их проводимости для ионов натрия; 2) облегчается мобилизация резервных AMPA-рецепторов из цитоплазмы в плазматическую мембрану, что приводит к росту входящего натриевого тока через каналы AMPA-рецепторов [18]. Таким образом, увеличение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция в постсинаптических окончаниях при действии пероксида водорода вызывает рост синаптического тока, что в результате приводит к увеличению амплитуды отрицательной фазы постсинаптического сигнала.

Кроме того, цитозольные ионы кальция в пресинаптической терминали модулируют процесс высвобождения нейротрансмиттеров [19, 20]. Увеличение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция при действии пероксида водорода на рецепторы внутриклеточных кальциевых депо в пресинаптической терминали способствует выбросу нейромедиатора, что, в свою очередь, вызывает дополнительное «усиление» синаптической передачи и рост амплитуды быстрой отрицательной фазы постсинаптического сигнала.

Действие пероксида водорода на рецепторы внутриклеточных кальциевых депо и последующее увеличение концентрации свободных ионов кальция в цитозоле приводит к активации кальцийзависимых калиевых каналов плазматической мембраны пирамидальных клеток. Активация кальцийзависимых калиевых каналов приводит к нарастанию выходящего калиевого тока и амплитуды положительной фазы постсинаптического сигнала [21]. При этом возросший выходящий калиевый ток может «шунтировать» входящий натриевый ток, в результате происходит уменьшение амплитуды отрицательной фазы постсинаптического сигнала.

Отсутствие изменений амплитуды как отрицательной, так и положительной фаз постсинаптического сигнала при концентрации пероксида водорода выше 3 ммоль/л обусловлено тем, что число рецепторов внутриклеточных кальциевых депо, которые подвергаются окислительной модификации, ограничено. Поэтому при увеличении концентрации пероксида водорода наблюдается такой же эффект насыщения, как и при связывании агонистов с данными рецепторами [22].

При перфузии среза ИЦСЖ, содержащей рианодин в концентрации 10 мкмоль/л, наблюдался рост амплитуд отрицательной и положительной фаз постсинаптического сигнала, как и при действии пероксида водорода. При этом амплитуды обеих фаз постсинаптического сигнала увеличивались значительно, чем при действии пероксида водорода в концентрациях выше 2 ммоль/л.

Различие максимального эффекта под влиянием пероксида водорода и рианодина на срез связано с тем, что при действии рианодина внутриклеточная концентрация свободных ионов кальция определяется общим числом рецепторов внутриклеточных кальциевых депо, в то время как при действии пероксида водорода содержание свободных ионов кальция в цитозоле зависит от степени окислительной модификации рецепторов внутриклеточных кальциевых депо.

* * *

Таким образом, показано, что действие пероксида водорода в диапазоне концентраций от 0,5 до 5 ммоль/л на пирамидальные нейроны области CA1 гиппокампа крысы приводит как к росту синап-

тического тока, так и к увеличению тока кальцийзависимых калиевых каналов плазматической мембраны. Модификация параметров синаптической проводимости и проводимости мембраны пирамидальных клеток вызвана действием пероксида водорода на рецепторы внутриклеточных кальциевых депо.

Полученные данные свидетельствуют о том, что модулирующее действие пероксида водорода на процесс синаптической передачи в гиппокампе опосредовано модификацией кальциевого гомеостаза пирамидальных клеток гиппокампа, что может быть использовано при объяснении механизмов редокс-регуляции процессов, протекающих в нервных клетках.

Работа выполнена при поддержке БРФФИ (грант № Б05М-136).

1. Droge W. // *Physiol. Rev.* 2002. Vol. 82. P. 47.
2. Tabner B.J., El-Agnaf O.M., German M.J. et al. // *Biochem. Soc. Trans.* 2005. Vol. 33(5). P. 1082.
3. Emerit J., Edeas M., Bricaire F. // *Biomedecine & Pharmacotherapy*. 2004. Vol. 58(1). P. 39.
4. Billy T. Chen, Marat V. Avshalumov, Margaret E. Rice // *J. Neurophysiol.* 2001. Vol. 85(6). P. 2468.
5. Kamsler A., Segal M. // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23(1). P. 269.
6. Marat V. Avshalumov, Margaret E. Rice // *Ibid.* 2002. Vol. 87. P. 2896.
7. Bielefeldt K., Whiteis C.A., Sharma R.V. et al. // *Am. J. Physiol.* 1997. Vol. 272(6). P. 1439.
8. Verkhratsky A.J., Petersen O.H. // *Cell Calcium*. 1998. Vol. 24(5-6). P. 333.
9. Verkhratsky A. // *Biol. Res.* 2004. Vol. 37(4). P. 693.
10. Berridge M.J. // *Neuron*. 1998. Vol. 21. P. 13.
11. Гаркун Ю.С., Денисов А.А., Черенкевич С.Н. // *Новости мед.-биол. наук*. 2004. № 3. С. 92.
12. Гаркун Ю.С., Денисов А.А., Черенкевич С.Н. и др. // *Там же*. 2004. № 4. С. 70.
13. Sargsyan A.R., Paratheodoropoulos C., Kostopoulos G.K. // *J. Neurosci. Meth.* 2001. Vol. 104. P. 143.
14. Hidalgo C., Bull R., Behrens M.I., Dononso P. // *Biol Res.* 2004. Vol. 37(4). P. 539.
15. Kelly P.T., MacKinnon R.L., Dietz R.V. et al. // *Mol. Brain Res.* 2005. Vol. 135(1-2). P. 232.
16. Мартинович Г.Г., Мартинович И.В., Черенкевич С.Н. // *Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Сб. ст. Междунар. науч. конф. Мн., 2006. С. 289.*
17. Wang D., Maler L. // *Neurobiology*. 1998. Vol. 96. P. 7133.
18. Николс Дж. Г., Мартин А.Р., Валлас Б. и др. *От нейрона к мозгу*. М., 2003. С. 253.
19. Bouchard R., Pattarini R., Geiger J.D. // *Progress in Neurobiology*. 2003. Vol. 69(6). P. 391.
20. Galante M., Marty A. // *J. Neurosci.* 2003. Vol. 23(35). P. 11229.
21. Golding N.L., Jung H.Y., Mickus T., Spruston N. // *Ibid.* 1999. Vol. 19(20). P. 8789.
22. Lokuta A.J., Komai H., McDowell T.S., Valdivia H.H. // *FEBS Letters*. 2002. Vol. 511(1-3). P. 90.

Поступила в редакцию 10.10.07.

Тарас Николаевич Питлик – аспирант кафедры биофизики. Научный руководитель – С.Н. Черенкевич.

Павел Михайлович Булай – младший научный сотрудник кафедры биофизики.

Андрей Анатольевич Денисов – младший научный сотрудник кафедры биофизики.

Юрий Сергеевич Гаркун – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории психонейрофизиологии и онкогенеза Института физиологии НАН Беларуси.

Сергей Николаевич Черенкевич – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биофизики.

Владимир Адамович Кульчицкий – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе Института физиологии НАН Беларуси.