

КАЛЬЦИЕВАЯ СОЛЬ N-(5-ГИДРОКСИНИКОТИНОИЛ)-L-ГЛУТАМИНОВОЙ КИСЛОТЫ ИЗМЕНЯЕТ РЕАКЦИЮ ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ CA1 ОБЛАСТИ ГИППОКАМПА ПРИ ОРТОДРОМНОЙ СТИМУЛЯЦИИ У КРЫС

©МОТИН В.Г.¹, КИСЕЛЕВ А.В.², СТОВБУН С.В.², СЕРГИЕНКО В.И.³, КАЛИНИНА Т.С.⁴

¹ФГБНУ Научно-исследовательский институт нормальной физиологии имени П.К. Анохина, Москва, РФ

²ФГБУН Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва, РФ

³ФГБУ Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, Москва

⁴ФГБНУ Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова, Москва, РФ

Изучено влияние кальциевой соли N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты (соединение ампасе) на нейрональную активность в CA1 области гиппокампа в ответ на стимуляцию коллатералей Шаффера с частотой 1Гц (30 импульсов в течение 30 с) на переживающих срезах гиппокампа крыс Вистар. При регистрации ортодромных популяционных спайков (1-го и 30-го) установлено, что ампасе (500 мкМ, 1, 2 и 10 мМ) облегчает синаптическую передачу в системе коллатерали Шаффера — пирамидные нейроны поля CA1 гиппокампа, оказывая максимальное действие в концентрации 2 мМ. В концентрации 10 мМ ампасе вызывает эпилептиформную активность, которая ингибируется специфическим неконкурентным антагонистом NMDA-рецепторного комплекса МК-801.

Ключевые слова: поле CA1 гиппокампа, ампасе, NMDA-рецепторный комплекс, эпилептиформная активность.

Разработка средств фармакотерапии когнитивной недостаточности, развивающейся на фоне структурно-функциональных изменений мозговой ткани, представляет актуальную и сложную медицинскую проблему. При решении задачи создания эффективного соединения, сочетающего свойства стимулятора когнитивных процессов с нейропротективным действием, был синтезирован препарат "Ампасе" (АМП), представляющий собой растворимую в водных растворах кальциевую соль N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты. В эксперименте установлено, что АМП (5–20 мг/кг) обладает антиамнестическими свойствами на моделях амнезии условного рефлекса пассивного избегания, вызванной максимальным электрошоком, оказывает положительный эффект на выживаемость, способность к обучению и неврологические функции после экспериментальной интрацеребральной гематомы у крыс [2].

Одной из главных структур принимающих участие в когнитивных процессах является гиппокамп, который играет важную роль в процессах памяти и обучения у человека и животных, участвуя, например, в регистрации новой информации, формировании декларативной памяти, эмоций, пространственном обучении, а также имеет большое значение в механизмах скорости передачи информации и развития эпилепсии [1, 5, 6, 9]. Из-за сложной дендритной структуры, пирамидные нейроны гиппокампа имеют большие поверхности мембраны по отношению к другим клеткам, а также большую электрическую емкость с большой постоянной времени мембраны (τ_m). Это приводит к медленной деполаризации в ответ на возбуждение синаптических входов, и, следовательно, к росту потенциала действия и переменной задержки, которые могут быть вычислены. Тоническая активация ГАМК-рецепторов, увеличивает проводимость мембраны и таким образом регулирует возбудимость нейронов посредством торможения. Кроме того, тоническая активация ГАМК-рецепторов, повышает проводимость мембраны, уменьшая постоянную времени мембраны (τ_m) [12]. Следствием изменения (τ_m) является уменьшение или увеличение латентного периода популяционных ответов в CA1 области гиппокампа при стимуляции коллатералей Шаффера.

В регуляции нейротрансмиссии между коллатералами Шаффера и пирамидными нейронами CA1 области гиппокампа NMDA-рецепторный комплекс играет важную роль.

NMDA-рецепторный комплекс — сложное надмолекулярное образование, включающее в себя сайты специфического связывания с NMDA (и L-глутаминовой кислотой) и глицином (коагонист), а также аллостерические модуляторные сайты, расположенные как на мембране, так и в ионном канале, сопряженном с рецептором [4, 10, 11]. Канал NMDA-рецепторного комплекса блокируется как МК-801 (его специфическим неконкурентным антагонистом), так и потенциалзависимым образом ионами Mg^{2+} , также он высокопроницаем для ионов Ca^{2+} (передача примерно 10% тока, протекающего через данный канал, осуществляется этими ионами). При этом возможен запуск ряда Ca^{2+} -зависимых внутриклеточных процессов, одним из которых является эпилептиформная активность.

NMDA-рецепторный комплекс играет важную роль в регуляции длительности возбуждающего потенциала, синаптической пластичности, осуществлении когнитивных функций, в запуске эксайтотоксических процессов, приводящих в конечном итоге к гибели нейронов [3, 7, 8].

Целью данной работы являлось исследование влияния соединения АМП на синаптическую передачу в системе коллатерали Шаффера — пирамидные нейроны поля CA1 гиппокампа на переживающих срезах гиппокампа крыс *in vitro*.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на срезах гиппокампа 22 самцов крыс Вистар массой 150–200 г. Приготовление и инкубирование срезов (толщиной 350 мкм) описано нами ранее [1]. Состав перфузионной среды (ACSF): 126 mM NaCl, 3 mM KCl, 1,2 mM MgSO₄, 1,25 mM NaH₂PO₄, 2 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, 10 mM глюкозы. Раствор насыщался газовой смесью 95% O₂ и 5% CO₂ pH 7,4 при 34±0,5°C. Скорость протока составляла 2 мл/мин. Период адаптации среза к указанной солевой среде продолжался 1 ч, после чего приступали к регистрации исходных показателей. Регистрацию суммарной электрической активности производили в поле CA1 с помощью одноканальных стеклянных микроэлектродов, заполненных 0,15 M NaCl. Электроды помещали в *stratum pyramidale* поля CA1 для регистрации популяционного спайка. Ортодромную электрическую стимуляцию осуществляли посредством платиновых биполярных электродов (прямоугольные импульсы длительностью 0,1 мс, амплитудой 3–8 В) которые помещали в области коллатералей Шаффера (*stratum radiatum*). Усиленные сигналы (30 кГц полоса пропускания) от регистрирующих электродов поступали на аналого-цифровой преобразователь, а затем на компьютер. Для определения эпилептизации, вызванной аппликацией АМП, мы воспользовались стимуляцией коллатералей Шаффера с частотой 1 Гц (30 импульсов в течение 30 с), регистрируя 1-й и 30-й популяционный спайк (ПС). Степень эпилептизации оценивали по появлению дополнительных ПС и их величину измеряли от пика также, как и контрольного ПС.

В работе использовали кальциевую соль N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты (субстанция, ООО «Национальная исследовательская компания»), специфический неконкурентный антагонист NMDA-рецепторного комплекса МК-801 (субстанция, "Sigma-Aldrich").

Статистическую обработку полученных результатов проводили в программе "BioStat 2009 Professional" и "OriginPro 8 SRO". Для оценки значимости различий двух выборок применяли *t* критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В I серии экспериментов выявлено, что перфузия переживающих срезов раствором, содержащим АМП в концентрации 500 мкМ ($n=5$) увеличивал амплитуду ПС (1-й стимул – на 3,46±1,00%, $p<0,05$; 30-й стимул – достоверно не изменялся), а латентный период ПС уменьшала (1-й стимул – на 1,1±0,1 мс, 30-й стимул – на 1±0,1%; $p<0,05$). (рис. 1, а, б) В концентрации 1мМ ($n=5$) увеличивал амплитуду ПС (1-й стимул – на 27,8±2,6%, 30-й стимул – на 9,46±1,90%; $p<0,05$), а латентный период ПС уменьшал (1-й стимул – на 2,96±0,85 мс, 30-й стимул – на 1,96±0,52 мс; $p<0,05$).

В концентрации 2мМ ($n=5$) увеличивал амплитуду ПС (1-й стимул – на 28,9±2,6%, 30-й стимул – на 15,6±9,6%; $p<0,05$), а латентный период ПС уменьшал (1-й стимул – на 1,9±0,3 мс, 30-й стимул – на 1,56±0,15 мс; $p<0,05$) (рис. 2, а, б).

Следует отметить, что АМП в исследованном диапазоне концентраций (500 мкМ–2 мМ) не стимулировал возникновение эпилептиформной активности. Следовательно, АМП в зависимости от концентрации способен облегчать синаптическую передачу в системе коллатерали Шаффера — пирамидные нейроны поля CA1 гиппокампа крыс, не вызывая эпилептиформной активности.

Во II серии экспериментов выявлено, что перфузия переживающих срезов раствором, содержащим АМП в концентрации 10 мМ ($n=7$) увеличивал амплитуду ПС (1-й стимул – на 21,1±12,0%, $p<0,05$ 30-й стимул – на 14,9 ± 2,1 %. ($p \leq 0,05$)). (рис. 3 А), а латентный период ПС уменьшала (1-й стимул – на 2,8±0,1 мс, 30-й стимул – на 5,6±0,5 мс; $p<0,05$). Добавление АМП в концентрации 10 мМ приводило к появлению дополнительных ПС. При этом наблюдалось постепенное увеличение количества ПС в зависимости от порядкового номера (от 1-го до 30-го) стимула, а через 40 мин после аппликации оно значительно ($p<0,05$) увеличилось на 44±2%. При отмывании количество дополнительных ПС уменьшалось на 30±5%. При этом специфический неконкурентный антагонист NMDA-рецепторного комплекса МК-801 (100 мкМ) предупреждал данный эффект (рис. 3, б).

Таким образом, АМП дозозависимо облегчает нейротрансдукцию в системе коллатерали Шаффера — пирамидные нейроны CA1 области гиппокампа крыс, изменяя величину и уменьшая латентный период ПС, вызывая эпилептиформную активность только в концентрации 10 мМ, которая выражалась в образовании дополнительных ПС. В диапазоне концентраций 500 мкМ – 2 мМ АМП не вызывал эпилептиформной активности. Следовательно, АМП в зависимости от концентрации способен облегчать синаптическую передачу в системе коллатерали Шаффера — пирамидные нейроны поля CA1 гиппокампа крыс, не вызывая эпилептиформной активности.

Рис. 1.

Влияние добавления перфузионную среду АМП на ортодромные популяционные ответы в поле CA1 гиппокампа крыс.

а – 1-й ПС, б – 30-й ПС.

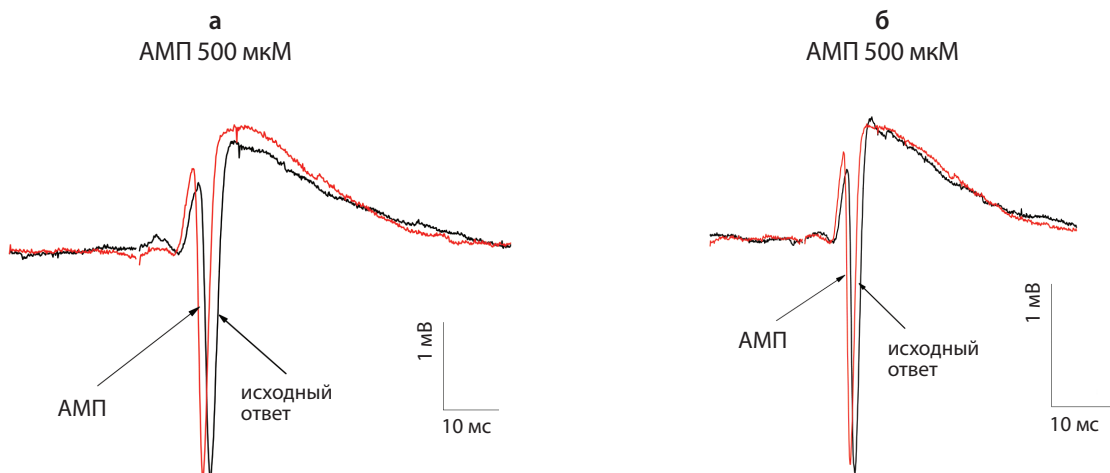


Рис. 2.

Влияние добавления перфузионную среду АМП на ортодромные популяционные ответы в поле CA1 гиппокампа крыс.

а – 1-й ПС, б – 30-й ПС.

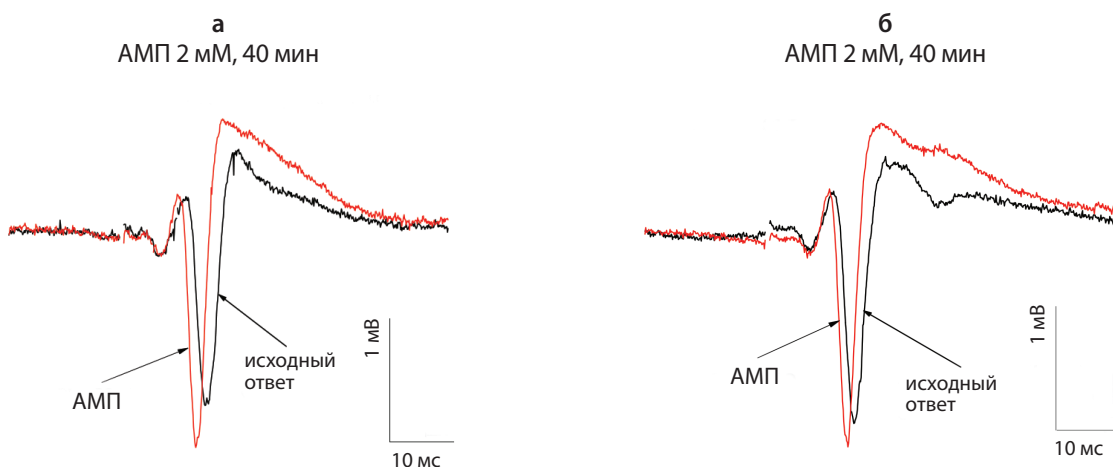
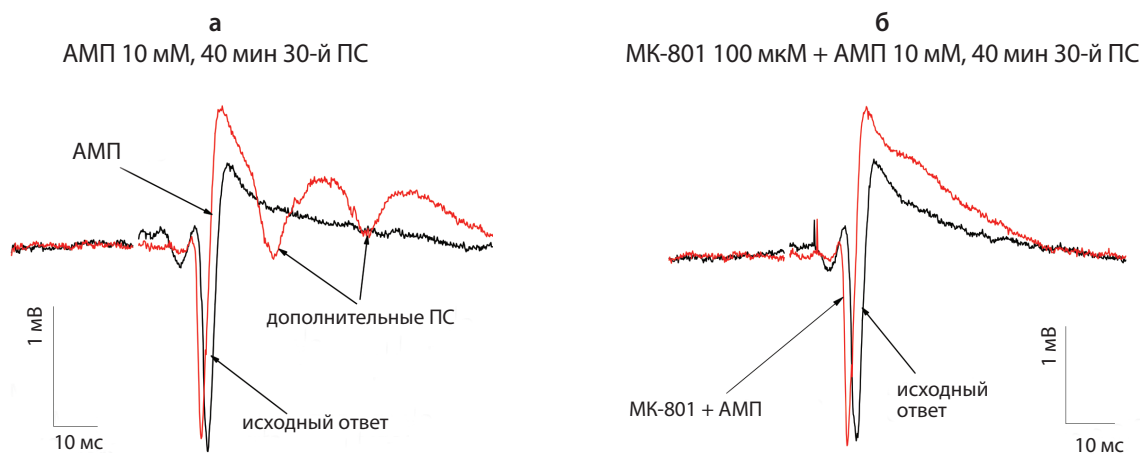


Рис. 3.

Влияние добавления перфузионную среду АМП на ортодромные популяционные ответы в поле CA1 гиппокампа крыс (а) и влияние специфического неконкурентного антагониста NMDA-рецепторного комплекса МК-801 на эпилептиформную активность, вызванную добавлением в перфузионную среду АМП (б).



ЛИТЕРАТУРА

1. Мотин В.Г. Холин — предшественник ацетилхолина — вызывает NMDA-зависимую эпилептиформную активность в CA1 области гиппокампа крыс // Бюл. экпер. биол. 2011 Т. 152, № 7 С. 32–35.
2. Стовбун С.В., Киселев А.В., Сергиенко В.И. Экспериментальное изучение ноотропных и нейропротективных свойств кальциевой соли N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты // Вестн. МГОУ. Сер. Естеств. науки. 2011 № 2 С. 83)93.
3. Arrigo A., Mormina E., Anastasi G.P., Gaeta M., Calamuneri A., Quartarone A., De Salvo S., Bruschetta D. Rizzo G., Trimarchi F., Milardi D. Constrained spherical deconvolution analysis of the limbic network in human, with emphasis on a direct cerebello-limbic pathway // Front. Hum. Neurosci. 2014 Vol. 8 P. 987 doi: 10.3389/fnhum.2014.00987.
4. Black S.A., Stys P.K., Zamponi G.W., Tsutsui S. Cellular prion protein and NMDA receptor modulation: protecting against excitotoxicity // Front. Cell Dev. Biol. 2014 Vol. 2 P. 45 doi: 10.3389/fcell.2014.00045.
5. Bonaccorso C., Micale N., Ettari R., Grasso S., Zappalà M. Glutamate binding-site ligands of NMDA receptors // Curr. Med. Chem. 2011 Vol. 18, N 36 P. 5483)5506.
6. Coras R., Pauli E., Li J., Schwarz M., Rössler K., Buchfelder M., Hamer H., Stefan H., Blumcke I. Differential influence of hippocampal subfields to memory formation: insights from patients with temporal lobe epilepsy // Brain. 2014 Vol. 137, Pt 7 P. 1945)1957.
7. Jalili C., Salahshoor M.R., Pourmotabbed A., Moradi S., Roshankhah Sh., Darehdori A.S., Motaghi M. The effects of aqueous extract of *Boswellia Serrata* on hippocampal region CA1 and learning deficit in kindled rats // Res. Pharm. Sci. 2014 Vol. 9, N 5 P. 351)358.
8. Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones // Prog. Biophys. Mol. Biol. 2004 Vol. 86, N 2 P. 279)351.
9. Nyitrai G., Lasztóczy B., Kardos J. Glutamate uptake shapes low-[Mg²⁺] induced epileptiform activity in juvenile rat hippocampal slices // Brain Res. 2010 Vol. 1309 P. 172)178.
10. Tanaka K.Z., Pevzner A., Hamidi A.B., Nakazawa Y., Graham J., Wiltgen B.J. Cortical representations are reinstated by the hippocampus during memory retrieval // Neuron. 2014 Vol. 84, N 2 P. 347)354.
11. Vyklicky V., Korinek M., Smejkalova T., Balik A., Krausova B., Kaniakova M., Lichnerova K., Cerny J., Krusek J., Dittert I., Horak M., Vyklicky L. Structure, function, and pharmacology of NMDA receptor channels // Physiol. Res. 2014 Vol. 63, Suppl. 1 P. S191)S203.
12. Wlodarczyk A.I., Xu C., Song I., Doronin M., Wu Y.W., Walker M.C., Semyanov A. Tonic GABA_A conductance decreases membrane time constant and increases EPSP-spike precision in hippocampal pyramidal neurons // Front. Neural Circuits. 2013 Vol. 7 P. 205 doi: 10.3389/fncir.2013.00205.