

УДК 577.352.465

РОЛЬ IP_3 -ЗАВИСИМОЙ МОБИЛИЗАЦИИ КАЛЬЦИЯ В ФОРМИРОВАНИИ ПОСТГИПОКСИЧЕСКОЙ ГИПЕРВОЗБУДИМОСТИ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА

Туровская М.В., Туровский Е.А., Зинченко В.П.

Институт биофизики клетки РАН, Пущино, e-mail: turovsky.84@mail.ru

В работе показано, что активация NMDA-рецепторов, с последующими кратковременными эпизодами гипоксии, способна приводить к появлению спонтанного транзиторного увеличения концентрации цитозольного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в период реоксигенации, амплитуда которого может возрастать при последующих эпизодах гипоксии, что является признаком постгипоксической гипервозбудимости нейронов. Генерация $[Ca^{2+}]_i$ никогда не происходит во время кратковременных эпизодов гипоксии без предварительной активации NMDA-рецепторов селективным агонистом, либо в отсутствие эпизодов гипоксии при активации NMDA-рецепторов. Постгипоксический Ca^{2+} импульс наблюдается также в бескальциевой среде, но с меньшей амплитудой, что свидетельствует о минорной роли входа кальция снаружи в механизме генерации $[Ca^{2+}]_i$. Ингибитор SERCA – тапсигаргин в концентрациях, вызывающих опустошение кальциевых запасов эндоплазматического ретикулума, предотвращает появление $[Ca^{2+}]_i$ во всех нейронах. А использование малых концентраций тапсигаргина (100 нМ) приводит к увеличению амплитуды $[Ca^{2+}]_i$, что является подтверждением ведущей роли внутриклеточных запасов Ca^{2+} в генерации $[Ca^{2+}]_i$. Ингибиторы фосфолипазы C препятствуют появлению признаков постгипоксической гипервозбудимости. Ингибитор рианодинного рецептора – рианодин – не влияет на появление и нарастание амплитуды $[Ca^{2+}]_i$. Таким образом, в механизме формирования постгипоксической гипервозбудимости нейронов гиппокампа ведущую роль играет мобилизация кальция при активации IP_3 -рецептора эндоплазматического ретикулума.

Ключевые слова: гипоксия, реоксигенация, гипервозбудимость, Ca^{2+} , NMDA-рецептор, IP_3 -рецептор

ROLE IP_3 -DEPENDENT CALCIUM MOBILIZATION IN THE GENERATION OF POSTHYPOXICAL HYPEREXCITABILITY HIPPOCAMPAL NEURONS

Turovskaya M.V., Turovsky E.A., Zinchenko V.P.

Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, e-mail: turovsky.84@mail.ru

In this work it was shown that activation of NMDA receptors with subsequent transitory hypoxia episodes can result in spontaneous transitory increase in cytosolic calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) during reoxygenation, with a possibility of amplitude increase upon further hypoxia episodes, which might indicate posthypoxic hyperexcitability of neurons. The generation of $[Ca^{2+}]_i$ is never observed during short-term hypoxia episodes without preliminary activation of NMDA receptors by selective agonist, or in the absence of hypoxia episodes upon NMDA receptor activation. Posthypoxic Ca^{2+} impulse is also observed in Ca-free medium, but it has lower amplitude, which indicates a minor role of calcium entry from the outside in the mechanism of $[Ca^{2+}]_i$ generation. Thapsigargin, an inhibitor of SERCA, prevents $[Ca^{2+}]_i$ income in all neurons in concentrations, which cause depletion of calcium supplies in endoplasmic reticulum. However, the application of low thapsigargin (100 nM) leads to an increase in $[Ca^{2+}]_i$ amplitude, supporting the leading role of intracellular Ca^{2+} supplies in the generation of $[Ca^{2+}]_i$. Phospholipase C inhibitors prevent the appearance of posthypoxic hyperexcitability symptoms. Ryanodine, an inhibitor of ryanodine receptor, does not affect the appearance and amplitude increase of $[Ca^{2+}]_i$. Thus in the mechanism of posthypoxic hyperexcitability in hippocampal neurons the major role belongs to the mobilization of calcium upon activation of IP_3 receptor in endoplasmic reticulum.

Keywords: hypoxia, reoxygenation, hyperexcitability, Ca^{2+} , NMDA-receptor, IP_3 -receptor

Известно, что кратковременные эпизоды гипоксии защищают нейроны от гибели при глобальной гипоксии и ишемии. При этом кратковременные эпизоды гипоксии подавляют увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле ($[Ca^{2+}]_i$), вызванное последующей глобальной ишемией [9]. Однако, наряду с защитным эффектом, кратковременные эпизоды гипоксии часто вызывают симптомы постгипоксической гипервозбудимости, которая, как известно, является фактором, приводящим к гибели клеток [10].

Увеличение концентрации внутриклеточного кальция при действии глутамата может вызывать широкий спектр реакций нейронов, начиная с нормальной синаптической нейропластичности и регуляции возбудимости нервных клеток до форми-

рования нейротоксических эффектов, приводящих к апоптозу. Продолжительный вход Ca^{2+} в цитозоль через активированные глутаматом рецепторы-каналы и потенциал-управляемые кальциевые каналы представляет собой ключевой фактор гибели нейронов при гипоксии и ишемии [6].

Цель данного исследования состоит в определении механизма формирования постгипоксической гипервозбудимости нейронов гиппокампа, а также роли внутриклеточного кальциевого депо в формировании постгипоксического спонтанного кальциевого импульса ($[Ca^{2+}]_i$).

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали смешанную нейроглиальную культуру клеток гиппокампа крысы, вы-

деленную из мозга новорожденных (2–4 дня) крыс породы Sprague Dawley в соответствии с общепринятой методикой [1]. Исследовали влияние кратковременных эпизодов гипоксии на амплитуду кальциевого ответа нейронов гиппокампа при аппликации агониста NMDA-рецепторов – N-methyl-d-aspartate в безмагниевой среде. Концентрацию цитозольного кальция измеряли с помощью флуоресцентного зонда Fura-2. Уровень цитозольного кальция в клетках, нагруженных кальциевым зондом, регистрировали с помощью системы анализа изображений «Cell observer» (Carl Zeiss, Германия), на базе моторизованного микроскопа Axiovert 200M. В эксперименте использовали культуру гиппокампа 8–10 DIV. Измерения проводили при температуре 28°C. Для подачи веществ использовали систему, позволяющую производить добавки агонистов и антагонистов рецепторов при полной смене среды. Для создания гипоксии в ячейку с клетками подавали среду (солевой раствор Хенкса с 20 mM HEPES), из которой предварительно в течение 20 минут вытеснялся кислород с помощью продувки аргоном, при этом воздушная часть ячейки также была заполнена аргоном.

Эксперимент состоял из 3-кратковременных эпизодов гипоксии по 3 минуты, каждый из которых сменялся 10-минутной реоксигенацией. Аппликация NMDA производилась перед первым эпизодом гипоксии (контроль) и после каждого из трех эпизодов гипоксии-реоксигенации. Время аппликации агонистов составляло 30 секунд с последующей отмывкой агониста 10 мл среды и реоксигенацией в течение 10 минут.

Для построения графиков и статистической обработки использовали программу OriginPro 8.0. В случае кратковременного (транзитного) сигнала амплитуду измеряли по максимальному значению флуоресценции за период аппликации вещества. Ошибка среднего при измерении амплитуд составляла 0,04. Исходный уровень сигнала в клетках обычно составлял $0,23 \pm 0,07$ (здесь и далее среднее значение $\pm$ стандартное отклонение).

Результаты исследования и их обсуждение

Изменение $[Ca^{2+}]_i$, вызываемое активацией NMDA-рецепторов и кратковременной гипоксией.

Кратковременная аппликация агониста NMDA-рецепторов – N-methyl-d-aspartate в концентрации 10 мкМ в безмагниевой среде вызывает резкое увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах гиппокампа. После отмывки NMDA клетки быстро восстанавливают базальный уровень Ca^{2+} в цитозоле. Амплитуды кальциевых ответов (АКО) индивидуальных нейронов различаются, но строго повторяются в каждой клетке при повторных кратковременных добавках NMDA. Эпизоды гипоксии вызывают незначительное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в $45 \pm 08\%$ нейронов гиппокампа (не показано). Амплитуда индуцированного гипоксией увеличения Ca^{2+} в цитозоле составила в среднем $0,03 \pm 0,01$ относительных единиц флуоресценции Fura-2. Возвращение флуоресценции Fura-2 к исходному уровню происходит у всех прореагировавших на гипоксию нейронов в течение 2 минут реоксигенации. Кратковременные эпизоды гипоксии вызывают прогрессирующее уменьшение АКО нейронов гиппокампа на NMDA (рис. 1). Кроме того, после активации NMDA-рецепторов и кратковременных эпизодов гипоксии во время каждого периода реоксигенации наблюдается спонтанное (синхронное) транзитное увеличение Ca^{2+} в цитозоле ($s[Ca^{2+}]_i$) у 50% нейронов (см. рис. 1). Подобный эффект никогда не наблюдался во время кратковременных периодов гипоксии без добавления NMDA, а также при активации NMDA-рецепторов без создания условий гипоксии. Амплитуда $s[Ca^{2+}]_i$ может увеличиваться от первого эпизода гипоксии к третьему эпизоду, что, вероятно, является симптомом постгипоксической гипервозбудимости нейронов гиппокампа, которое также наблюдается в нейронах срезов гиппокампа после кратковременных эпизодов гипоксии [7].

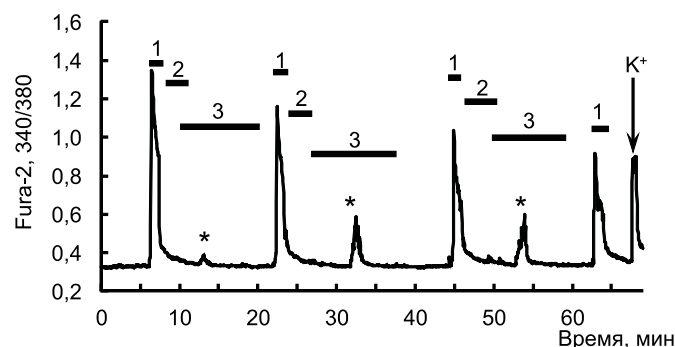


Рис. 1. Изменение $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах гиппокампа в ответ на аппликацию NMDA 10 мкМ (1), при действии кратковременных эпизодов гипоксии (2) и во время периода реоксигенации (3). Аппликация NMDA производилась в среде без магния. Представлен усредненный ответ 52 нейронов. Здесь и далее звездочкой * отмечена генерация $s[Ca^{2+}]_i$ во время периода реоксигенации

Постгипоксический спонтанный Ca^{2+} импульс сохраняется в безкальциевой среде и ингибируется тапсигаргином.

Постгипоксический спонтанный Ca^{2+} -импульс наблюдается также во время реоксигенации в безкальциевой среде, при этом амплитуда $s[\text{Ca}^{2+}]_i$ уменьшается в 2-3 раза (не показано). Как известно, для генерации Ca^{2+} -сигналов клетки используют наружный и запасенный во внутриклеточных депо кальций [3]. Эндоплазматический ретикулум (ЭПР) представляет собой основное внутриклеточное депо Ca^{2+} [4]. Появление $s[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нейронах гиппокампа во время реоксигенации в безкальциевой среде свидетельствует об участии внутриклеточного кальциевого пула в механизме постгипоксической гипервоз-

будимости. Однако уменьшение амплитуды $s[\text{Ca}^{2+}]_i$ говорит также о существенном вкладе входа кальция снаружи в формирование Ca^{2+} импульса.

Для исследования регуляторной роли ЭПР в генерации постгипоксического кальциевого импульса клетки перед третьей аппликацией NMDA обрабатывали тапсигаргином в различных концентрациях. В концентрации 1 мкМ тапсигаргин вызывает быстрое опустошение ЭПР, что сопровождается временным увеличением Ca^{2+} в цитозоле и откачкой его во внеклеточную среду. Такая обработка клеток тапсигаргином не изменяла Ca^{2+} ответ на NMDA, но предотвращала появление $s[\text{Ca}^{2+}]_i$ в период реоксигенации (рис. 2).

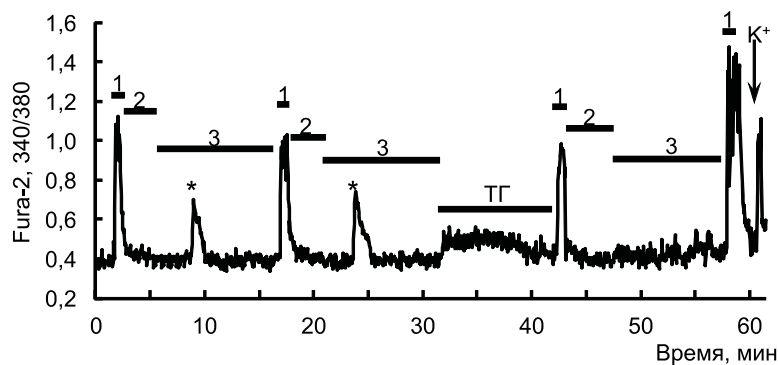


Рис. 2. Действие ингибитора SERCA – тапсигаргина на изменение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нейронах гиппокампа в ответ на аппликацию NMDA 10 мкМ (1) во время кратковременных эпизодов гипоксии (2) и периодов реоксигенации (3). Аппликация тапсигаргина (ТГ) в концентрации 1 мкМ подавляет появление $s[\text{Ca}^{2+}]_i$ в период реоксигенации

рианодин не влияет на генерацию $s[\text{Ca}^{2+}]_i$. Преинкубирование нейронов гиппокампа с рианодином в течение 10 минут, в концентрации 1 мкМ, после второго периода реоксигенации перед третьей аппликацией NMDA не влияет на возникновение $s[\text{Ca}^{2+}]_i$ в период реоксигенации. На рис. 3 показано, что во время двух первых периодов

реоксигенации в нейронах наблюдается появление $s[\text{Ca}^{2+}]_i$, а после преинкубирования клеток с рианодином амплитуда $s[\text{Ca}^{2+}]_i$ даже несколько увеличивается, но в пределах изменений в контроле. Таким образом, рианодиновый рецептор не участвует в формировании постгипоксической гипервозбудимости нейронов гиппокампа.

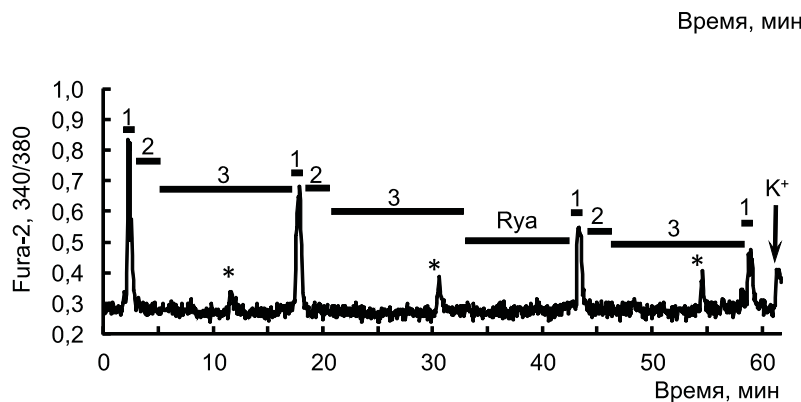


Рис. 3. Действие ингибитора рианодинового рецептора – рианодина – на изменение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нейронах гиппокампа в ответ на аппликацию NMDA 10 мкМ (1) во время кратковременных эпизодов гипоксии (2) и периодов реоксигенации (3). Аппликация рианодина (Rya) в концентрации 1 мкМ не влияет на появление $s[\text{Ca}^{2+}]_i$ в период реоксигенации

Постгипоксический кальцевый импульс подавляется ингибитором фосфолипазы C (PLC).

Для исследования вклада IP_3 -рецепторов в высвобождение Ca^{2+} из ЭПР при генерации $s[Ca^{2+}]_i$ использовали один из ингибиторов PLC – U73122 [4]. Концентрации U73122, используемые в данном исследовании, не вызывают проявления неспецифических эффектов. На рис. 4 показано, что преинкубирование нейронов гиппокампа в течение 10 мин с 1–5 мкМ

U73122 предотвращает появление $s[Ca^{2+}]_i$ в период реоксигенации после активации NMDA-рецепторов и действия кратковременного эпизода гипоксии во всех нейронах. Таким образом, появление $s[Ca^{2+}]_i$ в сетевых нейронах гиппокампа в культуре, в период реоксигенации, после активации NMDA-рецепторов и кратковременных эпизодов гипоксии не зависит от активации рианодинового рецептора, а включает высвобождение Ca^{2+} через IP_3 -рецептор из тапсигаргин-чувствительного пула.

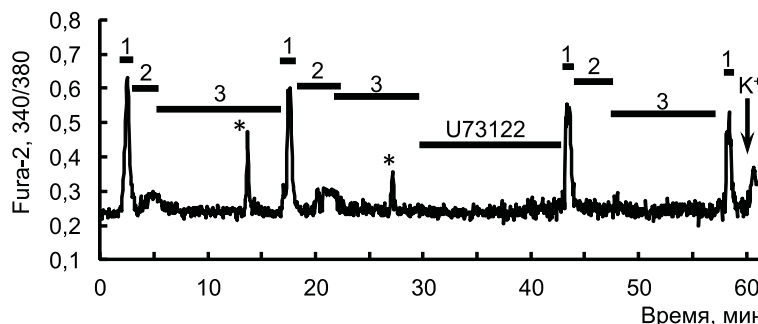


Рис. 4. Действие ингибитора фосфолипазы C – U73122 на изменение $[Ca^{2+}]_i$ в нейронах гиппокампа в ответ на аппликацию NMDA 10 мкМ (1) во время кратковременных эпизодов гипоксии (2) и периодов реоксигенации (3). Аппликация U73122 в концентрации 1 мкМ подавляет появление $s[Ca^{2+}]_i$ в период реоксигенации

Известно, что кратковременные эпизоды аноксии (2–3 минуты) сами могут вызывать Ca^{2+} -ответы в нейронах гиппокампа крысы за счет выброса кальция в цитозоль из IP_3 -чувствительных внутриклеточных депо [2]. Как видно из рис. 4, ингибирование PLC не только препятствует появлению постгипоксического Ca^{2+} импульса, но также подавляет повышение Ca^{2+} в период гипоксии.

Считается, что в условиях гипоксии или кратковременной ишемии головного мозга возбудимость пирамидных нейронов CA1 области гиппокампа возрастает вследствие изменения активности Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов [8], а также активации неселективных катионных каналов, активируемых гиперполяризацией мембраны [5].

Заключение

В настоящей работе показано, что эффект постгипоксической гипервозбудимости возникает в сетевых нейронах гиппокампа в период реоксигенации после кратковременных эпизодов гипоксии и проявляется в возникновении спонтанного, синхронного постгипоксического Ca^{2+} -импульса, который происходит за счет активации PLC – IP_3 пути мобилизации Ca^{2+} из тапсигаргин-чувствительного пула ЭПР.

Список литературы/References

1. Banker G.A., Maxwell Cowan W. Rat hippocampal neurons in dispersed cell culture. // Brain Res. 1977. Vol. 126, no. 3, pp. 397–425.
2. Belousov A.B., Godfraind J. M., Krnjevic K. Internal Ca^{2+} stores involved in anoxic responses of rat hippocampal neurons. // J. Physiol. 1995. Vol. 486, no. 3, pp. 547–556.

3. Berridge M.J. Capacitative calcium entry. // Biochem. J. 1995. Vol. 312, no. 1, pp. 1–11.
4. Bleasdale J.E., Thakur N.R., Gremban R.S., Bundy G.L., Fitzpatrick F.A., Smith R.J., Bunting S. Selective inhibition of receptor-coupled phospholipase C-dependent processes in human platelets and polymorphonuclear neutrophils // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1990. Vol. 255, no. 2, pp. 756–768.
5. Fan Y., Deng P., Wang Y.C., Lu H.C., Xu Z.C., Schulz P.E. Transient cerebral ischemia increases CA1 pyramidal neuron excitability. // Exper. Neurology. 2008. Vol. 212, no. 2, pp. 415–421.
6. Friedman L. K. A role for neuroprotection and sustained adaptation. // Calcium. // Mol. Interventions. 2006. Vol. 6, no. 6, pp. 315–329.
7. Godukhin O., Savin A., Kalemenev S., Levin S. Neuronal hyperexcitability induced by repeated brief episodes of hypoxia in rat hippocampal slices: involvement of ionotropic glutamate receptors and L-type Ca^{2+} channels. // Neuropharmacology. 2002. Vol. 42, pp. 459–466.
8. Levin S. G., Shamsutdinova A. A., Godukhin O. V. Apamin, a selective blocker of SK_Ca channels, inhibits posthypoxic hyperexcitability but does not affect rapid hypoxic preconditioning in hippocampal CA1 pyramidal neurons in vitro. // Neurosci. Lett. 2010. Vol. 484 no. 1, pp. 35–38.
9. Semenov D.G., Belyakov A.V., Samoilov M.O. Moderate hypobaric hypoxia modifies Ca^{2+} -mediated glutamatergic signal transduction in rat cerebral cortex. // Neuroscience and Behavioral Physiology. 2002. Vol. 40, no. 9, pp. 1012–1016.
10. Turovskaya M.V., Turovsky E.A., Zinchenko V.P., Levin S.G., Shamsutdinova A.A., Godukhin O.V. Repeated brief episodes of hypoxia modulate the calcium responses of ionotropic glutamate receptors in hippocampal neurons // Neurosci. Lett. 2011. Vol. 496, no.1, pp. 11–14.

Рецензенты:

Асланиди К.Б., д.ф.-м.н., лаборатория регуляции внутриклеточных процессов Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН), г. Пущино;
Мошков Д.А., д.б.н., профессор лаборатории ультраструктуры нейрона Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН (ИТЭБ РАН), г. Пущино.

Работа поступила в редакцию 09.10.2012.