

На правах рукописи

Персиянцева Надежда Александровна

РОЛЬ ПРОТЕИН КИНАЗЫ С В МЕХАНИЗМАХ НАРУШЕНИЯ
КАЛЬЦИЕВОГО ГОМЕОСТАЗА В НЕЙРОНАХ МОЗЖЕЧКА И
КОРЫ ПРИ ГИПЕРСТИМУЛЯЦИИ ГЛУТАМАТНЫХ
РЕЦЕПТОРОВ

03.00.13. -- Физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2008

Работа выполнена в лаборатории мембранологии с группой генетических исследований НИИ Педиатрии ГУ Научного центра здоровья детей РАМН (заведующий – доктор медицинских наук, профессор Пинелис Всеволод Григорьевич)

Научный руководитель: д. м. н., профессор
Пинелис Всеволод Григорьевич

Официальные оппоненты: д. б. н., профессор кафедры физиологии человека и животных МГУ им. М. В. Ломоносова
Балезина Ольга Петровна

д. б. н. Хаспеков Леонид Георгиевич
ГУ Научный центр неврологии РАМН, отдел исследований мозга

Ведущая организация: Институт ВНД и НФ РАН

Защита состоится «24» марта 2008 г. в 15 ч. 30 мин. на заседании диссертационного учёного совета Д 501.001.93, созданного при биологическом факультете Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Воробьёвы горы, МГУ, биологический факультет, ауд. М-1

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

Автореферат разослан «24» февраля 2008 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Умарова Б.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Заболевания центральной нервной системы являются одной из актуальных проблем медицины, что обусловлено их существенной долей в структуре заболеваемости и смертности населения, высокими показателями временной и стойкой утраты трудоспособности. Среди данных заболеваний ведущее место занимает ишемический инсульт. По данным ряда авторов он составляет около 80% общего числа инсультов (Bright and Mochly-Rosen, 2005).

В ишемическом каскаде большую роль играют глутаматные рецепторы. При спазмах сосудов наблюдается снижение кровотока, гипоксия, что провоцирует выброс нейротрансмиттеров. Глутамат (Глу) активирует рецепторы, происходит мощный вход кальция и натрия внутрь клетки и выход калия (Ходоров и др., 2003). Обнаружено, что длительное воздействие Глу на нейроны приводит к увеличению концентрации внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) и развитию так называемой отсроченной Ca^{2+} дисрегуляции (ОКД) (Ходоров и др., 2001, 2003; Khodorov 2004; Nicholls and Budd, 2000). Стойкое повышение $[Ca^{2+}]_i$ способно стимулировать активность Ca^{2+} -зависимых протеин киназ и протеин фосфатаз, в частности протеин киназы C (ПКС). Активность ПКС при ишемии была отмечена в тканях многих органов: сердца, печени, почек (Speechly-Dick et al., 1994).

Несмотря на интенсивные исследования, вклад ПКС в механизмы повреждения нейронов при гиперстимуляции Глу рецепторов окончательно не установлен. Рядом исследователей показано, что предварительное уменьшение активности и содержания ПКС в нейронах защищает их от Глу нейротоксичности (Manev et al., 1989, 1990; Favaron et al., 1990; Coponen et al., 2003). В то же время другие исследователи утверждают, что для защиты клеток необходимо противодействовать инактивации ПКС (Durkin et al., 1996-1997; Tremblay et al., 1999; Busto 1994).

Со времени открытия ПКС в 1977 году было получено достаточное количество информации о биохимии и молекулярной биологии белков семейства ПКС. В понимании их регуляции и позиционировании в различных сигнальных путях множества организмов, от дрожжей до млекопитающих, были достигнуты фундаментальные успехи. Однако всё сказанное выше не позволяет сделать вывод, какой же вклад вносит ПКС в механизмы

повреждения нейронов, вызванные гиперстимуляцией Глу рецепторов: активация ПКС или падение активности связаны с повреждающим действием Глу. До сих пор мало изучена функциональная роль отдельных изоформ ПКС, которые экспрессируются в одной и той же клетке; практически отсутствуют данные о том, что происходит с ПКС при длительном Глу воздействии, остаётся ли она при этом на плазматической мембране. Имеются данные о влиянии ПКС на Ca^{2+} токи через NMDA каналы, однако, совершенно не изучено влияние её активации или ингибирования на нарушение Ca^{2+} гомеостаза, на развитие ОКД. Остаётся неизученным, принимает ли участие ПКС в особенностях действия Глу на нейроны разного возраста.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы было исследовать роль протеин киназы С в механизмах нарушения кальциевого гомеостаза и гибели культивируемых нейронов мозжечка и коры при гиперстимуляции глутаматных рецепторов.

Для достижения поставленной цели в работе решались следующие конкретные **задачи:**

1. Определить особенности изменений активности ПКС при кратковременном и длительном глутаматном воздействии, при действии активатора и ингибиторов ПКС;
2. Изучить изменения $[Ca^{2+}]_i$ и трансмембранной разности потенциала внутренней мембраны митохондрий при длительном воздействии глутамата, активатора и ингибиторов ПКС;
3. Изучить поведение изоформы ПКС β II в нейронах коры при длительном действии глутамата, активатора и ингибитора ПКС;
4. Оценить выживаемость нейронов после длительного глутаматного воздействия при действии активатора и ингибиторов ПКС.

Научная новизна исследования.

В работе впервые было обнаружено, что транслокация изоформы ПКС β II происходит параллельно с изменениями $[Ca^{2+}]_i$, вызванными длительным Глу воздействием. Во время первой фазы повышения $[Ca^{2+}]_i$ ПКС перемещается из цитозоля на плазматическую мембрану нейронов. Обратная транслокация ПКС β II с плазматической мембраны в цитозоль (в органелло-подобные структуры в цитоплазме) происходит одновременно с развитием ОКД и осуществляется с помощью транспортного белка RACK1. Впервые было показано, что развитие ОКД не является обязательным

условием для последующей гибели нейронов спустя 2 часа после действия Глу. Обнаружено, что в молодых нейронах ингибиторы ПКС защищают клетки от действия Глу, задерживают развитие ОКД и уменьшают её процент. Установлено, что 24 часовое действие ФЭ уменьшает активность ПКС до минимальных значений и приводит к развитию “down-regulation” ПКС. Впервые показано, что в этих условиях длительное воздействие Глу не вызывает гибели нейронов, уменьшает число клеток с ОКД, замедляет время её наступления. Обнаружено, что ингибитор фосфатаз омега-3 жирная кислота на фоне длительного действия Глу вызывает эффекты, подобные ФЭ, ускоряя развитие ОКД.

Научное и практическое значение работы.

Полученные в работе данные, раскрывающие вклад ПКС в механизмы нарушения Ca^{2+} гомеостаза и гибели нейронов, вызванные длительным Глу воздействием, важны для понимания процессов, лежащих в основе повреждения нейронов при ишемии/гипоксии мозга. Способность некоторых ингибиторов ПКС защищать нейроны от токсического действия Глу может иметь практический выход: это создание лекарственных препаратов, нацеленных на изменение активности ПКС. Очевидную практическую ценность имеют полученные в работе данные об изменениях активности ПКС и эффекты “down-regulation” на механизмы нарушения Ca^{2+} гомеостаза и повреждения нейронов. Это способствует выявлению причин повреждения нейронов при гиперстимуляции глутаматных рецепторов и, тем самым, поможет подойти к решению актуальной проблемы, направленной на профилактику и терапию ряда заболеваний центральной нервной системы.

Положения, выносимые на защиту.

1. Глутамат приводит к изменению активности ПКС в нейронах, которая зависит от длительности его воздействия.
2. Глутамат вызывает транслокацию изоформы ПКС β II из цитозоля на плазматическую мембрану, а затем обратно в цитозоль в виде органелло-подобных структур с помощью транспортирующего белка RACK1. По времени транслокация ПКС β II совпадает с динамикой развития ОКД и запускается кальцием, входящим в нейроны по NMDA каналам.
3. На фоне Глу ингибиторы ПКС задерживают развитие ОКД и уменьшают число нейронов с ОКД.

Апробация диссертации.

Результаты исследований были представлены на Международной Конференции "Рецепция и внутриклеточная сигнализация" (Пушино, 2005); Научной Конференции "Нейрохимия: Фундаментальные и прикладные аспекты" (Москва, 2005); Международной Конференции "Neuroscience 2005" (Вашингтон, 2005); XIII Международной Конференции и Дискуссионном Научном Клубе «Новые инфоФЭционные технологии в медицине, биологии, фаФЭкологии и экологии» (Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 2005); Втором Международном Междисциплинарном Конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым, Украина, 2006).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 7 работ.

Структура и объём диссертации.

Диссертационная работа изложена на _____ страницах машинописного текста; состоит из введения, обзора литературы, методической части, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы.

Работа иллюстрирована _____ рисунками и _____ таблицами.

Список литературы включает _____ источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на культивируемых гранулярных нейронах мозжечка (7-9 дней и 14-16 дней в культуре, ДВК) и кортикальных нейронах крыс (7-9 дней в культуре).

Для получения гранулярных клеток мозжечка и коры использовали 7 и 1-дневных крысят линии Wistar, соответственно. После декапитации животных выделяли мозжечок или кору, которые измельчали, трипсинизировали и переносили полученную суспензию клеток на покровные стёкла, покрытые поли-D-лизином или 24-луночные планшеты в концентрации 10^6 клеток/мл. На 3-ий день добавляли арабинозинмоноцитозид для предупреждения пролиферации не нейрональных клеток.

Измерения активности ПКС в плазматической мембране культивируемых нейронов мозжечка и коры проводились в лизатах с помощью набора PerTag®-анализ для нерадиоактивного определения ПКС (Promega). Для количественного определения активности ПКС цифровое изображение электрофореграмм с разделённым фосфорилированным и нефосфорилированным флуоресцентным субстратом ПКС анализировали с помощью программы ScanArrayExpress (Perkin Elmer).

Для измерения $[Ca^{2+}]_i$ нейроны нагружались высокоафинным или низкоафинным Ca^{2+} -чувствительными зондами Fura-2/AM или Fura-2FF/AM соответственно. Для измерения митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) нейроны нагружались потенциал-чувствительным зондом Rh-123. Измерения $[Ca^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$ проводились на инвертированном флуоресцентном микроскопе Axiovert-200 (“Zeiss”, Германия), оборудованном CCD камерой CoolSnap-fx (“Roper Scientific”, США) и системой синхронной смены фильтров “Lambda 10-2 (“Shutter”)”. Флуоресценция зондов возбуждалась светом от ксеноновой лампы, пропускаемым последовательно через светофильтры: 340 и 380 нм для Fura-2 и 490 нм для Rh-123. Динамика изменений флуоресценции зондов была проанализирована во всех нейронах, находящихся в поле зрения, с помощью компьютерной программы Metafluor 6.1 (Universal Imaging Corp.). Данные, полученные с помощью Ca^{2+} -чувствительных зондов представлены как отношение флуоресценции (505 нм), возбуждаемой светом с длинами волн 340 и 380 нм (F340/F380). Сигналы Rh-123 (535 нм) нормировались к базальному уровню флуоресценции.

Для изучения перемещения изоформы ПКСβII культивируемые нейроны коры головного мозга крыс трансфецировали с помощью химеры, содержащей ген ПКСβII, соединённый с зелёным флуоресцентным белком, и реагента Lipofectamine-2000. Плазмида была любезно предоставлена Dr. Rizzuto (Университет Феррары, Италия).

Для изучения перемещения изоформы ПКСβII и белка RACK1 использовали иммунофлуоресцентное окрашивание. После пермеабиллизации клетки инкубировали с первичными антителами (Mouse anti-RACK1 и mouse anti-ПКСβII) и со вторичными антителами (Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse). С помощью флуоресцентного микроскопа Axiovert-200 с CCD камерой получали цифровые изображения экспериментов.

Выживаемость нейронов оценивали морфологическим и биохимическим методами. Морфологическая оценка включала исследование ядерной фрагментации для анализа апоптоза с помощью флуоресцентного красителя Hoechst 33342 и Ethidium bromide для анализа некроза. С помощью красителя SYTO-13 оценивали количество живых нейронов. Анализ проводили через 2 и 24 часа после часового воздействия Глу или Глу в сочетании с ФЭ или ингибиторами ПКС (хелеритрином, кальфостином С или

стауроспорином). Окрашенные клетки исследовали под инвертированным флуоресцентным микроскопом Axiovert-200. Биохимическая оценка включала определение оптической плотности формазана МТТ (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) с помощью спектрофотометра Униплан (Россия) при 540 нм. МТТ восстанавливается в формазан только митохондриями живых клеток.

Статистическую обработку данных проводили не менее, чем в 3 параллельных пробах для каждого данного образца в 3-7 независимых экспериментах. Результаты представлены в виде «среднее значение±стандартное отклонение». Обработку результатов проводили с помощью программы PRIZM 3.0, используя для сравнения полученных выборок тест one-way ANOVA. Достоверными считали различия при $t < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Исследование активности ПКС при действии глутамата.

Учитывая особенности культивирования нейронов в наших условиях (смешанные культуры), мы исследовали изменения активности при гиперстимуляции Глу рецепторов и действии ингибиторов ПКС, а также её активатора ФЭ (неактивный аналог ФЭ 4 α РМА во всех контрольных экспериментах не влиял на эффекты Глу). В первой серии экспериментов исследовали активность ПКС при кратковременном (рис. 1) и длительном Глу воздействиях.

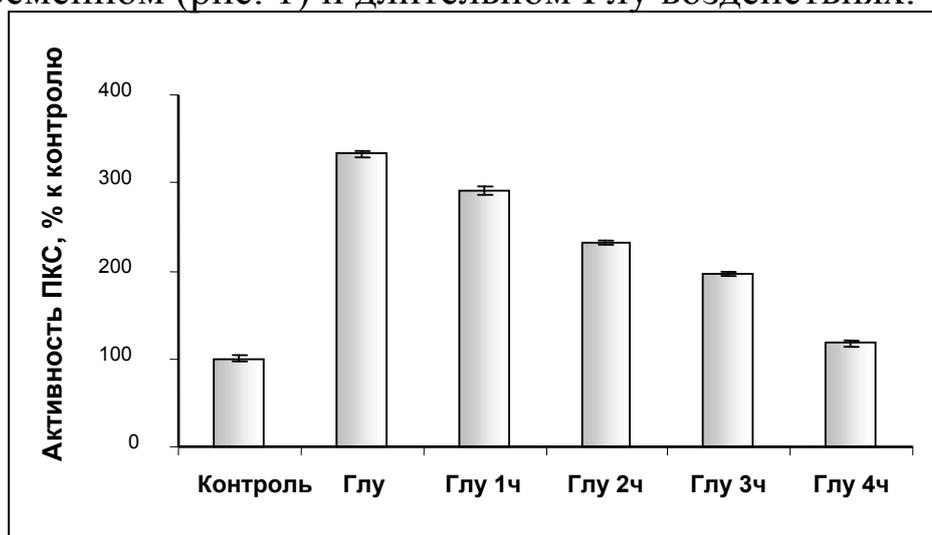


Рисунок 1. Изменение активности ПКС нейронов мозжечка (7 ДВК) после 15 минутного воздействия Глу в концентрации 100 μ М. Глу – 15 мин, Глу 1 ч – через час после отмывки, Глу 2 ч – через 2 часа, Глу 3 ч – через 3 часа, Глу 4 ч – через 4 часа. Приведены данные 3 независимых экспериментов.

Согласно литературным данным, 15 мин Глу воздействия достаточно для временной активации ПКС (Durkin et al., 1997). В своих

исследованиях мы измерили активность ПКС после 15 и 60 мин Глу воздействия. Выбор указанных временных интервалов обусловлен тем, что после 15 мин с Глу не наблюдалось развития ОКД. Как видно из рис. 1, после 15 мин действия Глу активность ПКС увеличивалась более, чем в 3 раза. После отмывки от Глу активность постепенно уменьшалась и через 4 часа она достигала контрольных величин. Полученные в настоящей работе результаты соответствуют литературным данным (Durkin et al., 1997; Tremblay et al., 1999; Busto et al., 1994).

Длительное Глу воздействие (60 мин) приводило к падению активности ПКС до $49\pm 7\%$ и $70\pm 3\%$ для клеток мозжечка и коры. Необходимо отметить, что в литературе нет единого мнения о роли изменений активности ПКС в Глу нейротоксичности: авторы, которые утверждают, что активность повышается, основываются на результатах, полученных после 15 мин с Глу (Favaron et al., 1990; Kubo and Nagiwaга, 2005). Авторы, которые считают, что в основе эксайтотоксичности -- падение активности ПКС, регистрируют это падение через 4 часа после отмывки от кратковременного действия Глу (Durkin et al., 1997; Tremblay et al., 1999; Busto et al., 1994). В гранулярных клетках мозжечка стауроспорин ($1\ \mu\text{M}$, 60 мин) уменьшал активность ПКС на $84\pm 2\%$, в клетках коры на $73\pm 3\%$ от контрольных величин. Кальфостин С в концентрации $100\ \text{nM}$ резко уменьшил активность ПКС как в клетках мозжечка ($19\pm 3\%$ от контрольных величин), так и коры ($9\pm 2\%$). Хелеритрин значительно меньше ингибировал ПКС в нейронах обеих культур, рис. 2.

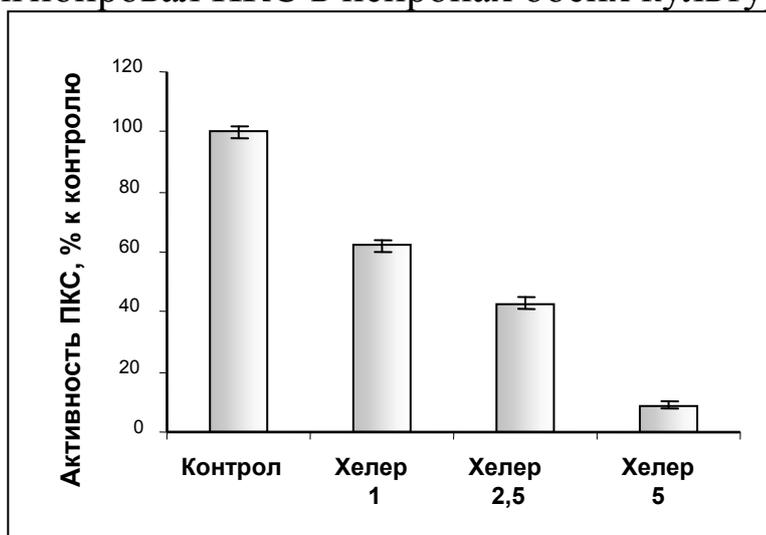


Рисунок 2. Изменение активности ПКС нейронов мозжечка (7 ДВК) после воздействия в течение 1 часа ингибитора хелеритрина в концентрациях 1-5 μM . Приведены данные 3 независимых экспериментов.

В следующей серии экспериментов было изучено влияние активатора ПКС ФЭ. Как видно на рис. 3, ФЭ в дозах 100 и 500 нМ вызывал достоверное увеличение активности ПКС, которая сохранялась в течение часа после добавления ФЭ. На рис. 3 так же видно, что инкубация нейронов с ФЭ в течение 24 часов приводила к практически полному падению активности ПКС. Favaron et al. (1990) обнаружил, что 24-часовая инкубация нейронов мозжечка с ФЭ приводит к уменьшению количества ПКС в клетках на 90%. При длительном воздействии ФЭ на клетки наступает десенситизация ПКС в ответ на агонисты и DAG (Newton, 1995; Huwiler et al., 1994), наступает так называемая “down-regulation” ПКС.

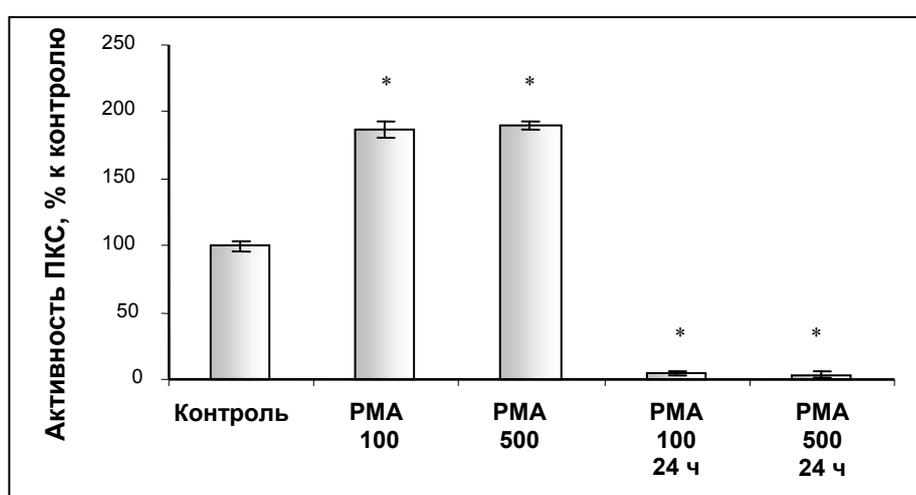


Рисунок 3. Изменение активности ПКС нейронов коры (7 ДВК) после воздействия в течение 1 или 24 часов активатора ПКС ФЭ в концентрациях 100 и 500 нМ. Приведены данные 3 независимых экспериментов. * $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

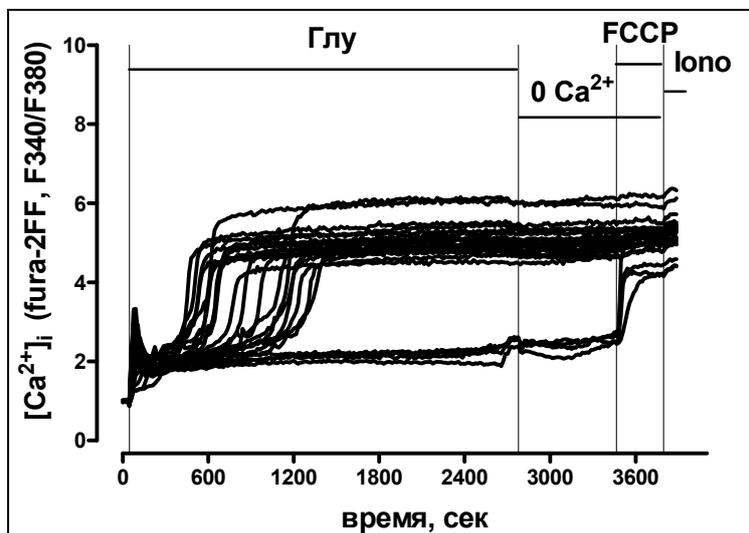
Инкубация нейронов мозжечка и коры с ФЭ или хелеритрином и последующее добавление Глу (100 μ M 1 час) не вносило изменений в активность ПКС, выявленную только при действии активатора или ингибитора ПКС. Аналогичные данные были получены при развитии “down-regulation” ПКС.

2. Влияние активатора и ингибиторов ПКС на нарушение кальциевого гомеостаза, вызванное действием глутамата.

В нашей лаборатории ранее было показано, что в культивируемых нейронах мозжечка, коры и гиппокампа длительное (до 1 часа) воздействие Глу вызывает двухфазное повышение $[Ca^{2+}]_i$, причём вторая фаза сопровождается синхронным падением митохондриального потенциала (так называемая отсроченная кальциевая дисрегуляция, ОКД) (Khodorov et al., 2000, Khodorov, 2004, Вабниц и др., 2006). В настоящих исследованиях мы изучили

влияние ФЭ, омега-3 кислоты и ингибиторов ПКС на нарушения Ca^{2+} гомеостаза, вызванные действием Глу. В контрольных экспериментах, выполненных на нейронах коры и мозжечка, длительное (45-60 мин) воздействие Глу вызывало изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и $\Delta\Psi_m$, которые можно условно разделить на две фазы (рис. 4А).

А



Б

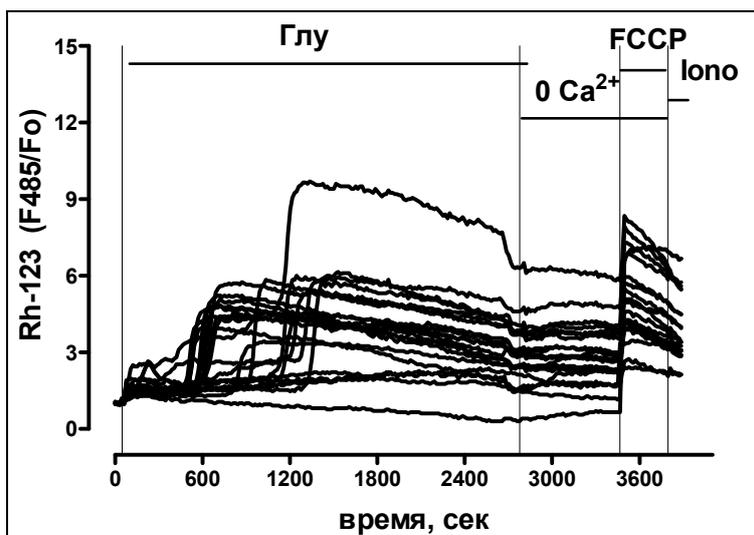


Рисунок 4. Типичная кривая динамики изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (А) и $\Delta\Psi_m$ (Б) нейронов мозжечка (7-9 ДВК) при действии Глу (100 μM , без Mg^{2+} , с 10 μM глицина). Количество независимых экспериментов 5.

Первая фаза охватывает период от начала Глу воздействия до начала вторичного подъема $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и включает в себя начальный пик $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и латентный период, предшествующий сильному вторичному подъему $[\text{Ca}^{2+}]_i$. В наших опытах длительность латентного периода варьировала между клетками в пределах от секунд до десятков минут. В эту фазу $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ответа митохондрии обычно претерпевали сравнительно слабую деполяризацию.

Вторая фаза $[Ca^{2+}]_i$ ответа включает в себя быстрый подъём $[Ca^{2+}]_i$ до высокого уровня квази-плато. Эти изменения $[Ca^{2+}]_i$ сопровождаются сильной практически синхронной митохондриальной деполяризацией (рис. 4Б).

Так как клетки отвечают на Глу несколькими фазами изменения $[Ca^{2+}]_i$, изучение влияния ПКС на кальциевый гомеостаз было целесообразно начать с влияния ПКС на первую фазу. Эти опыты мы проводили следующим образом: Глу действовал 60 секунд, затем, после 20 минутной отмывки, когда $[Ca^{2+}]_i$ возвращалась к исходному уровню, вновь добавлялся Глу на 60 секунд. Повторное добавление Глу вызывало повышение уровня свободного кальция, которое в среднем составило $52 \pm 6\%$ от первого (3 независимых эксперимента, $n=128$), с этим значением сравнивалось действие изученных веществ на фоне Глу, табл. 1. Ни ФЭ, ни хелеритрин сами по себе не вызывали изменений $[Ca^{2+}]_i$. Однако, добавление ФЭ на фоне Глу увеличивало $[Ca^{2+}]_i$ по сравнению с контрольным в 4 раза; в то же время хелеритрин уменьшал $[Ca^{2+}]_i$ в 8 раз.

Таблица 1. Изменение уровня свободного кальция в нейронах коры (7-9 ДВК) при действии ФЭ (100 нМ), хелеритрина (5 мкМ) и ооадаевой кислоты (1 мкМ) на фоне Глу (100 мкМ). 3 независимых эксперимента. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Воздействие	Глу	Глу+ФЭ	Глу+Хелеритрин	Глу+ОА
Вход Ca^{2+} в %	$52 \pm 6\%$	$200 \pm 11\%*$	$7 \pm 4\%*$	$76 \pm 4\%*$

Эти данные свидетельствуют о том, что ПКС оказывает стимулирующее влияние на проводимость NMDA канала. Действительно, как показали Chihab et al. (1998), Bickler et al. (2004), при действии ФЭ на фоне NMDA происходило повышение степени фосфорилированности NR1 субъединицы NMDA канала протеинкиназой С и усиление входящего кальциевого тока.

Необходимо отметить, что фосфорилирование белков – это сбалансированный процесс, на чашах весов которого находятся киназы и фосфатазы. Когда подобный баланс потерян, нейрон может погибнуть. Для изучения вклада фосфатаз обычно используется ооадаевая кислота (специфичный ингибитор протеин фосфатаз 1 и 2А). Manev et al. (1992) в исследованиях на гранулярных клетках мозжечка впервые описали токсический эффект ооадаевой кислоты, связанный с блокированием процесса дефосфорилирования белков. В этих опытах инкубация нейронов с ооадаевой кислотой вызывала значительную гибель, которая блокировалась ингибитором ПКС или предшествующей “down-regulation” ПКС. Был сделан вывод, что в

Глу нейротоксичности огромную роль играет длительное фосфорилирование, частично опосредованное ПКС. К таким же выводам пришли Jiang et al. (2000).

В наших экспериментах оадаевая кислота увеличивала $[Ca^{2+}]_i$ во время кратковременного воздействия Глу (60 сек) в полтора раза. Таким образом, дисбаланс фосфорилирования и дефосфорилирования сказывается уже на характере первой фазы входа Ca^{2+} : при активации ПКС или блокировании дефосфорилирования субстратов ПКС оадаевой кислотой количество вошедшего кальция увеличивается.

Далее мы проанализировали эффекты ФЭ, оадаевой кислоты и ингибиторов ПКС на 2 фазу изменений $[Ca^{2+}]_i$, т.е. на развитие ОКД, вызванной длительным воздействием Глу. Для характеристики ОКД использовались понятия среднего времени возникновения ОКД и процент клеток с ОКД к общему количеству нейронов, которые достаточно полно отражали различия между контрольным и опытным экспериментами, табл. 2.

Таблица 2. Среднее время возникновения ОКД и процент нейронов мозжечка (7-9 ДВК) с ОКД. Глу 100 μ M, ФЭ 100 nM, хелеритрин 5 μ M, оадаевая кислота 1 μ M. 5 независимых экспериментов. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с действием Глу.

Вид воздействия	Глу	ФЭ 24 часа+Глу	ФЭ+Глу	Хелеритрин+Глу	ОА+Глу
Процент клеток с ОКД	83 \pm 7	57 \pm 9*	88 \pm 7*	54 \pm 2**	91 \pm 4
Среднее время возникновения ОКД, сек	890 \pm 47	1308 \pm 85*	693 \pm 51*	1427 \pm 62*	356 \pm 42

Необходимо отметить, что молодые нейроны коры оказались более чувствительны к Глу, чем гранулярные клетки мозжечка (330 \pm 39 сек и 890 \pm 47 сек соответственно, $p < 0.05$).

ФЭ и оадаевая кислота на фоне Глу приводили к ускорению наступления ОКД и дизрегуляция наступала в большем числе нейронов.

Ингибитор ПКС хелеритрин и при “down-regulation” ПКС развитие ОКД замедлялось, количество нейронов с ОКД достоверно уменьшалось, рис. 5.

На культуре коры были получены аналогичные данные.

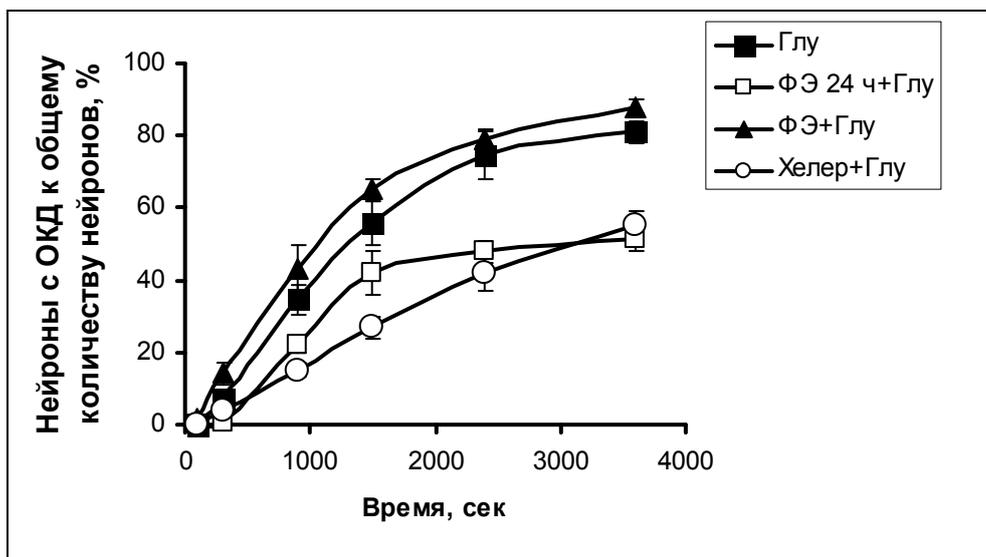


Рисунок 5. Динамика возникновения ОКД в нейронах мозжечка (7-9 ДВК).

■ – Глу 100 μM ; ▲ – ФЭ 100 нМ+Глу; □ – ФЭ 100 нМ 24 ч+Глу; ○ – хелеритрин 5 μM +Глу. 5 независимых экспериментов.

Окадаевая кислота на фоне Глу приводила к ускорению наступления кальциевой дисрегуляции. Однако процент клеток с ОКД изменился незначительно. Это говорит о том, что ОА и ФЭ при действии Глу оказывают аналогичное действие на кальциевый гомеостаз нейронов.

Из полученных данных можно сделать следующий вывод: активированная ПКС увеличивает пропускающую способность NMDA каналов для ионов кальция, окадаевая кислота и ФЭ способствуют поддержанию такого состояния каналов, вследствие этого ОКД наступает быстрее.

3. Изучение поведения изоформы ПКС β II и белка RACK1 при длительном действии глутамата.

ПКС β II – это такая изоформа, которая обладает основными свойствами и функциями, характерными для всего семейства ПКС. В работе были исследованы внутриклеточные перемещения специфической изоформы ПКС β II, генетически соединённой с зелёным флуоресцентным белком, при длительной активации Глу рецепторов нейронов коры головного мозга крысы. Одновременно с изучением транслокации ПКС измеряли внутриклеточный уровень Ca^{2+} с помощью флуоресцентного зонда Fura-2FF. В нейронах, которые демонстрировали характерный монофазный обратимый подъём уровня кальция в ответ на Глу (100 μM , 15 мин), ПКС β II транслоцировалась на плазматическую мембрану и оставалась на всем протяжении Глу воздействия. Однако, в нейронах, в которых наступала ОКД, во время первой фазы кальциевого ответа ПКС β II также транслоцировалась на плазматическую мембрану, но во время

2-ой фазы, когда Ca^{2+} начинал выходить на плато, ПКСβII отделялась от мембраны и перегруппировывалась в органелло-подобные структуры в цитоплазме, резко отличающиеся от равномерного распределения ПКСβII до Глу воздействия (рис. 6).

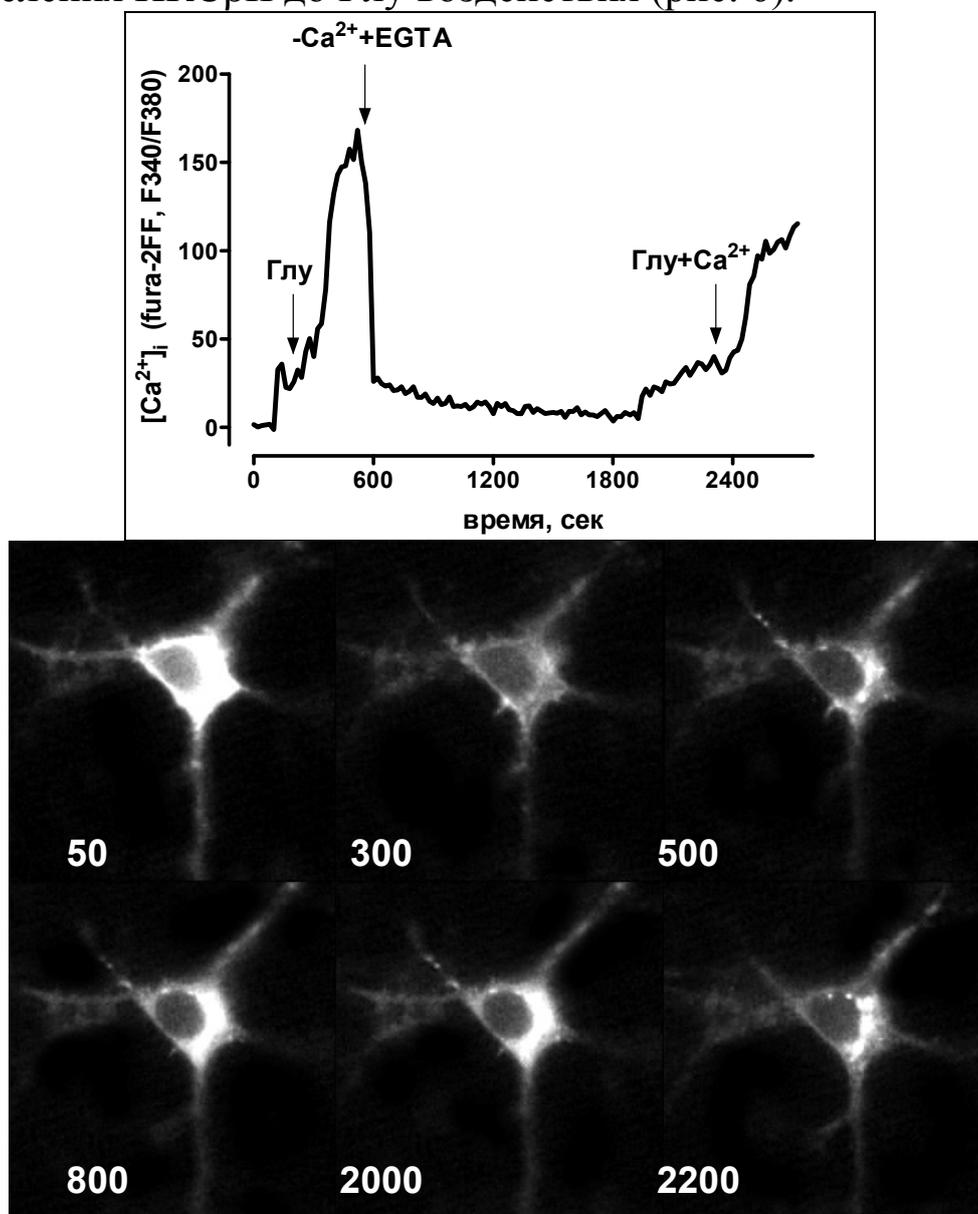


Рисунок 6. Одновременная регистрация изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и перемещения ПКСβII в нейроне коры (7 ДВК). Цифрами обозначено время в секундах. Глу 100 μM . 5 независимых экспериментов.

Уборка кальция из среды после транслокации ПКСβII приводила к восстановлению базального цитоплазматического уровня Ca^{2+} , при этом ПКСβII равномерно распределялась в цитозоле; при возвращении Ca^{2+} в среду инкубации вновь наступала ОКД, синхронно с ней ПКСβII вновь образовывала в цитозоле органелло-подобные структуры (рис. 6).

При добавлении иономицина, который, являясь кальциевым ионофором, резко увеличивает $[Ca^{2+}]_i$, наблюдалось перемещение ПКСβII в органелло-подобные структуры в цитоплазме.

Присутствие в среде ингибитора ПКС стауроспорина не оказывало заметного влияния на картину транслокации при действии Глу. При действии ФЭ ПКСβII транслоцировалась на мембрану, но при повышении $[Ca^{2+}]_i$, вызванном Глу или иономицином, ПКСβII оставалась на мембране. Это указывает на то, что ФЭ способствует необратимому сильному связыванию ПКСβII с мембраной.

Анализ механизмов транслокации ПКС был проведён в специальной серии экспериментов, в которой изучали перемещение ПКСβII и белка RACK1 с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания. Как известно, RACK1 связывает активированную ПКС, выступая как белок-транспортёр. RACK1 перемещается с ПКС к внутриклеточным органеллам. Связывание ПКС с RACKs специфическое, RACK1 взаимодействует с ПКСβII, RACK2 с ПКСε. С помощью окраски антителами к ПКС были получены данные, показывающие, что при Глу воздействию ПКС транслоцируется на мембрану, затем в различные внутриклеточные компартменты, в зависимости от изоформы ПКС (Popp et al., 2006). После воздействия ФЭ ПКС детектировалась только на плазматической мембране клеток (Buchner et al., 1999).

Обнаруженные нами изменения в транслокации ПКСβII при длительном воздействии Глу были сопоставлены с перемещениями белка RACK1. В контроле ПКСβII и RACK1 были равномерно распределены в цитоплазме и начальных участках нейритов. При длительном воздействии Глу, когда имела место ОКД, оба белка выявлялись во внутриклеточных органелло-подобных структурах цитоплазмы нейронов. Активация ПКСβII ФЭ приводила к транслокации обоих белков на плазматическую мембрану нейронов. При сравнении распределения RACK1 и ПКСβII наблюдалась колокализация белков. На обеих культурах нейронов были получены аналогичные результаты.

Полученные данные говорят о том, что при наступлении кальциевой перегрузки, вызванной гиперстимуляцией Глу рецепторов, активная, связанная с RACK1 ПКС перемещается из плазматической мембраны в органелло-подобные структуры в цитоплазме и, возможно, происходит дальнейшая передача сигнала на системы, приводящие к повреждению и последующей гибели нейронов.

4. Оценка выживаемости молодых и старых культур нейронов после длительного глутаматного воздействия при действии активатора и ингибиторов ПКС.

В следующей серии экспериментов мы оценили влияние ФЭ и ингибиторов ПКС на выживаемость нейронов спустя 24 часа после 60 мин воздействия Глу с помощью морфологического и биохимического методов. Результаты, полученные обоими методами, совпали. Процент гибели культивируемых нейронов в контроле не превышал 8-10%. Исследования, проведённые на интактных нейронах, показали, что ингибиторы ПКС стауроспорин и кальфостин С оказались более токсичными, чем хелеритрин. Часовое воздействие Глу вызывало гибель нейронов мозжечка и коры примерно в одинаковой степени ($22\pm 6\%$ и $24\pm 4\%$ соответственно). Как видно на рис.7, $0.2 \mu\text{M}$ стауроспорина, 20 nM кальфостина С оказывали защитный эффект при действии Глу.

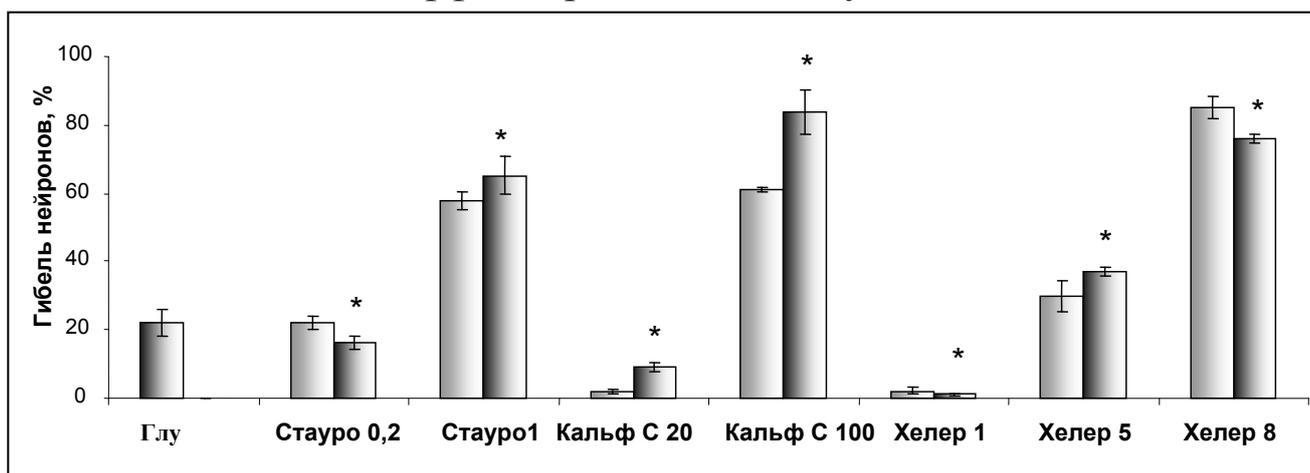


Рисунок 7. Влияние ингибиторов на гибель нейронов мозжечка (7-9 ДВК) при действии Глу. Левые столбики – ингибиторы, правые – ингибиторы с Глу. Глу $100 \mu\text{M}$ 1 час. Стауроспорин в концентрациях $0,2$ и $1 \mu\text{M}$, кальфостин С 20 и 100 nM , хелеритрин $1, 5, 8 \mu\text{M}$. Выживаемость измерялась через 24 часа. МТТ тест, гибель нейронов по отношению к контролю. Приведены данные 7 независимых экспериментов. * $p < 0.05$ по сравнению с действием ингибитора.

Большие дозы ингибиторов, добавленных во время Глу воздействия, усиливали гибель нейронов, вероятно, из-за высокой исходной токсичности этих препаратов. В то же время практически все применённые дозы хелеритрина защищали зернистые клетки мозжечка от токсического действия Глу. Аналогичные данные были получены при исследовании нейронов коры.

В следующей серии исследований мы оценили эффекты кратковременного и длительного действия ФЭ на выживаемость нейронов разного возраста на фоне Глу. В молодых нейронах (7-9

ДВК) “down-regulation” ПКС и ФЭ сам по себе не вызывали гибели нейронов. Добавление ФЭ к молодым нейронам мозжечка, подвергнутым токсическому действию Глу, увеличивало количество погибших нейронов. В тоже время после развития “down-regulation” ПКС Глу практически не вызывал гибель нейронов (рис. 8). Аналогичные данные при 24 часовом воздействии ФЭ на нейроны мозжечка были получены Favaron et al. (1990).

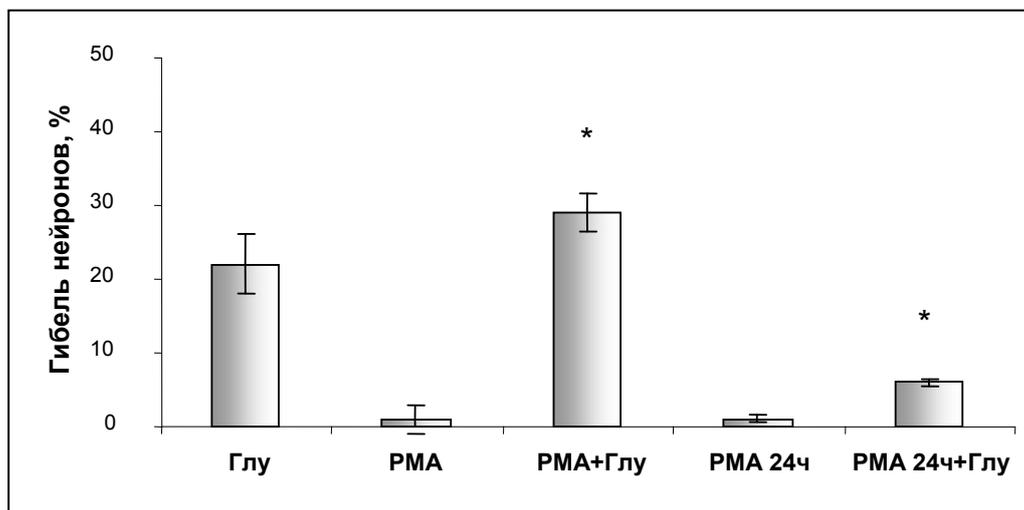


Рисунок 8. Влияние ФЭ на гибель нейронов мозжечка (7-9 ДВК) при действии Глу. Глу 100 μ M, ФЭ 100 nM 1 час или 24 часа. Выживаемость измерялась через 24 часа. МТТ тест, гибель нейронов по отношению к контролю. Приведены данные 7 независимых экспериментов. * $p < 0.05$ по сравнению с действием Глу.

Иные эффекты ФЭ и хелеритрина были выявлены в старых нейронах мозжечка (14-16 ДВК). Как видно на рис. 9, Глу вызывал $50 \pm 4\%$ гибель нейронов, хелеритрин в дозе 5 μ M сам по себе был высокотоксичен, а в сочетании с Глу гибель нейронов увеличилась до $69 \pm 8\%$. В отличие от молодых нейронов, в старых клетках 60 мин воздействие ФЭ защищало клетки от Глу нейротоксичности. При “down-regulation” ПКС после действия Глу гибель была такой же, что и при действии одного Глу.

Механизмы таких возрастных особенностей активатора и ингибитора ПКС не совсем понятны и требуется проведение специальных исследований, направленных на изучение процессов фосфорилирования NMDA каналов и развития отсроченной кальциевой дисрегуляции в старых нейронах.

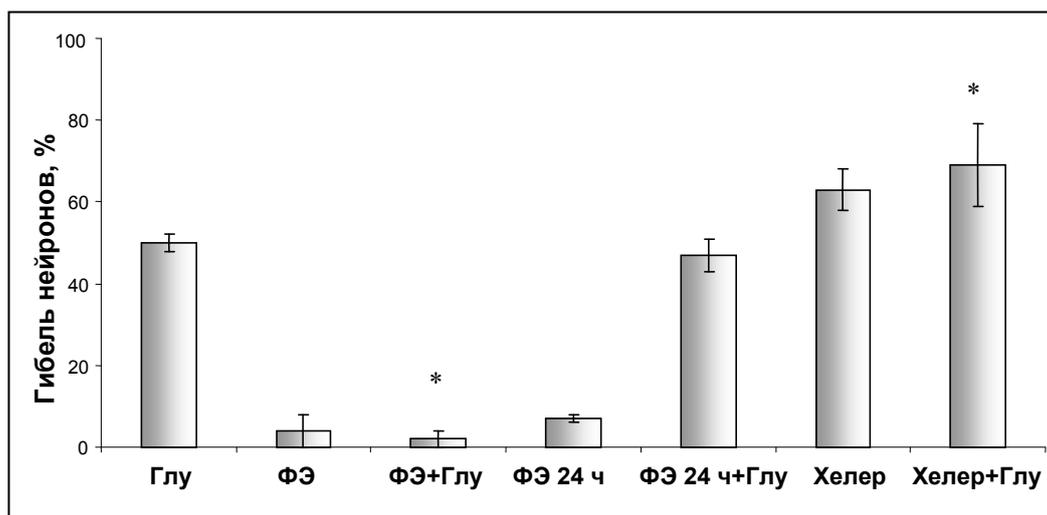


Рисунок 9. Гибель нейронов мозжечка (14 ДВК) при действии Глу. Глу 100 μM , ФЭ 100 nM , хелеритрин 5 μM 1 час. Выживаемость измерялась через 24 часа. МТТ тест, гибель нейронов по отношению к контролю. Приведены данные 4 независимых экспериментов. * $p < 0.05$ по сравнению с действием Глу.

Hartley et al. (1993) в исследованиях на нейронах коры показали, что при увеличении концентрации Глу (10-100 μM) и времени его воздействия (0-10 мин) количество накопленного $^{45}\text{Ca}^{2+}$ коррелировало с гибелью клеток через 24 часа. Присутствие в растворах наряду с Глу антагонистов NMDA-каналов уменьшало как накопление $^{45}\text{Ca}^{2+}$, так и долю погибших нейронов. Эти результаты позволили предположить, что избыточный вход кальция через NMDA-каналы является ключевым звеном в цепи процессов ведущих к нейрональной гибели, индуцируемой Глу.

Для того, чтобы ответить на вопрос, насколько связана ОКД с гибелью нейронов и какова роль при этом ПКС, в следующей серии исследований мы проследили в течение 2 часов за судьбой клеток, подвергнутых токсическому действию Глу после “down regulation” ПКС. Протокол этих исследований был следующим: молодые нейроны мозжечка были загружены Ca^{2+} чувствительным зондом Fura-2FF, было зафиксировано появление ОКД, затем через 2 часа после отмывки от Глу нейроны были окрашены флуоресцентным красителем Syto-13 для определения числа живых клеток. Как следует из табл. 3, при действии Глу ОКД развивалась в $60 \pm 4\%$ нейронов и большинство из них погибло. В то же время после “down regulation” ПКС ОКД развивалась в значительно меньшем числе нейронов, а погибших клеток было всего 2%.

Таблица 3. Влияние “down regulation” ПКС (ФЭ 100 нМ, 24 ч) в молодых нейронах мозжечка на ОКД и гибель нейронов через 2 часа после 45 мин Глу (100 μ М) воздействия. Проведено 3 независимых эксперимента. * $p < 0.05$ по сравнению с действием Глу.

Вид воздействия	Всего нейронов	% клеток с ОКД	% погибших нейронов
Контроль	290	0	3 \pm 1*
Глу	871	60 \pm 4*	43 \pm 4*
ФМА 500 нМ 24 часа, Глу	707	23 \pm 3*	2 \pm 1*

Дальнейший анализ этих данных показал, что после Глу воздействия нейроны можно разделить на три группы: (а) имеется только первая фаза и большинство нейронов остаются живыми; (б) есть вторая фаза, нейроны окрашиваются Syto-13; (в) есть ОКД и нейроны не окрашиваются Syto-13, т.е. мёртвые клетки. Итак, погибли только те нейроны, в которых развилась ОКД, но её наличие оказалось не обязательно для гибели клеток. В этих экспериментах так же была проанализирована первая фаза входа Ca^{2+} . Оказалось, что ни количество вошедшего кальция, ни длительность первой фазы во всех трёх популяциях нейронов друг от друга существенно не отличаются. То есть по характеру первой фазы нельзя предсказать дальнейшую судьбу клетки, погибнет она или нет. В экспериментах с “down-regulation” ПКС длительность первой фазы была короче и составила 52 \pm 12 секунд, в контроле - 112 \pm 16 секунд (данные по 3 независимым экспериментам). В случае “down-regulation” ПКС, когда количество киназы в клетке сильно понижено, нейроны с ОКД не погибли. Таким образом, можно выделить несколько необходимых факторов, наличие которых приведёт к гибели нейронов при действии Глу: (а) наличие ПКС в клетке; (б) активация ПКС; (в) появление ОКД. Таким образом, развитие ОКД не во всех случаях приводит к гибели нейронов.

Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о важной роли ПКС в нарушениях Ca^{2+} гомеостаза, развитии отсроченной Ca^{2+} дисрегуляции, вызванной гиперстимуляцией Глу рецепторов.

ВЫВОДЫ

1. Изменения активности ПКС, вызванные действием глутамата на культивируемые нейроны мозжечка и коры головного мозга, зависят от времени его воздействия. Кратковременное (15 мин) действие глутамата приводит к увеличению активности ПКС. В тоже время при длительной гиперстимуляции глутаматных рецепторов (45-60 мин) выявляется её уменьшение.
2. В опытах на нейронах коры и мозжечка показано, что при глутаматном воздействии происходит двухфазное увеличение $[Ca^{2+}]_i$, 2-ая фаза повышения $[Ca^{2+}]_i$ сочетается с сильной митохондриальной деполяризацией – наступает отсроченная кальциевая дисрегуляция.
3. Во время 1-ой фазы увеличения $[Ca^{2+}]_i$ выявлена транслокация ПКСβII из цитозоля на плазматическую мембрану. Развитие ОКД сопровождается перемещением ПКСβII с помощью транспортного белка RACK1 из мембраны в цитозоль, а затем в органелло-подобные структуры в цитоплазме.
4. В культивируемых молодых нейронах мозжечка и коры подавление активации ПКС ингибиторами в малых дозах замедляет развитие ОКД и защищает клетки от токсического действия глутамата. Высокие дозы ингибиторов ПКС являются токсичными и не оказывают защитного действия. В старых нейронах мозжечка ингибиторы ПКС увеличивают глутамат-вызванную гибель нейронов.
5. В молодых нейронах активатор ПКС форболовый эфир усиливает 1-ую фазу вызванного глутаматом повышения $[Ca^{2+}]_i$ и ускоряет развитие ОКД.
6. При “down-regulation” ПКС, когда активность ПКС после 24 часовой аппликации форболового эфира падает до нуля, наблюдается задержка появления ОКД и повышается выживаемость молодых нейронов. “down-regulation” ПКС не защищает старые нейроны мозжечка от токсического глутаматного воздействия, в этих клетках защитным эффектом обладает форболовый эфир.
7. Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о том, что активация ПКС участвует в нарушениях Ca^{2+} гомеостаза, развитии отсроченной Ca^{2+} дисрегуляции, вызванной гиперстимуляцией Глу рецепторов. Представленные результаты показывают, что при действии глутамата активная ПКС принимает участие в каскаде сигнальных механизмов, приводящих к повреждению и последующей гибели нейронов.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. **Коровкина Н. А. (Персиянцева)**, Пинелис В. Г., Бирих К. Р., Михайлова М. М., Большаков А. П. Протеин киназа С и глутаматная нейротоксичность//Сборник тезисов Второго Международного Междисциплинарного Конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». - Судак, Крым, Украина, 2006. – С. 110.
2. Бирих К. Р., Михайлова М. М., Большаков А. П., **Коровкина Н. А. (Персиянцева)**, Пинелис В. Г. Ретранслокация протеинкиназы СβII (ПКСβII) с плазматической мембраны во внутриклеточные кластеры при кальциевой перегрузке в культивированных нейронах//Материалы международной конференции "Рецепция и внутриклеточная сигнализация". - Пушино, 2005. – С. 107.
3. **Коровкина Н. А. (Персиянцева)**, Пинелис В. Г., Бирих К. Р., Михайлова М. М., Большаков А. П. Роль протеин киназы С при глутаматной нейротоксичности//Материалы международной конференции "Рецепция и внутриклеточная сигнализация". – Пушино, 2005. – С. 135.
4. Бирих К. Р., Большаков А. П., Михайлова М. М., **Коровкина Н. А. (Персиянцева)**, Пинелис В. Г. Ретранслокация протеин киназы СβII (ПКСβII) с плазматической мембраны во внутриклеточные кластеры при кальциевой перегрузке в культивированных нейронах//Материалы научной конференции "Нейрохимия: Фундаментальные и прикладные аспекты". – Москва, 2005. – С. 156.
5. Pinelis V. G., Birikh K. R., **Korovkina N. A. (Persiyantseva)**, Mikhailova M. M., Bolshakov A. P. Retranslocation of protein kinase C from plasma membrane to distinct intracellular sites under [Ca²⁺] overload induced with glutamate in primary cultured cortical neurons//Материалы международной конференции "Neuroscience 2005"/ - Вашингтон, США, 2005. – Poster 946.7.
6. Сорокина Е. Г., Пинелис В. Г., Реутов В. П., Крушинский А. Л., Кузенков В. С., Кошелев В. Б., Сторожевых Т. П., Сенилова Я. Е., **Коровкина Н. А. (Персиянцева)**, Гранстрем О. К. Новые данные в изучении механизмов повреждения мозга при эпилепсии и гипоксии//Материалы XIII Международной Конференции и Дискуссионного Научного Клуба “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии”, Приложение к журналу «Открытое образование». - Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 2005. – С. 288.
7. **Персиянцева Н. А.**, Бирих К. Р., Дворецкова Е. А., Пинелис В. Г., Ходоров Б. И. Вклад протеин киназы С в механизмы нарушения Ca²⁺ гомеостаза в культивируемых нейронах крысы при гиперстимуляции глутаматных рецепторов//Бюлл. Эксп. Медицины и Биологии. - 2008.- № 3.