

О.И. Эпштейн, Т.А. Запара, О.Г. Симонова, А.С. Ратушняк, М.Б. Штарк

ПЛАСТИЧНОСТЬ НЕЙРОНАЛЬНЫХ ОТВЕТОВ, ИНДУЦИРОВАННАЯ НИЗКИМИ КОНЦЕНТРАЦИЯМИ ЭКЗОГЕННЫХ ЛИГАНДОВ

Научно-производственная фирма «Материя Медика холдинг», Москва
Конструкторско-технологический институт вычислительной техники СО РАН
НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН, Новосибирск

Фундаментальным свойством клетки является пластичность — способность изменять реакцию под влиянием повторяющихся воздействий. В этом исследовании мы показали влияние низких концентраций двух экзогенных модуляторов клеточных процессов (кофеин и циклоспорин А) на нейрональные пластические свойства. Исследования проводили на изолированных нейронах *Lymnaea stagnalis*. Обнаружено, что предобработка нейронов низкими концентрациями кофеина или циклоспорино А уменьшала амплитуду изменений мембранного потенциала, вызванных действием физиологических концентраций этих лигандов, в среднем на 30,8 и 29,1% соответственно. Полученные результаты указывают на участие низких концентраций лиганда в формировании памяти и нейрональных пластических реакций.

Ключевые слова: нейрональная пластичность, изолированные нейроны, стресс, кофеин, циклоспорин А, низкие концентрации

В последние годы накапливаются данные о влиянии на клеточные процессы веществ в ультранизких концентрациях (10^{-12} – 10^{-16} М) [2, 3, 7, 9, 14]. В этом исследовании мы попытались показать эффекты низких концентраций двух экзогенных модуляторов клеточных процессов (кофеин и циклоспорин А) на нейрональные пластические свойства. Физиологические концентрации (10^{-3} ... 10^{-9} М) этих веществ вызывают нейрональные ответы [1, 5, 11] и традиционно используются в электрофизиологических экспериментах.

Как известно, мишенями кофеина являются аденозиновые рецепторы плазматической мембраны и рианодиновые рецепторы саркоплазматического ретикулума и митохондрий клетки [1, 6, 10, 11]. Активация аденозиновых рецепторов подавляет нейрональную активность, модулируя ионные токи или снижая выброс медиатора [4]. Аденозиновые рецепторы повсеместно находятся в мозге и оказывают влияние на различные типы калиевых и кальциевых токов через активацию G-белков, которые взаимодействуют с ионными каналами, аденилатциклазой или фосфолипазой [4]. В регуляции нейрональной активности и энергетического обмена центральную роль играет цАМФ-зависимый сигнальный каскад. Кофеин действует как конкурентоспособный антагонист аденозиновых рецепторов, вызывая интенсификацию нейрональной активности [4]. Второй мишенью кофеина являются

рианодиновые рецепторы. Взаимодействуя с рианодиновыми рецепторами, кофеин способствует выбросу кальция из депо. Этот процесс обуславливает кратковременное, но значительное увеличение ионизированного кальция, за которым следует снижение его концентрации ниже исходного уровня. Это снижение может быть вызвано усиленной кальций-стимулированной секрецией кальция и перезапполнением кальциевых депо [1, 6, 10, 11]. Эти процессы приводят к изменениям мембранного потенциала (МП) и модификациям ответов клетки.

Циклоспорин А, напротив, является блокатором рианодиновых рецепторов, одного из типов пор митохондрий и протеаз клетки [5, 12, 13].

Мы предположили, что предобработка нейронов низкими концентрациями лигандов, взаимодействующими с рецепторами, которые регулируют активность основных сигнальных и энергетических систем, позволит выявить изменения реакций нейронов на применение физиологических концентраций этих лигандов.

Методика исследования

Исследования проводили на изолированных нейронах, выделенных из окологлоточных ганглиев пресноводного моллюска *Lymnaea stagnalis* (Большой прудовик). Животных (возраст 1–1,5 года) собирали из дикой популяции в сентябре. Хранились они в течение сентября–декабря в холодильнике при температуре 4 °С, в кюветах со

свежей водой, в активном состоянии. В качестве корма использовали салат и морковь.

Изолированные нейроны получали по методике, разработанной Костенко с соавторами [8]. Этот метод основан на сочетании ферментативной обработки ткани с последующим механическим разделением клеточных агрегатов. Окологлобальные ганглии извлекали и помещали в солевой раствор, содержащий (мМ): NaCl — 30; KCl — 1,6; CaCl₂ — 4; MgCl₂ — 1,5; NaHCO₃ — 10, pH 7,6 ... 7,8. Проводили ферментативную обработку ткани раствором проназы (0,03%, 45-60 мин). Затем ганглии промывали солевым раствором и проводили механическую дезагрегацию нейронов в часовых стеклах в течение 15-20 минут. Полученные изолированные нейроны тщательно промывали несколькими сменами солевого раствора в часовых стеклах и переносили пипеткой в пластиковые чашки Петри (объем 5 мл) на поверхность стеклянной подложки. В этих условиях при комнатной температуре нейроны культивировали 12-18 часов.

Микроэлектроды для регистрации мембранных потенциалов заполняли раствором 2,5 М KCl, сопротивление 7-15 МОм. Регистрацию данных проводили с помощью аналого-цифрового преобразователя (L-CARD, Россия). Все эксперименты проводили при комнатной температуре (18-24 °C).

Измеряли мембранный потенциал и максимальное значение гипер- или деполяризации нейрона после аппликации физиологических концентраций кофеина или циклоспорина А. Значение МП до аппликации исследуемых веществ принимали за 100%. Пиковую амплитуду изменений МП выражали как процент от этого значения. Измеряли время от аппликации физиологических концентраций исследуемых веществ до появления первого пикового изменения МП.

Обработка данных была сделана с помощью Excel 7,0. Результаты представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Различия между группами оценивали по критерию U (Манна-Уитни).

Вещества использовали в следующих физиологических концентрациях: циклоспорин А (Sundimmun) 20 мМ (Novartis, Switzerland), кофеин 5 мМ (ICN, USA).

Результаты исследования

Для того чтобы смоделировать условия адаптационных изменений реакции нейронов и экспериментально выявить, что реакции нейронов на экзогенные вещества могут регулироваться низкими концентрациями веществ, сому изолированных нейронов подвергали действию

кофеина два раза. Нейроны подвергали последовательному воздействию кофеина. Для этого в каждом эксперименте проводили предобработку нейронов низкими концентрациями, а затем воздействовали физиологическими концентрациями веществ. Нейроны подвергали действию низких концентраций кофеина при различных условиях и сроках культивирования. Это было либо сразу после ферментативной обработки, в условиях стрессирующего воздействия при диссоциации клеток, либо после 12-18 часов культивирования.

Первоначально было исследовано действие аппликации физиологических концентраций кофеина на мембранный потенциал изолированных нейронов, которые культивировались 12-18 часов в солевом растворе. Для этого аппликацию 50 мкМ кофеина на нейрон проводили из близко расположенной микропипетки (Рис. 1). Эта концентрация кофеина вызвала обратимые изменения МП у всех исследованных нейронов. Примеры реакций нейрона на аппликацию кофеина приведены на рисунке 2А. Физиологическая концентрация кофеина (5 мМ) вызвала обратимые де- и гиперполяризационные изменения МП. Эти изменения наблюдали в течение первых 10-15 минут. Постепенно амплитуда изменений и МП возвращался к значению потенциала покоя, который был до аппликации кофеина.

Измеряли максимальную амплитуду деполяризации или гиперполяризации нейрональной мембраны после аппликации кофеина. Эту пиковую амплитуду изменений МП выражали как процент от значения МП до аппликации. Измеряли также время от аппликации кофеина до появления первого пика изменений МП, который регист-

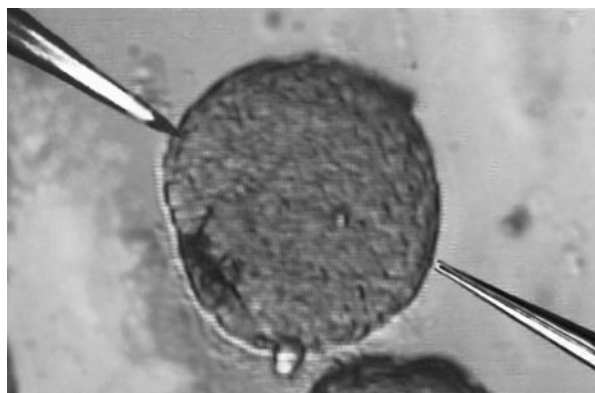


Рис. 1. Изолированный нейрон *Lymnaea stagnalis* с микроинструментами: микроэлектрод для регистрации мембранного потенциала (слева от нейрона), микропипетка для аппликации растворов лигандов (справа от нейрона). Масштаб: 5 мкм

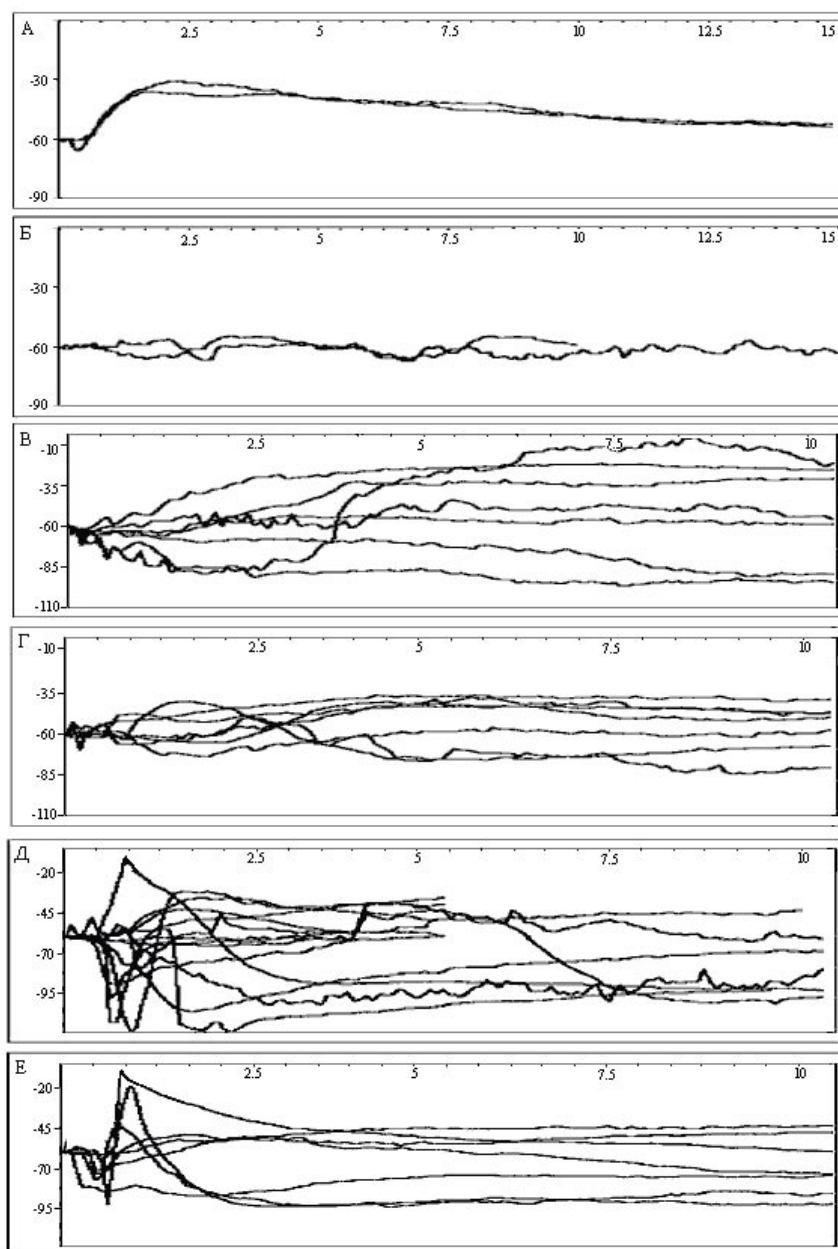


Рис. 2. Примеры изменений мембранного потенциала нейронов, вызванных аппликацией физиологических концентраций кофеина или циклоспорина А

Аппликацию физиологических концентраций кофеина или циклоспорина А и регистрацию мембранного потенциала изолированных нейронов во всех группах проводили после 12-18 часов культивирования.

А — изменения МП, вызванные аппликацией физиологических концентраций кофеина.

Нейроны этой группы не подвергались инкубации в растворах низкой концентрации кофеина.

Б — изменения МП, вызванные аппликацией физиологических концентраций кофеина.

Нейроны этой группы инкубировались в растворе низкой концентрации кофеина 15-20 минут во время механической дезагрегации ганглиев и изоляции нейронов (находились в стрессовых условиях)

В — изменения МП, вызванные аппликацией физиологических концентраций циклоспорина А.

Нейроны этой группы не подвергались инкубации в растворах низкой концентрации циклоспорина А.

Г — изменения МП, вызванные аппликацией физиологических концентраций циклоспорина А.

Нейроны этой группы инкубировались в растворе физиологической концентрации циклоспорина А 15-20 минут во время механической дезагрегации ганглиев и изоляции нейронов (находились в стрессовых условиях)

Д — изменения МП, вызванные аппликацией физиологических концентраций циклоспорина А.

Нейроны этой группы инкубировались в течение 30 минут в растворе физиологической концентрации циклоспорина А.

Е — изменения МП, вызванные аппликацией физиологических концентраций кофеина.

Нейроны второй группы инкубировались в растворе низкой концентрации циклоспорина А 15-20 минут во время механической дезагрегации ганглиев и изоляции нейронов (находились в стрессовых условиях)

Оси: Y — значение мембранного потенциала в мВ. X — время от начала аппликации кофеина или циклоспорина А, в минутах.

рировали в среднем через $99,1 \pm 14,4$ секунды после аппликации кофеина. В этой контрольной группе (контрольная группа № 1) преобладали нейроны с пиковой амплитудой изменений МП больше чем 30%. Диаграмма распределения количества клеток в зависимости от величины реакции на аппликацию кофеина представлена на *рисунке 3*.

Низкие концентрации кофеина (разведение $1:10^{12}$) не вызывали каких-либо изменений МП изолированных нейронов. Однако обработка нейронов растворами кофеина (разведение $1:10^{12}$) в различные периоды культивирования позволила обнаружить эффекты низких концентраций кофеина на реакции нейрона, вызванные аппликацией физиологических концентраций этого вещества. Было обнаружено, что низкие концентрации лиганда оказывают существенное влияние на реакцию нейронов, вызванную аппликацией физиологических концентраций, если механическую дезагрегацию ганглиев и получение изолированных нейронов проводили в растворе низкой концентрации кофеина. Необходимо отметить, что механическую дезагрегацию ганглиев и получение изолированных нейронов выполняли в течение 15-20 минут. Изолированные нейроны промывали в часовых стеклах физиологическим раствором и переносили пипеткой в чашки Петри для культивирования. Дальнейший электрофизиологический эксперимент выполняли после 12-18 часов культивирования, как и в контрольной группе. Примеры реакций нейрона на аппликацию физиологических концентраций кофеина приведены на *рисунке 2А*. Предварительная обработка нейронов низкой концентрацией кофеина уменьшила амплитуду изменений МП, вызванных аппликацией физиологических концентраций кофеина. В контрольной группе № 1 нейронов пиковая амплитуда изменений МП варьировала от 7 до 103% (в среднем $58,4 \pm 5,1\%$; 30 нейронов). В группе нейронов, предварительно обработанных низкими концентрациями кофеина во время дезагрегации ганглиев, пиковая амплитуда изменений МП варьировала от 6 до 100% (в среднем $27,6 \pm 3,8\%$; 32 нейрона) Средняя пиковая амплитуда изменений МП уменьшилась в этой группе на 30,8 % по сравнению с контрольной группой № 1. В этой группе большая часть нейронов была с маленькой амплитудой изменений МП (6-30%). Это составляет 78% от общего количества клеток в этой группе. Первый пик изменений МП наблюдали в среднем через $96,5 \pm 11,3$ секунды после аппликации.

Примеры изменений МП в этой группе представлены на *рисунке 2*. Средние значения МП в контрольной и экспериментальной группах перед аппликацией физиологических концентраций ко-

феина не отличались: $63,9 \pm 5,4$ мВ и $64,3 \pm 4,3$ мВ соответственно. Различия пиковой амплитуды изменений МП между группами были статистически существенны ($P_0 < 0,001$). Предварительная обработка нейронов в течение 40 минут физиологическим раствором, содержащим низкие концентрации кофеина после 12-18 часов культивирования, по существу, не влияла на нейрональные реакции, вызванные аппликацией физиологических концентраций кофеина. Средняя пиковая амплитуда изменений МП, вызванная аппликацией физиологических концентраций кофеина в группе клеток, проинкубированных в течение 40 минут в физиологическом растворе, содержащем низкие концентрации кофеина, непосредственно перед регистрацией МП, была $57,2 \pm 4,7\%$ (21 нейрон) ($58,4 \pm 5,1\%$ в контрольной группе № 1). Диаграмма распределения количества клеток в зависимости от амплитуды изменений МП на аппликацию физиологических концентраций кофеина представлена на *рисунке 3*.

Кофеин оказывает активирующее воздействие на свои мишени и вызывает усиление нейрональной активности. Для того чтобы экспериментально выявить возможность регуляции реакций нейронов низкими концентрациями веществ, оказывающих блокирующее действие на свои ми-

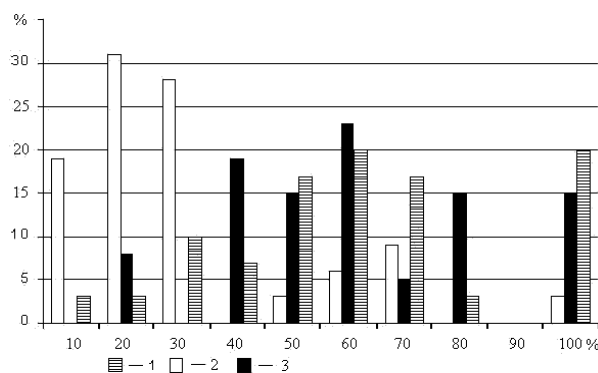


Рис. 3. Диаграмма распределения количества нейронов в зависимости от максимальной амплитуды изменения мембранного потенциала в ответ на аппликацию физиологических концентраций кофеина

Аппликацию физиологических концентраций кофеина и регистрацию мембранного потенциала изолированных нейронов во всех группах проводили через 12-18 часов культивирования. Нейроны первой группы (1) не подвергали инкубации в растворах низкой концентрации кофеина. Нейроны второй группы (2) инкубировали в растворах низкой концентрации кофеина 15-20 минут во время механической дезагрегации ганглиев и изоляции нейронов (находились в стрессовых условиях). Нейроны третьей группы (3) инкубировали в течение 40 мин непосредственно перед регистрацией мембранного потенциала в растворах низкой концентрации кофеина. Оси: Y — количество нейронов (% от общего числа клеток в группе). X — амплитуда максимального изменения мембранного потенциала в каждой группе представлена в процентах от потенциала покоя до аппликации.

шени, использовали циклоспорин А (ЦсА). Эксперименты выполняли так же, как те, в которых было выявлено действие низких концентраций кофеина, но вместо алкалоида кофеина был использован белок ЦсА. Этот белок взаимодействует с рецепторами кальциевых депо, одним из типов пор митохондрий и фосфатазами клетки. ЦсА оказывает блокирующее воздействие на все свои мишени [5, 12]. Первоначально было исследовано действие аппликации физиологических концентраций ЦсА на мембранный потенциал изолированных нейронов, которые культивировались 12-18 часов в солевом растворе. Аппликации физиологических концентраций ЦсА вызывали обратимые изменения МП у всех исследованных нейронов. Примеры реакций нейронов на аппликацию ЦсА приведены на *рисунке 2В*. В этой контрольной группе (контрольная группа № 2) амплитуда изменений МП колебалась от 32 до 108% (в среднем на $68,4 \pm 40,7\%$; 11 нейронов). Первый пик изменений МП наблюдали в среднем через $162 \pm 24,3$ секунды после аппликации ЦсА.

Механическую дезагрегацию ганглиев и получение изолированных нейронов в этой группе клеток выполняли в солевом растворе, содержащем низкие концентрации ЦсА. Примеры реакций нейронов на аппликацию ЦсА приведены на *рисунке 2Г*. Предобработка нейронов низкими концентрациями ЦсА не изменяла динамику реакции, но уменьшала амплитуду изменений МП, которые вызывает аппликация ЦсА в физиологических концентрациях. В группе нейронов, обработанных низкой концентрацией ЦсА во время дезагрегации клеток, амплитуда изменений МП варьировали от 15 до 88% (в среднем на $39,2 \pm 9,4\%$; 7 нейронов). Средняя амплитуда изменений МП в этой группе нейронов уменьшалась на 29,1% по сравнению с контрольной группой. Первый пик изменений МП наблюдали в среднем через $90 \pm 27,4$ секунды после аппликации ЦсА. Различия пиковой амплитуды изменений МП между группами были статистически значимы ($P_v < 0,001$).

Предобработка нейронов в растворах с низкими концентрациями ЦсА в другие сроки культивирования не оказывала существенного влияния на амплитуду реакции нейронов на аппликацию физиологических концентраций ЦсА.

Для того чтобы экспериментально выявить, возможность регуляции реакций нейронов низкими концентрациями одних лигандов на физиологические концентрации других лигандов, соматическим нейронов подвергали последовательному действию двух веществ, имеющих общие клеточные мишени (рианодиновые рецепторы). Эксперименты выполняли подобно тем, в которых было

выявлено действие низких концентраций кофеина или ЦсА. Однако вначале нейроны обрабатывали низкими концентрациями ЦсА, а потом физиологическими концентрациями кофеина [5, 10, 12].

Первоначально было исследовано действие аппликации физиологических концентраций кофеина на мембранный потенциал изолированных нейронов, которые инкубировали 30 минут в растворе физиологических концентраций ЦсА. Примеры реакций нейронов этой группы приведены на *рисунке 2Д*. В этой контрольной группе (контрольная группа № 3) амплитуда изменений МП в среднем была $78 \pm 12,5\%$ (13 нейронов). Первый пик изменений МП наблюдали в среднем через $82,5 \pm 22,63$ секунды после аппликации кофеина.

В следующей группе предобработку нейронов проводили в солевом растворе, содержащем низкую концентрацию ЦсА, во время получения изолированных клеток. После такой предобработки нейронов низкими концентрациями ЦсА среднее изменение амплитуды МП после аппликации физиологических концентраций кофеина было $51,9 \pm 9,5\%$ (8 нейронов). Примеры реакций нейронов этой группы приведены на *рисунке 2Е*. Первый пик изменений МП наблюдали в среднем через $35,5 \pm 4,8$ секунды после аппликации кофеина. В контрольной группе клеток № 1 (без предобработки) и в группе нейронов, которые инкубировали в растворе физиологических концентраций ЦсА, первый пик изменений МП наблюдался в среднем через $99,1 \pm 14,4$ и $82,5 \pm 22,63$ секунды, соответственно.

Важным результатом проведенных исследований по выбору условий выработки адаптивных реакций являются данные о том, что клетки в стрессированном состоянии более восприимчивы к воздействию низких концентраций веществ. Клетки, находившиеся в нормальных условиях культивирования, в наших экспериментах оказались менее чувствительными к действию низких концентраций лигандов. Это позволяет утверждать, что реакция клетки на внешнее воздействие может быть обусловлена ее состоянием, уровнем активности.

Эффекты предобработки низкими концентрациями кофеина и циклоспорина А в наших экспериментах проявлялись в уменьшении амплитуды изменений МП, вызванном физиологическими концентрациями каждого из двух исследованных веществ.

Результаты, представленные здесь, и данные других авторов [2, 14] указывают на физиологическое значение воздействий низких концентраций эндо- и экзогенных веществ и существование клеточных механизмов, которые формируют

долговременную пластичность реакций, индуцированную слабыми воздействиями. Например, известны ситуации, в которых повторяющиеся умеренные воздействия развивают толерантность.

Полученные данные о том, что клетки в стрессированном состоянии более восприимчивы к воздействию низких концентраций веществ, позволяют предположить, что реакции клеток зависят не только от количества и частоты взаимодействий лигандов с рецепторами, но и от состояния внутриклеточных систем, уровня активации систем вторичных посредников, комбинации возможных взаимодействий с системами вторичных посредников клетки. Известно, что в процессе получения диссоциированных нейронов происходят: ампутация нейритов, нарушение ионного гомеостаза, кислотно-щелочного баланса, активизация регенерационных процессов [8]. Мы обнаружили, что у большей части нейронов с нарушением ионного гомеостаза и кислотно-щелочного баланса низкие концентрации исследованных веществ индуцировали долговременные пластические изменения ответов.

Вероятно, во время инкубации нейронов в растворах с низкими концентрациями веществ создаются условия единичных, возможно, повторяющихся взаимодействий рецепторов клетки с лигандами. Такие взаимодействия лигандов с рецепторами клеток в растворах с низкой концентрацией веществ могут активировать способность клетки к пластическим изменениям реакций. Эта способность проявляется под действием последовательных воздействий. Повторяющиеся воздействия используются, например, для получения такого типа пластических изменений реакций, как привыкание [15]. В растворах с низкими концентрациями веществ единичные, вероятно, повторяющиеся на различных участках одной клетки взаимодействия лигандов с рецепторами могут приводить к изменению амплитуды, скорости активации систем вторичных медиаторов или вызвать перестройки локализации рецепторов и исполнительных элементов клетки.

Физиологические концентрации лигандов одновременно взаимодействуют с большим количеством рецепторов, вызывают регистрируемые в эксперименте реакции и позволяют выявлять изменения нейрональных реакций, которые обусловлены предшествующими воздействиями низких концентраций лигандов на клетку.

Поддержано грантом РФФИ

Plasticity of neuronal responses induced by low concentrations of exogenous ligands

O.I. Epshtein, T.A. Zapara, O.G. Simonova, A.S. Ratushnyak, M.B. Shtark

Modification of reactions caused by repeated influences (plasticity) is a fundamental property of cell. In this study, we have revealed effects of low concentrations of two exogenous modulators of cellular processes (caffeine and cyclosporin A) on neuronal plastic properties. The study was carried out on isolated neurons of *Lymnaea stagnalis*. Pretreatment of neurons with low concentrations of caffeine or cyclosporin A reduced the amplitude of MP changes caused by the action of physiological concentrations of these ligands on the average by 30,8% and 29,1%, respectively. The findings permitted implying a significant role of low ligand concentrations in the formation of cell memory and neuronal plastic properties.

Литература

1. Collins R.O., Thomas R.C. // Cell Calcium. — 2001. — № 1. — P. 41-48.
2. Donovan F., Dennis M., Cunningham D. // Biol. Chem. — 1998. — Vol. 273. — P. 12746-12752.
3. Epstein O.I., Beregovoy N.A., Sorokina N.S. et al. // Frontiers Biosci. — 2003. — № 8. — P. 79-84.
4. Haas H.L., Selbach O. // Arch. Pharmacol. — 2000. Vol. 362. — P. 375-381.
5. Huang H., Farley J. // Neurosci. — 2001. — Vol. 86. — №3. — P. 1297-1311.
6. Kennedy H.J., Thomas R.C. // Physiol. — 1995. — Vol. 484. — P. 533-548.
7. Kong L.Y., McMillan M.K., Hudson P.M. et al. // Pharmacol. Exp. Ther. — 1997. — Vol. 280. — P. 61-66.
8. Kostenko M.A., Tretjak N.N., Musienko V.S. // Brain Res. — 1982. — Vol. 236. — № 1. — P. 183-192.
9. Liu B., Qin L., Yang S.N. et al. // Pharmacol. Exp. Ther. — 2001. — Vol. 298. — № 3. — P. 1133-1141.
10. Mironov S.L., Usachev J.M. // Neurosci. Lett. — 1991. — Vol. 123. — № 2. — P. 200-202.
11. Orkand R.K., Thomas R.C. // Physiol. — 1995. — Vol. 489. — P. 19-28.
12. Smaili S.S., Stellato K.A., P. Burnett P. et al. // Biol. Chem. — 2001. — Vol. 276. — № 26. — P. 23329-23340.
13. Snyder S.H., Sabatini D.M., Lai M.M. et al. // Trends Pharmacol. Sci. — 1998. — Vol. 19. — № 1. — P. 21-26.
14. Striggow F., Riek M., Breder J., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97. — P. 2264-2269.
15. Zapara T.A., Simonova O.G., Zharkikh A.A. et al. // Neurosci. Behav. Physiol. — 2000. — Vol. 30. — P. 347-355.