

УДК 577.352.4

Исследование взаимосвязи между индуцированной глутаматом отсроченной Ca^{2+} -дизрегуляцией, митохондриальной деполяризацией и последующей гибелью нейронов*

Сурин А.М.^{1,2,3}, Красильникова И.А.², Пинелис В.Г.², Ходоров Б.И.¹

¹ — ФГБНУ НИИ общей патологии и патофизиологии, ул. Балтийская, 8, Москва, 125315.

Зав. лаб. патологии ионного транспорта и внутриклеточной сигнализации.

Тел: +7(495)601-2242, Факс: +7(499)151-1726; e-mail: surin_am@mail.ru

² — ФГБНУ Научный Центр здоровья детей, Ломоносовский пр-т, 2/1, Москва, 119991. Науч. сотр.

Тел: +7(499)134-1445; e-mail: bulldog@mail15.com

² — ФГБНУ Научный Центр здоровья детей, Ломоносовский пр-т, 2/1, Москва, 119991. Главный науч. сотр.

Тел: +7(499)134-1445; e-mail: pinelis@mial.ru

³ — ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова, Минздрава РФ, ул. Островитянова, д. 1, Москва, 117997,

ведущий науч. сотр.; e-mail: surin_am@mail.ru

На первичных нейрональных культурах установлено, что длительное воздействие токсических доз глутамата (Glu) вызывает двухфазное увеличение внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). Вторая фаза роста $[Ca^{2+}]_i$ (отсроченная кальциевая дизрегуляция, ОКД) происходит одновременно с сильной митохондриальной деполяризацией (МД). В настоящей работе показана линейная корреляция между длительностью лаг-периодов ОКД и МД в первичных культурах гранулярных клеток мозжечка крысы, подвергнутых глутаматному удару. Сопоставление изменений $[Ca^{2+}]_i$, индуцированных Glu, с флуоресцентными изображениями тех же нейронов, окрашенных Hoechst33342, Syto-13 и EthD-1, показали, что спустя 18–20 ч после Glu воздействия, все нейроны, в которых не произошла ОКД, остались живы. Напротив, почти все нейроны (~97%, 2 из 76), в которых развилась ОКД, погибли от некроза или апоптоза.

Ключевые слова: нейрональные культуры, флуоресцентная микроскопия, глутамат, кальций, митохондрии, потенциал, апоптоз, некроз

Введение

При травмах и инсульте в мозге вокруг зон повреждения возникают области, в которых основной возбуждающий нейротрансмиттер центральной нервной системы (ЦНС) глутамат (Glu) может длительно удерживаться в межклеточном пространстве в высоких концентрациях, приводя к избыточной стимуляции ионотропных глутаматных рецепторов и развитию отсроченной гибели нейронов [27]. На первичных нейрональных культурах, которые часто служат моделью при исследованиях патологических состояний ЦНС, показано, что длительное воздействие Glu вызывает двухфазное увеличение внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) [4, 18, 24]. Сначала происходит быстрый подъем $[Ca^{2+}]_i$, который стабилизируется на уровне 1–3 мкМ [10, 19]. После лаг-периода продолжительностью от единиц до десятков минут в нейронах развивается вторичный подъем $[Ca^{2+}]_i$, получивший название «отсроченная кальциевая дизрегуляция» (ОКД) [24, 25]. Амплитуда $[Ca^{2+}]_i$ во время ОКД может достигать десятков микромолей/литр [10, 11]. Особенностью этой фазы дизрегуляции Ca^{2+} гомеостаза является практически одновременное сильное падение митохондриального потенциала ($\Delta\psi_m$) [4, 5, 6, 15, 18, 24].

Ранее показали [25], что культивируемые нейроны спинного мозга мыши, в которых возникла ОКД, гибнут в результате, главным образом, осмотического шока и лизиса плазматической мембраны. Позже на примере культиви-

руемых нейронов гиппокампа крысы было показано, что погибают те нейроны, в которых развилась ОКД, и после удаления Glu они не сумели восстановить низкую $[Ca^{2+}]_i$ в течение, по крайней мере, 20 мин [23]. Необходимо, однако, подчеркнуть, что в работах [23, 25] эксперименты были выполнены на сестринских культурах, и вывод о том, что погибли именно те самые нейроны, которые имели задержку в восстановлении низкой $[Ca^{2+}]_i$, был сделан на основании статистических данных, а не прямого наблюдения за теми же самыми нейронами, в которых измеряли $[Ca^{2+}]_i$. Прямые измерения $[Ca^{2+}]_i$ ответов на Glu и проверка выживаемости тех же самых нейронов в пост-глутаматный период спустя 1–2 суток после глутаматного воздействия были выполнены в работе [20], в которой, однако, использовали высокоаффинный Ca^{2+} индикатор Fura-2 [16] и поэтому констатировали наличие высокой $[Ca^{2+}]_i$ в погибших нейронах, но не установили, произошла ли в них ОКД.

В настоящей работе, используя низкоаффинный Ca^{2+} индикатор Fura-FF, исследовали, как соотносятся лаг-периоды начала второй фазы роста $[Ca^{2+}]_i$ и сильной МД, а также лаг-периоды восстановления низкой $[Ca^{2+}]_i$ и увеличения митохондриального потенциала ($\Delta\psi_m$) после отмывания Glu бескальциевым буфером. Кроме того, было проверено, имеется ли корреляция между длительностью лаг-периода ОКД и последующей гибелью именно тех нейронов, в которых развилась ОКД.

* Работа поддержана грантами РФФИ 11-04-01961, 13-04-40084, 14-04-90450.

Авторы выражают глубокую благодарность Л.Г. Хаспекову за советы по дизайну экспериментов по выживаемости культивируемых нейронов.

Методы и материалы

Приготовление первичных культур нейронов

Культуры приготавливали из мозжечков 6—7-дневных крыс как описано в работе [19]. Использовали крыс линии Вистар. Эксперименты с животными выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и декларацией о гуманном отношении к животным. Животных анестезировали, декапитировали и извлекали мозжечок. Суспензию клеток получали, обрабатывая мозговую ткань трипсином (10 ед/мл), диссоциировали 15-кратным пипетированием и отмывали от разрушенных клеток 2-кратным осаждением в центрифуге (1000 об/мин = 200g). Суспензию (200 мкл; $\sim 10^6$ клеток/мл) переносили в 35-мм чашки Петри с лунками диаметром 14 мм и приклеенными снизу покровными стеклами (MatTek, USA). Стекла предварительно покрывали полиэтиленгликолем (10 мкг/мл). Через 1 час добавляли 1,5 мл нейробазальной среды, содержащей 2% Supplement B-27, 0,5 мМ L-глутамин и смесь антибиотиков/антимикотиков. Клетки содержали при 37°C в атмосфере 5% CO₂ / 95% воздуха при 100% влажности. На 3—4 день добавляли арабинозид (AraC, 1 мкМ) для подавления роста глиальных клеток. Культуры использовали в возрасте двух недель после посадки (13—15 DIV).

Флуоресцентно-микроскопические измерения $[Ca^{2+}]_i$ и морфологический анализ выживаемости нейронов

Измерения выполнены на установке, включающей инвертированный микроскоп Olympus IX-71, фильтровую систему освещения Sutter Labmda 10-2 со 175 Вт ксеноновой лампой (Sutter Instruments) и двумя колесами с фильтрами — одно для возбуждающего света (после лампы) и второе для излучения, испускаемого образцом (перед камерой). Возбуждающий свет подавали во входной порт микроскопа по жидкостному световоду. Флуоресценцию клеток регистрировали с помощью CCD-камеры CoolSNAP HQ2 (Photometrics). Управление установкой осуществляли с помощью компьютерной программы MetaFluor 6.1 (Molecular Devices).

Для измерения $[Ca^{2+}]_i$ клетки нагружали низкоаффинным Ca^{2+} -индикатором Fura-FF в форме ацетоксиметилового (AM) эфира (Fura-FF/AM 5 мкМ, 40—50 мин, 24—26°C). Для облегчения проникновения Fura-FF/AM в клетки его предварительно смешивали с неионным детергентом Pluronic F-127 (0,2%). Изменения ΔF_m отслеживали, окрашивая клетки потенциал-чувствительным зондом Rh123 (2,5 мкг/мл, 15 мин, при комнатной температуре), который загружали в клетки после отмывания непрореагировавшего Fura-FF/AM.

Для возбуждения флуоресценции Ca^{2+} -индикатора Fura-FF использовали светофильтры с максимумами пропускания 340 и 380 нм и полушириной полосы пропускания 8—10 нм. Флуоресценцию Rh123 возбуждали с помощью светофильтра 485 ± 8 нм. Сигналы Fura-FF и Rh123 регистрировали, используя пороговое дихроичное зеркало 495—505 нм и светофильтры, соответственно 525 ± 20 нм 535 ± 20 нм, в канале эмиссии.

Для регистрации флуоресценции витальных красителей Hoechst33342, Syto-13 и EthD-1 использовали трехполосное дихроичное зеркало (максимумы отражения 400, 485 и 560 нм; полосы пропускания 460 ± 20, 525 ± 20 и

выше 580 нм). Для возбуждения флуоресценции красок и регистрации их излучения использовали следующие пары светофильтров (возбуждение/эмиссия, нм): Hoechst33342, — 365/460; Syto-13 — 485/525 и EthD-1 — 565/свыше 610. Все светофильтры и дихроичные зеркала производства Omega (США). Окрашивание витальных красителей проводили добавлением маточных растворов (все зонды были растворены в диметилсульфоксиде) к клеткам в солевом буфере в пропорции 1:1000 и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, используя следующие концентрации (мкМ): Hoechst 33342 — 1,5; Syto-13 — 1; EthD-1 — 3.

Измерения $[Ca^{2+}]_i$ и выживаемости нейронов выполнены при 26—28°C в буфере, содержащем (мМ): 135 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 20 HEPES, 5 D-глюкозы; pH 7,4; pH буфера устанавливали, добавляя 20 мМ HEPES и дозируя 1M HCl до pH 7,4. Номинально бескальциевые растворы вместо CaCl₂ содержали 0,1 мМ EGTA и 2 мМ MgCl₂. Культуры использовали на 13—15 день после посадки.

Ca^{2+} -индикатор, потенциал-чувствительный зонд, витальные красители приобретены у Invitrogen (США). Остальные реагенты — фирмы Sigma.

Hoechst 33342 и Syto-13 способны за несколько минут проникать сквозь клеточные мембраны и окрашивать те компартменты клетки, где находятся нуклеиновые кислоты. Однако Hoechst 33342 связывается преимущественно с ДНК, тогда как Syto-13 при низкой концентрации и кратковременном окрашивании способен связываться, по-видимому, преимущественно с РНК, содержание которой достаточно велико в цитозоле. Поэтому флуоресценция Hoechst 33342 более яркая в ядерной зоне, а Syto-13 примерно одинакова по всей клетке. Красное свечение этидиум-гомодимера (EthD-1) наблюдается только в тех клетках, в которых отсутствует Syto-13. Известно, что EthD-1 окрашивает только такие клетки, в которых нарушена целостность плазматической мембраны. Согласно предложению «Номенклатурного комитета по клеточной гибели» одним из трех необходимых и достаточных морфологических критериев смерти клетки является потеря целостности клеточной мембраны, тогда как при апоптозе целостность мембраны сохраняется, но значительно меняется структура ядра [21, 22].

Долю нейронов, погибших от некроза, определяли как отношение числа клеток, имевших красную окраску EthD-1, к общему числу клеток. Долю нейронов, погибших от апоптоза, определяли как отношение числа клеток, имевших ярко окрашенное Hoechst33342 конденсированное ядро, но не окрашенных ни Syto-13, ни EthD-1, к общему числу клеток. Общее число нейронов определяли как сумму клеток, окрашенных Hoechst33342 и EthD-1. Для подсчета использовали 5 полей с общим числом нейронов не менее 100. Повышения надежности подсчета живых и мертвых клеток достигали, сопоставляя флуоресцентные изображения с изображениями того же поля в проходящем свете. В тех экспериментах, в которых после измерения $[Ca^{2+}]_i$ следовал анализ выживаемости нейронов, все операции выполняли без нарушения стерильности культур.

Для обчета флуоресцентных сигналов и построения графиков, а также для статистической обработки данных использовали программы MetaFluor Analyst, Excel-2007, Prism-4 и Origin 7.5. Результаты представляли как сред-

нее \pm ошибка среднего. Статистический анализ выполняли с использованием непарного и парного t-критериев Стьюдента. Значимыми считались различия при $p < 0,05$.

Результаты

Синхронность изменений внутриклеточной концентрации свободного Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) и трансмембранного потенциала внутренней мембраны митохондрий ($\Delta\Psi_m$)

На рис. 1 показаны типичные изменения $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 1А) и $\Delta\Psi_m$ (рис. 1Б), индуцированные Glu в культуре гранулярных нейронов мозжечка крысы и в двух представительных нейронах (рис. 1В,Г) из этой группы клеток. Видно, что токсическая доза Glu (100 мкМ, 10 мкМ глицина, 0 Mg^{2+}) вызвала вторичный подъем $[Ca^{2+}]_i$ (ОКД) и митохондриальную деполяризацию (падение $\Delta\Psi_m$) с лаг-периодами (DCD-Lag), индивидуальными для каждого нейрона. Совмещение графиков $[Ca^{2+}]_i$ и изменений сигнала потенциал-чувствительного зонда Rh123 (рис. 1В, Г) демонстрирует, что при развитии ОКД рост $[Ca^{2+}]_i$ и падение $\Delta\Psi_m$ происходят синхронно. Соотноше-

ние между началом ОКД и началом сильной митохондриальной деполяризации (МД) соответствует линейной функции во всем диапазоне измерений ($r^2 = 0,995$) (рис. 1Д).

Отмывание Glu бескальциевым буфером способствует восстановлению низкого $[Ca^{2+}]_i$, причем задержка между моментом удаления Glu и началом снижения $[Ca^{2+}]_i$ (Recovery-Lag) также индивидуальна для каждого нейрона, как и задержка между моментом добавления Glu и началом ОКД (DCD-Lag) (рис. 1Е). Такое соотношение объясняется, вероятно, тем, что при более раннем наступлении ОКД (короткий DCD-Lag) в митохондриях накапливается больше Ca^{2+} и, соответственно, требуется больше времени на его удаление в постглутаматный период (более длительный Recovery-Lag). Коэффициент линейной корреляции между DCD-Lag и Recovery-Lag невелик (на рис. 1Д, $r^2 = 0,45$), что отражает различие механизмов, регулирующих поступление и удаление Ca^{2+} во время ОКД и в постглутаматный период. На это же указывает отличие в сигналах потенциал-чувствительного зонда в нейронах, имеющих разную кинетику снижения $[Ca^{2+}]_i$ в постглута-

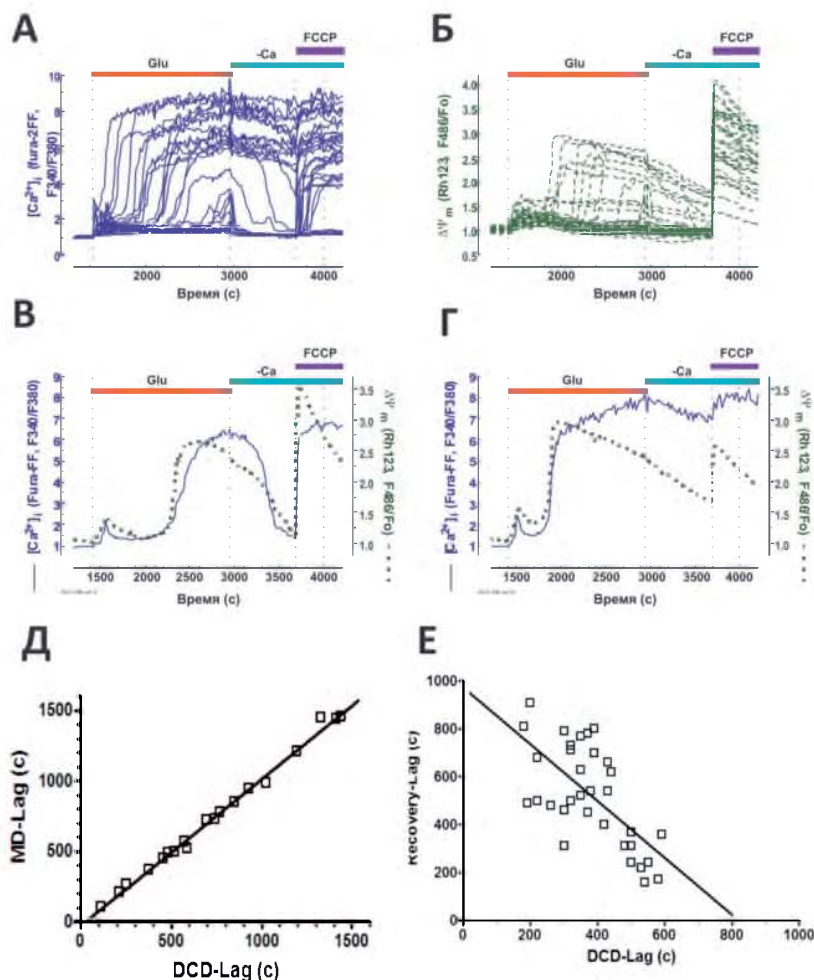


Рис. 1. Глутамат индуцирует двухфазные изменения внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) и митохондриального потенциала ($\Delta\Psi_m$) в культивируемых гранулярных нейронах мозжечка (7DIV). Изменения $[Ca^{2+}]_i$ (А) и $\Delta\Psi_m$ (Б) в группе клеток и в двух представительных нейронах (В и Г) из этой группы. (Д) Соотношение между началом ОКД (DCD-Lag, с) и началом второй фазы митохондриальной деполяризации (MD-Lag, с). (Е) Соотношение между лаг-периодом ОКД (DCD-Lag, с) и лаг-периодом восстановления $[Ca^{2+}]_i$ в постглутаматный период (Recovery-Lag, с); Изменения $[Ca^{2+}]_i$ представлены, как изменения рэйзиометрического сигнала флуоресцентного Ca^{2+} индикатора Fura-FF (F340/F380); относительные изменения $\Delta\Psi_m$ представлены, как изменения флуоресценции потенциал-чувствительного зонда Rh123 (F/Fo), где F – текущее значение сигнала, а Fo – исходное в покоящихся нейронах.

матный период (рис. 1В, Г). В среднем, чем раньше возникла ОКД, тем продолжительнее была фаза высокого плато $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 1Е).

Деполяризация митохондрий в бескальциевом буфере с помощью протонифора FCCP (1 мкМ) высвобождала из них Ca^{2+} (рис. 1 А, В, Г). Вызванное деполяризацией митохондрий увеличение $[Ca^{2+}]_i$ было тем больше, чем выше удерживалась $[Ca^{2+}]_i$ в постглутаматный период, предшествующий добавлению FCCP, что согласуется с опубликованными ранее данными [12, 19].

Продолжительность ОКД и путь гибели нейронов

Мы проверили, имеется ли корреляция между длительностью лаг-периода ОКД (DCD-Lag) и последующей гибелью именно тех нейронов, которые имели ОКД. На рис. 2А показаны изображения поля нейронов, окрашенных Fura-FF и подвергнутых действию нейротоксической дозы Glu. После этого культуру возвратили в кондиционную среду, поместили в CO_2 -инкубатор и спустя 18–20 ч окрасили одновременно Hoechst33342, Syto-13 и EthD-1 (рис. 2 Б, В, Г).

Графики $[Ca^{2+}]_i$ ответов нейронов на Glu разделены на две группы в зависимости от того, погибли эти нейроны впоследствии от некроза (рис. 3, 5 А) или апоптоза (рис. 3, 5 Б).

Превышение числа клеток, окрашенных EthD-1 (рис. 2 Г), над числом нейронов, имевших ОКД («красные» клетки на рэйшиометрическом изображении Fura-FF, рис. 2 А), обусловлено наличием нейронов, погибших за время, прошедшее от посева культуры до начала измерений $[Ca^{2+}]_i$. На рис. 2 красный цвет номеров соот-

ветствует нейронам, которые после обработки глутаматом имели характеристики некроза (окрашивание EthD-1), синий цвет номеров — нейронам, имевшим признаки апоптоза (окрашивание Hoechst-33342 и отсутствие окрашивания Syto-13 и EthD-1).

Сопоставление флуоресцентных Fura-FF имиджей (рис. 2А) с изображениями в проходящем свете (не показано) выявило то, что нейроны, чья сома набухла и округлилась в течение действия Glu, оказались в фазе некроза (например, клетки 2 и 10 на рис. 2). Стоит отметить, что эти нейроны имели самый короткий DCD-Lag. Возможно, гибель таких нейронов сопровождалась разрывом плазматической мембраны в результате высокого осмотического давления. Среди нейронов, погибших от некроза, были и такие, в которых не были заметны сильные изменения размеров (клетки 7 и 23 на рис. 2). Любопытно, что у этих нейронов, погибших от некроза, но без набухания, ОКД наступила даже позже, чем у некоторых их соседей, погибших в результате апоптоза (например, клетки 12, 14 и 31 на рис. 2).

На рис. 3 графики $[Ca^{2+}]_i$ ответов клеток на Glu разделены на две группы в зависимости от того, погибли клетки впоследствии от некроза (рис. 3А) или апоптоза (рис. 3Б). Видно, что кинетика развития ОКД одинакова в клетках, погибших как от некроза, так и от апоптоза, хотя в нейронах, погибших от некроза, DCD-Lag в среднем короче и ОКД наступала раньше (через 33 ± 4 мин; $n = 14$), чем в нейронах, погибших по апоптотическому пути (через 40 ± 4 мин; $n = 12$) (рис. 3В). Из всех нейронов, имевших ОКД, удалось обнаружить среди живых только 3% клеток (2 из 76 нейронов в трех посадках куль-

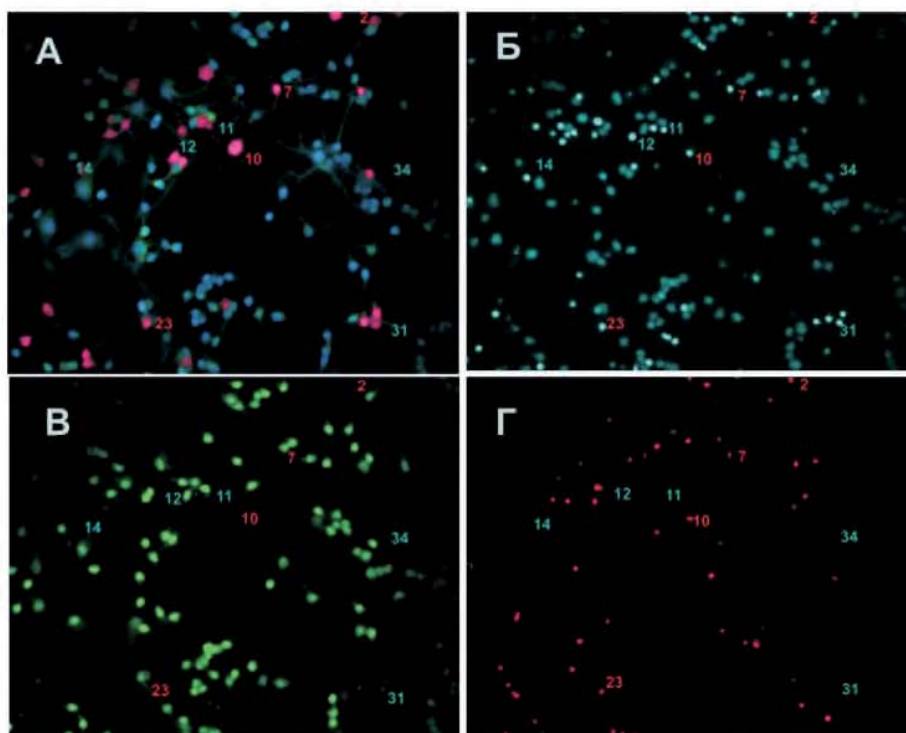


Рис. 2. Флуоресцентные изображения первичной культуры гранулярных нейронов мозжечка крысы (9 DIV), нагруженных Ca^{2+} индикатором Fura-FF и флуоресцентными витальными красителями и подвергнутых токсическому действию глутамата (Glu, 100 мкМ, 10 мкМ Gly, 0 Mg^{2+} , 65 мин). Нейроны в фазе ОКД имели более «теплую» красную окраску на рэйшиометрическом изображении Fura-FF (А) по сравнению с нейронами, удерживавшими $[Ca^{2+}]_i$ на относительно низком уровне («холодный» синий цвет). Через 18 ч клетки окрасили флуоресцентными витальными красителями Hoechst-33342 (Б), Syto-13 (В) и EthD-1 (Г). Расшифровку нумерации нейронов см. в тексте.

тур). Среди погибших 60% находились в некрозе, остальные 37% в апоптоза. Все нейроны, которые перед удалением Glu сохранили относительно низкую $[Ca^{2+}]_i$ и не имели ОКД, остались живы. На флуоресцентном изображении Fura-FF (рис. 2А) это те клетки, которые сохранили синюю псевдоокраску.

Обсуждение

Результаты данного исследования демонстрируют синхронность дисрегуляции Ca^{2+} гомеостаза и падения $\Delta\Psi_m$ (рис. 1Д), что свидетельствует о тесной взаимосвязи процессов, регулирующих эти два важнейших интегральных показателя функционального состояния клетки и ее митохондрий. Восстановление нормального уровня $[Ca^{2+}]_i$ после отмывания Glu бескальциевым буфером, то есть в условиях, предотвращающих проникновение Ca^{2+} в клетку извне по любому из транспортных путей, происходит тем позже, чем дольше период дисрегуляции (длительность высокого плато $[Ca^{2+}]_i$). В отличие от четкой линейной зависимости между началом ОКД и сильной МД (рис. 1Д), взаимоотношение между лаг-периодом восстановления низкой $[Ca^{2+}]_i$ и лаг-периодом реполяризации митохондрий в постглютаматный период не столь прямолинейно (рис. 1Е). Это указывает на то, что в развитии $[Ca^{2+}]_i$ дисрегуляции и в устранение ее последствий в постглютаматный период вовлечены разные, по крайней мере, отчасти, внутриклеточные процессы.

Процессы, происходящие во время первой фазы $[Ca^{2+}]_i$ ответа на Glu, приводят к тому, что наступает момент, причем индивидуальный для каждого нейрона, когда удаление Ca^{2+} из цитозоля во внеклеточное пространство и захват его митохондриями перестают уравнивать поток Ca^{2+} из внеклеточного пространства. Это событие быстро приобретает характер кооперативного процесса. На ключевую роль дисфункции митохондрий в возникновении ОКД указывает синхронность этого процесса (1) с началом сильной деполяризации митохондрий (рис. 1Д), (2) с появлением второй ступени снижения митохондриального NADH [1], (3) с сильным снижением рН митохондрий и градиента рН между митохондриями и цитозолем на восходящей фазе ОКД [3, 9] (4) с падением [АТР] [3].

Полученные результаты показали также, что, если после прекращения действия нейротоксических доз Glu, возвращать клетки в их кондиционную среду, то примерно через сутки практически все нейроны (>95%), в которых возникла ОКД, гибнут (рис. 3). Тенденция такова, что нейроны, имевшие более длительный лаг-период ОКД, имели более высокую вероятность гибели от апоптоза, чем от некроза. Напротив, все культивируемые гранулярные нейроны мозжечка, сумевшие удержать $[Ca^{2+}]_i$ на уровне, предшествующем ОКД (низкое $[Ca^{2+}]_i$ -плато), остались живы.

Кинетика увеличения $[Ca^{2+}]_i$ и снижения $\Delta\Psi_m$ во время развития ОКД была одинаковой как у клеток, по-

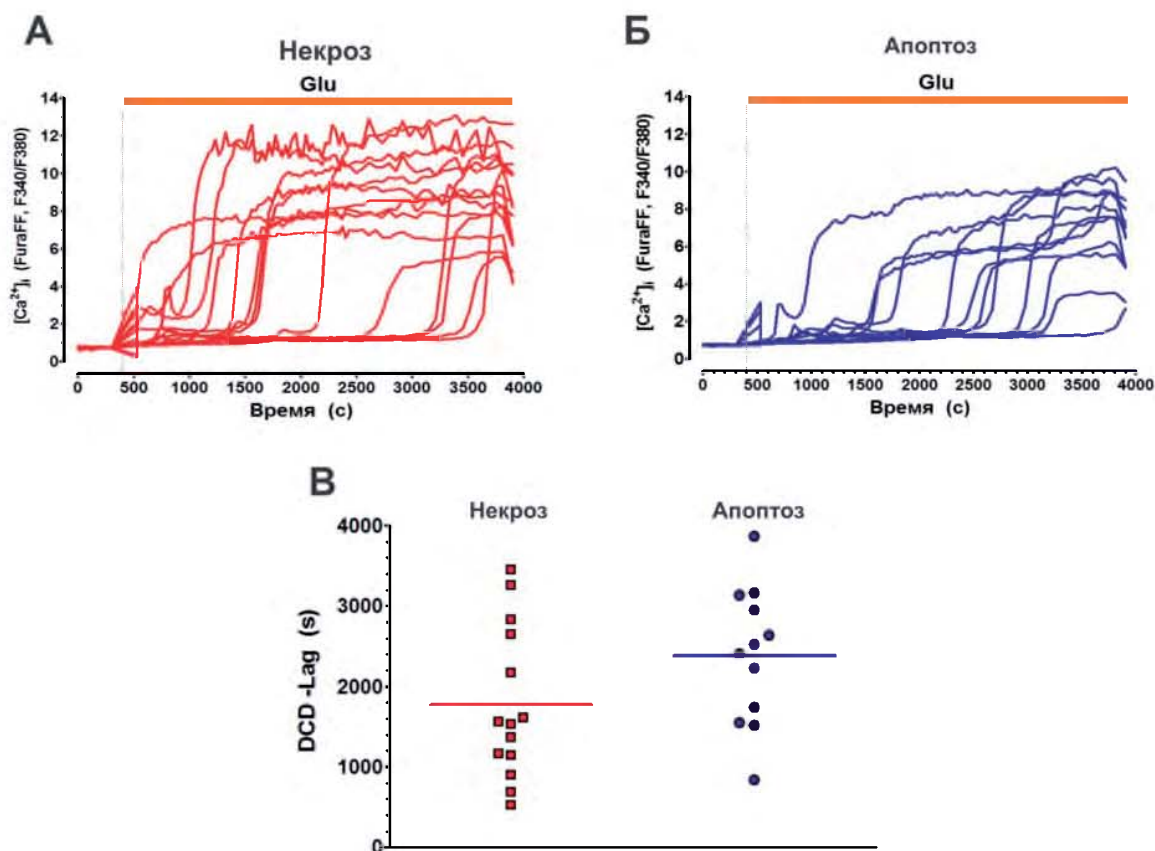


Рис. 3. Кинетика изменений $[Ca^{2+}]_i$ в гранулярных нейронах мозжечка, рассортированных по признаку последующей гибели от некроза или апоптоза. Пути гибели нейронов определены с помощью витальных флуоресцентных красителей Hoechst33342, Syto-13 и этидиум гомодимера, EthD-1 (рис. 2). $[Ca^{2+}]_i$ ответы на Glu рассортированы в зависимости от последующего пути гибели по некротическому (А) или апоптотическому (Б) пути. Времена наступления ОКД для каждого из указанных типов гибели представлены в виде красных прямоугольников (некротические клетки) и синих кружков (апоптотические клетки). Горизонтальные отрезки на (В) отмечают среднее время наступления ОКД (DCD Lag Period, с).

гибших от некроза, так и у тех, которые умерли от апоптоза. Другими словами, по кинетике увеличения $[Ca^{2+}]_i$ и снижения $\Delta\Psi_m$ во время развития ОКД невозможно предсказать, умрут ли культивируемые нейроны впоследствии от некроза или от апоптоза. Очевидно, внутриклеточные процессы, определяющие соотношение между некротическим и апоптотическим путями гибели нейронов, развиваются во время фазы высокого $[Ca^{2+}]_i$ -плато, которое может сохраняться и в постглутаматный период (рис. 1 А, В, Г). Спектр этих процессов полностью пока не известен. Исследование Glu-индуцированных изменений $[Ca^{2+}]_i$ и распределения поли(АДФ-рибозы) (ПАР) в одних и тех же нейронах показало, что за время действия Glu ПАР успевает диффундировать в цитозоль [2]. Взаимодействие ПАР с внешней митохондриальной мембраной способствует высвобождению фактора апоптоза АИФ [7, 8, 26]. Вероятно, это является одной из причин того, что в течение первых суток после действия Glu около половины нейронов, имевших ОКД, погибает от апоптоза.

9+Необходимо подчеркнуть, что все нейроны, в которых за время действия Glu не возникла ОКД, выжили. Поэтому удлинение лаг-периода ОКД может служить полезным для практики критерием отбора химических агентов на пригодность в качестве нейропротекторных препаратов.

Список литературы

- Сурин А.М., Зобова С.Н., Тухбагова Г.Р., Сенилова Я.Е., Пинелис В.Г., Ходоров Б.И. Изменения митохондриального NAD(P)H и нарушения кальциевого гомеостаза в культивируемых нейронах мозжечка крысы при гиперстимуляции глутаматных рецепторов // Биол. Мембраны. — 2010. — Т. 27, №1. — С. 39–45.
- Сурин А.М., Красильникова И.А., Персиянцева Н.А., Ефремова А.С., Шрам С.И., Горбачева Л.Р., Савинкова И.Г., Зобова С.Н., Пинелис В.Г., Ходоров Б.И. Роль поли(АДФ-рибоза)-полимеразы-1 (PARP-1) в нарушении кальциевого гомеостаза нейронов мозжечка крысы. Международная конференция «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» Пушкино, 24–26 мая 2011 г.: Сборник статей, Т. 1. — С. 150–156.
- Сурин А.М., Горбачева Л.Р., Савинкова И.Г., Шарипов Р.Р., Ходоров Б.И., Пинелис В.Г. Исследование изменений [АТФ] в цитозоле индивидуальных нейронов при развитии глутамат-индуцированной дисрегуляции кальциевого гомеостаза // Биохимия. — 2014. — Т. 79, №2. — С. 196–208.
- Ходоров Б.И. Нарушение нейронального кальциевого гомеостаза при гиперстимуляции глутаматных рецепторов // Патогенез. — 2003. — Т. 1. — С. 26–33.
- Abramov A.Y., Duchon M.R. Mechanisms underlying the loss of mitochondrial membrane potential in glutamate excitotoxicity // Biochim. Biophys. Acta. — 2008. — Vol. 1777, №(7–8). — P. 953–964.
- Abramov A.Y., Duchon M.R. Impaired mitochondrial bioenergetics determines glutamate-induced delayed calcium deregulation in neurons // Biochim. Biophys. Acta. — 2010. — Vol. 1800, №3. — P. 297–304.
- Andrabi S.A., Kim N.S., Yu S.W., Wang H., Koh D.W., Sasaki M., Klaus J.A., Otsuka T., Zhang Z., Koehler R.C., Hurn P.D., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M. Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2006. — Vol. 103, №48. — P. 18308–18313.
- Andrabi S.A., Dawson T.M., Dawson V.L. Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: parthanatos // Ann. NY Acad. Sci. — 2008. — Vol. 1147. — P. 233–241.
- Bolshakov A.P., Mikhaylova M.M., Szabadkai G., Pinelis V.G., Rizzuto R., Khodorov B.I. Measurements of mitochondrial pH in cultured cortical neurons clarify contribution of mitochondrial pore to the mechanism of glutamate-induced delayed Ca^{2+} deregulation // Cell Calcium. — 2008. — Vol. 43. — P. 602–614.
- Brustovetsky N., Dubinsky J.M. Dual responses of CNS mitochondria to elevated calcium // J. Neurosci. — 2000. — Vol. 20. — P. 103–113.
- Brittain M.K., Brustovetsky T., Sheets P.L., Brittain J.M., Khanna R., Cummins T.R., Brustovetsky N. Delayed calcium dysregulation in neurons requires both the NMDA receptor and the reverse Na^+/Ca^{2+} exchanger // Neurobiol. Dis. — 2012. — Vol. 46, №1. — P. 109–117.
- Brocard J.B., Tassetto M., Reynolds I.J. Quantitative evaluation of mitochondrial calcium content in rat cortical neurones following a glutamate stimulus // J. Physiol. (London). — 2001. — Vol. 531, №3. — P. 793–805.
- Budd S.L., Nicholls D.G. A reevaluation of the role of mitochondria in neuronal calcium homeostasis // J. Neurochem. — 1996. — Vol. 66. — P. 403–411.
- Budd S.L., Tenneti L., Lishnak T., Lipton S.A. Mitochondrial and extramitochondrial apoptotic signaling pathways in cerebrocortical neurons // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2000. — Vol. 97. — P. 6161–6166.
- Duchen M.R. Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease // Pflugers Arch. — 2012. — Vol. 464, №1. — P. 111–121.
- Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties // J. Biol. Chem. — 1985. — Vol. 260. — P. 3440–3450.
- Khodorov B., Pinelis V., Golovina V., Fajuk D., Andreeva N., Uvarova T., Khaspekov L., Victorov I. The origin of a stable neuronal calcium overload following a toxic glutamate challenge // Biol. Membr. — 1992. — Vol. 9. — P. 1045–1048.
- Khodorov B. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons. Prog. Biophys // Mol. Biol. — 2004. — Vol. 86, №2. — P. 279–351.
- Kiedrowski L., Costa E. Glutamate-induced destabilization of intracellular calcium concentration homeostasis in cultured cerebellar granule cells: role of mitochondria in calcium buffering // Mol. Pharmacol. — 1994. — Vol. 47, №1. — P. 140–147.
- Kiedrowski L. N-methyl-D-aspartate excitotoxicity: relationships among plasma membrane potential, $Na^+(+)/Ca^{2+}$ exchange, mitochondrial Ca^{2+} overload, and cytoplasmic concentrations of Ca^{2+} , H^+ , and K^+ // Mol Pharmacol. — 1999. — Vol. 56. — P. 619–632.
- Kroemer G., El-Deiry W.S., Golstein P., Peter M.E., Vaux D., Vandenberg P., Zhivotovskiy B., Blagosklonny M.V., Malorni W., Knight R.A., Piacentini M., Nagata S., Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death // Cell Death Differ. — 2005. — Vol. 12. — P. 1463–1467.
- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenberg P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., El-Deiry W.S., Golstein P., Green D.R., Hengartner M., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Nunez G., Peter M.E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovskiy B., Melino G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death // Cell Death Differ. — 2009. — Vol. 16, №1. — P. 3–11.
- Limbrick D.D., Churn S.B., Sombati S., DeLorenzo R.J. Inability to restore resting intracellular calcium levels as an early indicator of delayed neuronal cell death // Brain Res. — 1995. — Vol. 690. — P. 145–156.
- Nicholls D.G., Budd S.L. Mitochondria and neuronal survival // Physiol. Rev. — 2007. — Vol. 80, №1. — P. 315–360.
- Tymianski M., Charlton, M.P., Carlen, P.L., Tator, C.H. (). Secondary Ca^{2+} overload indicates early neuronal injury which precedes staining with viability indicators // Brain Res. — 1993. — Vol. 607. — P. 319–323.
- Wang Y., Kim N.S., Haince J.F., Kang H.C., David K.K., Andrabi S.A., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M. Poly(ADP-Ribose) (PAR) Binding to Apoptosis-Inducing Factor Is Critical for PAR Polymerase-1-Dependent Cell Death (Parthanatos) // Sci. Signal. — 2011. — Apr. 5. — 4(167). — ra20.
- Weinberger J.M. Evolving therapeutic approaches to treating acute ischemic stroke // J. Neurol. Sci. — 2006. — 249 (2). — P. 101–109.

Поступила 19.10.2014

Study of the relationship between glutamate-induced delayed calcium deregulation, mitochondrial depolarization and subsequent neuronal death

Surin A.M.^{1,2,3}, Krasilnikova I.A.², Pinelis V.G.², Khodorov B.I.¹

¹ – Institute of General Pathology and Pathophysiology, Baltiiskaya ul., 8, 125315, Moscow, Russia

² – Scientific Center for Children's Health, Lomonosovsky Prospekt, 2/1, 119991, Moscow, Russia

³ – Pirogov Russian National Research Medical University, Ostrovityanova str., 1, 117997, Moscow, Russia

It is known that prolonged exposure of primary neuronal cultures to toxic doses of glutamate (Glu) causes a biphasic increase in intracellular free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$). The second phase of $[Ca^{2+}]_i$ increase (delayed calcium deregulation, DCD) occurs simultaneously with a strong mitochondrial depolarization (MD). In the present study a linear correlation between lag periods of the DCD and MD in primary cultures of rat cerebellar granule cells exposed to Glu was shown. Comparison of $[Ca^{2+}]_i$ changes induced by Glu with fluorescent images of the same neurons stained with Hoechst 33342, Syto-13 and EthD-1 following 18–20 hours after Glu insult showed that all neurons, which did not have DCD, survived. In contrast, almost all neurons (~97%, 2 out of 76) who developed DCD died by necrosis or apoptosis.

Key words: neuronal cultures, fluorescence microscopy, glutamate, calcium, mitochondria, apoptosis, necrosis