

Д.Г. Семенов, А.В. Беляков, Т.С. Глущенко, М.О. Самойлов

## Участие метаботропных глутаматных рецепторов мозга в механизмах гипоксической сигнализации

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт физиологии им. И.П. Павлова» РАН,  
199034 Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

Метаботропные глутаматные рецепторы I группы (*ImGluRs*) относятся к семейству G-белок связанных рецепторов, которые активируют множество сигнальных путей важных для модуляции нейрональной возбудимости и синаптической пластичности, а также сигнальных путей гибели и выживания нейронов, которые инициирует гипоксия. Однако представления об этих функциях пока не полны и иногда противоречивы. В настоящей работе представлен обзор литературы о вовлечении *ImGluRs* в механизмы клеточного ответа на гипоксию. Приведены также собственные данные, демонстрирующие их участие в формировании как патогенных, так и адаптивных внутриклеточных перестроек, возникающих в течение суток в коре мозга крыс, подвергнутых тяжелой или умеренной гипобарической гипоксии, соответственно. Для этих двух гипоксических моделей на инкубируемых срезах коры выявлена специфика  $Ca^{2+}$  ответов на стимуляцию *ImGluRs*, а на гистологических препаратах определена экспрессия белков этих рецепторов и ключевых участников их канонического сигналинга — *IP3Rs* и *PLCβ1*.

**Ключевые слова:** кора мозга, кальций, *ImGluRs*, *IP3Rs*, *PLCβ1*, гипобарическая гипоксия, гипоксическая толерантность

D.G. Semenov, A.V. Belyakov, T.S. Gluschenko, M.O. Samoilov

## Participation of metabotropic glutamate receptors of brain in mechanisms of hypoxic signaling

Pavlov Institute of Physiology of the Russian Academy of Sciences, 6, Makarova str., St.Petersburg, 199034

Group I of metabotropic glutamate receptors (*ImGluRs*) are a family of G-protein-coupled receptors which activate a multitude of signaling pathways important for modulating neuronal excitability and synaptic plasticity as well as anti- and pro-survival pathways initiated by hypoxia. However these functions are still not complete and sometimes controversial. The present work is a review of data concerning involvement of *ImGluRs* in mechanisms of cell response to hypoxia. We also present original data demonstrating their participation in forming pathogenic and adaptogenic intracellular events, appearing in rat neocortex during a day after severe or moderate hypobaric hypoxia, respectively.  $Ca^{2+}$  responses to *ImGluRs* stimulation in survival cortical slices and expression of *ImGluRs*, *IP3Rs* and *PLCβ1* in immunolabelled cortical preparations were estimated for these two different hypoxic models.

**Key words:** brain cortex, calcium, *ImGluRs*, *IP3Rs*, *PLCβ1*, hypobaric hypoxia, hypoxic tolerance

Одним из эффектов временной гипоксии мозга является активация глутаматных рецепторов, изменяющая баланс внутриклеточных сигнальных путей, присутствующих в нормоксическом состоянии и участвующая в запуске реакций патологической или адаптивной модальности. В последнее десятилетие особо интенсивно исследуется именно нейропротективный эффект умеренных форм гипоксии. Феномен «индуцированной гипоксической толерантности» мозга заключается в том, что после умеренного гипоксического (ишеми-

ческого) воздействия повышается устойчивость нейронов к последующим воздействиям более тяжелых форм гипоксии или ишемии. Доказано существование раннего и позднего механизмов индуцированной гипоксической толерантности, которые экспрессируются, соответственно, в течение десятков минут или десятков часов после прекодиционирующего стимула [4, 6, 37, 40, 42].

Ключевая роль глутаматергической системы в развитии гипоксической и постгипоксической патологии мозга не вызывает сомнения и составляет основу представлений об эксайтотоксичности тяжелой гипоксии [24]. Вместе с тем участие этой системы в формировании гипоксической толерантности, вызываемой прекодиционированием, мало изучено. Глутамат,

Для корреспонденции: Семенов Дмитрий Германович, д-р биол. наук, вед. науч. сотр., лаб. регуляции функций нейронов мозга, ФГБУН ИФ им. И.П. Павлова.  
E-mail: dsem50@rambler.ru

межклеточная концентрация которого повышается в результате гипоксии, выступает лигандом для нескольких типов ионотропных и метаботропных рецепторов, в разной степени представленных в разных областях мозга и в разных участках нейронов и глиальных клеток. Ионотропные рецепторы (NMDARs и AMPARs) и их каналы играют основную роль в деполяризации и избыточном проникновении в цитозоль внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Na}^{+}$  во время и после гипоксии. Несколько групп метаботропных глутаматных рецепторов (mGluRs) обычно относят к категории модуляторов активности ионотропных рецепторов, действующих через каскады внутриклеточных энзимов. В связи с этим логично предположить их особую модулирующую роль при выборе нейроном либо путей выживания и адаптогенеза, либо патогенеза и гибели. Выяснение роли mGluRs в процессах индукции и экспрессии гипоксической толерантности осложняется большим числом их подтипов, с различными сигнальными путями и локализацией в клетке; наличием обратных связей в сигнальных путях и в способах межрецепторных взаимодействий; возможностью их транспортировки между плазмолеммой и цитозолем; способностью функционировать не только на плазмолемме, но и на внутриклеточных мембранах и многим другим. Не ясно, в какой степени, и какими механизмами mGluRs, а именно mGluRs I группы (ImGluRs), прекодицированных животных обуславливают гипоксическую толерантность мозга на ранних и поздних этапах ее формирования.

В данном обзоре обсуждается ряд указанных вопросов с привлечением данных литературы и результатов собственных исследований.

### **Глутаматные рецепторы и $\text{Ca}^{2+}$ в реакции нейронов на гипоксию**

Важным фактором в механизмах гибели или выживания нейронов после гипоксии выступает накопление в цитоплазме ионов  $\text{Ca}^{2+}$ . Повышение концентрации этого ключевого внутриклеточного посредника происходит за счет его поступления из внеклеточной среды и/или высвобождения из внутренних депо, баланс этих потоков в значительной мере обусловлен модификациями активности как ионотропных, так и метаботропных глутаматных рецепторов. Установлено, что развертывание программы гибели или выживания нейронов мозга после гипоксического инсульта определяется степенью и длительностью повышения концентрации  $\text{Ca}^{2+}$ , конкретными каналами его проникновения в цитозоль, субклеточной локализацией его «избытка» и другими параметрами [15, 19, 49]. На различных моделях гипоксии нервной ткани, выделенной из мозга (*ex vivo*) изучают обычно ближайшие последствия временной гипоксии, аноксии или

кислородно-глюкозной депривации (OGD). Специфика объекта позволяет наблюдать клеточный ответ на гипоксию не дольше нескольких часов. Вместе с тем, именно на этих моделях были раскрыты основные срочные глутамат-зависимые и  $\text{Ca}^{2+}$ -опосредованные механизмы как патологической, так и адаптивной направленности [19, 33, 41].

Наши исследования, выполненные более десяти лет назад, с предъявлением переживающему срезу коры мозга крысы 10 мин аноксии (тяжелая форма) показали, что во время самой аноксии внутриклеточная концентрация  $\text{Ca}^{2+}$  существенно повышается. Реоксигенация быстро нормализует ее, но ненадолго. Развивается вторичный рост уровня внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ , отражающий характерную для нейродегенеративных постгипоксических состояний «кальциевую перегрузку». Применение антагонистов глутаматных рецепторов доказало, что обе фазы нарушения обмена  $\text{Ca}^{2+}$  определяются активацией этих рецепторов, прежде всего NMDA типа [9], что подтверждает концепцию эксайтотоксичности острой гипоксии. На этом же объекте 2-минутная аноксия (умеренная форма) приводила к сдвигам уровня  $\text{Ca}^{2+}$  той же направленности, но существенно меньшей амплитуды. 10 мин аноксии на фоне такого сдвига (через час после прекодицирующей 2-минутной аноксии) не сопровождалось кальциевой перегрузкой. Таким образом, уже в течение 1 часа после прекодицирующего стимула срезы коры обретают гипоксическую толерантность, что совпадает с умеренным повышением уровня  $\text{Ca}^{2+}$ . Важно отметить, что и это повышение обеспечивалось активностью глутаматных рецепторов, так как предварительная аппликация соответствующих антагонистов предотвращала его и снимало сам нейропротективный эффект прекодицирования [9, 42].

Для оценки различных более отдаленных постгипоксических модификаций кальциевых сигналов, связанных с глутаматергической трансдукцией, применялись два режима гипобарического воздействия на крыс *in vivo*, используемого в нашей лаборатории. Умеренная и тяжелая гипобарические гипоксии (УГГ и ТГГ соответственно), представляют собой воздействия различной модальности. Если ТГГ имеет нейродегенеративные последствия, то УГГ (точнее, серия из 3 УГГ) развивает в течение последующих суток гипоксическую толерантность мозга. В отношении глутамат-опосредованных  $\text{Ca}^{2+}$  сигналов это доказывается тем, что ТГГ, предъявленная после УГГ, не вызывает характерных нарушений глутаматной рецепции [2, 43], а 10-минутная аноксия, предъявленная срезу мозга УГГ-прекодицированного животного, не приводила кальциевой перегрузки [10]. В срезах мозга, полученных в течение первых 6 ч по-

сле ТГГ, кальциевые ответы на стимуляцию глутаматных рецепторов полностью подавлены, однако, через 24 ч чувствительность рецепторов к глутамату не только восстанавливается, но и существенно повышается, а к 72 ч отмечается повторная волна их депрессии [2]. Вместе с тем, постгипоксическая активация глутаматергической  $Ca^{2+}$ -опосредованной сигнализации возникает не только после ТГГ, но и через сутки после УГГ. Однако степень этого усиления и его временной паттерн специфичны для каждого из рецепторных типов (NMDARs, AMPARs и ImGluRs) и отличны от таковых, выявленных после ТГГ. При этом нами было установлено, что наибольшее различие демонстрируют паттерны  $Ca^{2+}$ -ответов на стимуляцию ImGluRs. Данное обстоятельство вызвало особый интерес к выяснению роли этой группы рецепторов в адаптивных и патологических процессах, индуцируемых гипоксией.

### Сигнальные пути ImGluRs и их вовлечение в патогенные и адаптогенные эффекты гипоксии

ImGluRs относятся к семейству рецепторов, сопряженных с G-белками, а именно с белком  $G\alpha_q/11$ , который в ответ на присоединение глутамата к лигандчувствительной субъединице ImGluR активирует фосфолипазу  $C\beta$  (PLC $\beta$ ), гидролизующую один из мембранных дифосфоинозитидов — фосфоинозитол(4,5)дифосфат (PIP2) с образованием двух вторичных посредников: диацилглицерола (DAG) и инозитол-3-фосфата (IP3). DAG облегчает  $Ca^{2+}$ -зависимую активацию протеинкиназы-C (PKC), обеспечивает ее транслокацию от цитозоля к плазмолемме и пролонгирует ее активное состояние. Активированная PKC, в свою очередь, запускает каскад фосфорилирования многих мембранных белков, в том числе потенциалуправляемых и лигандуправляемых  $Ca^{2+}$ -каналов. В свою очередь IP3 взаимодействует с рецепторами (IP3Rs) внутриклеточных мембран и вызывает высвобождение  $Ca^{2+}$  из внутренних депо в цитозоль. В конечном итоге оба каскада, хотя с разной динамикой и разными путями, способствуют повышению уровня  $Ca^{2+}$  в цитозоле и  $Ca^{2+}$ -опосредованной активации многих регуляторных белков [27].

Принимая во внимание представления о том, что запуск адаптогенных или патогенных постгипоксических процессов зависит от умеренного или чрезмерного повышения уровня внутриклеточного  $Ca^{2+}$ , соответственно, следует отметить, что и та и другая его степень могла бы обеспечиваться только лишь указанными PLC-зависимыми путями. Это возможно благодаря сложности и пластичности каждого из плеч этого сигналинга (DAG и IP3-зависимого). В частности, эффективность передачи сигнала от ImGluRs к IP3Rs с помощью посредника IP3 зависит от белко-

вой конформации цитозоля между ними, которая обеспечивается лабильным семейством белков Homer [23]. Они же, взаимодействуя с «анкерными» белками других рецепторов, могут менять эффективность модуляционной связи ImGluRs с NMDARs и AMPARs, таким образом, ослаблять или усиливать поток внеклеточного  $Ca^{2+}$  [28]. В зависимости от того, какой из подтипов ImGluRs (1 или 5) влияет на IP3Rs, и в зависимости от состояния последних, в цитозоле возникают осцилляции концентрации  $Ca^{2+}$ -различных паттернов. [18]. Предполагается, что именно это явление способствует запуску либо адаптивных, либо патогенных  $Ca^{2+}$ -зависимых регуляторных каскадов. Обнаружено, что в некоторых отделах мозга, в частности в коре, mGluR1 предпочтительно реализуют PKC, а не IP3 сигналинг [29], таких свойств для mGluR5 не отмечено.

Долгое время описанные сигнальные механизмы считали основными (каноническими). Относительно недавно было обнаружено, что фермент фосфатидинозитол-3 киназа (PI3K) способен производить дальнейшее и предельно возможное фосфорилирование PIP2 с образованием фосфо-тидилинозитол(3,4,5) трифосфата (PIP3). Этот фосфоинозитид активирует протеинкиназу-B (Akt), известный ключевой фермент множества анаболических процессов адаптивной направленности, предотвращающих апоптоз [35]. Одним из стимулов активации PI3K, как и PLC, является возбуждение ImGluRs [51]. Связь ImGluRs с сигнальным каскадом PI3K/Akt не вполне раскрыта, но интенсивно изучается. Установлено, в частности, что умеренная активация ImGluRs в течение 30 мин заметно увеличивает фосфорилирование Akt [39] и снижает апоптотическую гибель клеток от последующей «ишемии» *ex vivo* (модель OGD).

Следует отметить, что обе составляющие ImGluRs сигнализации: канонические каскады PIP2/PLC/DAG,IP3 и PLC-независимый каскад PIP2/PI3K/PIP3/Akt, взаимосвязаны. С одной стороны, известны  $Ca^{2+}$ -зависимые механизмы активации PI3K с помощью  $Ca^{2+}$ /CaMKK [50], с другой стороны, отмечается Akt-опосредованное ограничение чрезмерного высвобождения  $Ca^{2+}$  из эндоплазматического ретикула [46].

Некоторые авторы считают, что ImGluRs включены в ряд патологических ответов, в частности, в генерацию ишемического и постишемического повреждения [25, 32]. Такие представления основываются на способности осуществлять IP3-зависимое повышение концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  и PKC-зависимую активацию  $Ca^{2+}$  каналов плазмолеммы, в том числе ассоциированных с NMDARs [14, 44]. Одним из следствий выступает активация риадиноновых рецепторов эндо-плазматического ретикула и доба-

вочное высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из депо. Часть этих представлений подтверждаются в модельных экспериментах. Показано, что DHPG, агонист  $\text{mGluRs}$ , потенцирует вход  $\text{Ca}^{2+}$ , опосредованный возбуждением NMDARs в культуре корковых нейронов, подвергнутых OGD [13]. Другим губительным для клетки следствием чрезмерного усиления IP3 сигналинга выступает так называемый «стрессорный ответ эндоплазматического ретикула». В результате обеднения ретикула кальцием нарушаются механизмы трансляции и фолдинга адаптивных белков и накопление белков, активирующих апоптоз [47].

Вместе с тем, множество работ свидетельствуют о нейропротективной роли  $\text{mGluR}$ . В экспериментальных моделях *ex vivo* их активация защищала клетки мозга от повреждающего воздействия NMDA [16, 20], аноксии [48] и OGD [30]. Причем, и эти эффекты связываются с PLC-зависимым сигналингом и, очевидно, характерны для механизмов быстрой экспрессии нейрональной толерантности. Другой быстрый нейропротективный механизм, обнаруженный на культуре и срезах гиппокампа — интернализация ионотропных рецепторов, вызванная  $\text{mGluR}$ -зависимой стимуляцией белков, управляющих эндоцитозом [17, 45]. Дальнейшие исследования показали, что протекция может реализоваться на множестве более сложных и, потому, более медленных сигнальных путей. Например, активация  $\text{mGluR}$  препятствует деградации ДНК через Akt — опосредованную антиапоптотическую систему [16, 21]. Вероятно, такие не прямые и сложные ветви  $\text{mGluR}$  сигналинга могут включаться в механизмы долгосрочной стойкой экспрессии гипоксической толерантности.

Источником противоречий в оценке роли  $\text{mGluRs}$  в гипоксических и постгипоксических процессах в мозге выступает сама природа этого типа рецепторов, главное назначение которых — тонкая модуляция и координация исключительного множества внутриклеточных сигнальных путей. При этом направленность такой модуляции должна зависеть от функционального состояния клетки, ее генетического предназначения, паттерна межклеточных отношений, организменных факторов ответа на гипоксию, разумеется, от самой степени «гипоксической угрозы» и других факторов. Все это, очевидно, и определяет конечную роль  $\text{mGluRs}$  при выборе нейроном своей «постгипоксической судьбы». Для раскрытия этой роли необходимо выявить различия в функциональной активности, синтезе, транслокации и прочих характеристиках самих рецепторов и ключевых участников их сигнальных путей в мозге животных, переживших гипоксические воздействия противоположных модальностей. В практическом аспекте особую важность представляет исследование долгосрочных форм гипоксической

толерантности, вызываемой гипоксией *in vivo*. В последние годы нами уделяется особое внимание соответствующим экспериментальным моделям. Модель гипобарической гипоксии весьма удобна в исполнении и дозировке, а также соответствует экологически естественным экстремальным ситуациям, с которыми сталкиваются люди определенных профессий (краткосрочное пребывание в «высокогорье» с применением легких летательных аппаратов или в ходе горнолыжных тренировок, повреждения герметичных летательных аппаратов и пр.). Адаптивный (нейропротективный) эффект дозированной гипобарической гипоксии показан в многолетних исследованиях нашей лаборатории на экспериментальных животных. С использованием этой модели проводятся исследования различных отделов мозга крыс *in vitro* на различных сроках реоксигенации после предъявления животным *in vivo* гипобарической гипоксии обеих модальностей. Такие подходы позволяют судить, во-первых, о влиянии на клетки мозга гипоксии целого организма, в отличие от гипоксии объекта *ex vivo*, во-вторых, раскрывают кинетику формирования постгипоксической патологии мозга или, напротив, развития его долгосрочной гипоксической толерантности.

### Модели гипобарической гипоксии

Тяжелая (патогенная) гипобарическая гипоксия (ТГГ) создается животным в гипобарической камере проточного типа однократно в течение 3 ч путем разрежения воздуха до 180 мм Hg, что соответствует подъему на 10000—11000 м над уровнем моря. Это воздействие обычно выдерживают лишь 50% животных. Выжившие используются для изучения патологических последствий в течение 1—7 суток. ТГГ применяется и как тестирующее воздействие на прекондиционированных животных. Умеренная (адаптогенная) гипобарическая гипоксия (УГГ) создается раз в сутки в течение 2 ч путем разрежения воздуха до 360 мм Hg («подъем» на 5000 м над уровнем моря). Выживаемость крыс после такого воздействия в его эффективной дозировке (3-кратное) составляет не менее 85%. УГГ применяется для исследования динамики формирования стойких адаптивных процессов и для изучения механизмов нейропротекции, как прекондиционирующая мера за сутки до предъявления ТГГ или тяжелых стрессорных воздействий.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что у крыс, выживших после ТГГ, развиваются структурные повреждения нейронов неокортекса и гиппокампа [3, 36, 37], нарушается обучение и память [1, 36], изменяется экспрессия ранних генов и транскрипционных факторов [5, 36], активируются проапоптотические факторы [8, 37]. Предшествующая УГГ в значительной степени предотвращает структур-

но-функциональные повреждения [1, 3, 5, 10, 36, 37, 43] и индуцирует повышение экспрессии транскрипционных факторов *c-Fos*, NGFI-A,  $\rho$ CREB, NF $\kappa$ рaB, активирующих проадаптивные гены и их продукты [3, 36, 38], пептидных антиоксидантов [12], а также антиапоптотических факторов [7, 8, 37].

### Оценка кальциевых ответов на стимуляцию глутаматных рецепторов в переживающих срезах коры мозга после УГГ и ТГГ

Задачей данного фрагмента наших исследований было сравнение динамических характеристик кальциевых ответов на стимуляцию различных типов глутаматных рецепторов их агонистами в инкубируемых срезах коры мозга крыс, переживших воздействие ТГГ или УГГ, а также сопоставить их с кальциевыми ответами срезов коры интактных животных.

Для визуализации  $\text{Ca}^{2+}$ , связанного с мембранами и белками (Ca-c), использовали флуоресцентный зонд хлортетрацилин (Ex400/Em520). Для оценки  $\text{Ca}^{2+}$  ответа от макроучастков применялась лабораторная установка на базе контактного микроскопа ЛЮМAM-K и спектрометра AvaSpec 2048. Для вычленения роли различных типов глутаматных рецепторов применяли аппликацию на срезы их агонистов: L-глутамат (L-Glu) — неселективный агонист GluRs (50 мкМ, 2 мин), альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионат (AMPA) — селективный агонист AMPARs (40 мкМ, 2 мин), S(3-5)-дигидрокси-фенилглицин (DHPG) — селективный агонист ImGluRs (100 мкМ, 2 мин) и N-метил-D-аспарат (NMDA) — селективный агонист NMDARs (100 мкМ, 15 мин). Более подробно эта методика и результаты описаны ранее [11, 43].

На срезах коры мозга контрольных животных  $\text{Ca}^{2+}$  ответы на аппликацию L-Glu, NMDA или AMPA выражались стойкими позитивными сдвигами уровня Ca-c, а аппликация DHPG создавала кратковременное негативное смещение этого показателя (рис. 1А). Позитивные сдвиги Ca-c отражают явление входа внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  и его последующее связывание различными внутриклеточными депо и буферными системами. Снижение ответа на DHPG демонстрирует преобладание высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, вызванного IP3-опосредованным сигналом. Эти объяснения представляются правдоподобными, так как в отдельных опытах при тех же экспериментальных условиях мы определяли  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы, используя флуоресцентный индикатор свободного  $\text{Ca}^{2+}$  — fura-2, и сопоставляли их динамику с ответами пула связанного  $\text{Ca}^{2+}$  [43].

Для оценки выраженности  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа был проведен расчет интеграла смещения уровня Ca-c в пре-

делах от 0 до 30 мин для каждого агониста. Интегральные кальциевые ответы были рассчитаны как для контрольных срезов, так и для срезов животных переживших УГГ или ТГГ. В результате развития адаптивного процесса через сутки после УГГ интегральный  $\text{Ca}^{2+}$ -ответ на L-Glu возрастал почти на треть. В меньшей степени возрастал ответ на NMDA, и не менялся ответ на AMPA. Ответ на DHPG, сохраняя свою негативную направленность, был усилен в несколько раз по сравнению с контролем. Через сутки после ТГГ, так же как и после УГГ, отмечено усиление ответов на аппликации L-Glu. Однако ответы на AMPA и NMDA были несколько ослаблены по сравнению с контролем. Ответ же на DHPG приобрел позитивную направленность и многократно возрастал по абсолютной величине (рис. 1Б).

Сопоставление результатов двух серий опытов выявляет способность срезов повышать уровень внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в ответ на неселективную стимуляцию всех подтипов GluRs экзогенным L-глутаматом через сутки после ТГГ и особенно после УГГ. Селективная стимуляция отдельных подтипов GluRs выявляет их вклад в общую картину. Можно сделать заключение, что усиление  $\text{Ca}^{2+}$ -ответов на глутамат после УГГ определяется отчасти сенситизацией NMDARs, но, в большей степени, резким усилением способности ImGluRs высвобождать  $\text{Ca}^{2+}$  из депо. Усиление же ответа на глутамат после ТГГ нельзя объяснить вкладом ионотропных рецепторов, так как их ответы были снижены. В состоянии же сигнальной системы ImGluRs, вероятно, происходит смещение акцента от IP3 опосредованного высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  к позитивной модуляции механизмов  $\text{Ca}^{2+}$ -входа. Наряду с этим следует учитывать и возможность различной экспрессии и/или транслокации белков

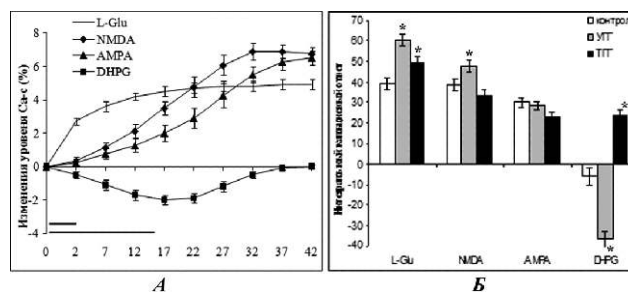


Рис. 1. Кальциевые ответы на стимуляцию различных типов глутаматных рецепторов их агонистами:

А — динамика кальциевых ответов на стимуляцию различных типов глутаматных рецепторов в срезах коры контрольных животных. По оси абсцисс время в минутах от начала аппликации. Отрезки внизу: «2 мин» — длительность аппликации L-Glu, AMPA и DHPG, «15 мин» — длительность аппликации NMDA;

Б — интегральные кальциевые ответы за интервал времени 30 мин на применение агонистов различных типов глутаматных рецепторов в срезах животных контрольных и подвергнутых УГГ или ТГГ. Звездочками отмечены достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) от соответствующих контро-

ImGluRs и ключевых элементов их сигнальных путей вслед за УГГ или ТГГ. Эти исследования были проведены нами и описываются в следующих подразделах.

### Иммуноцитохимическая оценка модификации ImGluRs и компонентов их сигнальных путей после УГГ и ТГГ

Иммуноцитохимическое исследование проводилось на парафиновых срезах мозга крыс, контрольных и перенесших УГГ или ТГГ. Для анализа экспрессии белков mGluR1 и mGluR5 использовали первичные антитела фирмы AbCam (1:100 и 1:50 соответственно); PLC $\beta$ 1 и IP3Rs — фирмы Santa-Cruz (1:100); вторичные антитела получены от фирмы Vector Labs (1:200). Визуализацию экспрессии проводили с помощью диаминобензида. Препараты анализировали под световым микроскопом Jenaval с последующим обсчетом изображений в программе ImageJ.

#### 1. Иммунореактивность mGluR1 и mGluR5 в коре мозга после УГГ и ТГГ

Выявлено, что в коре мозга контрольных животных mGluR1 и mGluR5 не колокализуются в своем распределении. Это отмечали не только в коре, но и в гиппокампе, мозжечке, таламусе и других отделах [27]. В коре mGluR1 преимущественно выявляются в телах интернейронов [26, 31]. mGluR5 равномерно распределены в нейропиле всех слоев коры [31], иногда отмечают их повышенную иммунореактивность в крупных дендритных стволах [34]. Мы проводили оценку иммунореактивности этих подтипов и в тех участках неокортекса, где они были наиболее специфично представлены, а именно, mGluR1 — в клеточных телах, а mGluR5 в дендритных стволах крупных пирамид и окружающих участках нейропила. На некоторых препаратах коры «постгипоксических», но не контрольных, животных нами наблюдалась повышенная экспрессия mGluR5 также и в телах пирамидных нейронов, в частности в перикарионе. При количественной оценке экспрессии mGluR5 в стволах апикальных дендритов крупных пирамид групп УГГ и ТГГ в сравнении с соответствующими контрольными группами было показано небольшое, но достоверное снижение уровня иммунореактивности mGluR5 (на  $0,31 \pm 0,16$  и  $0,26 \pm 0,15$  относительных единиц соответственно). Оценка иммунореактивности ImGluRs в участках нейропила, не включающих стволы апикальных дендритов, а также mGluR1 в телах нейронов V слоя не выявила существенного влияния УГГ или ТГГ на их экспрессию.

#### 2. Оценка иммунореактивности IP3Rs в коре мозга после УГГ и ТГГ

IP3Rs расположены на внутренних мембранах клетки и обнаруживаются во всех слоях коры преимущественно в пирамидных клетках [29]. Участки репрезентативных препаратов с иммунореактивностью по IP3Rs проиллюстрированы на рис. 2А. Для количественного анализа нами был выбран V слой, хотя качественные изменения были обнаружены также и в других слоях коры. Определялся уровень иммунореактивности крупных пирамид, после чего они были разделены на 3 класса по интенсивности окраски как «слабые», «умеренные» и «интенсивные» (1, 2 и 3 соответственно). На гистограммах (рис. 2Б) представлены количества клеток каждого класса в процентах от общего числа учтенных клеток в контрольных и экспериментальных группах. Гистограммы иллюстрируют снижение числа клеток с высокой плотностью IP3Rs после УГГ. После ТГГ отмечена та же, но не достоверная тенденция.

#### 3. Оценка иммунореактивности PLC в коре мозга после УГГ и ТГГ

Экспрессия PLC $\beta$ 1 определялась в V слое коры у трех экспериментальных групп животных. На рис. 3А представлены материалы, характеризующие качественные различия иммунореактивности PLC $\beta$ 1 в телах пирамидных нейронов. Для количественной оценки клетки также были разделены на классы по интенсивности окраски. Обнаружено, что после ТГГ доля слабореактивных клеток достоверно снижается,

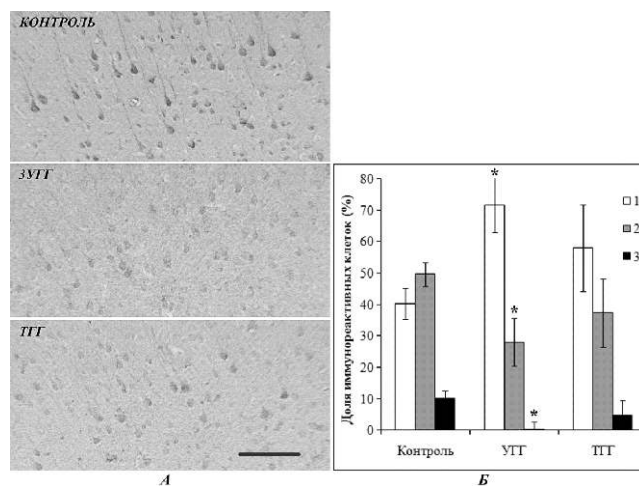


Рис. 2. Иммунореактивность IP3Rs в препаратах коры мозга: А — репрезентативные фотографии распределения иммунореактивности IP3Rs в коре контрольных и подвергнутых УГГ и ТГГ животных. Масштаб: 100 мкм; Б — диаграмма представленности трех классов иммунореактивных по IP3Rs нейронов в коре контрольных и подвергнутых УГГ и ТГГ животных. Звездочками отмечены достоверные отличия ( $p < 0,05$ ) от соответствующих контролей

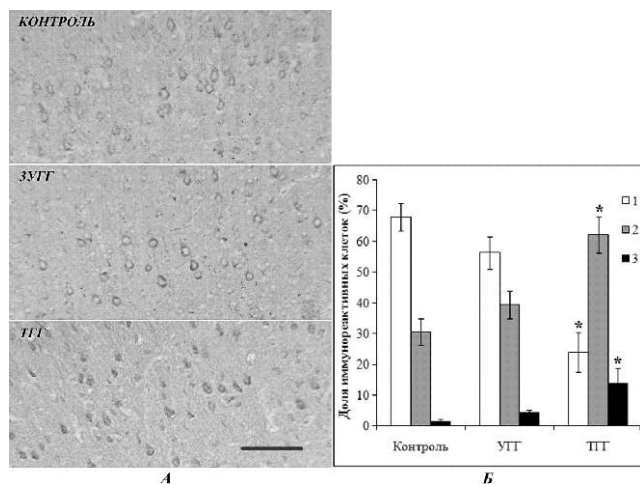


Рис. 3. Иммунореактивность PLCβ1 в препаратах коры мозга. Расположение и обозначения те же, что для рис. 2

а клеток 2 и 3 типа — увеличивается, т.е. экспрессия PLCβ1 возрастает. Сходные, но не достоверные сдвиги отмечены и после УГГ (рис. 3Б).

Сопоставление полученных нами фактов и привлечение данных литературы об участии ImGluRs в адаптивных и патологических реакциях коры мозга на гипоксию позволяют сделать следующие предварительные заключения. Функциональные состояния ImGluR — сигнальных систем после ТГГ и УГГ различаются между собой и отличаются от нормального статуса по нескольким характеристикам. В отношении их участия во внутриклеточном балансе Ca<sup>2+</sup>, обнаружено, что, если через сутки после УГГ активируемые ImGluRs обеспечивают преимущественно механизмы умеренного высвобождения Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо, то после ТГГ преобладает эффект потенциации входа экстраклеточного Ca<sup>2+</sup>. Обнаруженный паттерн Ca<sup>2+</sup>-ответа в коре животных, переживших УГГ, очевидно, нельзя объяснить ни увеличением количества ImGluRs ни повышенной экспрессией IP3Rs, так как наши данные показывают противоположные изменения иммунореактивности этих белков. УГГ стимулирует экспрессию PLCβ и, возможно, снижение синтеза IP3Rs на этом фоне является одним из компенсаторных механизмов, который ограничивает риск чрезмерного выхода Ca<sup>2+</sup> из внутриклеточных депо, ведущего к кальциевой перегрузке и/или одному из вариантов стрессорного ответа эндоплазматического ретикулума, при котором массивное высвобождение Ca<sup>2+</sup> сопровождается чередой нескольких губительных для клетки процессов. Возможно, постгипоксическое снижение экспрессии mGluR5 активация которых, предположительно, играет ведущую роль в IP3 сигналинге также направлено на предотвращение чрезмерного высвобождения

Ca<sup>2+</sup>. Следовательно, наблюдаемое после УГГ повышение Ca<sup>2+</sup>-высвобождающего эффекта стимуляции ImGluRs должно объясняться другими причинами. В их ряду следует отметить возможную апрегуляцию лигандного домена самого IP3R [22] и позитивную модуляцию сопряженности ImGluR и IP3R через систему Нотем-белков [23]. Кроме того, важную роль может играть не столько изменение числа ImGluRs, сколько модификации паттернов их транслокации между отростками и сомой, плазмолеммой и цитозолем, цитозолем и нуклеолеммой. На некоторых препаратах выявлена транслокация рецепторов после гипобарической гипоксии. Это явление может объясняться сокращением чрезмерно богатого пула плазмолеммных рецепторов путем их интернализации. Вместе с тем, транслокация ImGluRs к ядру и облегчение их воздействия на IP3Rs ядерной мембраны может играть роль в кальциевом обеспечении транскрипционной активности генов. Эти и другие возможные механизмы являются предметом дополнительных исследований. В ответ на ТГГ экспрессия PLCβ существенно возрастает, что предполагает потенциально высокий уровень образования IP3 и DAG. При этом эффект супрессии синтеза IP3Rs выражен слабее, чем после УГГ. Эти обстоятельства должны создавать ситуацию стойкого повышения концентрации внутриклеточного Ca<sup>2+</sup>, характерную для патогенных последствий тяжелой гипоксии.

Заключая, следует заметить, что нами практически не рассматривается важная роль системы Akt в ImGluR-зависимых механизмах формирования долговременной толерантности мозга, индуцируемой УГГ. Изучение этих вопроса является предметом дальнейших исследований.

Работа поддержана грантами РФФИ 10-04-01134 и 11-04-00677.

### Список литературы

1. Ватаева Л.А., Тюлькова Е.И., Самойлов М.О. Влияние предварительного воздействия умеренной гипоксии на нарушения выработки и воспроизведения условной реакции пассивного избегания, вызываемые тяжелой гипобарической гипоксией у крыс // Журн. Внд. — 2004. — 54(6). — С. 795—801.
2. Миллер О.Л., Семенов Д.Г., Самойлов М.О. // Бюлл. эксп. биол. и медицины. — 2003. — 135(4). — С. 398—401.
3. Рыбникова Е.А., Хожай Л.И., Тюлькова Е.И. и др. Экспрессия белков ранних генов, структурные изменения нейронов мозга при гипобарической гипоксии и корректирующий эффект прекодиционирования // Морфол. — 2004. — 125(2). — С. 10—15.
4. Самойлов М.О. Мозг и адаптация. Молекулярно-клеточные механизмы. ИНФРАН. — СПб., 1999. — 271 с.

5. **Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Толькова Е.И.** и др. Влияние гипобарической гипоксии на поведенческие реакции и экспрессию ранних генов в мозге крыс: корректирующий эффект preconditionирующего воздействия // Докл. РАН. — 2001(a). — 381(1). — С. 1—3.
6. **Самойлов М.О., Лазаревич Е.В., Семенов Д.Г.** и др. Адаптивные эффекты гипоксического preconditionирования нейронов мозга // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. — 2001(6). — 87(6). — С. 714—729.
7. **Самойлов М.О., Ситник Н.А., Рыбникова Е.А.** и др. Особенности экспрессии про- и антиапоптотических белков Вах и Vcl-2 в нейронах мозга крыс в ответ на тяжелую гипобарическую гипоксию: корректирующий эффект гипоксического preconditionирования // Докл. РАН. — 2005. — 403(4). — С. 1—5.
8. **Самойлов М.О., Рыбникова Е.А., Ситник Н.А.** и др. Preconditionирование модифицирует активность митогенактивируемых протеинкиназ и транскрипционного фактора c-Jun в гиппокампе крыс вслед за тяжелой гипобарической гипоксией // Нейрохимия. — 2007. — 1(3). — С. 219—226.
9. **Семенов Д.Г., Самойлов М.О., Лазаревич Е.В.** DTNB подавляет кальциевые ответы срезов коры мозга крыс на аноксию различной длительности // Бюлл. эксп. биол. и медицины. — 2001. — 131(6). — С. 526—528.
10. **Семенов Д.Г., Миллер О.Л., Самойлов М.О.** Влияние гипоксического preconditionирования крыс *in vivo* на динамику содержания внутриклеточного кальция, индуцируемую одновременной аноксией в срезах мозга // Бюлл. эксп. биол. и медицины. — 2004. — 138(10). — С. 382—385.
11. **Семенов Д.Г., Беляков А.В., Самойлов М.О.** Сравнение Ca<sup>2+</sup> ответов на стимуляцию глутаматных рецепторов коры мозга крыс после гипобарической гипоксии // Рос. физиол. журн. им. Сеченова. — 2009. — 95(9). — С. 71—77.
12. **Строев С.А., Самойлов М.О.** Эндогенные антиоксиданты и гипоксическая толерантность мозга. ИНФРАН. — СПб., 2006. — 148 с.
13. **Allen J.W., Vicini S., Faden A.I.** Exacerbation of neuronal cell death by activation of group I metabotropic glutamate receptors: role of NMDA receptors and arachidonic acid release // Exp. Neurol. — 2001. — 169(2). — P. 449—460.
14. **Bandrowski A.E., Aramakis V.B., Moore S.L., Ashe J.H.** Metabotropic glutamate receptors modify ionotropic glutamate receptors in neocortical cells and interneurons // Exp. Brain Res. — 2001. — 136. — P. 25—40.
15. **Bano D., Nicotera P.** Ca<sup>2+</sup> signals and neuronal death in brain ischemia // Stroke. 2007. — 38(2). — P. 674—676.
16. **Baskys A., Fang L., Bayazitov I.** Activation of neuroprotective pathways by metabotropic group I glutamate receptors: a potential target for drug discovery? // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2005. — 1053. — P. 55—73.
17. **Baskys A., Bayazitov I., Zhu E.** et al. Rab-mediated endocytosis: linking neurodegeneration, neuroprotection, and synaptic plasticity? // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 2007. — 1122. — P. 313—329.
18. **Berridge M.J.** Inositol trisphosphate and calcium oscillations // Biochem. Soc. Symp. — 2007. — 74. — P. 1—7.
19. **Bickler P.E., Fahlman C.S.** Moderate increases in intracellular calcium activate neuroprotective signals in hippocampal neurons // Neuroscience. — 2004. — 127. — P. 673—683.
20. **Blaabjerg M., Fang L., Zimmer J., Baskys A.** Neuroprotection against NMDA excitotoxicity by group I metabotropic glutamate receptors is associated with reduction of NMDA stimulated currents // Exp. Neurol. — 2003. — 183(2). — P. 573—580.
21. **Chong Z.Z., Kang J.-Q., Li F., Maiese K.** mGluR1 targets microglial activation and selectively prevents neuronal cell engulfment through Akt and caspase dependent pathways // Curr. Neurovasc. Res. — 2005. — 2(3). — P. 197—211.
22. **Devogelaere B., Verbert L., Parys J.B.** et al. The complex regulatory function of the ligand-binding domain of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor // Cell Calcium. — 2008. — 43. — P. 17—27.
23. **Duncan R.S., Hwang S.Y., Koulen P.** Effects of Ves1/Homer proteins on intracellular signaling // Exp. Biol. Med. (Maywood). — 2005. — 230(8). — P. 527—535.
24. **Duncan R.S., Goad D.L., Grillo M.A.** et al. Control of Intracellular Calcium Signaling as a Neuroprotective Strategy // Molecules. — 2011. — 15(3). — P. 1168—1195.
25. **Faden A.I., O'Leary D.M., Fan L.** et al. Selective blockade of the mGluR1 receptor reduces traumatic neuronal injury *in vitro* and improves outcome after brain trauma // Exp. Neurol. — 2001. — 167(2). — P. 435—444.
26. **Ferraguti F., Conquet F., Corti C.** et al. Immunohistochemical localization of the mGluR1beta metabotropic glutamate receptor in the adult rodent forebrain: evidence for a differential distribution of mGluR1 splice variants // J. Comp. Neurol. — 1998. — 400(3). — P. 391—407.
27. **Ferraguti F., Shigemoto R.** Metabotropic glutamate receptors // Cell Tissue Res. — 2006. — 326. — P. 483—504.
28. **Foa L., Gasperini R.** Developmental roles for Homer: more than just a pretty scaffold // J. of Neurochem. — 2009. — 108. — P. 1—10.
29. **Fotuhi M., Sharp A.H., Glatt C.E.** et al. Differential localization of phospho-inositide-linked metabotropic glutamate receptor (mGluR1) and the Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor in rat brain // J. of Neurosci. — 1993. — 13(5). — P. 2001—2012.
30. **Kalda A., Kaasik A., Vassiljev V.** et al. Neuroprotective action of group I metabotropic glutamate receptor agonists against oxygen-glucose deprivation-induced neuronal death // Brain Res. — 2000. — 853(2). — P. 370—373.
31. **Lopez-Bendito G., Shigemoto R., Fairen A., Lujan R.** Differential distribution of group I metabotropic glutamate receptors during rat cortex development // Cerebr. Cortex. — 2002. — 12. — P. 625—638.
32. **Pellegrini-Giampietro D.E., Cozzi A., Peruginelli F.** et al. 1-Aminoindan-1,5-dicarboxylic acid and (S)-(+)-2-(3-carboxybicyclo [1.1.1]pentyl)- glycine, two mGlu1 receptor-preferring antagonists, reduce neuronal death in *in vitro* and *in vivo* models of cerebral ischemia // Eur. J. Neurosci. — 1999. — 11. — P. 3637—3647.
33. **Perez-Pinzon M., Born J., Centeno J.** Ca<sup>2+</sup> and increase excitability promote tolerance against anoxia in hippocampal slices // Brain Res. — 1999. — 833(1). — P. 20—26.
34. **Romano C., Sesma M., McDonald C.** et al. Distribution of metabotropic glutamate receptor mGluR5 immunoreactivity in rat brain // J. Comp. Neurol. — 1995. — 355(3). — P. 455—469.
35. **Rong R., Ahn J.Y., Huang H.** et al. PI3 kinase enhancer-Homer complex couples mGluR1 to PI3 kinase, preventing neuronal apoptosis // Nat. Neurosci. — 2003. — 6(11). — P. 1153—1161.
36. **Rybnikova E., Vataeva L., Tyulkova E.** et al. Mild hypoxia preconditioning prevents impairment of passive avoidance learning and suppression of brain NGFI-A expression induced by severe hypoxia // Behav. Brain Res. — 2005. — 160. — P. 107—114.
37. **Rybnikova E., Sitnik N., Glushchenko T.** et al. The preconditioning modified neuronal expression of apoptosis-related proteins of Bcl-2 superfamily following severe hypobaric hypoxia in rats // Brain Research. — 2006. — 1089. — P. 195—202.



38. *Rybnikova E., Glushchenko T., Tjul'kova E.* et al. Preconditioning induces prolonged expression of transcription factors pCREB and NF-kappa B in the neocortex of rat before and following severe hypobaric hypoxia // *J. Neurochem.* — 2008. — 106(3). — P. 1450–1458.
39. *Scartabelli T., Gerace E., Landucci E.* et al. Neuroprotection by group I mGlu receptors in a rat hippocampal slice model of cerebral ischemia is associated with the PI3K-Akt signaling pathway: a novel preconditioning strategy? // *Neuropharmacology.* — 2008. — 55(4). — P. 509–516.
40. *Schaller B., Graf R.* Cerebral ischemic preconditioning. An experimental phenomenon or a clinically important entity of stroke prevention? // *Neurol.* — 2002. — 249. — P. 1503–1511.
41. *Semenov D.G., Samoilo M.O., Zelonka P., Lazarewicz J.* Responses to reversible anoxia of intracellular free and bound  $Ca^{2+}$  in rat cortical slices // *Resuscitation.* — 2000. — 44. — P. 207–214.
42. *Semenov D., Samoilo M., Lazarewicz J.* Calcium transients in the model of rapidly induced anoxic tolerance in rat cortical slices: involvement of NMDA receptors // *Neurosignals.* — 2002. — 11. — P. 329–335.
43. *Semenov D.G., Samoilo M.O., Lazarewicz J.W.* Preconditioning reduces hypoxia-evoked alterations in glutamatergic  $Ca^{2+}$  signaling in rat cortex // *Acta Neurobiol. Exp.* — 2008. — 68. — P. 169–179.
44. *Skeberdis V.A., Lan J., Opitz T.* et al. mGluR1 — mediated potentiation of NMDA receptors involves a rise in intracellular calcium and activation of protein kinase C // *Neuropharm.* — 2001. — 40. — P. 856–865.
45. *Snyder E., Philpot B., Huber K.* et al. Internalization of ionotropic glutamate receptors in response to mGluR activation // *Nat. Neurosci.* — 2001. — 4(11). — P. 1079–1085.
46. *Szabo T., Vanderheyden V., Parys J.B.* et al. Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits  $Ca^{2+}$  release and apoptosis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2008. — 105(7). — P. 2427–2432.
47. *Verkhatsky A., Toescu E.C.* Endoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$  homeostasis and neuronal death // *J. Cell. Mol. Med.* — 2003. — 7(4). — P. 351–361.
48. *Vincent A.M., Maiese K.* The metabotropic glutamate system promotes neuronal survival through distinct pathways of programmed cell death // *Exp. Neurol.* — 2000. — 166(1). — P. 65–82.
49. *Wang R.M., Yang F., Zhang Y.X.* Preconditioning-induced activation of ERK5 is dependent on moderate  $Ca^{2+}$  influx via NMDA receptors and contributes to ischemic tolerance in the hippocampal CA1 region of rats // *Life Sci.* — 2006. — 79(19). — P. 1839–1846.
50. *Yano S., Morioka M., Kuratsu J., Fukunaga K.* Functional proteins involved in regulation of intracellular  $Ca^{2+}$  for drug development: role of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in ischemic neuronal death // *J. Pharmacol. Sci.* — 2005. — 97. — P. 351–354.
51. *Ye K., Snyder S.H.* PIKE GTPase: a novel mediator of phosphoinositide signaling // *J. Cell Sci.* — 2004. — 117. — P. 155–161.

Поступила 21.03.12

#### Сведения об авторах:

*Беляков Александр Витальевич*, канд. биол. наук, науч. сотр., лаб. регуляции функции нейронов мозга ФГБУН ИФ им. И.П. Павлова РАН

*Глушченко Татьяна Сергеевна*, канд. биол. наук, старш. науч. сотр., лаб. регуляции функции нейронов мозга ФГБУН ИФ им. И.П. Павлова РАН

*Самойлов Михаил Олегович*, д-р биол. наук, проф., зав. лаб. регуляции функции нейронов мозга, зам. директора ФГБУН ИФ им. И.П. Павлова РАН