

DOI: 10.7868/S0869813918060072

**НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЙ ЭФФЕКТ ФОРСКОЛИНА  
И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ ДИСФУНКЦИЮ  
В НЕЙРОНАХ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ МОЗЖЕЧКА КРЫС**

© М. А. Иванова, Л. С. Ситникова, Т. В. Карелина, Д. А. Сибаров,  
П. А. Абушик, С. М. Антонов

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,  
Санкт-Петербург, Россия  
E-mail: polinaabushik@gmail.com

Известно, что активация синтеза циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) приводит к запуску нейропротекторных сигнальных каскадов. В связи с этим было интересно оценить влияние форсколина как активатора аденилатциклазы и продукции цАМФ на нейротоксическое действие глутамата в нейронах мозжечка крыс и определить участников данного сигнального каскада. С использованием данного подхода в экспериментах с ингибитором протеинкиназы А (РКА), блокатором протеинкиназы С — хелеритрином или блокатором кальмодулин-зависимой киназы II (СаМКII) — KN93 нам удалось определить, что в нейропротекторный эффект форсколина (1 мкМ) при долговременном (24 ч) действии глутамата (100 мкМ) вовлечены РКА и СаМКII. Дополнительный анализ динамики развития митохондриальной дисфункции при действии глутамата показал, что форсколин способен предотвращать падение митохондриального мембранного потенциала нейронов мозжечка крыс, характерного для эксайтотоксического стресса.

*Ключевые слова:* нейродегенерация, глутамат, форсколин, нейропротекция, апоптоз, митохондриальный потенциал.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 104. № 6. С. 659—664. 2018

*M. A. Ivanova, L. S. Sitnikova, T. V. Karelina, D. A. Sibarov, P. A. Abushik, S. M. Antonov.*  
NEUROPROTECTIVE EFFECT OF FORSKOLIN INFLUENCE MITOCHONDRIAL  
DYSFUNCTION IN RAT CEREBELLAR NEURONS. Sechenov Institute of Evolutionary  
Physiology and Biochemistry of the RAS, St. Petersburg, Russia, e-mail: polinaabushik@gmail.  
com.

It is commonly accepted that an increase in cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production triggers neuroprotection related signaling cascades. It was interesting to evaluate the influence of forskolin induced cAMP production by adenylate cyclase on the neurotoxic action of glutamate in rat cerebellar neurons. We also aimed to determine the participants of the involved signaling cascade. In our experiments we used protein kinase A (PKA) inhibitor, protein kinase C (PKC) inhibitor — chelerythrine, and calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) inhibitor — KN93 to determine that forskolin (1  $\mu$ M) mediated neuroprotection during long-term 24 h treatment with glutamate (100  $\mu$ M) involves PKA and CaMKII. Further analysis of mitochondrial dysfunction during glutamate treatment revealed that forskolin can prevent the drop mitochondrial membrane potential in cerebellar neurons, which is usually observed in excitotoxic stress.

*Key words:* neurodegeneration, glutamate, forskolin, neuroprotection, apoptosis, mitochondrial potential.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 104. N 6. P. 659—664. 2018

В настоящее время известно, что нейротоксическое действие глутамата приводит к нарушению ионного баланса клетки, который в свою очередь инициирует митохондриальную дисфункцию, приводящую к гибели нейрона [12]. При активации рецепторов глутамата  $\text{Ca}^{2+}$  поступает в цитоплазму не только через каналы  $\text{Ca}^{2+}$ -проницаемых ионоотропных рецепторов глутамата, но также из эндоплазматического ретикулума и митохондрий [5]. Существуют механизмы, поддерживающие ионный баланс и обеспечивающие быстрое и своевременное восстановление внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в условиях кратковременного действия глутамата, все они частично являются цАМФ-зависимыми [8].

Известно, что нейроны в условиях эксайтотоксичности накапливают  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях [15], что зависит от мембранного потенциала этих органелл и указывает на электрогенный характер транспорта  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриях. Таким образом, мембранный потенциал митохондрий может быть рассмотрен как фактор, вносящий вклад в регуляцию концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитоплазме нейрона, что должно наблюдаться и в условиях чрезмерной активации рецепторов глутамата. На данный момент стимулирование синтеза цАМФ аденилатциклазой в условиях патологии глутаматергической системы считается одним из перспективных нейропротекторных механизмов [10]. Ранее нам удалось показать, что нейродегенеративное действие глутамата и гомоцистеина предотвращается введением активаторов аденилатциклазного сигнального каскада форсколина и эндогенного пептида CGRP [1–3]. Однако вопрос определения следующих участников нейропротекторного сигнального каскада, активируемого форсколином при эксайтотоксичности в нейронах мозжечка, оставался открытым.

В данной работе нам впервые удалось определить некоторых участников, вовлеченных в реализацию нейропротекторного эффекта форсколина против длительного токсического действия глутамата и определить его положительное модулирующее действие на работу митохондрий в нейронах мозжечка крыс *in vitro*.

## МЕТОДИКА

*Приготовление первичной культуры нейронов мозжечка.* Первичную культуру нейронов мозжечка крыс получали из мозжечков эмбрионов на 20—21-й день пренатального развития (E20—E21). С целью получения суспензии клеток мозжечка выделенную ткань помещали в раствор трипсина (0.04 мг/мл) на 15 мин, а затем клетки обрабатывали раствором ДНКазы (0.04 мг/мл), ингибитором трипсина и фетальной сывороткой крупного рогатого скота. После центрифугирования производили диссоциацию клеток путем пипетирования в питательной среде. Диспергированные клетки культивировали на обработанных поли-D-лизинном 7-миллиметровых стеклах в среде Neurobasal (Gibco, США) с добавлением B27 (Gibco, США), L-глутамина (Gibco, США) и 20 мМ KCl [9].

Все эксперименты проводили в полном соответствии с требованиями Этического комитета ИЭФБ РАН (European Communities Council Directive 1986) (2010/63/ЕЕС) и правилам, изложенным в «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals».

*Оценка выживаемости нейронов.* Для измерения соотношения живых, некротических и апоптотических клеток нейроны последовательно окрашивали флуоресцентными красителями: акридиновым оранжевым (10 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США) и бромистым этидием (40 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США). Флуоресценцию измеряли на прямом сканирующем микроскопе Leica TCS SL (Leica Microsys-

tems, Германия), активируя флуорохромы лазером 488 нм. Эмиссия в зеленой части спектра 500—560 нм соответствовала ядрам живых нейронов, окрашенных АО. Эмиссия в красной части спектра > 600 нм выявляла окраску ядер некротических клеток бромистым этидием. Закисление цитоплазмы при апоптозе смещало эмиссию акридинового оранжевого в желтую область [13, 14], регистрируемую одновременно в красном и зеленом диапазонах. Полученные изображения анализировали, используя программу ImageJ, как описано ранее [11]. При проведении экспериментов стекла с культивированными клетками мозжечка на 240 мин помещали в среду содержащую 100 мкМ глутамата и/или 1 мкМ форсколина. Для сравнения групп измерений использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с постобработкой Бонферрони. Отличия считали статистически значимыми при уровне доверительной вероятности  $p < 0.05$  (см. рисунок).

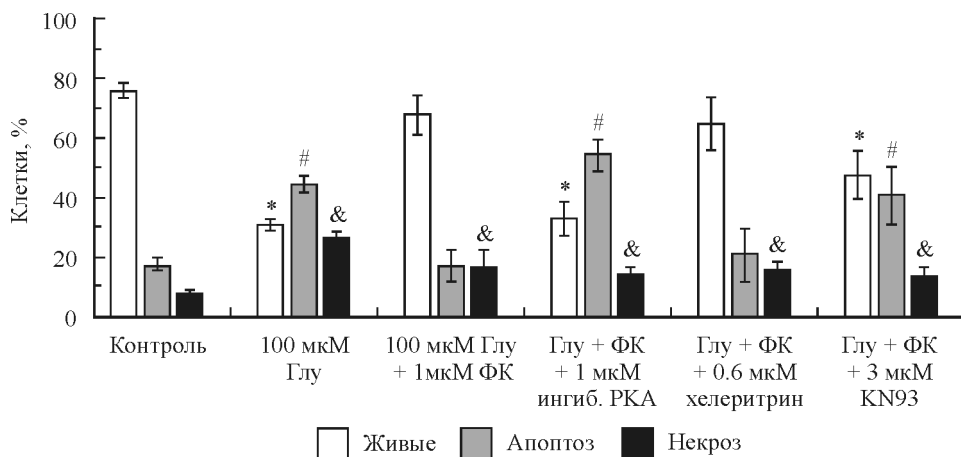
*Флуориметрическое измерение относительных значений митохондриального мембранного потенциала.* Мониторинг митохондриального мембранного потенциала осуществлялся с использованием флуоресцентного зонда родамин-123 (Invitrogen, США). Флуорофор загружали в клетки (5 мкМ, 30 мин, в темноте, 23—25 °С), а затем клетки инкубировали в течение 15 мин в темноте. Анализ изменений проводили на конфокальном микроскопе Leica SP5 MP (Leica Microsystems, Германия). Действующие вещества апплицировали на клетки с помощью системы быстрой локальной перфузии. Возбуждение флуорохрома родамин-123 осуществляли светом с длиной волны 488 нм. Эмиссию флуорохрома регистрировали в спектральном диапазоне 500—560 нм. Частота сканирования составляла 24 кадра (512 × 512 пикселей) в минуту. В качестве контроля падения митохондриального потенциала использовали протонофор carbonyl cyanide *p*-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP, 4 мкМ), который приводил к полному разобщению дыхательной цепи — падению митохондриального потенциала, вызывая тем самым максимум эмиссии родамина-123 [6].

В качестве контрольного использовали раствор следующего состава (мМ): 140 NaCl, 2 KCl, 10 HEPES, 1 CaCl<sub>2</sub>. В экспериментах использовали следующие реагенты (Sigma-Aldrich, США): 100 мкМ глутамата совместно с 30 мкМ глицина; 1 мкМ форсколина.

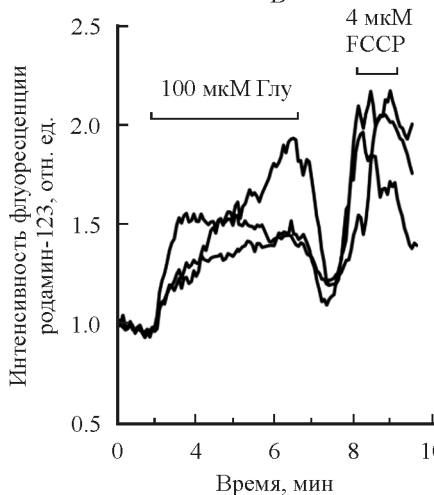
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольных условиях (после 24 ч в ростовой среде) абсолютное большинство нейронов оставалось жизнеспособными (см. рисунок, А). После 24 ч действия 100 мкМ глутамата (см. рисунок, А) количество живых нейронов значительно сокращалось из-за развития апоптоза и некроза. Если выживаемость в контроле составила  $75.0 \pm 3.2$  %, при апоптозе  $18.1 \pm 3.3$  % и некрозе  $6.9 \pm 1.7$  % ( $n = 6$ , см. рисунок, А), что соответствует нормальным физиологическим показателям для первичной культуры нейронов [9, 13], то после действия глутамата она снижалась до  $29.6 \pm 3.8$  %, а уровень апоптоза и некроза возрастал до  $44.1 \pm 2.7$  и  $25.5 \pm 2.5$  % соответственно ( $n = 6$ , см. рисунок, А). Нейротоксический эффект глутамата предотвращал 1 мкМ форсколина, который в течение 24 ч действовал совместно с агонистом. Уровень выживаемости составил  $67.5 \pm 6.8$  % ( $n = 5$ ) и достоверно не отличался от значений в контроле (см. рисунок, А). Уровень апоптоза и некроза также не отличался статистически значимо от значений в контроле и составил  $16.0 \pm 5.9$  и  $16.5 \pm 4.9$  % соответственно ( $n = 3$ , см. рисунок, А). Эксперименты с ингибитором (см. рисунок, А) протеинкиназы А (РКА, РКА inhibitor fragment 14—22, 0.6 мкМ), блокатором протеинкиназы С (РКС) — хелеритрином (1 мкМ) и ингибитором кальмодулин-зависимой киназы II типа (СаМКII) — KN93 (3 мкМ), позволили определить, что в нейропротекторный эффект форсколина в первую очередь вовлечена РКА, которая напрямую активируется цАМФ, и СаМКII, поскольку ингибиторы данных сигнальных молекул пол-

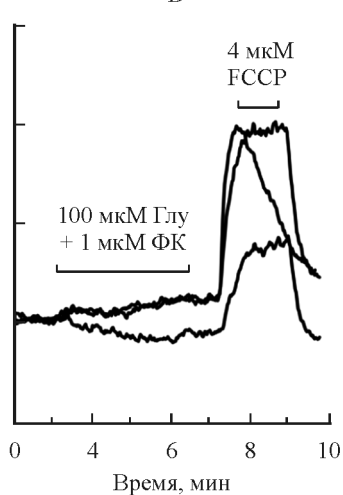
A



B



B



Блокирование нейропротекторного эффекта действия форсколина в условиях эксайтотоксичности и изменение митохондриального мембранного потенциала в нейронах мозжечка крыс *in vitro*.

A — доля живых, апоптотических и некротических нейронов после 24 ч инкубации в контроле в присутствии глутамата (Глу, 100 мкМ) и/или форсколина (ФК, 1 мкМ), ингибитора РКА (ингиб. РКА, 1 мкМ) или блокатора РКС (хелеритрин, 0.6 мкМ), или ингибитора СаМКП (KN93, 3 мкМ).  $n = 3-6$ , \*  $p < 0.05$  — количество живых клеток в контроле, %; #  $p < 0.05$  — количество апоптотических клеток контроля, %; &  $p < 0.05$  — количество некротических клеток от контроля, %. Изменение митохондриального мембранного потенциала нейронов на глутамат (B) и глутамат с форсколином (B) (представлены ответы 6 нейронов).  $n = 3$  (количество проанализированных нейронов 64).

ностью блокировали нейропротекцию. В случае действия ингибитора РКА уровень живых клеток составил  $32.5 \pm 5.5\%$ , апоптоза  $54.1 \pm 5.1\%$  и некроза  $13.5 \pm 2.7\%$  ( $n = 6$ , см. рисунок, A), при действии KN93 уровень живых клеток составил  $47.2 \pm 8.1\%$ , апоптоза  $40.2 \pm 9.6\%$  и некроза  $12.6 \pm 3.8\%$  ( $n = 4$ , см. рисунок, A). Ингибитор РКС не был эффективен в нейронах мозжечка после 24 ч действия (см. рисунок, A), тем самым исключая вовлеченность РКС в нейропротекторный механизм активации аденилатциклазы форсколином в клетках мозжечка крыс при нейродегенеративном действии глутамата. Полученные нами ре-

зультаты согласуются с данными относительно вовлеченности РКА, СаМКП в нейропротекторный эффект активации аденозинмонофосфата в условиях гипергомоцистеинемии, которая реализуется за счет чрезмерной активации NMDA и mGluR5 рецепторов глутамата ЦНС и ПНС [3, 4].

Поскольку известно, что нейродегенеративное действие глутамата сопряжено с кальциевой дисрегуляцией и митохондриальной дисфункцией [12] было интересно провести анализ изменения митохондриального мембранного потенциала при действии 1 мкМ форсколина и/или 100 мкМ глутамата. Ранее нами было показано, что в условиях эксайтотоксичности 1 мкМ форсколина способен предотвращать чрезмерный вход кальция в нейроны мозжечка и тем самым блокировать кальциевую дисрегуляцию [1], однако анализ состояния митохондрий в данных условиях не проводился.

Во всех экспериментах по анализу состояния митохондрий кратковременная (6 мин) аппликация 100 мкМ глутамата вызывала значительное снижение митохондриального мембранного потенциала, что проявлялось в увеличении интенсивности свечения флуоресцентного зонда родамин-123 (см. рисунок, Б). При действии 100 мкМ глутамата и 1 мкМ форсколина уровень мембранного митохондриального потенциала изменялся незначительно, поскольку свечение родамина-123 оставалось практически на уровне контроля (см. рисунок, В).

Можно предполагать, что здесь наблюдается цАМФ-зависимое подавление мобилизации внутриклеточного кальция из внутриклеточных депо, расположенных в митохондриях и эндоплазматическом ретикулуме [7]. Кроме того, сАМР-зависимая активация РКА приводит к фосфорилированию фактора ингибирования протонной АТФазы митохондрий [8].

Таким образом, результаты наших экспериментов показали, что дополнительная активация форсколином аденилатциклазы и цАМФ-зависимых сигнальных путей развивается при участии РКА и СаМКП киназы и предотвращает развитие митохондриальной дисфункции, характерной для эксайтотоксичности.

Работы выполнены в рамках государственного задания № АААА-А18-118012290427-7, поддержана грантом РФФИ 16-04-00653 и стипендией президента РФ.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

[1] Иванова М. А., Ситникова Л. С., Степаненко Ю. Д., Карелина Т. В., Сибаров Д. А., Абушик П. А., Антонов С. М. Форсколин как нейропротектор и модулятор глутамат-зависимого входа  $\text{Ca}^{2+}$  в нейронах мозжечка. Биологические мембраны. 2018. (В печати).

[2] Ситникова Л. С., Иванова М. А., Степаненко Ю. Д., Карелина Т. В., Гиниатуллин Р., Сибаров Д. А., Абушик П. А., Антонов С. М. Коллапс энергетического баланса нейронов мозжечка как основа нейротоксического действия L-гомоцистеина. Биологические мембраны. 2018. (В печати).

[3] Abushik P. A., Bart G., Korhonen P., Leinonen H., Giniatullina R., Sibarov D. A., Levenen A.-L., Malm T., Antonov S. M., Giniatullin R. Pro-nociceptive migraine mediator CGRP provides neuroprotection of sensory, cortical and cerebellar neurons via multi-kinase signaling. Cephalalgia. 37(14) : 1373—1383. 2017.

[4] Abushik P. A., Niitykoski M., Giniatullina R., Shakirzyanova A., Bart G., Fayuk D., Sibarov D. A., Antonov S. M., Giniatullin R. The role of NMDA and mGluR5 receptors in calcium mobilization and neurotoxicity of homocysteine in trigeminal and cortical neurons and glial cells. J. Neurochem. 129 (2) : 264—274. 2014.

[5] DiPolo R., Beauge L. An ATP-dependent  $\text{Na}^+/\text{Mg}^{2+}$  countertransport is the only mechanism for Mg extrusion in squid axons. Biochim. Biophys. Acta. 946(2) : 424—428. 1988.

[6] Duchen M. R. Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease. Pflügers Arch. 464(1) : 111—121. 2012.

[7] El-hassar L., Hagenston A. M., D'angelo L. B., Yeckel M. F. Metabotropic glutamate receptors regulate hippocampal CA1 pyramidal neuron excitability via  $\text{Ca}^{2+}$  wave-dependent activation of SK and TRPC channels. J. Physiol (Lond.). 589 : 3211—3229. 2011.

- [8] *Garcia-Bermúdez J., Sánchez-Aragó M., Soldevilla B., Del Arco A., Nuevo-Tapióles C., Cuezva J. M.* PKA phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and inactivates its capacity to bind and inhibit the mitochondrial H(+)-ATP synthase. *Cell Rep.* 12 : 2143—2155. 2015.
- [9] *Hockberger P. E., Tseng H. Y., Connor J. A.* Development of rat cerebellar Purkinje cells: electrophysiological properties following acute isolation and in long-term culture. *J. Neurosci.* 9(7) : 2258—2271. 1989.
- [10] *Huang H., Wang H., Figueiredo-Pereira M. E.* Regulating the ubiquitin/proteasome pathway via cAMP-signaling: neuroprotective potential. *Cell Biochem. Biophys.* 67(1) : 55—66. 2013.
- [11] *Józwiak-Bebenista M., Kowalczyk E., Nowak J. Z.* The cyclic AMP effects and neuroprotective activities of PACAP and VIP in cultured astrocytes and neurons exposed to oxygen-glucose deprivation. *Pharmacol. Rep.* 67 (2) : 332—338. 2015.
- [12] *Khodorov B.* Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons. *Progr. Biophys. Molec. Biol.* 86(2) : 279—351. 2004.
- [13] *Mironova E. V., Evstratova A. A., Antonov S. M.* A fluorescence vital assay for the recognition and quantification of excitotoxic cell death by necrosis and apoptosis using confocal microscopy on neurons in culture. *J. Neurosci. Methods.* 163 (1) : 1—8. 2007.
- [14] *Sibarov D. A., Bolshakov A. E., Abushik P. A., Krivoi I. I., Antonov S. M.* Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase functionally interacts with the plasma membrane Na<sup>+</sup>,Ca<sup>2+</sup>-exchanger to prevent Ca<sup>2+</sup> overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343 (3) : 596—607. 2012.
- [15] *White R. J., Reynolds I. J.* Mitochondria and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *J. Neurosci.* 15(2) : 1318—1328. 1995.

Поступила 7 IV 2018  
После доработки 17 IV 2018