

## МЕХАНИЗМ НЕЙРОПРОТЕКТОРНОГО ЭФФЕКТА АЛЛОСТЕРИЧЕСКИХ МОДУЛЯТОРОВ $\text{Ca}^{2+}$ -АКТИВИРУЕМЫХ $\text{K}^+$ -КАНАЛОВ В НЕЙРОНАХ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ МОЗЖЕЧКА

© 2017 г. Ю. Д. Степаненко\*, Т. В. Карелина, Д. А. Сибаров,  
П. А. Абушик, С. М. Антонов

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,  
194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44

\*e-mail: juli@unixway.org

Поступила в редакцию 26.01.2017

Принята к печати 15.02.2017

Показано, что аллостерические модуляторы (СуРРА и NS309)  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов малой (СК) и средней (ИК) проводимости в нейронах первичной культуры мозжечка независимо от присутствия  $\text{Mg}^{2+}$  в физиологическом растворе вызывают уменьшение вызванного активацией рецепторов глутамата входа  $\text{Ca}^{2+}$  в нейроны. При анализе выживаемости нейронов в условиях длительного (240 мин) действия глутамата обнаружено нейропротекторное действие СуРРА и NS309. Следует отметить, что при длительном воздействии глутамата присутствие  $\text{Mg}^{2+}$  во внеклеточном растворе не обеспечивает защиты нейронов от развития апоптоза. Поскольку активация СК- и ИК-каналов аллостерическими модуляторами приводит к локальной гиперполяризации мембраны и сопровождается усилением блока каналов NMDA-рецепторов наружным  $\text{Mg}^{2+}$ , а также ослаблением активации потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов, можно предполагать, что именно эти механизмы лежат в основе нейропротекторного эффекта СуРРА и NS309. Полученные данные вскрывают важную роль СК и ИК  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов нейронов мозжечка в регуляции входа  $\text{Ca}^{2+}$  в нейроны через NMDA-рецепторы и потенциал-зависимые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы.

**Ключевые слова:** первичная культура, нейроны, мозжечок, СК-каналы, кальций

DOI: 10.7868/S0233475517040077

### ВВЕДЕНИЕ

Известно, что эксайтотоксичность, сопровождающая острые патологические и хронические состояния, вызывает гибель нейронов различных отделов мозга, в том числе и мозжечка [1]. Эксайтотоксичность вызывается чрезмерной активацией рецепторов глутамата и характеризуется нарушением  $\text{Ca}^{2+}$ -гомеостаза [2]. Для разработки эффективного терапевтического подхода к лечению патологических состояний, вызванных эксайтотоксическим действием глутамата, необходимо изучение механизмов регуляции внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) и нейропротекции в нейронах. Один из возможных путей регуляции  $\text{Ca}^{2+}$  при эксайтотоксичном действии глутамата – активация  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых  $\text{K}^+$ -каналов (СК и ИК), опосредующих токи следовой гиперполяризации. Эффективное снижение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  при активации рецепторов глутамата и нейропротекторный эффект позитивных модуляторов данных каналов показаны на нейронах первичной культуры коры большого мозга в условиях вызванной глутаматом эксайтотоксичности

[3]. В экспериментах *in vivo* позитивные модуляторы (СуРРА и NS309) снижают частоту разрядов простых спайков клеток Пуркинью мозжечка мышей и крыс [4, 5]. Эти эффекты объясняются тем, что активация СК- и ИК-каналов вызывает локальную гиперполяризацию мембраны [5], что усиливает эффективность  $\text{Mg}^{2+}$  блока NMDA-рецепторов [3, 6].

Основные результаты настоящего исследования показывают, что аллостерическая модуляция СК- и ИК-каналов нейронов первичной культуры мозжечка при эксайтотоксическом стрессе существенно ограничивает нарастание внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и оказывает значительный нейропротекторный эффект, независимый от  $\text{Mg}^{2+}$  блока каналов NMDA-рецепторов.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проводили на первичной культуре нейронов, полученной из мозжечков эмбрионов крыс на 20–21 день пренатального развития (E20–E21). Диспергированные клетки культивировали

на обработанных поли-*D*-лизином стеклах (диаметром 7 мм) в среде Neurobasal (Gibco, США) с добавлением B27 (Gibco, США), *L*-глутамина (Gibco, США), 100 ед./мл смеси пенициллина-стрептомицина и 20 мМ KCl для увеличения выживаемости нейронов мозжечка [7].

Определение относительных значений  $[Ca^{2+}]_i$  в субмикромольном диапазоне проводили с использованием флуоресцентного зонда Fluo-3 (Invitrogen, США). Флуорофор загружали в клетки в форме ацетоксиметилового эфира – AM (1 мМ, 60 мин в темноте при 23–25 °С). Затем клетки инкубировали в темноте на протяжении 15 мин в физиологическом растворе (140 мМ NaCl, 2.8 мМ KCl, 2 мМ CaCl<sub>2</sub>, 10 мМ HEPES) для расщепления эфирной группы Fluo-3 AM с образованием внутри клеток непроникающего через мембрану Fluo-3. Для проведения флуориметрических измерений на инвертированном сканирующем конфокальном микроскопе Leica SP5 MP (Leica Microsystems, Германия) покровные стекла с клетками переносили в перфузионную камеру ROСmini Chamber System (LaCon, Германия), которую подключали к системе общей и быстрой локальной перфузии. Действующие вещества апплицировали на клетки с помощью быстрой локальной перфузии. Возбуждение флуорохрома Fluo-3 осуществляли светом аргонового лазера с длиной волны  $\lambda_{ex} = 488$  нм. Эмиссию флуорохрома регистрировали в диапазоне  $\lambda_{em} = 500–560$  нм. Частота сканирования составляла 24 кадра (512 × 512 пикселей)/мин.

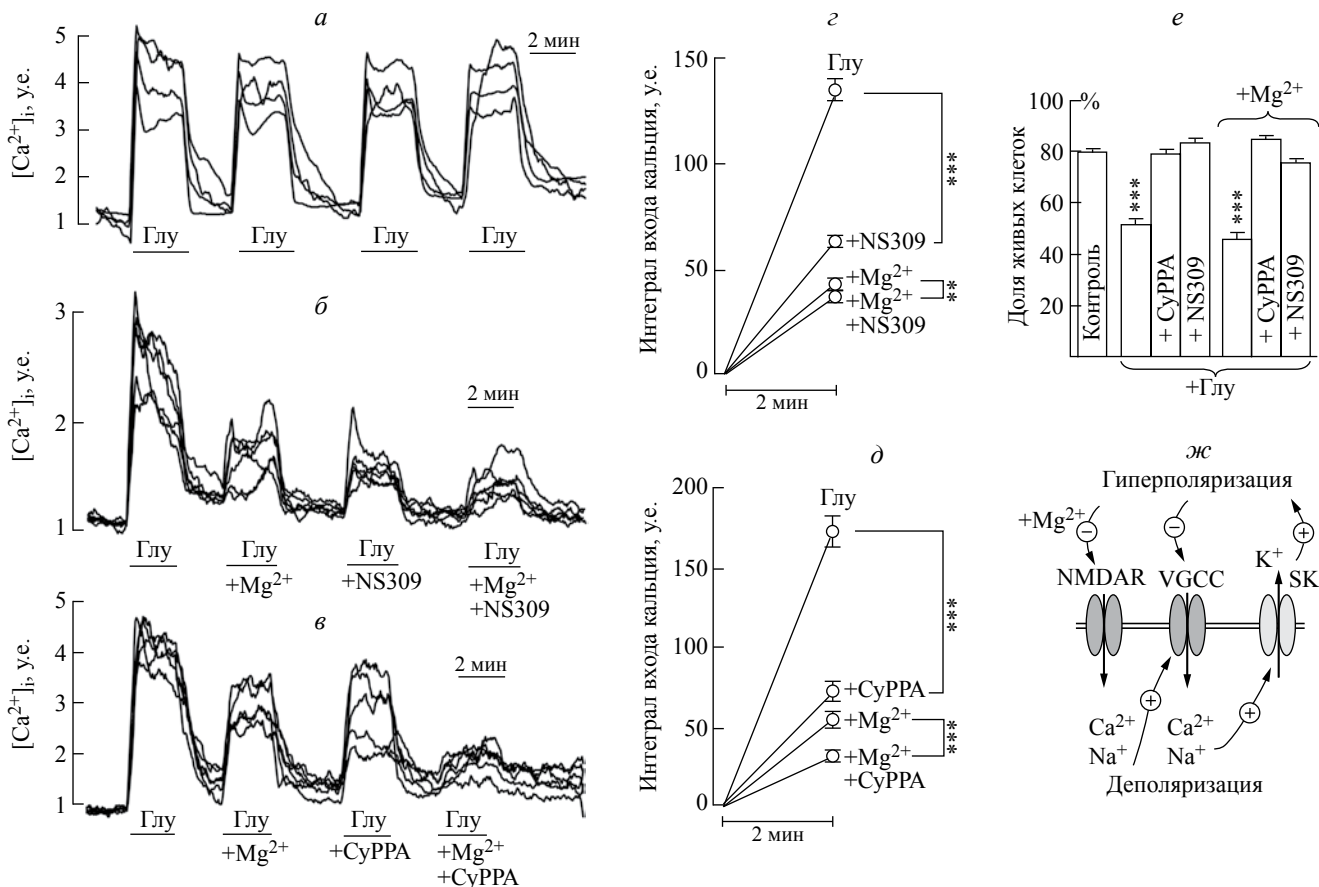
Живые, некротические и апоптотические нейроны выявляли с использованием конфокальной сканирующей микроскопии клеток, которые последовательно окрашивали флуоресцентными красителями: акридиновым оранжевым (АО, 10 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США) и бромистым этидием (БЭ, 40 мкг/мл, Sigma-Aldrich, США). Флуоресценцию измеряли на прямом конфокальном сканирующем микроскопе Leica TCS SL (Leica Microsystems, Германия), активируя флуорохромы светом длиной волны  $\lambda_{ex} = 488$  нм и регистрируя эмиссию в областях 500–560 нм и > 600 нм. Ядра нейронов с разрушенной мембранной, характерной для некроза, окрашивались БЭ и светились красным светом. Ядра живых нейронов окрашивались АО и светились зеленым. При апоптозе, когда происходит закисление цитоплазмы клетки и эмиссия АО смещается в желтую область спектра, ядра светились оранжевым цветом [8, 9]. Полученные изображения анализировали, используя программу ImageJ, как описано ранее [9]. При проведении экспериментов стекла с культивируемыми нейронами на 240 мин помещали в соответствующие растворы. В качестве контроля использовали раствор следующего состава: 112 мМ NaCl, 20 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 22 мМ глюкозы. Ниже приведен список реагентов и их концентрации: 100 мМ глутамат (Глу) (Sigma-Aldrich, США) применяли совместно с 30 мМ глицином (Sigma-Aldrich, США). Также использовали

10 мМ NS309 (позитивный модулятор SK1-, SK2-, SK3- и IK-каналов) (Tocris, США), 10 мМ СуРРА (позитивный модулятор SK2, SK3) (Tocris, США), 1 мМ Mg<sup>2+</sup>. Для сравнения групп измерений использовали дисперсионный анализ (ANOVA) с пост-тестом Бонферрони. Отличия считали статистически значимыми при уровне доверительной вероятности  $p < 0.05$  (\*) или  $p < 0.01$  (\*\*) или  $p < 0.001$  (\*\*\*).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Последовательные аппликации глутамата вызывали равновеликое увеличение флуоресцентного Ca<sup>2+</sup>-сигнала нейронов (рисунок *а*). Для относительной оценки количества Ca<sup>2+</sup>, вошедшего в клетки за время аппликации веществ (рисунок *б*, *в*), вычисляли площадь под кривой, описывающей изменение интенсивности флуоресценции. Сравнение накопления Ca<sup>2+</sup> при аппликации глутамата в растворе без Mg<sup>2+</sup> и с Mg<sup>2+</sup> в сомах нейронов показало, что в Mg<sup>2+</sup>-содержащей среде изменение  $[Ca^{2+}]_i$  было значимо ( $p < 0.001$ ,  $n = 4$ ) меньше, чем в растворе без Mg<sup>2+</sup> (рисунок *г*, *д*). Сравнение накопления Ca<sup>2+</sup> при подаче глутамата в отсутствие и в присутствии СуРРА или NS309 показало, что накопление Ca<sup>2+</sup> при подаче глутамата с СуРРА или с NS309 было меньше, чем в отсутствие положительных модуляторов ( $p < 0.001$ ,  $n = 4$ ). Накопление Ca<sup>2+</sup> при аппликации глутамата с СуРРА ( $p < 0.001$ ,  $n = 4$ ) или с NS309 в присутствии Mg<sup>2+</sup> ( $p < 0.01$ ,  $n = 4$ ) (рисунок *г*, *д*) было статистически значимо ниже, чем при аппликации тех же веществ в физиологическом растворе без Mg<sup>2+</sup>, а также только глутамата в присутствии Mg<sup>2+</sup>. Результаты, полученные с использованием флуоресцентного витально-го теста, показали, что выживаемость нейронов (содержание (%) нейронов во всей популяции, не подверженных некрозу и не проявляющих признаков апоптоза) после 240 мин инкубации в контрольном растворе составляло  $79.4 \pm 1.4\%$  ( $n = 12$ , рисунок *е*). Действие 100 мМ глутамата в течение 240 мин приводило к снижению этого показателя до  $51.0 \pm 4.0\%$  ( $p < 0.001$ ,  $n = 8$ ). При сочетанном действии 100 мМ глутамата и аллостерических модуляторов СуРРА или NS309 значения выживаемости нейронов культуры мозжечка были следующими: глутамат с СуРРА –  $79.0 \pm 1.5\%$ ; глутамат с NS309 –  $83.0 \pm 1.6\%$  ( $n = 8$  в каждой группе), и не отличались значимо от контроля (рисунок *е*). Добавление Mg<sup>2+</sup> к действующим веществам не влияло существенно на количество выживших нейронов.

Так как активация SK- и IK-каналов приводит к локальной гиперполяризации мембраны, их аллостерическая модуляция может влиять на активность расположенных рядом потенциал-зависимых ионных каналов (рисунок *ж*). Полученные нами данные показали, что применение



Влияние позитивной модуляции SK- и IK-каналов на концентрацию внутриклеточного кальция и выживаемость нейронов мозжечка. Кальциевые ответы нейронов на глутамат: *а* – контрольная запись четырех последовательных аппликаций (показаны четыре нейрона); *б* – в присутствии и в отсутствие магния и NS309 (показаны четыре нейрона) или CyPPA (*в*, представлены четыре нейрона), *n* = 4. *г* и *д* – интегральные значения входа кальция при двухминутной аппликации веществ. *е* – доля живых нейронов после 240 мин инкубации в контроле и в присутствии глутамата (Глу – глутамат 100 мкМ + глицин 30 мкМ) в различных комбинациях: с Mg<sup>2+</sup> (1 мМ), NS309 (10 мкМ) или CyPPA (10 мкМ), *n* = 8. *ж* – Схема локального взаимодействия SK-каналов (SK), NMDA-рецепторов (NMDAR) и потенциал-зависимых кальциевых каналов (VGCC) в мембране нейронов мозжечка. Гиперполяризация при активации SK-каналов вызывает ослабление активации VGCC и усиление блока наружным Mg<sup>2+</sup> каналов NMDA-рецепторов. “+” и “-” обозначают положительную и отрицательную модуляции. Статистическая значимость различий: ANOVA *p* < 0.05 (\*), *p* < 0.01 (\*\*), *p* < 0.001 (\*\*\*)

аллостерических модуляторов SK- и IK-каналов в среде без Mg<sup>2+</sup> при активации рецепторов глутамата приводит к уменьшению изменения  $[Ca^{2+}]_i$ , что может быть следствием уменьшения вероятности активации потенциал-зависимых Ca<sup>2+</sup>-каналов (VDCC). Ранее был обнаружен существенный вклад VDCC в изменение внутриклеточной концентрации Ca<sup>2+</sup> в зернистых клетках мозжечка при активации рецепторов глутамата [10]. Имеются данные о колокализации SK-каналов и VDCC в клетках Пуркинье мозжечка [11]. Однако наименьшим изменением внутриклеточной концентрации Ca<sup>2+</sup> было при аппликации аллостерических модуляторов SK-каналов в Mg<sup>2+</sup>-содержащем растворе. Это может объясняться влиянием модуляции SK-каналов на потенциал-зависимый Mg<sup>2+</sup> блок в случае колокализации SK-каналов

и NMDA-рецепторов. Такая колокализация характерна для ЦНС. В частности, в шипиках пирамидных нейронов гиппокампа SK-каналы пространственно колокализованы и функционально взаимодействуют как с NMDA-рецепторами, так и с VGCC [12, 13]. При объяснении эффектов аллостерических модуляторов следует также учитывать, что накопление внутриклеточного Ca<sup>2+</sup> в областях экспрессии NMDA-рецепторов может вызывать Ca<sup>2+</sup>-зависимую инактивацию последних [14].

Результаты наших экспериментов показали, что аллостерическая модуляция SK- и IK-каналов оказывала нейропротекторный эффект в условиях эксайтотоксического действия глутамата. Этот эффект не зависел от присутствия ионов Mg<sup>2+</sup> и, вероятно, объясняется восстановлением нормального

функционирования  $\text{Ca}^{2+}$  гомеостатических внутриклеточных систем через уменьшение вероятности активации потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов. В частности, показано, что вызванная глутаматом нейротоксичность сопровождается снижением уровня экспрессии SK2-каналов, при совместной аппликации глутамата и NS309 экспрессия SK2-каналов сохранялась на прежнем уровне [3]. Следует заметить, что в случае NS309, но не СуРРА описано прямое частичное ингибирование VGCC при значительной деполяризации мембраны [15], что также может способствовать подавлению кальциевого сигнала нейронов на аппликацию глутамата в присутствии NS309.

Таким образом, гиперактивация рецепторов глутамата в нейронах мозжечка вызывает вход кальция в цитоплазму через ионотропные рецепторы глутамата, а также деполяризацию нейронов и дополнительный вход кальция через VGCC. Применение аллостерических модуляторов  $\text{Ca}^{2+}$ -активируемых калиевых каналов гиперполяризует мембрану нейронов мозжечка и предотвращает их гибель за счет ограничения входа кальция в цитоплазму через потенциал-зависимые ионные каналы (VGCC) и NMDA-рецепторы.

Работа поддержана РФФИ (гранты 15-04-08283 и 16-04-00653) и средствами государственного бюджета по госзаданию на 2013–2017 годы № 01201351571. Эксперименты проведены на базе центра коллективного пользования ИЭФБ РАН.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Slemmer J.E., De Zeeuw C. I., Weber J. T. 2005. Don't get too excited: mechanisms of glutamate-mediated Purkinje cell death. *Prog. Brain Res.* **148**, 367–390.
- Abushik P.A., Sibarov D. A., Eaton M. J., Skatchkov S. N., Antonov S. M. 2013. Kainate-induced calcium overload of cortical neurons *in vitro*: dependence on expression of AMPAR GluA2-subunit and down-regulation by subnanomolar ouabain. *Cell Calcium*, **54** (2), 95–104.
- Dolga A.M., Terpolilli N., Kepura F., Nijholt I. M., Knaus H-G., D'Orsi B., Prehn J. H.M., Eisel T., Plant U. L.M., Plesnila N., Culmsee C. 2011.  $\text{K}_{\text{Ca}2}$  channels activation prevents  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  deregulation and reduces neuronal death following glutamate toxicity and cerebral ischemia. *Cell Death Dis.* **2**(4), e147.
- Егорова П.А., Карелина Т.В., Власова О.Л., Антонов С.М., Безпрозванный И.Б. 2014. Влияние модуляторов SK каналов на частоту простых спайков в разряде клеток Пуркинье мозжечка лабораторных мышей. *Журн. эвол. биохим. и физиол.* **50** (2), 102–108.
- Karelina T.V., Stepanenko Yu.D., Abushik P. A., Sibarov D. A., Antonov S. M. 2016. Down regulation of Purkinje cell activity by modulators of small conductance calcium-activated potassium channels in rat cerebellum. *Acta Naturae.* **8** (4), 91–99.
- Lam J., Coleman N., Garing A. L.A., Wulff H. 2013. The therapeutic potential of small-conductance  $\text{KCa}2$  channels in neurodegenerative and psychiatric diseases. *Expert Opin. Ther. Targets.* **17** (10), 1203–1220.
- Hockberger P.E., Tseng H. Y., Connor J. A. 1989. Development of rat cerebellar Purkinje cells: electrophysiological properties following acute isolation and in long-term culture. *J. Neurosci.* **9** (7), 2258–2271.
- Mironova E.V., Evstratova A. A., Antonov S. M. 2007. 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.
- Sibarov D.A., Bolshakov A. E., Abushik P. A., Kriyovoi I. I., Antonov S. M. 2012.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase functionally interacts with the plasma membrane  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -exchanger to prevent  $\text{Ca}^{2+}$  overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **343** (3), 596–607.
- D'Angelo E., Filippi G. D., Rossi P., Taglietti V. 1997. Synaptic activation of  $\text{Ca}^{2+}$  action potentials in immature rat cerebellar granule cells *in situ*. *J. Neurophysiol.* **78** (3), 1631–1642.
- Indriaiti D.W., Kamasawa N., Matsui K., Meredith A. L., Watanabe M., Shigemoto R. 2013. Quantitative localization of Cav2.1 (P/Q-type) voltage-dependent calcium channels in Purkinje cells: somatodendritic gradient and distinct somatic coclustering with calcium-activated potassium channels. *J. Neurosci.* **33** (8), 3668–3678.
- Bloodgood B.L., Sabatini B. L. 2008. Regulation of synaptic signalling by postsynaptic, non-glutamate receptor ion channels. *J. Physiol.* **586** (6), 1475–1480.
- Ngo-Anh T.J., Bloodgood B. L., Lin M., Sabatini B. L., Maylie J., Adelman J. P. 2005. SK channels and NMDA receptors form a  $\text{Ca}^{2+}$ -mediated feedback loop in dendritic spines. *Nat. Neurosci.* **8**, 642–649.
- Sibarov D.A., Abushik P. A., Poguzhelskaya E. E., Bolshakov K. V., Antonov S. M. 2015. Inhibition of plasma membrane  $\text{Na}/\text{Ca}$ -exchanger by KB-R7943 or lithium reveals its role in Ca-dependent NMDAR inactivation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **355** (3), 484–495.
- Morimura K., Yamamura H., Ohya S., Imaizumi Y. 2006. Voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$ -channel block by openers of intermediate and small conductance  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channels in urinary bladder smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Sci.* **100** (3), 237–241.

## The Mechanism of Neuroprotection by Positive Modulation of Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels of Cerebellar Neurons in Primary Culture

Yu. D. Stepanenko\*, T. V. Karelina, D. A. Sibarov, P. A. Abushik, S. M. Antonov

*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,  
pr. Toreza 44, St. Petersburg, 194223 Russia*

*\*e-mail: juli@unixway.org*

Here we show that positive modulators (CyPPA and NS309) of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels of small (SK) and intermediate (IK) conductances in cerebellar neurons decrease glutamate-evoked Ca<sup>2+</sup> entry into neurons independently of the Mg<sup>2+</sup> presence in the extracellular media. An analysis of neuronal viability after long-term (240 min) glutamate treatments demonstrated a neuroprotective action of CyPPA and NS309. Extracellular Mg<sup>2+</sup> did not protect neurons from apoptosis during prolonged treatment with glutamate. Activation of SK and IK channels results in local membrane hyperpolarization, which enhances Mg<sup>2+</sup> block of NMDA receptors and reduces activation of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels, which can explain neuroprotection caused by CyPPA or NS309. The obtained results reveal an important role of SK and IK Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in regulation of Ca<sup>2+</sup> entry into cerebellar neurons via NMDA receptors and voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels.

**Keywords:** primary culture, neurons, cerebellum, SK-channels, calcium