

УДК 576.32/.36;57.085.23;57.053.2;577.352.465

ДОЗОЗАВИСИМЫЙ ХАРАКТЕР АНТИАПОПТОТИЧЕСКОГО И ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ УАБАИНА В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕЙРОНОВ КОРЫ КРЫСЫ

© 2012 г. А. Е. Большаков¹, Д. А. Сибаров^{2*}, П. А. Абушик¹, И. И. Кривой², С. М. Антонов¹

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44;

* электронная почта: dsibarov@gmail.com

²Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

Поступила в редакцию 17.04.2012 г.

Исследовали влияние уабаина в концентрации 0.01–1 нМ на выживаемость нейронов в условиях эксайтотоксического стресса и собственный эффект более высоких концентраций уабаина (10 нМ–30 мкМ). Выживаемость нейронов оценивали при помощи теста витальной окраски, позволяющего различать живые, апоптотические и некротические клетки, а также по уровню экспрессии белка Bcl-2. Эксайтотоксический стресс вызывали, воздействуя на нейроны агонистами ионотропных рецепторов глутамата (NMDA и каината) в насыщающих концентрациях в течение 240 мин. Исследования проводили на первичной культуре нейронов коры головного мозга крыс (7–14 дней в культуре, DIV). Воздействие NMDA (30 мкМ) вызывало апоптоз в $45 \pm 9\%$ ($n = 5$) нейронов, а каината (30 мкМ) – в $52 \pm 5\%$ ($n = 5$). В условиях эксайтотоксического стресса наблюдался антиапоптотический эффект сверхмалых концентраций уабаина (0.01–1 нМ), который сопровождался восстановлением экспрессии белка Bcl-2 и снижением количества апоптотических нейронов до контрольного уровня, равного примерно 10% ($n = 5$). Неспособность уабаина в данном диапазоне концентраций ингибировать насосную функцию Na^+ , K^+ -АТФ-азы (НКА) свидетельствует о сигнальной роли НКА в нейротропном эффекте уабаина. Собственное токсическое действие уабаина проявлялось при более высоких концентрациях (10 нМ–30 мкМ, 240 мин) и выражалось в гибели около 45% нейронов путем некроза, но не апоптоза. Низкий уровень пороговой концентрации токсического действия уабаина (10 нМ) соответствует его способности ингибировать уабаин-чувствительную $\alpha 3$ -изоформу НКА. Таким образом, выявлен бимодальный эффект уабаина. Антиапоптотическое действие уабаина проявлялось в условиях эксайтотоксического инсульта при концентрации 0.01–1 нМ. Собственное токсическое действие уабаина наблюдалось при более высоких его концентрациях за счет ингибирования насосной функции НКА. Обнаруженная гетерогенность чувствительности нейронов к токсическому действию уабаина связана, предположительно, с различиями в экспрессии $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ -изоформ НКА пирамидными и вставочными нейронами.

Ключевые слова: Na^+ , K^+ -АТФ-аза, уабаин, апоптоз, кортикальные нейроны, рецепторы глутамата.

Na^+ , K^+ -АТФ-аза (НКА) – интегральный мембранный фермент, основная функция которого заключается в поддержании трансмембранных градиентов Na^+ и K^+ за счет их активного транспорта. Кардиотонические стероиды (КС), в частности уабаин, являются высокоспецифичными ингибиторами НКА. В относительно больших дозах эти лиганды вызывают деполяризацию мембраны и из-за нарушения трансмембранных градиентов Na^+ и K^+ тормозят работу ряда других важных транспортных механизмов клетки, включая натрий-зависимый захват глутамата [1]. Сходные нарушения функции НКА наблюдаются при ишемии, приводящей к кислородному голоданию нейронов и сопутствующему дефициту выработки АТФ. Связанное с этим избыточное на-

копление глутамата в синаптической щели и межклеточном пространстве в результате усиления некантовой секреции нейромедиатора [2] приводит к гиперактивации ионотропных рецепторов глутамата и нескомпенсированному входу ионов Na^+ и Ca^{2+} в цитоплазму. Высокая концентрация свободного внутриклеточного Ca^{2+} усиливает секрецию глутамата, формируя положительную обратную связь, что приводит нейроны в состояние эксайтотоксичности. Распространенной моделью для изучения эксайтотоксичности служит первичная культура нейронов коры в условиях действия насыщающих концентраций агонистов ионотропных рецепторов глутамата N-метил-D-аспартата (NMDA) и каината (КА) [3–5]. Несмотря на различия механизмов эксайтоток-

сичности, вызываемой гиперактивацией рецепторов NMDA или AMPA/КА, преимущественным механизмом гибели нейронов в обоих случаях является апоптоз [6].

На культуре нейронов мозжечка крыс было показано, что уже в концентрации 10 нМ убаин ингибирует NKA. В присутствии 100 нМ и 1 мкМ убаина активность NKA снижается до 80 и 50% соответственно [7]. При дальнейшем увеличении концентрации КС усиливается и гибель клеток, связанная с чрезмерной деполяризацией клеточной мембраны. Однако в сверхмалых концентрациях КС вызывают совершенно другие эффекты, в частности, могут усиливать активность NKA [8]. В опытах *in vivo* было показано, что микроинъекция убаина в стриатум крысы статистически значимо повышает выживаемость нейронов и экспрессию в них антиапоптотического белка Bcl-2 при нейротоксическом действии каината [9]. Аналогичные данные получены *in vitro* в первичной культуре нейронов коры крысы, в которых при действии токсических концентраций избирательного агониста ионотропных рецепторов глутамата NMDA-типа существенно снижается продукция белка Bcl-2 и многократно усиливается гибель нейронов, главным образом в результате апоптоза. При добавлении в среду 0.1 или 1 нМ убаина экспрессия Bcl-2 и выживаемость нейронов восстанавливались до контрольных значений [10].

Мы полагаем, что нейропротекторная активность КС, наблюдаемая в области наномолярных концентраций, обусловлена тем, что КС вызывают два независимых эффекта, реализуемых через NKA — ингибируют насосную функцию и включают сигнальную функцию, активирующую внутриклеточные каскады [10–13]. Высокий потенциал КС в качестве средств, препятствующих гибели нейронов, заставляет нас подробнее изучить механизмы цитотоксического действия КС, которое проявляется при их высоких концентрациях. Кроме того, широкий диапазон концентраций в которых наблюдаются цитопротекторные свойства убаина [12, 14, 15], ставит вопрос об определении оптимальной эффективной концентрации КС и, в частности, убаина.

В настоящей работе изучен механизм действия убаина в концентрации от 0.01 нМ до 30 мкМ на функциональное состояние нейронов. В качестве маркеров выживаемости использовали тест витальной окраски, позволяющий различать живые, апоптотические и некротические нейроны [16], а также уровень экспрессии клетками белка Bcl-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на первичной культуре нейронов коры большого мозга крыс, полученной из эмбрионов на 16-й день пренатального развития, т.е. в момент, когда кора почти не содержит глиальных клеток. Крыс усыпляли инга-

ляцией CO₂, что соответствует этическим нормам работы с животными при проведении экспериментов и правилам, утвержденным комитетом по этике ИЭФБ РАН. Клетки культивировали в питательной среде на стеклах, предварительно обработанных поли-D-лизином. Эксперименты проводили на 7–14-й день культивирования. Использовали физиологический раствор следующего состава (мМ): NaCl 140, KCl 2.8, CaCl₂ 1, MgCl₂ 1, NEPES 10 (pH 7.2–7.4). Отсутствие глюкозы в растворе, как показано нами ранее [16], не приводило к снижению выживаемости нейронов в течение 5 ч. Для того, чтобы исключить нейропротекторный эффект ионов магния, блокирующих входящие токи через каналы рецепторов NMDA [17], в опытах с NMDA использовали безмагниевого раствор. Агонисты ионотропных рецепторов глутамата NMDA или каинат добавляли в перфузионный раствор в конечной концентрации 30 мкМ. NMDA всегда применяли в сочетании с равным количеством глицина, являющегося коагонистом NMDA-рецепторов.

Изучение нейронов проводили в контрольных условиях (без добавок), в присутствии агонистов рецепторов глутамата без убаина и в сочетании с убаином (в концентрациях 0.01 нМ–1 нМ), а также в присутствии убаина (в концентрациях от 1 нМ до 30 мкМ) без агонистов рецепторов глутамата. Количественную оценку гибели нейронов осуществляли при помощи витального теста, заключающегося в последовательном окрашивании нейронов акридиновым оранжевым (0.001%) и бромистым этидием (0.001%), по 1 мин каждым [16]. Такая процедура позволяет разделить клетки на три группы — живые, погибшие в результате некроза и находящиеся в процессе апоптоза. Бромистый этидий — краситель с красной флуоресценцией, окрашивает только некротические клетки с нарушенной мембраной, но не проникает в живые или апоптотические. Акридиновый оранжевый проходит через клеточную мембрану и вызывает зеленую флуоресценцию ядер живых клеток. В случае апоптоза и сопутствующего ему закисления цитозоля флуоресценция смещается в оранжевую область. Для оценки соотношения живых, некротических и апоптотических нейронов делали снимки культуры клеток в красной и зеленой областях спектра. По полученной паре снимков строили двумерную диаграмму, в которой по осям располагали яркости пикселей в красной и зеленой областях. Точки на диаграмме соответствовали отличным от нуля значениям интенсивности флуоресценции. Установка шумовых порогов, отсекающих пиксели со слишком слабым свечением, позволила выделить на диаграмме четыре области: 1) пиксели с красной флуоресценцией (600–800 нм) от некротических клеток; 2) пиксели с зеленым свечением (500–560 нм), соответствующие живым нейронам; 3) пиксели с колокализованным свечением в красной и зеле-

ной областях, т.е. апоптотические клетки; 4) пиксели со свечением ниже шумового порога в обеих областях, исключаемые из рассмотрения. Количество пикселей в каждой из областей было пропорционально общей площади, занимаемой на препарате ядрами живых, апоптотических и некротических нейронов.

Перед витальной окраской или фиксацией стекла с нейронами инкубировали в течение 240 мин в физиологическом растворе (контроль) или в растворах, содержащих агонисты рецепторов глутамата (NMDA или каинат) отдельно или в комбинации с убаином, либо только убаин в различных концентрациях. Для иммуноцитохимического определения клетки Vcl-2 фиксировали в растворе 4% параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 30 мин. После фиксации клетки дважды (по 15 мин) отмывали PBS. Перед обработкой 2% бычьим сывороточным альбумином клетки обрабатывали тритоном X-100 (0.2%) в течение 15 мин, затем отмывали PBS и обрабатывали поликлональными антителами кроликов (разведение 1 : 100) к Vcl-2 на протяжении 12 ч при температуре 4°C. После отмывки от первичных антител наносили вторичные (разведение 1 : 150), конъюгированные с флуорохромом — фикоэритрином (Phg). Реакцию с вторичными антителами проводили в течение 40 мин при температуре 23°C. В работе использовали антитела производства Abscam plc (Великобритания) и реагенты производства Sigma-Aldrich Co.

Изображения нейронов получены на конфокальном микроскопе Leica SP5 MF (Германия). Флуорохромы активировали аргоновым лазером с длиной волны 488 нм (мощность освещения в фокальной плоскости менее 3 мВт). Зеленую флуоресценцию регистрировали в диапазоне 500–560 нм, красную — в диапазоне 600–800 нм. Эмиссию Phg регистрировали в красной области спектра (максимум излучения 620 нм). На снимках подсчитывали количество клеток, иммунопозитивных в отношении Vcl-2, и клеток, не экспрессирующих этот белок. Диаграммы колокализации свечения акридинового оранжевого и бромистого этидия строили автоматически при помощи разработанного нами плагина (<http://sibarov.ru/index.php?slab=software>) для программы анализа изображений ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием двухфакторного дисперсионного анализа с поправкой Бонферрони. Уровень доверительной вероятности, при котором различия считали статистически значимыми, не превышал 0.05. В тексте и на рисунках приведены средние значения величин с их стандартными ошибками.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Применение витального теста на культуре нейронов коры мозга крыс в контроле позволило оценить соотношение живых, апоптотических и некротических клеток. График совместного распределения интенсивности флуоресценции в зеленой и красной областях спектра указывает на абсолютное преобладание живых нейронов ($79 \pm 9\%$, $n = 5$) (рис. 1а,б), т.е. в контроле практически не наблюдается колокализация зеленого и красного свечения, что говорит о неповрежденности мембран клеток. В небольшом проценте ядер нейронов выявлен сдвиг флуоресценции акридина в желтую область, что является индикатором начальных стадий закисления цитозоля, связанного с апоптозом.

В модели эксайтотоксического стресса, вызываемого 30 мкМ NMDA или 30 мкМ КА, через 240 мин после начала воздействия доля апоптотических клеток увеличивалась статистически значимо ($p < 0.001$, $n = 5$) (рис. 1). Добавление убаина оказывало нейропротекторное дозозависимое действие. На фоне как NMDA (рис. 1а), так и КА (рис. 1б) с добавлением 0.1 или 1 нМ убаина значимо ($p < 0.01$, $n = 4$) повышалась доля живых нейронов до уровня, статистически неотличимого от контрольных значений. Сравнение выживаемости нейронов при действии как одного КА, так и с добавлением убаина, выявило нейропротекторный эффект убаина, начиная с концентрации 0.01 нМ ($p < 0.05$, $n = 4$). На фоне NMDA убаин в концентрации 0.01 нМ не влиял на выживаемость нейронов в отличие от КА. По-видимому, 0.01 нМ является пороговой концентрацией, с которой начинает проявляться антиапоптотическое действие убаина на нейроны коры. Несмотря на существование различий в механизмах клеточной смерти, вызываемой активацией NMDA- или AMPA/КА-рецепторов [6], в обоих случаях убаин в концентрации 0.01–1 нМ повышал выживаемость нейронов, главным образом, за счет подавления апоптоза. Важно, что доля нейронов, погибших в результате некроза, достоверно не изменялась (рис. 1).

Таким образом, добавление агонистов ионотропных рецепторов глутамата в насыщающей концентрации вызывает гибель нейронов именно по пути апоптоза, а не некроза. Выраженные антиапоптотические свойства убаина проявляются, начиная с концентрации 0.1 нМ, однако это не влияет на вероятность некроза клеток.

Гибель нейронов при гиперактивации ионотропных рецепторов глутамата чаще всего происходит в результате нарушения работы митохондрий [18]. Хорошим индикатором нарушения работы митохондрий при апоптозе служит экспрессия белка Vcl-2, внутриклеточного регулятора энергетического метаболизма клеток. Высокая в норме экспрессия этого белка значительно снижается при апоптозе [19]. В следующей серии опытов мы изучали влияние убаина в различных концентраци-

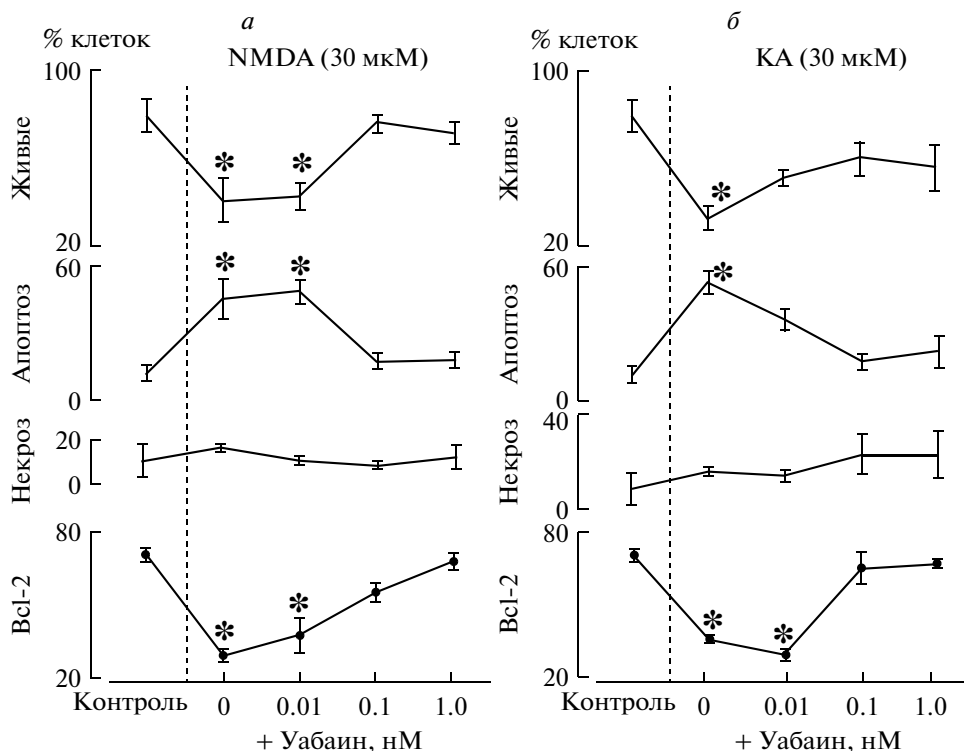


Рис. 1. Зависимость нейропротекторного эффекта уабаина от его концентрации в условиях эксайтотоксического инсульта. Воздействие 30 мкМ NMDA или 30 мкМ КА в течение 240 мин (*a* и *б* соответственно). Показано соотношение живых, апоптотических и некротических нейронов, а также доля клеток, экспрессирующих белок Bcl-2. Каждая точка на графике представлена усредненными данными по пяти опытам (600–700 клеток). *Данные статистически значимо отличаются ($p < 0.001$, $n = 5$) от контрольного уровня и от уровня, соответствующего применению агонистов вместе с 0.1 или 1 нМ уабаина.

я на экспрессию белка Bcl-2 в моделях эксайтотоксического стресса, вызванного NMDA или КА. В контроле в большинстве нейронов Bcl-2 экспрессировался на высоком уровне. При экспозиции клеток в течение 4 ч в присутствии 30 мкМ NMDA или КА экспрессия Bcl-2 статистически значимо ($p < 0.001$, $n = 5$) снижалась (рис. 1). Однако экспрессия Bcl-2 не снижалась при совместной инкубации агонистов с 0.1 или 1 нМ уабаина. Более низкая концентрация уабаина 0.01 нМ была неэффективной. Как видно из рис. 1, такие параметры, как уровень экспрессии Bcl-2 и количество живых нейронов синхронно уменьшаются при аппликации NMDA или КА, и так же синхронно возвращаются к контрольному уровню при аппликации агонистов вместе с уабаином. Это говорит о высокой взаимной зависимости выживаемости нейронов от уровня экспрессии Bcl-2, характеризующего эффективность работы митохондрий, и указывает на то, что при эксайтотоксическом стрессе аппликация уабаина в субнанолярных концентрациях приводит к восстановлению работы митохондрий, что одновременно снижает вероятность перехода нейронов к апоптозу.

Итак, как и при использовании витального теста, подсчет числа нейронов, иммунопозитивных в отношении Bcl-2, показал, что наибольшим ан-

тиапоптотическим эффектом обладал уабаина в концентрации 0.1–1 нМ. При более низкой концентрации уабаина экспрессия Bcl-2 не восстанавливалась, но была пороговой для повышения выживаемости клеток в использованной модели нейротоксического стресса.

При определении верхней границы концентраций уабаина, безопасных для применения на нейронах коры головного мозга, следовало принимать во внимание нейротоксичность самого уабаина как ингибитора NKA. В следующей серии опытов мы оценивали влияние уабаина в возрастающих концентрациях (1, 10 и 100 нМ, 1 и 30 мкМ) на выживаемость нейронов.

Как сказано выше, уабаин в концентрации 1 нМ наиболее эффективно противодействовал нейротоксическому действию агонистов ионотропных рецепторов глутамата. На рис. 2*a* видно, что воздействие 1 нМ уабаина в течение 240 мин не вызывает заметных сдвигов в выживаемости нейронов. Диаграммы распределения флуоресценции (рис. 2*б*) показывают практически идентичную картину жизнеспособности нейронов в контроле и при воздействии 1 нМ уабаина.

Токсичными оказались концентрации уабаина, начиная с 10 нМ. При этой концентрации уабаина доля некротических клеток увеличивалась

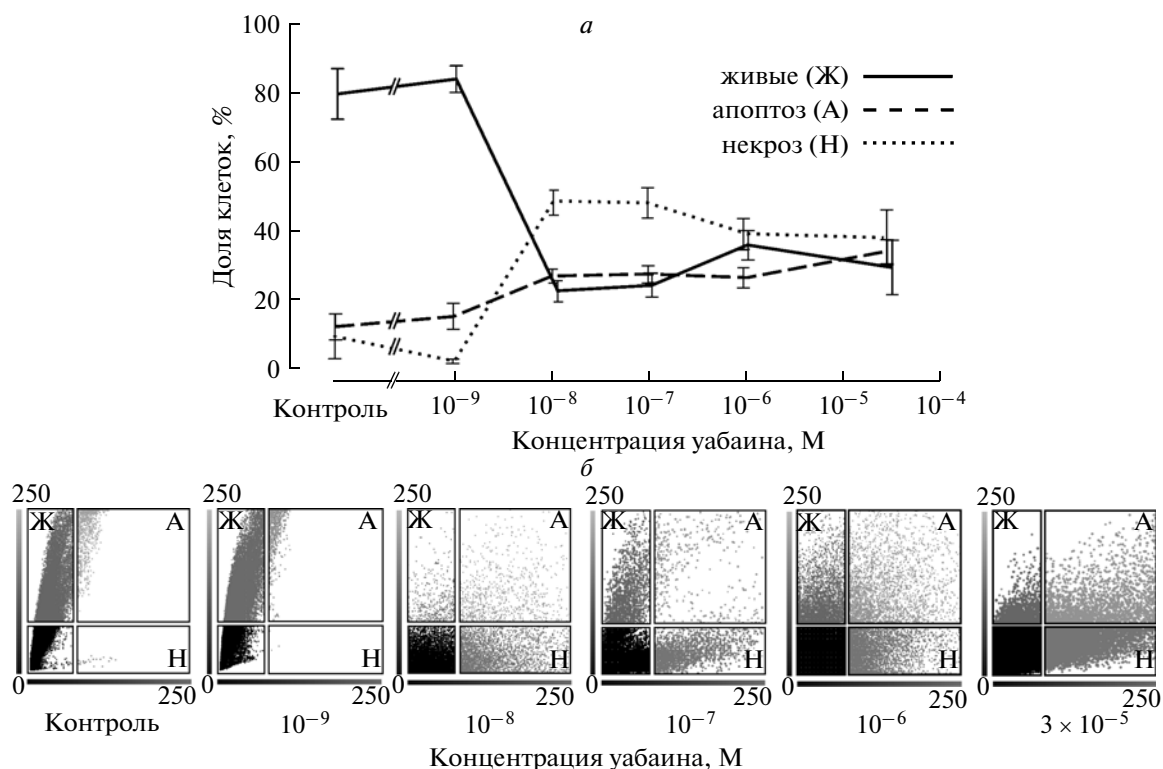


Рис. 2. Зависимость токсического эффекта уабаина от концентрации. *а* – Соотношение живых, апоптотических и некротических клеток после инкубации с уабаином в течение 4 ч. Каждая точка на графике представлена усредненными данными по 4–9 опытам. *б* – Диаграммы колокализации флуоресценции акридинового оранжевого (ось ординат) и бромистого этидия (ось абсцисс), полученных в отдельных опытах. Показано разбиение диаграмм на области, соответствующие живым (Ж), апоптотическим (А) и некротическим (Н) клеткам. Пояснения в разделе “Материалы и методы”.

до $48.3 \pm 5.2\%$ по сравнению с $1.8 \pm 0.6\%$ в присутствии 1 нМ уабаина (рис. 2а, $p < 0.001$, $n = 6$). На диаграмме распределения флуоресценции нейронов (рис. 2б) виден значительный рост красного свечения за счет убыли зеленого при увеличении концентрации уабаина с 1 до 10 нМ. Это показывает, что, уже начиная с концентрации 10 нМ, достаточной для подавления насосной функции уабаин-чувствительных изоформ НКА [20], может нарушаться ионный баланс нейронов, в результате чего будет снижаться доля живых и возрастать количество некротических клеток.

Дальнейшее увеличение концентрации уабаина не сказывалось на соотношении живых и гибнущих нейронов (рис. 2а). Диаграммы распределения флуоресценции нейронов (рис. 2б), соответствующие 10 и 100 нМ, 1 и 30 мкМ уабаина, демонстрируют сходную картину со значительной долей красной флуоресценции некротических клеток. При увеличении концентрации уабаина с 10 нМ до 30 мкМ имела тенденция к возрастанию доли нейронов, вступивших в апоптоз, за счет небольшого падения доли некротических клеток, что может отражать возможный взаимный переход процессов некроза и апоптоза при падении градиентов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} [21]. Возможно, это связано с тем, что в нейронах с увели-

чением концентрации уабаина не только растет степень ингибирования насосной функции НКА, но и усиливается сигнальное действие НКА на проапоптотические р42/44 MAP-киназные каскады [7].

Таким образом, блокирование НКА уабаином в концентрации от 10 нМ и выше вызывает гибель нейронов преимущественно по некротическому пути, что, по всей видимости, обусловлено падением мембранных градиентов Na^+ , K^+ и сопутствующего нарушения водного баланса, сопровождающегося разрушением клеточной мембраны. Повышение концентрации уабаина до 0.1–30 мкМ не приводит к дальнейшему усилению гибели нейронов ни путем некроза, ни путем апоптоза. Возможно, это объясняется достаточно глубоким ингибированием нейрональных изоформ НКА уже при концентрации уабаина 10 нМ, что не противоречит данным о чувствительности этих изоформ к уабаину [7, 20, 22].

ОБСУЖДЕНИЕ

Эксайтотоксический стресс является составной частью патогенеза множества нейродегенеративных патологий (эпилепсии, ишемии, инсультов и т.д.) [1]. Он вызывает гибель нейронов в связи с их гипервозбуждением, избыточным накоплением кальция в цитоплазме и сопутствующим нару-

шением энергетического баланса. В использованной нами модели эксайтотоксического стресса, вызванного воздействием насыщающих концентраций агонистов ионотропных рецепторов глутамата на первичную культуру нейронов коры, добавление убаина в концентрации 0.01–1 нМ оказывало антиапоптотический эффект, имеющий дозозависимый характер. Пороговая концентрация убаина, в которой проявляются антиапоптотические свойства, была несколько выше при применении NMDA (рис. 2а) по сравнению с КА (рис. 2б). Причина этого, по-видимому, заключается в том, что аппликация NMDA вызывает скачкообразное, а аппликация КА плавное увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} [5].

В настоящее время считается, что единственным местом связывания убаина является специфический участок на α -субъединице NKA. Хорошо известно, что в нейронах экспрессируются преимущественно $\alpha 1$ - и $\alpha 3$ -субъединицы NKA, причем у крысы это убаин-резистентная и убаин-чувствительная изоформы, соответственно [22]. Константы блокирования этих изоформ NKA убаином существенно варьируют, однако у $\alpha 1$ -изоформы лежат в диапазоне десятков микромолей, а у $\alpha 3$ -изоформы составляют примерно 10 нМ. Таким образом, эффективная для подавления апоптоза концентрация убаина (0.01–1 нМ) в наших опытах намного меньше концентрации, необходимой для ингибирования насосной функции NKA. Это позволяет предположить, что нейропротекторное действие убаина в использованной нами модели эксайтотоксичности осуществляется через включение другой функции NKA, сигнальной. Считается, что эта функция запускается в результате конформационных изменений молекулы NKA после связывания молекулы убаина, и показаны различные внутриклеточные пути ее реализации [11–13]. Конкретный механизм реализации сигнальной функции NKA в наших опытах не установлен. Однако полученные нами данные позволяют предположить, что этот механизм связан с запуском противоапоптотических каскадов, что подтверждается увеличением экспрессии противоапоптотического белка Bcl-2.

В более высоких концентрациях (10 нМ и выше) убаин вызывал гибель нейронов преимущественно по механизму некроза. Показано, что экспрессия $\alpha 3$ - и $\alpha 1$ -изоформ NKA может различаться в зависимости от типов нейронов. Так вставочные нейроны преимущественно экспрессируют $\alpha 3$ -NKA, активность которой подавляется в присутствии уже 10 нМ убаина [20]. Пирамидные нейроны преимущественно экспрессируют $\alpha 1$ -NKA, для ингибирования которой требовалась гораздо более высокая концентрация убаина – 25 мкМ [20]. Гетерогенность популяции нейронов наблюдается также в первичной культуре нейронов, где сохраняются типы нейронов, соответствующие вставочным и пирамид-

ным клеткам [5]. В наших экспериментах убаин в концентрации 10 нМ вызывал резкое увеличение доли некротических клеток, что, скорее всего, отражает гибель вставочных нейронов. Однако около трети нейронов оставались живыми даже при увеличении концентрации убаина до 30 мкМ, что подтверждает неоднородность нейронной популяции по степени чувствительности к убаину и в наших опытах. Мы полагаем, что в диапазоне от 1 до 10 нМ убаин подавляет активность $\alpha 3$ -NKA в некоторых типах нейронов, в результате чего происходит их гибель преимущественно путем некроза. Оставшаяся популяция нейронов, мембранный потенциал которых поддерживается преимущественно $\alpha 1$ -NKA, резистентна к убаину вплоть до концентрации 30 мкМ. В результате гетерогенности нейронов по чувствительности NKA к убаину, его концентрация, оказывающая нейропротекторное действие при эксайтотоксическом стрессе, находится в диапазоне 0.01–10 нМ.

Таким образом, эксайтотоксический стресс, вызываемый в первичной культуре нейронов агонистами ионотропных рецепторов глутамата (NMDA или каинатом), индуцирует гибель клеток путем апоптоза. В различных диапазонах концентраций убаин вызывает два противоположных эффекта. В диапазоне 0.01–1 нМ он оказывает антиапоптотическое действие на нейроны в условиях эксайтотоксического стресса и не проявляет собственной токсичности. В концентрациях от 10 нМ до 30 мкМ убаин проявляет токсические свойства, выражающиеся в усилении гибели нейронов по механизму некроза. Необходимо отметить, что даже в высоких концентрациях убаин не стимулирует развитие апоптоза. В представленной работе показаны существенные различия механизмов антиапоптотического действия убаина в условиях эксайтотоксического инсульта и его цитотоксического действия в высоких концентрациях.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (№ 11-04-00397 и 10-04-00970), а также средствами НИР СПбГУ (№ 1.37.118.2011).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Doyle K.P., Simon R.P., Stenzel-Poore M.P. 2008. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*. **55**, 310–318.
2. Antonov S.M., Magazanik L.G. 1988. Intense non-quantal release of glutamate in an insect neuromuscular junction. *Neurosci. Lett.* **93** (2–3), 204–208.
3. Khodorov B., Pinelis V., Storozhevych T., Vergun O., Vinskaya N. 1996. Dominant role of mitochondria in protection against a delayed neuronal Ca^{2+} overload induced by endogenous excitatory amino acids following a glutamate pulse. *FEBS Lett.* **393** (1), 135–138.
4. Ходоров Б.И. 2003. Нарушение нейронального кальциевого гомеостаза при гиперстимуляции глутаматных рецепторов. *Патогенез*. **1**, 20–33.

5. Абушик П.А., Большаков А.Е., Сибаров Д.А., Антонов С.М. 2011. Гетерогенность механизмов кальциевого ответа на кайнат и типы нейронов в первичной культуре коры мозга крыс. *Биол. мембраны*. **28** (1), 25–34.
6. Евстарова А.А., Миронова Е.В., Дворецкова Е.А., Антонов С.М. 2008. Апоптоз и рецепторная специфичность его механизмов при нейротоксическом действии глутамата. *Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*. **94** (4), 380–393.
7. Karpova L.V., Bulygina E.R., Boldyrev A.A. 2010. Different neuronal Na⁺/K⁺-ATPase isoforms are involved in diverse signaling pathways. *Cell Biochem. Funct.* **28** (2), 135–141.
8. Oselkin M., Tian D., Bergold P.J. 2010. Low-dose cardiotonic steroids increase sodium-potassium ATPase activity that protects hippocampal slice cultures from experimental ischemia. *Neurosci. Lett.* **473** (2), 67–71.
9. Golden W.C., Martin L.J. 2006. Low-dose ouabain protects against excitotoxic apoptosis and up-regulates nuclear Bcl-2 *in vivo*. *Neuroscience*. **137** (1), 133–144.
10. Антонов С.М., Кривой И.И., Драбкина Т.М., Миронова Е.В., Евстратова А.А. 2009. Нейропротекторное действие уабаина и экспрессия пептида Bcl-2 при гиперактивации NMDA-рецепторов в нейронах коры головного мозга крыс *in vitro*. *ДАН*. **426** (4), 552–555.
11. Xie Z. 2003. Molecular mechanisms of Na/K-ATPase-mediated signal transduction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **986**, 497–503.
12. Zhang L., Zhang Z., Guo H., Wang Y. 2008. Na⁺/K⁺-ATPase-mediated signal transduction and Na⁺/K⁺-ATPase regulation. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **22** (6), 615–621.
13. Corrêa G.R., Cunha K., Santos A., Araujo E. 2010. The trophic effect of ouabain on retinal ganglion cell is mediated by EGF receptor and PKC delta activation. *Neurochem. Res.* **35**, 1343–1352.
14. Trevisi L., Visentin B., Cusinato F., Pighin I., Luciani S. 2004. Antiapoptotic effect of ouabain on human umbilical vein endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **321** (3), 716–721.
15. Dvela M., Rosen H., Ben-Ami H.C., Lichtstein D. 2012. Endogenous ouabain regulates cell viability. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **302** (2), C442–452.
16. 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.
17. Antonov S.M., Johnson J.W. 1999. Permeant ion regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channel block by Mg²⁺. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **96**, 14571–14576.
18. Green D.R., Reed J. 1998. Mitochondria and apoptosis. *Science*. **281**, 1309–1312.
19. Adams J.M., Cory S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. **281**, 1322–1326.
20. Richards K.S., Bommert K., Szabo G., Miles R. 2007. Differential expression of Na⁺/K⁺-ATPase alpha-subunits in mouse hippocampal interneurons and pyramidal cells. *J. Physiol.* **585** (Pt 2), 491–505.
21. Xiao A.Y., Wei L., Xia S., Rothman S., Yu S.P. 2002. Ionic mechanism of ouabain-induced concurrent apoptosis and necrosis in individual cultured cortical neurons. *J. Neurosci.* **22** (4), 1350–1362.
22. Lingrel J.B. 2010. The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase. *Annu. Rev. Physiol.* **72**, 395–412.

Dose-Dependence of Antiapoptotic and Toxic Action of Ouabain in Neurons of Primary Cultures of Rat Cortex

A. E. Bolshakov¹, D. A. Sibarov^{1*}, P. A. Abushik¹, I. I. Krivoi², S. M. Antonov¹

¹*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, pr. Toreza, 44, Saint-Petersburg, 194223 Russia;*

*e-mail: dsibarov@gmail.com

²*St. Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7/9, St.-Petersburg, 199034 Russia*

Effects of 0.01 nM–1 nM ouabain on neuronal survival in excitotoxic stress and ouabain self toxic action in concentrations from 10 nM to 30 μM were studied. Neuronal viability was evaluated by measuring Bcl-2 protein expression and using vital staining test allowing recognition of live, necrotic and apoptotic cells. Excitotoxic stress was induced by 240 min treatment with agonists of ionotropic glutamate receptors (NMDA or kainate). Experiments were performed on rat primary neuronal cultures (7–14 days *in vitro*). 30 μM NMDA induced apoptosis in 45 ± 9% (*n* = 5) of neurons and 30 μM kainate, in 52 ± 5% (*n* = 5). An antiapoptotic effect of ultra low (0.01 nM–1 nM) ouabain concentrations was found to restore Bcl-2 expression and to bring apoptosis level back to control values (about 10%, *n* = 5). Since in this concentration range ouabain is not able to inhibit Na⁺/K⁺-ATPase (NKA), we conclude that neuroprotection discloses the signaling function of NKA. Ouabain self toxic action in higher concentrations (10 nM–30 μM, during 240 min) resulted in necrotic death of 45% neurons (apoptosis remained as under the control conditions), the large portion of neurons were unaffected. The relatively low threshold concentration of ouabain toxic action (10 nM) is consistent with the sensitivity to ouabain of the NKA α3-isoform. Thus, ouabain was found to have a bimodal effect, including antiapoptotic action in excitotoxic stress in the concentration range from 0.01 nM to 1 nM, and self toxic action at higher concentrations. Self toxicity of ouabain is initiated through inhibition of NKA pumping function. Neuronal heterogeneity with respect to ouabain toxic action is probably connected with different expression of α1 and α3 isoforms of NKA in pyramid neurons and interneurons.