

СОПОСТАВЛЕНИЕ МЕМБРАННЫХ ТОКОВ, КАЛЬЦИЕВЫХ ОТВЕТОВ И МИТОХОНДРИАЛЬНОГО ПОТЕНЦИАЛА ПРИ ДЕЙСТВИИ ГОМОЦИСТЕИНА НА НЕЙРОНЫ КОРЫ МОЗГА КРЫС

© П. А. Абушик,¹ Т. В. Карелина,¹ Д. А. Сибаров,¹ Ю. Д. Степаненко,¹
Р. А. Гиниятуллин,^{2, 3} С. М. Антонов¹

¹ Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

² Университет Восточной Финляндии, Куопио, Финляндия

³ Казанский федеральный университет, Казань, Россия
E-mail: polinaabushik@gmail.com

Резюме

Гомоцистеин, серосодержащая аминокислота, оказывает нейротоксический эффект и вовлечена в патогенез многих нейродегенеративных заболеваний. В отличие от глутамата, механизм нейротоксического действия гомоцистеина мало изучен. В опытах на нейронах коры мозга крыс *in vitro* методом регистрации интегральных токов нейронов (patch-clamp), имиджингом кальция (Fluo-3) и митохондриального мембранного потенциала (родамин 123) исследовали трансмембранные токи, Ca^{2+} ответы и изменения митохондриального потенциала, вызванные гомоцистеином, в сопоставлении с ответами на NMDA и глутамат. L-гомоцистеин (50 мкМ) в нейронах вызывал входящий ток, который полностью был блокирован избирательным антагонистом NMDA рецепторов — AP-5, и который, в отличие от NMDA-вызванного тока, после достижения пика спадал до стационарного уровня малой амплитуды. Сравнительный анализ Ca^{2+} ответов на гомоцистеин, NMDA и глутамат показал, что в нейронах гомоцистеин вызывал быстрые Ca^{2+} ответы осцилляторного характера, в то время как NMDA и глутамат вызывали «классическое» постепенное увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . На ранних этапах действия гомоцистеин, в отличие от NMDA, не вызывал падения митохондриального потенциала. Однако при его длительном действии, как и в случае NMDA и глутамата, развивалось изменение митохондриального мембранного потенциала, сопоставимое с полным падением потенциала при разобщении дыхательной цепи протонофором FCCP. Наши данные показывают, что в нейронах коры мозга *in vitro* гомоцистеин оказывает нейротоксическое действие на начальных этапах через активацию ионотропных рецепторов глутамата NMDA-типа с последующим входом Ca^{2+} через каналы данных рецепторов, которое при длительном действии может приводить к дисфункции митохондрий, проявляющейся в падении митохондриального потенциала.

Ключевые слова: гомоцистеин, глутамат, кальций, митохондриальный потенциал, нейроны.

Принятые сокращения: $[Ca^{2+}]_i$ — концентрация внутриклеточного кальция, $\Delta\varphi_{mit}$ — мембранный митохондриальный потенциал, FCCP — карбонилцианид-р-трифлуорометоксифенилгидразон, NMDA — N-метил-D-аспарат, Rho123 — родамин 123, Fluo3 — флуо-3.

Введение

Эндогенная аминокислота гомоцистеин (2-амино-4-меркаптобутановая кислота) участвует в нормальном клеточном метаболизме, включая синтез метионина и цистеина, с последующим образованием ключевого фактора антиоксидантной защиты — глутатиона. Однако в результате дефицита фолиевой кислоты, а также витаминов группы В или генетического полиморфизма — замены цитозина (С) тиминном (Т) в

нуклеотиде (С677Т) гена 5'-10'-метилентетрагидрофолат редуктазы [1] концентрация гомоцистеина в плазме крови может возрастать (превышением нормы при этом считается уровень выше 16 мкМ). Это состояние, называемое гипергомоцистеинемией, сопряжено с патогенезом многих сердечно-сосудистых заболеваний [2], а также нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона [3, 4], боковой амиотрофический склероз [5]. В последнее время появились данные, что гомоцистеин также мо-

жет участвовать в патогенезе такого широко распространенного неврологического расстройства, как мигрень с аурой [6, 7].

Известно, что мигрень с аурой ассоциирована с распространяющейся корковой депрессией [8, 9] — увеличением возбудимости корковых нейронов, обусловленным избытком глутамата во внеклеточном пространстве [10]. Глутамат, активируя ионотропные и метаботропные рецепторы, приводит к нейрональной деполяризации и потенциально к нейротоксичности. Известно, что наиболее важными в генерации распространяющейся корковой депрессии являются NMDA рецепторы [11]. Однако, несмотря на то что гомоцистеин также способен активировать корковые нейроны [12], роль этой аминокислоты в гипервозбудимости при мигрени и сопутствующей нейротоксичности практически не изучена.

Существует несколько исследований, показавших взаимодействие гомоцистеина с глутамат-связывающим сайтом NMDA рецепторов [12, 13] и с I группой метаботропных рецепторов глутамата [14—16]. В связи с этим рецепторы глутамата могут быть рассмотрены в качестве потенциальной мишени для высоких концентраций гомоцистеина [17].

Известно, что гиперактивация NMDA рецепторов часто ассоциирована с окислительным стрессом в нейронах [18, 19]. С другой стороны, известно, что гомоцистеин может также инициировать окислительный стресс в некоторых экспериментальных моделях [20]. Однако показано, что в эндотелиальных клетках гомоцистеин скорее снижает окислительный эффект [21], а в некоторых исследованиях гомоцистеин проявляет восстанавливающие свойства [22, 23]. Таким образом, вопрос участия гомоцистеина в окислительном стрессе остается открытым и является одной из целей данной работы.

Материал и методика

Исследования проводили на первичной культуре нейронов коры мозга крыс линии Вистар при температуре 23—26 °С. Методика приготовления культуры нейронов была детально описана ранее [24, 25]. Кратко, для получения культуры использовали эмбрионы на 16- или 17-й день пренатального развития (E16-17). Клетки культивировали в питательной среде на покровных стеклах, предварительно обработанных поли-D-лизинном.

Эксперименты на клетках первичной культуры коры мозга крыс проводили на 7—10-й день *in vitro* (DIV). В опытах с нейронами коры мозга использовали физиологический раствор следующего состава: 140 mM NaCl, 2.8 mM KCl, 10 mM Hepes, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ (pH 7.2—7.4). Так как в нейронах внеклеточный Mg²⁺ блокирует каналы NMDA рецепторов, в опытах с NMDA использовали физиологический раствор, не содержащий Mg²⁺ [26].

Для индукции нейротоксического стресса были выбраны насыщающие концентрации агонистов рецепторов глутамата: 50 мкМ L-гомоцистеина, 30 мкМ

NMDA и 300 мкМ глутамата (Sigma-Aldrich, США). При аппликации NMDA и гомоцистеина всегда добавляли аминокислоту глицин — коагонист NMDA рецепторов в концентрации, присутствующей в ростовой среде (30 мкМ или 100 мкМ).

Флуориметрическое определение внутриклеточной концентрации Ca²⁺ проводили с использованием флуоресцентного зонда флуо-3АМ (Fluo-3, Invitrogene, США), позволяющего получить относительные значения концентрации [Ca²⁺]_i в микромолярном диапазоне [27]. Флуорофор вводили в клетки в форме ацетоксиметилового эфира — АМ (4 мкМ, 45 мин, в темноте, 23—25 °С). Затем клетки инкубировали в темноте на протяжении 15 мин в физиологическом растворе для деэтерификации с образованием внутри клеток мембрано-непроницающего Fluo-3.

Для флуориметрического измерения митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\phi_{mit}$) использовали витальный флуоресцентный краситель родамин 123 (Rho123, Invitrogene, США) [28]. Флуорофор (5 мкМ) загружался в клетки в течение 30 мин в полной темноте при комнатной температуре (23—25 °С). В качестве контроля для измерения $\Delta\phi_{mit}$ использовали протонифор карбонилцианид-р-трифлуорометоксифенилгидразон (FCCP, 4 мкМ; Sigma-Aldrich, США), который приводит к полному разобщению дыхательной цепи — падению $\Delta\phi_{mit}$, вызывая тем самым максимум эмиссии Rho123 [28].

Для проведения флуориметрических экспериментов с Fluo-3 или Rho123 на инвертированном сканирующем конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 MP (Leica Microsystems, Германия) покровные стекла с клетками переносили в регистрационную/перфузионную камеру POCmini Chamber System (LaCon, Германия), которую подключали к системе общей и быстрой локальной перфузии. На протяжении всего эксперимента (10—90 мин) клетки перфузировали с помощью общей перфузии физиологическим раствором со скоростью 1 мл/мин. Действующие вещества апплицировались на клетки с помощью быстрой локальной перфузии с аналогичной скоростью. Полное замещение раствора вокруг нейронов происходило менее чем за 1 с.

Возбуждение флуорохромов Rho123 и Fluo-3 осуществляли светом аргонового лазера с длиной волны 488 нм. Эмиссию флуорохромов регистрировали в спектральном диапазоне 500—560 нм. Частота сканирования составляла 0.03 кадр/с. Полученные конфокальные изображения с флуоресценцией Fluo-3 или Rho123 оцифровывали при помощи программного обеспечения Leica LAS AF и строили графики зависимости интенсивности свечения отдельных клеток от времени.

Регистрацию интегральных токов нейронов проводили методом локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» [29]. Внутриклеточный раствор для заполнения микроэлектрода имел следующий состав: 9 mM NaCl, 17.5 mM KCl, 121.5 mM K-глюконат, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 0.2 mM EGTA, 2 mM MgATP, 0.5 mM NaGTP [30]. Патч-пипетки для регистрации были вытянуты из боросиликатно-

го стекла с внешним диаметром 1.5 мм и внутренним филаментом (Sutter Instrument #BF150-86-10, Sutter Instruments Company, США). Токи регистрировали с использованием усилителя MultiClamp 700B с системой сбора данных Digidata 1440A и программного обеспечения pClamp v10.2 (Molecular Devices, США). Частота дискретизации составляла 20 000 изм/с с предварительной аналоговой фильтрацией (эквивалент фильтра Бесселя 8-го порядка), с частотой среза 1.4 кГц для удаления высокочастотных шумов. Позиционирование кончика микроэлектрода выполняли микроманипулятором MP-85 (Sutter Instruments Company, США) под визуальным контролем на инвертированном микроскопе Nikon Diaphot TMD (Nikon, Япония). Для аппликации тестовых веществ использовали систему быстрой смены растворов на базе BPS-4 (Ala Scientific Instruments, США). Регистрацию токов, вызванных агонистами, а также их анализ выполняли в программе Clampfit 10.2, входящей в пакет pClamp.

Полученные данные подвергались статистической обработке с использованием компьютерных программ Origin 6.1 и GraphPad Prism 5. При установлении достоверности различий данных использовали *t*-критерий Стьюдента.

Результаты

Для изучения взаимодействия гомоцистеина с рецепторами глутамата в нейронах коры мозга крыс была проведена серия экспериментов, в которой исследовали природу входящих токов, активируемых гомоцистеином, и сопоставляли кинетику ответов с ответами на специфический агонист NMDA. Для этого ана-

лизировали кинетику входящих токов, отводимых методом локальной фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка», при быстрой аппликации 50 мкМ гомоцистеина или 30 мкМ NMDA (агонисты апплицировались с 30 мкМ глицина, как коагониста NMDA рецепторов). Оба агониста вызывали сравнимые по амплитуде входящие интегральные токи (рис. 1, *a*). Мембранный ток, вызванный NMDA, после первичного пика частично спадал до стационарного уровня (плато). В отличие от NMDA ток, вызванный аппликацией гомоцистеина, спадал гораздо быстрее, что приводило к меньшей амплитуде фазы плато, чем у тока, вызванного в той же клетке при аппликации NMDA (рис. 1, *a*). Подобные отличия могут быть связаны с тем, что эти вещества взаимодействуют с разными рецепторами либо они отражают разную кинетику десенситизации при действии разных агонистов на один тип рецепторов. Наши эксперименты с AP-5, избирательным блокатором NMDA рецепторов, подтвердили, что гомоцистеин активирует NMDA рецепторы, так как AP-5 практически полностью блокировал гомоцистеин-вызванный ток в нейронах коры мозга, тем самым исключив вклад других ионотропных рецепторов глутамата.

Известно, что входящий ток наряду с переносом ионов натрия и калия определяется входом ионов кальция через ионный канал NMDA рецептора. В связи с тем что существуют различия в кинетике входящих токов при действии NMDA и гомоцистеина на NMDA рецепторы, было интересно исследовать природу Ca^{2+} ответов при кратковременном (6 мин) действии данных агонистов рецепторов глутамата и сопоставить их с ответами на сам глутамат. В нейронах первичной культуры коры мозга крыс динамика Ca^{2+} ответов по-

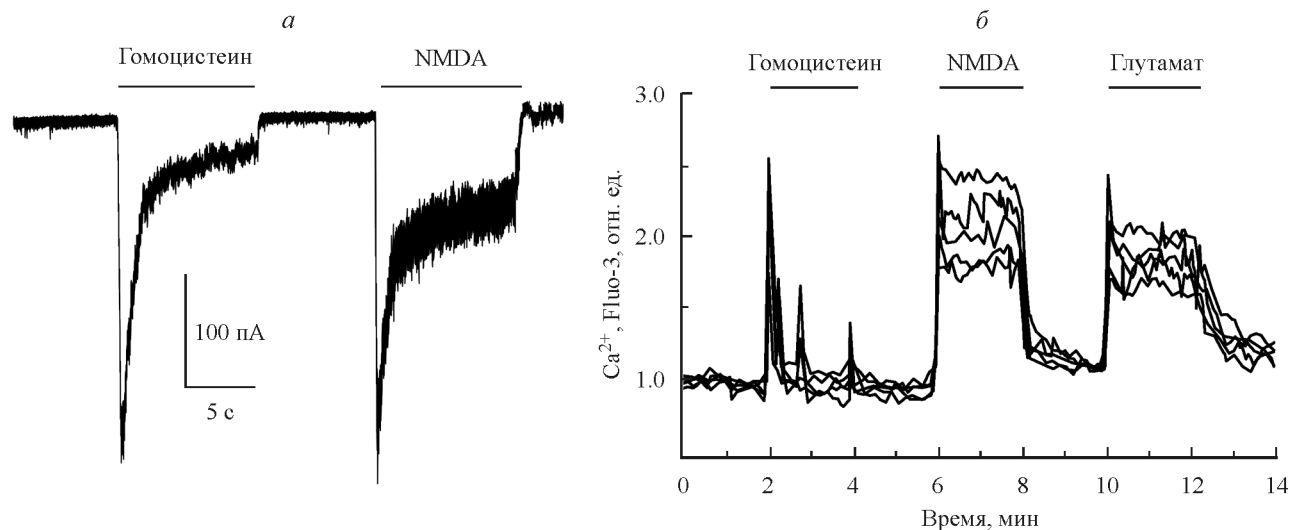


Рис. 1. *a*. Входящие интегральные токи, вызванные 50 мкМ гомоцистеина и 30 мкМ NMDA в присутствии ко-агониста глицина при мембранном потенциале -70 мВ в нейронах коры мозга крыс. Момент аппликации и длительность действия агонистов показаны линией над графиками. Представлены характерные регистрации от одной клетки из общего числа зарегистрированных клеток — 57. *б*. Внутриклеточные кальциевые ответы, вызванные 50 мкМ гомоцистеина, 30 мкМ NMDA и 300 мкМ глутамата в нейронах коры мозга крыс.

Ось ординат — относительная интенсивность свечения (за 1 принято свечение в контроле). Момент аппликации и длительность действия агонистов показаны линией над графиками. Каждая из кривых представляет собой зарегистрированный в соме флуоресцентный Ca^{2+} ответ одного нейрона. Представлены данные из одного эксперимента. Число опытов 3.

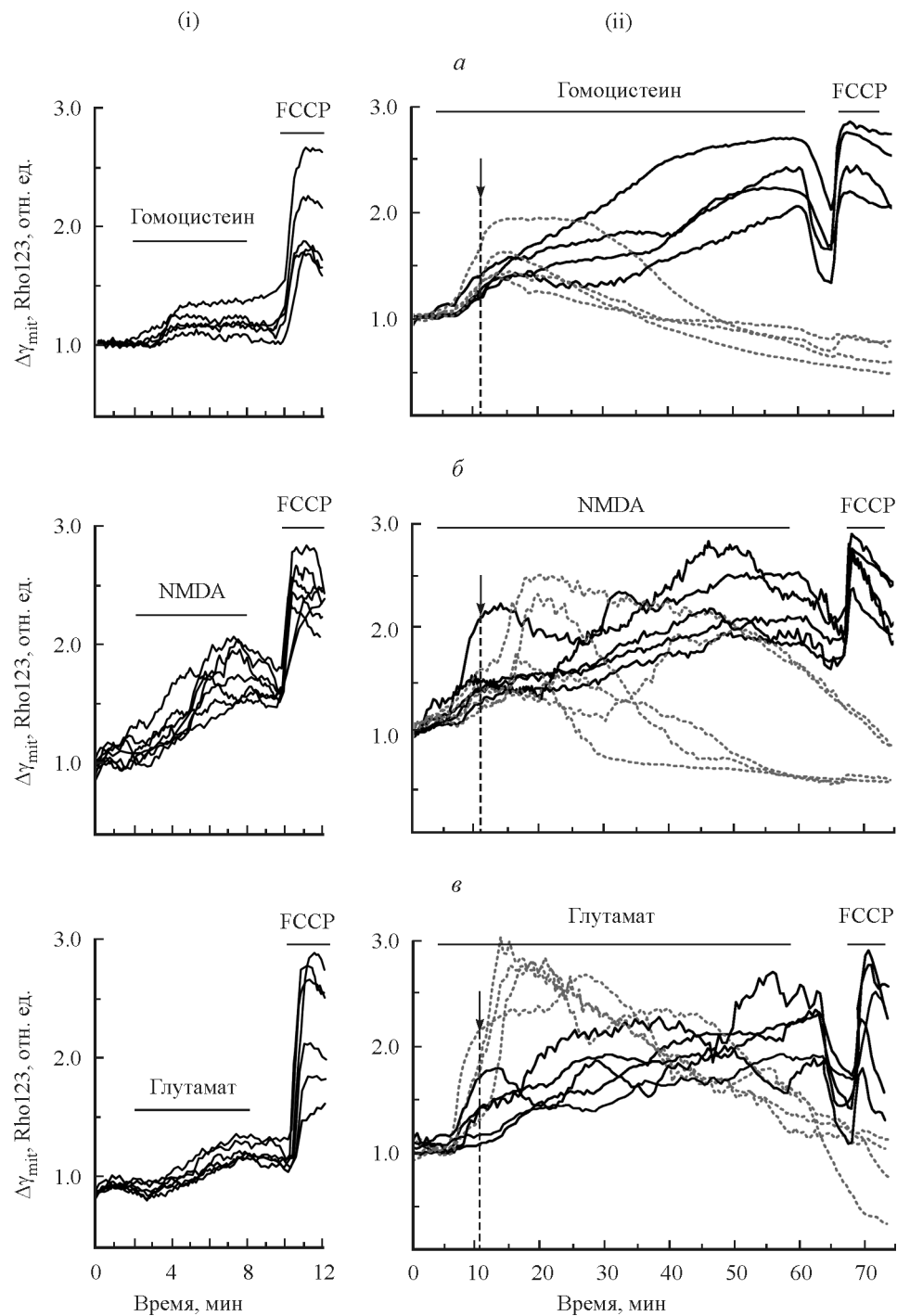


Рис. 2. Изменение митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\psi_{mit}$), выявленного с использованием Rho123 в нейронах коры мозга крыс при действии 50 мкМ гомоцистеина (а), 30 мкМ NMDA (б) и 300 мкМ глутамата (в) в течение 6 мин (i) и 60 мин (ii).

Вертикальной пунктирной линией на части ii отмечено 6 мин действия агонистов. В качестве контроля максимума падения $\Delta\psi_{mit}$ в нейроне на 2 мин апплицировали 4 мкМ FCCP. Момент аппликации и длительность действия агонистов и FCCP показаны линиями над графиками. Ось ординат — относительная интенсивность свечения (за 1 принято свечение в контроле). Каждая из кривых представляет собой зарегистрированный в some флуоресцентный ответ от Rho123 одного нейрона. Число опытов 3—5.

сле 6 мин действия агонистов для всех нейронов была сходна: 50 мкМ гомоцистеина вызывали характерные Ca^{2+} ответы осцилляционного характера [16], в то время как 30 мкМ NMDA и 300 мкМ глутамата вызывали быстрое увеличение $[Ca^{2+}]_i$, достигающего плато и сохра-

няющегося на протяжении всего времени присутствия агонистов (рис. 1, б). Эти данные подтвердили наши результаты, полученные с регистрацией мембранных токов и свидетельствующие о быстрой десенситизации NMDA рецепторов гомоцистеином. В частности, спа-

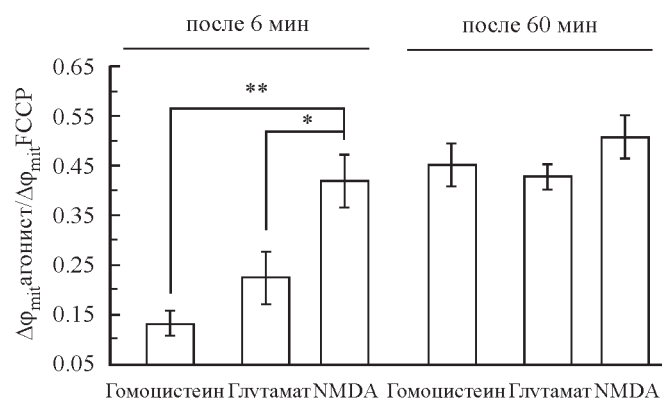


Рис. 3. Отношение падения митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\phi_{mit}$), вызванного 50 мкМ гомоцистеина, 30 мкМ NMDA или 300 мкМ глутамата, к полному падению $\Delta\phi_{mit}$ при разобщении дыхательной цепи, вызванного 4 мкМ FCCP в нейронах коры мозга крыс — $\Delta\phi_{mit}^{agonист}/\Delta\phi_{mit}^{FCCP}$ после 6 и 60 мин действия агонистов.

Представлены средние данные со стандартной ошибкой (* — $p < 0.05$, ** — $p < 0.01$) по 3–5 экспериментам.

дающий кальциевый сигнал на гомоцистеин, по-видимому, определяется низкой амплитудой тока на гомоцистеин на стационарном уровне (рис. 1, а).

Известно, что долговременная Ca^{2+} дисрегуляция приводит к дисфункции митохондрий, нарушению функционирования дыхательной цепи, запуску окислительного фосфорилирования и инициирует гибель нейронов [31].

В связи с тем что гомоцистеин, NMDA и глутамат могут оказывать нейротоксический эффект на нейроны ЦНС и ПНС [16], было интересно исследовать влияние данных агонистов рецепторов глутамата на $\Delta\phi_{mit}$ как маркер состояния митохондрий. Флуорофор Rho123 позволяет детектировать падение $\Delta\phi_{mit}$. В качестве контроля для определения максимального $\Delta\phi_{mit}$ на 2 мин после действия агонистов апплицировали протонифор FCCP в концентрации 4 мкМ, который приводит к полному разобщению дыхательной цепи и полному падению митохондриального потенциала, вызывая тем самым максимум эмиссии Rho123.

На рис. 2 представлены $\Delta\phi_{mit}$ при кратковременном [6 мин, рис. 2(i)] и долговременном [60 мин, рис. 2(ii)] действии 50 мкМ гомоцистеина (рис. 2, а), 30 мкМ NMDA (рис. 2, б) или 300 мкМ глутамата (рис. 2, в) на нейроны коры мозга крыс. Гомоцистеин (50 мкМ) после 6 мин действия не вызывал сильного падения $\Delta\phi_{mit}$ в нейронах коры мозга по сравнению с FCCP [рис. 2(i), а]. В то время как 30 мкМ NMDA [рис. 2(i), б] в течение первых 6 мин действия, напротив, вызывали падение $\Delta\phi_{mit}$, сопоставимое с падением потенциала от действия FCCP.

В отличие от кратковременного действия агонистов после 60 мин их аппликации каких-либо существенных различий между ними выявлено не было. Во всех случаях: при 50 мкМ гомоцистеина, 30 мкМ NMDA или 300 мкМ глутамата, начиная с 30-й минуты действия, агонисты одинаково сильно вызывали падение $\Delta\phi_{mit}$ [рис. 2(ii)], которое к 50–60 мин дейст-

вия агонистов достигало максимума, сопоставимого с полным разобщением дыхательной цепи, вызванным FCCP. Важно заметить, что при долговременном действии NMDA, гомоцистеина и глутамата в каждом эксперименте существовали клетки, в которых происходило резкое увеличение интенсивности флуоресценции Rho123 в течение первых 20 мин действия агонистов, указывающее на сильное падение $\Delta\phi_{mit}$. В дальнейшем эти клетки отвечали падением интенсивности флуоресценции Rho123 и не реагировали на аппликацию FCCP [рис. 2(ii), ответы отмечены пунктирной линией]. По-видимому, именно эти клетки первыми гибнут при нейротоксическом действии гомоцистеина, глутамата и NMDA [16, 32–34].

Для более точного сопоставления падения $\Delta\phi_{mit}$, вызванного действием агонистов рецепторов глутамата на нейроны коры мозга крыс, было рассчитано отношение $\Delta\phi_{mit}^{agonист}/\Delta\phi_{mit}^{FCCP}$ ($\Delta\phi_{mit}$ для каждого из агонистов — 50 мкМ гомоцистеина, 30 мкМ NMDA или 300 мкМ глутамата относительно $\Delta\phi_{mit}$, вызванного действием FCCP), отражающее долю падения митохондриального потенциала при действии агонистов NMDA рецепторов от его максимального значения. На рис. 3 представлены гистограммы отношения $\Delta\phi_{mit}^{agonист}/\Delta\phi_{mit}^{FCCP}$ после 6 и 60 мин действия агонистов. Для нейронов коры мозга крыс после 6 мин действия $\Delta\phi_{mit}^{гомoцистеин}/\Delta\phi_{mit}^{FCCP}$ составило 0.13 ± 0.02 отн. ед., $\Delta\phi_{mit}^{глутамат}/\Delta\phi_{mit}^{FCCP}$ составило 0.22 ± 0.05 отн. ед., а $\Delta\phi_{mit}^{NMDA}/\Delta\phi_{mit}^{FCCP}$ составило 0.41 ± 0.05 отн. ед. Результаты для NMDA достоверно отличались от значений, полученных при действии 50 мкМ гомоцистеина ($p < 0.01$, количество опытов 3) и при действии 300 мкМ глутамата ($p < 0.05$, количество опытов 3). После 60 мин действия агонистов $\Delta\phi_{mit}^{гомoцистеин}/\Delta\phi_{mit}^{FCCP}$ составило 0.44 ± 0.04 отн. ед., $\Delta\phi_{mit}^{глутамат}/\Delta\phi_{mit}^{FCCP}$ составило 0.42 ± 0.06 отн. ед., а $\Delta\phi_{mit}^{NMDA}/\Delta\phi_{mit}^{FCCP}$ составило 0.52 ± 0.08 отн. ед. и они достоверно не отличались друг от друга ($p > 0.05$, количество опытов 3–5). Таким образом, в результате 60 мин действия агонистов NMDA рецепторов происходит падение митохондриального мембранного потенциала почти вдвое.

Обсуждение

Нейротоксичность глутамата на первичной культуре нейронов коры мозга крыс исследована достаточно хорошо [31–33, 35]. Однако механизм действия высоких концентраций гомоцистеина на клетки первичной культуры нейронов коры изучен крайне мало. Известно, что L-гомоцистеиновая кислота, которая является ближайшим по строению к L-глутамату соединением и ближайшим аналогом L-гомоцистеина, может взаимодействовать с NMDA рецепторами и метаболитными рецепторами глутамата I группы сильнее, чем сам гомоцистеин [14]. Однако гипергомоцистеинемия связана с увеличением концентрации самого L-гомоцистеина в плазме и цереброспинальной жидкости [36]. В связи с этим для исследования механизмов действия

гомоцистеина на клетках ЦНС (первичная культура коры мозга крыс) был использован L-гомоцистеин в концентрации, соответствующий средней гипергомоцистеинемии (30—100 мкМ).

Ранее было показано, что при долговременном действии гомоцистеина на нейроны коры и нейроны тригеминального ганглия он вызывает гибель нейронов по механизму апоптоза, иными словами, оказывает цитотоксический эффект [16], который реализуется за счет ионотропных рецепторов глутамата NMDA типа и метаботропных рецепторов глутамата 5 типа [12, 14, 15, 16, 17].

Электрофизиологических исследований действия гомоцистеина существует немного [12, 13, 37]. Нами впервые были измерены входящие интегральные токи при действии гомоцистеина, которые были сопоставлены с вызванными NMDA интегральными токами. В отличие от NMDA рецепторы, активированные гомоцистеином, десенситизируются быстрее (рис. 1, а). Интересно, что амплитуда входящего тока, вызванного гомоцистеином, характерна для NMDA рецепторов, не содержащих GluN2B субъединицу [38]. Известно, что входящие токи при активации NMDA рецепторов отражают также кинетику входа ионов Ca^{2+} в нейроны. В связи с этим было проведено сопоставление внутриклеточных Ca^{2+} ответов, вызванных кратковременным действием гомоцистеина, NMDA и глутамата.

Данные электрофизиологических экспериментов согласуются с результатами по изучению внутриклеточных Ca^{2+} ответов. Кратковременное действие гомоцистеина, NMDA и глутамата в нейронах коры вызывает Ca^{2+} ответы, которые различались по своей динамике: Ca^{2+} ответ на гомоцистеин в нейронах коры мозга крыс, достигнув максимума, затем спадал практически до контрольного уровня и представлял собой Ca^{2+} осцилляции (рис. 1, б), отличные от характерной Ca^{2+} динамики, вызванной действием NMDA или глутаматом [31, 34].

Исследования последних лет показали, что гибель эмбриональных корковых нейронов при действии гомоцистеина реализуется не только через NMDA рецепторы, но и включает в себя ERK-МАРК и р38-МАРК киназные сигнальные пути [17]. Другие исследования предполагают, что гомоцистеин участвует в окислительном стрессе, приводящем к гибели нейронов [18, 19, 39]. При этом общепринято, что гиперактивация NMDA рецепторов ассоциирована с окислительным стрессом [18, 19]. Более того, на нейронах гиппокампа было показано, что гомоцистеин в высокой концентрации (250 мкМ) приводит к полимеризации поли-АДФ-рибозы и истощению запасов NAD^+ , которые вызывают митохондриальный окислительный стресс и апоптоз [40]. Также было показано, что индуцированная сильная гипергомоцистеинемия вызывает перекисное окисление липидов, которое является маркером окислительного стресса клеток [20]. Важно, что в экспериментах с изучением $\Delta\varphi_{\text{mit}}$ при кратковременном действии 50 мкМ гомоцистеина не было выявлено падения потенциала в нейронах первичной культуры коры мозга крыс [рис. 2(i), а]. По сравнению с гомоцистеином глутамат и NMDA вызывали большее смеще-

ние $\Delta\varphi_{\text{mit}}$ [рис. 2(i), б, в]. В первую очередь данные различия можно объяснить тем, что гомоцистеин и глутамат являются эндогенными агонистами рецепторов глутамата, и для них у клетки существуют механизмы утилизации (глутаматный транспортер для глутамата и образование глутатиона для гомоцистеина [41]). Вероятно, что для детектирования окислительного стресса через падение $\Delta\varphi_{\text{mit}}$ необходимо более длительное действие гомоцистеина. В отличие от этого NMDA вызывает сильную гиперактивацию NMDA рецепторов, относительно слабую десенситизацию, что совместно достаточно быстро приводит к Ca^{2+} дисрегуляции с последующим падением $\Delta\varphi_{\text{mit}}$, приводящим к гибели клетки.

Данную теорию подтверждают эксперименты по изучению $\Delta\varphi_{\text{mit}}$ при долговременном действии агонистов — гомоцистеина, глутамата и NMDA [рис. 2(ii)]. Во всех случаях, в течение 60 мин действия, агонисты, включая гомоцистеин, приводили к сильной деполяризации митохондрий, сопоставимой с полным разобщением дыхательной цепи, вызванным FCCP, что впоследствии может приводить к гибели нейронов [31].

Полученные результаты демонстрируют, что в нейронах коры мозга механизмы развития нейротоксического эффекта гомоцистеина хотя и выражены существенно меньше, но по своей природе не отличаются принципиально от механизмов действия глутамата и NMDA и включают в себя, помимо кальциевой дисрегуляции, дисфункцию митохондрий, приводящую к разобщению митохондриальной дыхательной цепи, к запуску окислительного фосфорилирования, которое впоследствии может приводить к инициации гибели нейронов по механизму апоптоза.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ 14-04-31707, 14-04-00227 и 15-04-08283, гранта РНФ 14-15-00618 и программы конкурентного роста Казанского федерального университета.

Список литературы

- [1] *Isobe C., Terayama Y.* A remarkable increase in total homocysteine concentrations in the CSF of migraine patients with aura // *Headache*. 2010. V. 50. N 10. P. 1561—1569.
- [2] *Brattstrom L., Wilcken D. E.* Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? // *Am. J. Clin. Nutr.* 2000. V. 72. N 2. P. 315—323.
- [3] *Sachdev P. S.* Homocysteine and brain atrophy // *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2005. V. 29. N 7. P. 1152—1161.
- [4] *Boldyrev A. A., Johnson P.* Homocysteine and its derivatives as possible modulators of neuronal and non-neuronal cell glutamate receptors in Alzheimer's Disease // *J. Alzheimers. Dis.* 2007. V. 11. P. 219—228.
- [5] *Zoccolella S., Bendotti C., Beghi E., Logroscino G.* Homocysteine levels and amyotrophic lateral sclerosis: A possible link // *Amyotroph. Lateral. Scler.* 2010. V. 11. N 1—2. P. 140—147.
- [6] *Lea R., Colson N., Quinlan S., Macmillan J., Griffiths L.* The effects of vitamin supplementation and MTHFR (C677T) genotype on homocysteine-lowering and migraine disability // *Pharmacogenet. Genomics*. 2009 V. 19. N 6. P. 422—428.

- [7] *Oterino A., Toriello M., Valle N., Castillo J., Alonso-Arzan A., Bravo Y., Ruiz-Alegria C., Quintela E., Pascual J.* The relationship between homocysteine and genes of folate-related enzymes in migraine patients // *Headache*. 2010. V. 50. N 1. P. 99—168.
- [8] *Гиниатуллин Р. А.* Нейрофизиологические механизмы мигрени и новые принципы патогенетического лечения // *Казанский мед. ж.* 2011. Т. 92. № 5. С. 728—735.
- [9] *Moskowitz M. A.* Genes, proteases, cortical spreading depression and migraine: impact on pathophysiology and treatment // *Funct. Neurol.* 2007. V. 22. N 3. P. 133—136.
- [10] *Pietrobon D., Moskowitz M. A.* Pathophysiology of migraine // *Annu. Rev. Physiol.* 2013. V. 75. P. 365—391.
- [11] *Chauvel V., Vamos E., Pardutz A., Vecsei L., Schoenen J., Multon S.* Effect of systemic kynurenine on cortical spreading depression and its modulation by sex hormones in rat // *Exp. Neurol.* 2012. V. 236. N 2. P. 207—214.
- [12] *Lipton S. A., Kim W. K., Choi Y. B., Kumar S., D'Emilia D. M., Rayuda P. V., Arnelo D. R., Stamler J. S.* Neurotoxicity associated with dual actions of homocysteine at the N-methyl-D-aspartate receptor // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. N 11. P. 5923—5928.
- [13] *Ganapathy P. S., White R. E., Ha Y., Bozard B. R., McNeil P. L., Caldwell R. W., Kumar S., Black S. M., Smith S. B.* The role of N-methyl-D-aspartate receptor activation in homocysteine-induced death of retinal ganglion cells // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011. V. 52. N 8. P. 5515—5524.
- [14] *Shi Q., Savage J. E., Hufeisen S. J., Rauser L., Grajkowska E., Ernsberger P., Wroblewski J. T., Nadeau J. H., Roth B. L.* L-homocysteine sulfinic acid and other acidic homocysteine derivatives are potent and selective metabotropic glutamate receptor agonists // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. V. 305. N 1. P. 131—142.
- [15] *Yeganeh F., Nikbakht F., Bahmanpour S., Rastegar K., Namavar R.* Neuroprotective effects of NMDA and group I metabotropic glutamate receptor antagonists against neurodegeneration induced by homocysteine in rat hippocampus: in vivo study // *J. Mol. Neurosci.* 2013. V. 50. N 3. P. 551—557.
- [16] *Abushik P. A., Niittykoski 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.* 2014. V. 129. N 2. P. 264—274.
- [17] *Poddar R., Paul S.* Novel crosstalk between ERK MAPK and p38 MAPK leads to homocysteine-NMDA receptor-mediated neuronal cell death // *J. Neurochem.* 2013. V. 124. N 4. P. 558—570.
- [18] *Tenneti L., D'Emilia D. M., Troy C. M., Lipton S. A.* Role of caspases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons // *J. Neurochem.* 1998. V. 71. N 3. P. 946—959.
- [19] *Reyes R. C., Brennan A. M., Shen Y., Baldwin Y., Swanson R. A.* Activation of neuronal NMDA receptors induces superoxide-mediated oxidative stress in neighboring neurons and astrocytes // *J. Neurosci.* 2012. V. 32. N 37. P. 12 973—12 978.
- [20] *Matte C., Monteiro S. C., Calcagnotto T., Bavaresco C. S., Netto C. A., Wyse A. T.* In vivo and in vitro effects of homocysteine on Na⁺,K⁺-ATPase activity in parietal, prefrontal and cingulate cortex of young rats // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2004. V. 22. N 4. P. 185—190.
- [21] *Outinen P. A., Sood S. K., Liaw P. C. Y., Sarge K. D., Maeda N., Hirsh J., Ribau J., Podor T. J., Weitz J. I., Austin R. C.* Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine // *Biochem. J.* 1998. V. 332. Pt 1. P. 213—221.
- [22] *Perna A. F., Ingrosso D., De Santo N. G.* Homocysteine and oxidative stress // *Amino Acids* 2003. V. 25. N 3—4. P. 409—417.
- [23] *Loureiro S. O., Romao L., Alves T., Fonseca A., Heimfarth L., Moura Neto V., Wyse A. T., Pessoa-Pureur R.* Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes // *Brain Res.* 2010. N 1355. P. 151—164.
- [24] *Миронова Е. В., Лукина А. А., Бровцына Н. Б., Кривченко А. И., Антонов С. М.* Типы рецепторов глутамата, определяющие концентрационную зависимость его нейротоксического действия на нейроны коры головного мозга крыс // *Ж. эвол. биохим. и физиол.* 2006. Т. 42. № 6. С. 559—566.
- [25] *Antonov S. M., Johnson J. W.* Voltage-dependent interaction of open-channel blocking molecules with gating of NMDA receptors in rat cortical neurons // *J. Physiol.* 1996. V. 493. Pt 2. P. 425—445.
- [26] *Antonov S. M., Johnson J. W.* Permeant ion regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channel block by Mg²⁺ // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. N 25. P. 14 571—14 576.
- [27] *Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y.* A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. N 6. P. 3440—3450.
- [28] *Duchen M. R.* Mitochondria, calcium-dependent neuronal death and neurodegenerative disease // *Pflugers Arch.* 2012. V. 464. N 1. P. 111—121.
- [29] *Hamill O. P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F. J.* Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches // *Pflugers Arch.* 1981. V. 391. N 2. P. 85—100.
- [30] *Han E. B., Stevens C. F.* Development regulates a switch between post- and presynaptic strengthening in response to activity deprivation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. N 26. P. 10 817—10 822.
- [31] *Khodorov B.* Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons // *Progr. Biophys. Molec. Biol.* 2004. V. 86. N 2. P. 279—351.
- [32] *Abushik P. A., Sibarov D. A., Eaton M. J., Skatchkov S. N., Antonov S. M.* Kainate-induced calcium overload of cortical neurons in vitro: Dependence on expression of AMPAR GluA2-subunit and down-regulation by subnanomolar ouabain // *Cell Calcium*. 2013. V. 54. N 2. P. 95—104.
- [33] *Евстарова А. А., Миронова Е. В., Дворецкова Е. А., Антонов С. М.* Апоптоз и рецепторная специфичность его механизмов при нейротоксическом действии глутамата // *Росс. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*. 2008. Т. 94. № 4. С. 380—393.
- [34] *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 the confocal microscopy on neurons in culture // *J. Neurosci. Methods*. 2007. V. 163. N 1. P. 1—8.
- [35] *Sibarov D. A., Bolshakov A. E., Abushik P. A., Krivoi I. I., Antonov S. M.* Na⁺,K⁺-ATPase functionally interacts with the plasma membrane Na⁺,Ca²⁺ exchanger to prevent Ca²⁺ overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2012. V. 343. N 3. P. 596—607.
- [36] *Surtees R., Bowron A., Leonard J.* Cerebrospinal fluid and plasma total homocysteine and related metabolites in children with cystathionine beta-synthase deficiency: the effect of treatment // *Pediatr Res.* 1997. V. 42. N 5. P. 577—582.

- [37] Bolton A. D., Phillips M. A., Constantine-Paton M. Homocysteine reduces NMDAR desensitization and differentially modulates peak amplitude of NMDAR currents, depending on GluN2 subunit composition // *J. Neurophysiol.* 2013. V. 110. N 7. P. 1567—1582.
- [38] Traynelis S. F., Wollmuth L. P., McBain C. J., Menniti F. S., Vance K. M., Ogden K.K., Hansen K. B., Yuan H., Myers S. J., Dingledine R. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation and function // *Pharmacol. Rev.* 2010. V. 62. N 3. P. 405—496.
- [39] Sibrian-Vazquez M., Escobedo J. O., Lim S., Samoei G. K., Strongin R. M. Homocystamides promote free-radical and oxidative damage to proteins // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. N 2. P. 551—554.
- [40] Jara-Prado A., Ortega-Vazquez A., Martinez-Ruano L., Rios C., Santamaria A. Homocysteine-induced brain lipid peroxidation: effects of NMDA receptor blockade, antioxidant treatment, and nitric oxide synthase inhibition // *Neurotox. Res.* 2003. V. 5. N 4. P. 237—243.
- [41] Lu S. C. Regulation of glutathione synthesis // *Mol. Aspects Med.* 2009. V. 30. N 1—2. P. 42—59.

Поступила 11 IX 2014

HOMOCYSTEINE-INDUCED MEMBRANE CURRENTS, CALCIUM RESPONSES AND CHANGES OF MITOCHONDRIAL POTENTIAL IN RAT CORTICAL NEURONS

P. A. Abushik,¹ T. V. Karelina,¹ D. A. Sibarov,¹ J. D. Stepanenko,¹ R. Giniatullin,^{2,3} S. M. Antonov

¹ Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

² University of Eastern Finland, Kuopio, Finland

³ Kazan Federal University, Kazan, Russia

ABSTRACT

Homocysteine, a sulfur-containing amino acid, exhibits neurotoxic effects and is involved in the pathogenesis of several major neurodegenerative disorders. In contrast to well studied excitotoxicity of glutamate, the mechanism of homocysteine neurotoxicity is not clearly understood. By using whole-cell patch-clamp, calcium imaging (fluo-3) and measurements of mitochondrial membrane potential (rhodamine 123) we studied transmembrane currents, calcium signals and changes in mitochondrial membrane potential induced by homocysteine versus responses induced by NMDA and glutamate in cultured rat cortical neurons. L-homocysteine (50 μ M) induced inward currents that could be completely blocked by the selective antagonist of NMDA receptors — AP-5. In contrast to NMDA-induced currents, homocysteine-induced currents had a smaller steady-state amplitude. Comparison of calcium responses to homocysteine, NMDA or glutamate demonstrated that in all cortical neurons homocysteine elicited short, oscillatory-type calcium responses, whereas NMDA or glutamate induced sustained increase of intracellular calcium. Analysis of mitochondrial changes demonstrated that in contrast to NMDA homocysteine did not cause a drop of mitochondrial membrane potential at the early stages of action. However, after its long-term action, as in the case of NMDA and glutamate, the changes in mitochondrial membrane potential were comparable with the full drop of respiratory chain induced by protonophore FCCP. Our data suggest that in cultured rat cortical neuron homocysteine at the first stages of action induces neurotoxic effects through activation of NMDA-type ionotropic glutamate receptors with strong calcium influx through the channels of these receptors. The long-term action of homocysteine may lead to mitochondrial disfunction and appears as a drop of mitochondrial membrane potential.

Key words: homocysteine, glutamate, calcium, mitochondrial potential, cortical neurons.