

А.С. Левина, Ю.Н. Савенко, Н.А. Дюжикова и А.И. Вайдо

КАИНАТНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ В ГИППОКАМПЕ КРЫС ЛИНИЙ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО УРОВНЮ ВОЗБУДИМОСТИ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Лаборатория генетики высшей нервной деятельности (зав. — д-р биол. наук А.И. Вайдо),
Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург

В реализации механизмов дифференциальной адаптации к условиям среды важная роль принадлежит рецепторам глутамата в ЦНС. В настоящее время наименее изучены структурно-функциональные особенности каинатных рецепторов (КР) как в норме, так и при стрессе. В связи с этим цель работы состояла: 1) в изучении распределения и содержания субъединиц GluR 5/6/7 КР; 2) их изменения в пирамидном слое гиппокампа крыс линий с генетически детерминированными различиями по уровню возбудимости нервной системы под влиянием краткосрочного эмоционально-болевого стрессорного воздействия; 3) в оценке чувствительности пирамидных нейронов гиппокампа к действию агониста КР — каиновой кислоты. Установлено, что GluR 5/6/7-содержащие КР локализуются преимущественно в районе поля CA2 гиппокампа, у низковозбудимых животных их содержание выше, чем у высоковозбудимых. Короткий эмоционально-болевого стресс приводит к увеличению количества КР в поле CA2 гиппокампа только у высоковозбудимых крыс. Обнаружена избирательная чувствительность пирамидных нейронов разных полей гиппокампа к действию каиновой кислоты, зависящая от линейных характеристик возбудимости нервной системы животных.

Ключевые слова: гиппокамп, каинатные рецепторы, стресс, крысы

Известно, что стресс приводит к усиленному выделению нервными клетками глутамата — одного из основных возбуждающих нейромедиаторов. В высоких концентрациях глутамат действует на нервные клетки как эксайтотоксикант — вещество, способное нарушать процессы их жизнедеятельности вследствие гипервозбуждения. Механизм эксайтотоксичности затрагивает вначале ионные, а затем и метаболические процессы, что приводит к дегенеративным изменениям в клетке, вплоть до её гибели. Первичным звеном в механизме эксайтотоксичности являются глутаматные рецепторы не-NMDA-подтипа, в первую очередь, — каинатные рецепторы (КР) [12]. КР представлены в клетках гомо- и гетеромерными комплексами, включающими 5 типов субъединиц — GluR 5/6/7 и KA 1/2. Принцип организации субъединиц сходен, а различие между ними обеспечивается, наряду с экспрессией пяти разных генов, наличием участков альтернативного сплайсинга (GluR 5/6/7) и редактирования в РНК-транскрипте (GluR 5/6). В рецепторных комплексах GluR 5/6/7 являются основными функциональными субъединицами, а KA модулируют их активность [10, 16]. Функцией КР в синапсах считают активацию механизмов потенциации (постсинапс), регуляцию выделения медиатора по принципу обратной связи (пресинапс). КР играют существенную роль в процессах диффузной передачи [7], участвуют в метаботропном механизме пресинаптического ингибирования выброса глутамата с помощью протеинкиназы А [14]. В настоя-

щее время строение и функциональная роль КР в механизмах стрессовых реакций изучены мало [9]. Исследование морфофункциональных особенностей КР в пирамидном слое гиппокампа, структуры, являющейся мишенью действия стресса, где уровень экспрессии КР довольно высок [1], представляется особо важным на моделях животных с генетически детерминированными различиями по возбудимости нервной системы, — на линиях крыс, селекция которых по этому показателю длительно проводится в лаборатории генетики высшей нервной деятельности Института физиологии им. И.П. Павлова [3].

Цель работы — иммуногистохимическое исследование распределения и количественного содержания субъединиц GluR 5/6/7 КР в пирамидном слое гиппокампа крыс линий, контрастных по возбудимости нервной системы, и их изменения под влиянием краткосрочного эмоционально-болевого стрессорного воздействия, а также определение чувствительности линий к действию агониста КР — каиновой кислоты, оцениваемой по степени нейродегенеративных изменений в пирамидных нейронах гиппокампа.

Материал и методы. Объектом исследования служили крысы линий ВП1 и НП2 (ВП — высокий порог, низковозбудимые, НП — низкий порог возбудимости нервной системы, высоковозбудимые, 1,2 — селекционные программы), селектированные по указанному показателю в лаборатории генетики высшей нервной деятельности Института физиологии им. И.П. Павлова РАН [2, 3]. Животных содержали в виварии в условиях стандартного светового режима (12 ч

день : 12 ч ночь), на стандартном пищевом рационе. Для экспериментов использовали взрослых самцов в возрасте 5 мес. При этом соблюдали требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) об использовании животных для экспериментальных исследований. Протоколы опытов были утверждены комиссией по гуманному обращению с животными Института физиологии им. И.П.Павлова РАН.

В работе были использованы 8 экспериментальных групп по 5 крыс в каждой. Из них животные двух групп (ВП1, НП2) были интактными, крыс двух групп (ВП1, НП2) подвергали действию краткосрочного эмоционально-болевого стресса. Однократное эмоционально-болевое стрессорное воздействие проводили по стохастической схеме К. Гехта [11]. Животное помещали в прозрачную камеру с электрифицированным полом, в которую подавали 12 световых 10-секундных сигналов: 6 — неподкрепляемых и 6 — подкрепляемых в последние 4 с током (2,5 мА), межсигнальный интервал составлял 1 мин. Крысам следующих двух групп (ВП1, НП2) инъецировали каиновую кислоту (внутрибрюшинно из расчёта 10 мг/кг массы) [17], животным двух контрольных групп (ВП1, НП2) вводили изотонический раствор хлорида натрия. Через 30 мин после окончания эмоционально-болевого воздействия и через 4 сут после введения каиновой кислоты животных наркотизировали с помощью инъекций уретана (0,3 мл/100 г массы), проводили транскардиальную перфузию изотоническим раствором и 4% раствором параформальдегида, после чего животных декапитуировали, извлекали головной мозг, дополнительно фиксировали в 4% параформальдегиде в течение ночи, заливали в парафин по общепринятой методике. Изготавливали срезы гиппокампа на уровне –2,80 мм от брегмы в соответствии с атласом [15]. На срезах мозга интактных и подвергнутых стрессорному воздействию животных иммуногистохимически выявляли GluR 5/6/7-содержащие КР с использованием первичного антитела к субъединицам глутаматных рецепторов GluR 5/6/7 (Santa Cruz, США) (разведение 1:100), вторичного универсального биотинилированного антитела из QuickKit (Vectastain) (Vector, США). Визуализацию реакции с первичным антителом проводили с помощью DAB-набора (Vector, США). Срезы мозга после инъекций каиновой кислоты обрабатывали флюоресцентным маркером нейродегенерации FluoroJade В (Chemicon, США) [17]. Препараты анализировали с помощью светового микроскопа Микромед-3 и люминесцентного ЛЮАМ Р1. Фотосъёмку производили камерой

Canon PowerShot A640 с использованием программы Image Micro Canon. Фотоизображения окрашенных срезов обрабатывали и анализировали с использованием программного обеспечения ВидеоТест-FISH (Санкт-Петербург, Россия) (измерение площадей мечения). Статистическую обработку данных производили с помощью пакета программ Statgraphics PLUS 5.0 (тест Манна—Уитни).

Результаты исследования. В гиппокампе крыс линий ВП1 и НП2 при иммуногистохимическом окрашивании КР GluR5/6/7 они имеют тёмно-коричневый цвет и располагаются на плазмолемме сомы и проксимальных сегментов отростков дендритов пирамидных нейронов кластерами (рис. 1, а). Также хорошо видно наличие метки в пресинаптических окончаниях.

У интактных крыс обеих исследованных линий ВП1 и НП2 GluR 5/6/7-содержащие КР выявлены преимущественно поля СА2 гиппокампа, в районах полей СА1 и СА3 гиппокампа исследуемые субъединицы либо единичны, либо отсутствуют (см. рис. 1, б, в). Область иммуногистохимического мечения рецепторов, оцениваемая качественно и количественно по площади меченых районов в поле СА2 гиппокампа, у крыс линии НП2 меньше, чем у ВП1, что указывает на межлинейные различия по количественному содержанию рецепторов у интактных животных (см. рис. 1, б, в; таблица).

Область локализации КР в поле СА2 после действия эмоционально-болевого стресса у животных линии НП2 значительно превышает данный показатель в контрольной группе (см. рис. 1, в, д; таблицу), что свидетельствует об увеличении количества КР у крыс линии НП2 в ответ на стресс. У крыс линии ВП1 изменений этой характеристики после стрессорного воздействия не обнаружено (см. рис. 1, б, г; таблицу).

У животных линии ВП1 после введения каиновой кислоты выявили широкую область дегенеративных изменений в пирамидном слое поля СА3 (рис. 2, а), у крыс линии НП2 объем дегенерации в этом районе значительно меньше (см. рис. 2, б). Однако у крыс линии НП2 наблюдается интенсивная нейродегенерация в пирамидных нейронах поля СА1 (см. рис. 2, г), в то время как у крыс линии ВП1 в этой области либо вовсе не обнаруживаются дегенеративные процессы, либо могут присутствовать единичные флюоресцирующие клетки (см. рис. 2, в). Поскольку качественная картина межлинейных различий по степени нейродегенерации в поле СА1, представленная на рис. 2, достаточно убедительна, приводим площади районов дегенерации только для поля СА3, в котором этот показатель у крыс линии ВП1 значимо ($P < 0,05$) превышает аналогичный показа-

Площадь (мкм²) иммуногистохимического мечения GluR 5/6/7-содержащих каиновых рецепторов на срезах гиппокампа крыс двух линий в норме и после воздействия короткого стресса

| Линия крыс | Группа животных | |
|------------|----------------------|---------------------|
| | Контрольная, медиана | Подопытная, медиана |
| ВП1 | 6163,94 | 6608,94 |
| НП2 | 4720,23* | 7632,09** |

Примечание. ВП1 — линия крыс с высоким порогом возбудимости; НП2 — линия крыс с низким порогом возбудимости.

* Различия значимы между контрольными группами линий ВП1 и НП2.

** Различия значимы между контрольной и подопытной группами линии НП2 при $P < 0,05$ (тест Манна—Уитни).

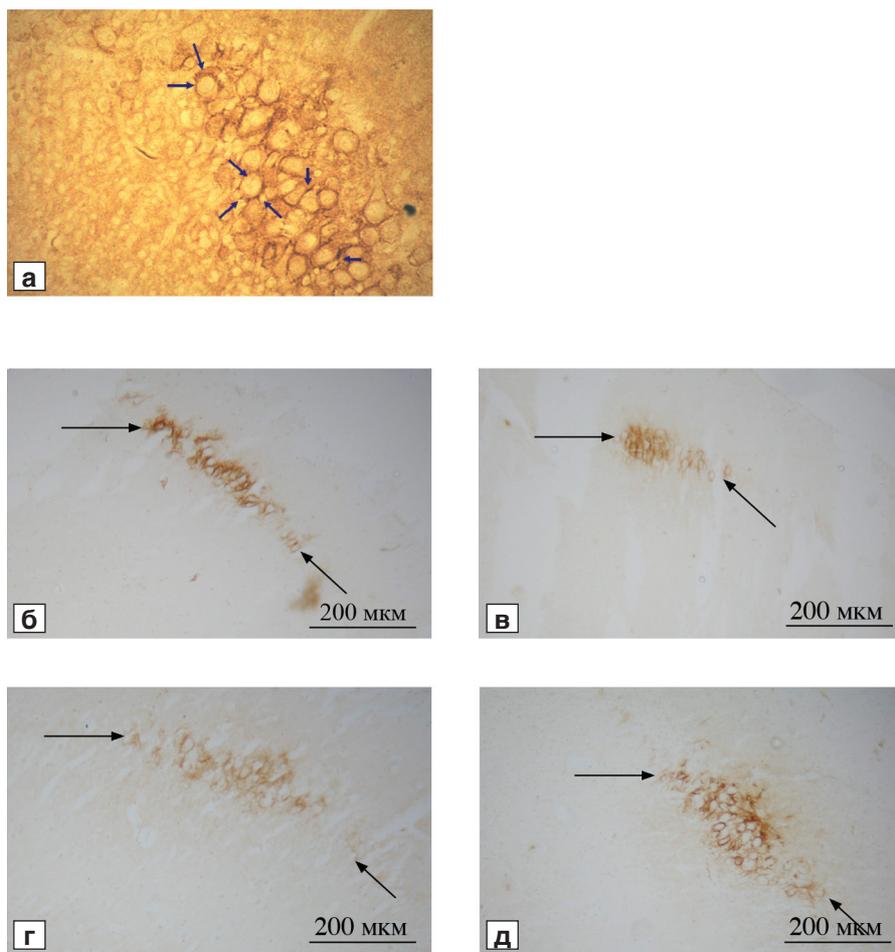


Рис. 1. Распределение каинатных рецепторов GluR 5/6/7 в пирамидном слое гиппокампа крыс двух линий ВП1 (б, г) и НП2 (в, д). а — кластеры каинатных рецепторов в плазмолемме нейронов (стрелки); б, в — в норме (контроль); г, д — после эмоционально-болевого стресса (опыт). Стрелки — границы районов пирамидного слоя, содержащих рецепторы. Иммуногистохимическое окрашивание: I антитело — к GluR 5/6/7 (Santa Cruz) (разведение 1:100), II антитело — универсальное биотинилированное антитело (Quick Kit). а — об. 40, ок. 10.

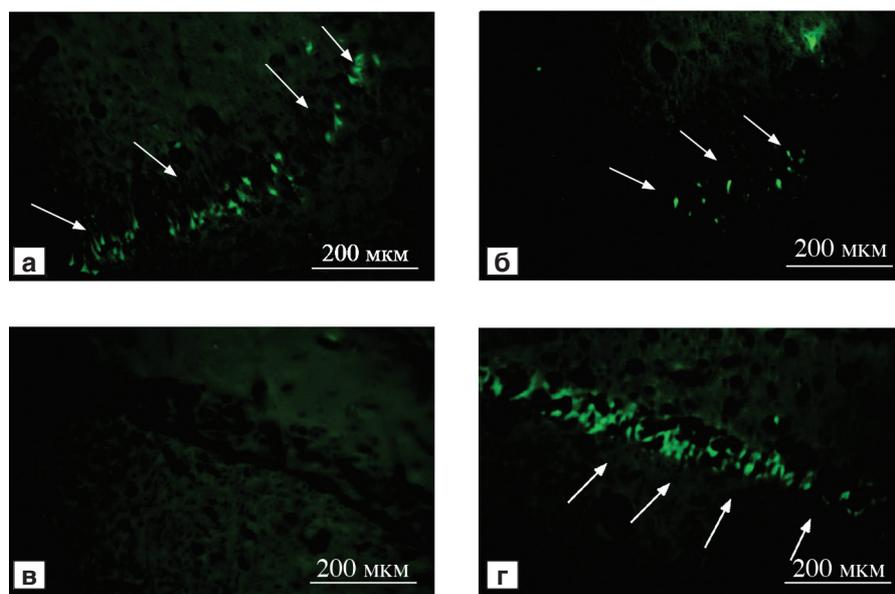


Рис. 2. Дегенерирующие нейроны в поле CA3 (а, б) и поле CA1 (в, г) гиппокампа у крыс линии ВП1 (а, в) и НП2 (б, г). Светящиеся клетки (стрелки) — дегенерирующие нейроны. Обработка FluoroJade B.

тель у крыс линии НП2 (0,088 и 0,052 мкм² соответственно).

Обсуждение полученных данных. Результаты проведенного исследования позволяют заключить, что GluR 5/6/7-содержащие КР локализованы у крыс как низковозбудимой ВП1, так и высоковозбудимой НП2 линий в пирамидных нейронах поля СА2 гиппокампа. Количественное содержание КР этого типа ниже у крыс линии НП2, чем у крыс линии ВП1, что свидетельствует в пользу существования межлинейных различий, обусловленных генетически детерминированными особенностями возбудимости нервной системы.

Реакция на эмоционально-болевого стрессорное воздействие наблюдалась только у крыс линии НП2 и проявлялась значительным увеличением количества рецепторов, что можно объяснить процессами сенситизации вследствие гипервозбуждения клеток и, возможно, увеличением числа синапсов, так как к качественным особенностям развития патологических процессов относится и образование новых межнейрональных связей вследствие пластических изменений [5]. Увеличение количества КР вследствие аноксического стресса описано в литературе [9].

Выявленные дифференциальные межлинейные различия по степени дегенеративных изменений нейронов могут свидетельствовать в пользу разной чувствительности пирамидных нейронов к действию агониста КР — каиновой кислоты: у крыс линии ВП1 наиболее чувствительными являются пирамидные нейроны поля СА3, а у НП2 — клетки поля СА1.

Различия между линиями животных по чувствительности нейронов гиппокампа к каиновой кислоте описаны в литературе на примере разных моделей [13]. В частности, в работе на нескольких инбредных, аутбредных и гибридных линиях мышей была продемонстрирована разница не только по подверженности тканей гиппокампа каинат-индуцированной нейродегенерации, но и по расположению чувствительных участков [14]. Такие различия могут быть обусловлены дифференциальным распределением КР либо особенностями структурной организации гиппокампа, характерными для разных линий животных и закрепившимися в результате селекции.

В нашем исследовании КР локализовались преимущественно в районе поля СА2, в котором не было зарегистрировано нейродегенерации, индуцированной каинатом, а в полях СА3 и СА1, в свою очередь, рецепторы также практически не обнаруживались. Такое пространственное разнесение процессов восприятия нейротоксиканта и гибели клеток может быть связано с существова-

нием, наряду с КР типа GluR 5/6/7, других субъединиц — КА1 и КА2, которые могут принимать участие в этом процессе, а также с передачей возбуждения как через проводящие пути, так и диффузно — через выброс глутамата в межклеточное вещество или распространение NO, образующегося при гипервозбуждении и известного в качестве вторичного посредника, способного диффундировать сквозь мембраны и в межклеточном пространстве [4]. Таким образом, гибель нейронов индуцируется каиновой кислотой, которая влияет не только на рецепторы GluR 5/6/7, но и на другие подтипы КР, а также на ряд вторичных процессов, которые она запускает.

Известно, что животные линий ВП1 и НП2 имеют дифференциальный характер проявления поведенческих реакций на стресс в ряде этологических тестов, в частности, по скорости формирования условного рефлекса активного избегания (УРАИ), в зависимости от генетически детерминированного уровня возбудимости нервной системы [8]. Ранее на линиях крыс, селективных по скорости формирования УРАИ, было показано изменение структурной организации связей в гиппокампе в зависимости от направления селекции [6]. На основании этого, можно предположить, что крысы исследуемых линий различаются по организации системы внутренних связей структур гиппокампа, что обуславливает различные пути передачи возбуждающего сигнала и различную их подверженность процессам гипервозбуждения.

Таким образом, совокупность полученных результатов позволяет заключить: 1) у крыс с высоким и низким порогами возбудимости нервной системы GluR 5/6/7 субъединицы КР локализованы в пирамидном слое поля СА2 гиппокампа, рецепторы расположены кластерами на плазмолемме тел и проксимальных сегментов дендритов пирамидных нейронов, в пресинаптических окончаниях; 2) количественное содержание субъединиц GluR 5/6/7 в поле СА2 гиппокампа зависит от линейных характеристик возбудимости животных; 3) GluR 5/6/7-содержащие КР принимают участие в реализации реакции на краткосрочный эмоционально-болевого стресс в зависимости от генетически детерминированных параметров возбудимости животных; 4) линии крыс различаются по преимущественной чувствительности пирамидных нейронов разных полей гиппокампа к действию агониста КР — каиновой кислоты — поля СА3 у низковозбудимых и СА1 у высоковозбудимых крыс.

ЛИТЕРАТУРА

1. Архипов В.И., Сирота Т.В. и Лебедев Д.С. Влияние внутригиппокампального введения каиновой кислоты на поведение крыс и функциональное состояние митохондрий в структурах мозга. Изв. РАН, Сер. биол., 2007, № 5, с. 570–576.
2. Вайдо А.И. Физиолого-генетический анализ возбудимости нервной системы и поведения лабораторной крысы: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. СПб., 2000.
3. Вайдо А.И. и Ситдииков М.Х. Селекция линий крыс по долгосрочному порогу возбудимости нервно-мышечного аппарата. Генетика, 1979, т. 15, № 1, с. 144–147.
4. Калиниченко С.Г. и Матвеева Н.Ю. Морфологическая характеристика апоптоза и его значение в нейрогенезе. Морфология, 2007, т. 131, вып. 2, с. 6–28.
5. Крыжановский Г. Н. Общая патофизиология нервной системы. М., Медицина, 1997.
6. Лопатина Н.Г. и Пономаренко В.В. Исследование генетических основ высшей нервной деятельности. В кн.: Физиология поведения: нейробиологические закономерности (Руководство по физиологии). Л., Наука, 1987, с. 31–36.
7. Семьянов А.В. Диффузная внесинаптическая нейротрансдукция посредством глутамата и ГАМК. Журн. высш. нервн. деят., 2004, т. 54, № 1, с. 68–84.
8. Ширяева Н.В., Вайдо А.И. и Лопатина Н.Г. Дифференциальная чувствительность к невротизирующему воздействию линий крыс, различающихся по порогу возбудимости нервной системы. Журн. высш. нервн. деят., 1992, т. 42, № 1, с. 137–143.
9. El-Khodor B.F., Flores G., Srivastava L.K. and Boksa P. Effects of birth insult and stress at adulthood on excitatory amino acid receptors in adult rat brain. Synapse, 2004, v. 54, № 3, p. 138–146.
10. Feligioni M., Holman D., Haglerod K. et al. Ultrastructural localization and differential agonist-induced regulation of AMPA and kainate receptors present at the presynaptic active zone and postsynaptic density. J. Neurochem., 2006, v. 99, p. 549–560.
11. Hecht K., Treptov K., Choinovski K. and Peschel M. Die raum-zeitliche Organisation der Reiz-Reaktion-Beziehungen bedingtreflektorischer Prozesse. Jena, Fischer, 1972.
12. Lerma J., Paternain A.V., Rodriguez-Moreno A. and Lopez-Garcia J.C. Molecular physiology of kainate receptors. Physiol. Rev., 2001, v. 81, № 3, p. 971–998.
13. McLin J.P. and Steward O. Comparison of seizure phenotype and neurodegeneration induced by systemic kainic acid in inbred, outbred, and hybrid mouse strains.. Eur. J. Neurosci., 2006, v. 24, № 8, p. 2191–2202.
14. Negrete-Diaz J.V., Sihra T. S., Delgado-Garcia J.M. and Rodriguez-Moreno A. Kainate receptor-mediated inhibition of glutamate release involves protein kinase A in the mouse hippocampus. J. Neurophysiol., 2006, v. 96, № 4, p. 1829–1837.
15. Paxinos G. and Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 6th edition. NY, Academ. Press, 2007.
16. Pinheiro P. and Mulle C. Kainate receptors. Cell Tiss. Res., 2006, v. 326, № 2, p. 457–482.
17. Schmued L.C., Albertson C. and Slikker W.J. Fluoro-Jade : a novel fluorochrome for the sensitive and reliable histochemical localization of neuronal degeneration. Brain Res., 1997, v. 751, p. 37–46.

Поступила в редакцию 24.09.2010
Получена после доработки 14.02.2011

KAINATE RECEPTORS IN THE HIPPOCAMPUS OF RAT STRAINS WITH DIFFERENT LEVELS OF THE NERVOUS SYSTEM EXCITABILITY

A.S. Levina, Yu.N. Savenko, N.A. Dyuzhikova and A.I. Vaydo

Glutamate receptors in the central nervous system play a significant role in the mechanisms of differential adaptation to the environmental conditions. However, structural and functional parameters of kainate receptors (KR) under normal conditions and during exposure to stress are not well characterized. Therefore, the aim of this research was to 1) study the distribution and the quantity of KR GluR 5/6/7 subunits; 2) examine their changes in the pyramidal cell layer of the hippocampus in rat strains with have genetically determined distinctions in the levels of nervous system excitability following the exposure to short-term emotional-painful stress; 3) estimate the sensitivity of hippocampal pyramidal neurons to the action of KR agonist — kainic acid. It was demonstrated that GluR 5/6/7 KR are localized mainly in the region of hippocampal CA2 area; in the animals with low excitability their quantity was greater than in those with high excitability. Short-term emotional-painful stress resulted in the increase of KR in hippocampal CA2 area only in highly excitable rats. Selective sensitivity of pyramidal neurons in different hippocampal fields to the action of kainic acid was demonstrated and it was found to depend on animal strain characteristics of of the nervous system excitability.

Key words: *hippocampus, kainate receptors, stress, rats*

Laboratory of Higher Nervous Activity, RAS I.P. Pavlov Institute of Physiology, St. Petersburg