

**ВЛИЯНИЕ ЭТАНОЛА НА ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКУЮ АКТИВАЦИЮ  
КАЛЬЦЕВОГО СИГНАЛА В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОНАХ КОРЫ  
ЛЕВОГО И ПРАВОГО ПОЛУШАРИЙ МОЗГА КРЫС**

*Новоселова Н.Ю.*

Учреждение Российской Академии Наук Институт эволюционной физиологии и  
биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

[nina.novoselova@mail.ru](mailto:nina.novoselova@mail.ru)

Чрезмерное потребление алкоголя или алкогольная интоксикация приводят к развитию обширных и выраженных процессов нейродегенерации в различных структурах мозга, включая его кортикальные и субкортикальные отделы [4, 7]. Так, макро- и микроструктурные исследования мозга (*in vivo* imaging, *postmortem*) у больных алкоголизмом выявили значительное уменьшение объема серого и белого вещества, численности нейронов, дендритов и размеров дендритного дерева [4, 7]. Согласно современным представлениям, в качестве общих механизмов нейродегенерации рассматриваются эксайтотоксичность, избыточное накопление внутриклеточной концентрации ионов кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ), кальцийзависимая активация гидролитических ферментов (фосфолипазы, протеазы, нуклеазы) и развитие окислительного стресса. Исследования *in vitro* показали, что этанол повышает базальный уровень  $[Ca^{2+}]_i$  в нейрональных (нейроны, астроциты) [8, 10, 12] и других (PC12, мышечные) типах клеток [12], путем высвобождения ионов кальция из внутриклеточных депо. Согласно многочисленным сообщениям патологические эффекты этанола реализуются в значительной степени посредством глутаматергической системы. Так, на моделях *in vitro* установлено, что этанол блокирует вход  $Ca^{2+}$  в клетку за счет ингибирования, в частности, активности ионотропных глутаматных рецепторов (NMDA, каинатные, AMPA) [5, 2], физиологическим агонистом которых служит глутамат – основной возбуждающий нейромедиатор ЦНС, широко представленный в структурах мозга (в частности, 80-90% нейронов коры и гиппокампа формируют глутаматергические синапсы). При этом преимущественной мишенью действия этанола является NMDA рецепторы, функционально связанные с кальциевым каналом и непосредственно вовлеченные в каскадный механизм эксайтотоксичности. Выявлены принципиальные различия в эффектах острого и хронического действия этанола на NMDA рецепторы. Так, в случае острого воздействия, этанол подавляет активность NMDA рецепторов [5, 2], тогда как

при его длительной экспозиции усиливает активность NMDA рецепторов, что в свою очередь приводит к развитию эффекта гиперчувствительности к эксайтотоксичности [11]. При этом, установлено, что ингибирование этанолом активности NMDA рецепторов способно оказывать нейропротекторное действие в условиях острых нейрональных повреждений. Так, обработка этанолом (100мМ) культивируемых нейронов коры мозга крыс, частично предотвращала их гибель при глутамат и NMDA индуцированной токсичности, при чем этот эффект отменялся с помощью NMDA антагониста МК-801 [6]. Учитывая вовлеченность NMDA рецепторов, в частности, в механизмы памяти и обучения, предполагается, что нарушения функций этого рецептора могут лежать в основе развития когнитивного дефицита при алкоголизме.

К настоящему времени, накоплено достаточно фактов, свидетельствующих о правополушарной латерализации эффекта алкоголя, условно рассматриваемого в качестве правополушарного ингибитора [1]. Тем не менее, нейрохимические аспекты межполушарного действия алкоголя на сегодняшний день далеко не изучены. С учетом имеющихся сведений о формировании межполушарной асимметрии на самых ранних стадиях эмбрионального развития [3], адекватной моделью для изучения лево- и правополушарных нейрохимических механизмов нейродегенерации может служить нейрональная культура, полученная отдельно из соответствующих полушарий мозга новорожденных крыс.

Задачей настоящей работы была сравнительная оценка влияния этанола непосредственно на внутриклеточную концентрацию кальция и активность глутаматных рецепторов, регистрируемую по  $Ca^{2+}$  ответу в культивируемых нейронах коры левого и правого полушарий мозга новорожденных крыс.

### **Материалы и методы**

Вкратце, культуру нейронов получали из коры отдельно левого и правого полушарий мозга новорожденных крыс-самцов линии Wistar (1 сутки после рождения). Животных умерщвляли с использованием  $CO_2$  ингаляции. Извлеченную ткань мозга диссоциировали на клетки ферментативным гидролизом с использованием трипсина (0,25%, Биолот, Россия). Рассев клеток, осуществляли в соответствии с методом [9] в чашках Петри (d=40 мм, Биолот) на полосках покровных стекол (12x24 мм), покрытых поли-D-лизином. Клетки культивировали в питательной среде (DMEM/F12, 10% эмбриональная сыворотка коровы, 0,5% пенициллин/стрептомицин) в  $CO_2$  инкубаторе при атмосфере содержащей 5%  $CO_2$  и температуре 37°C. Для определения

внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ) использовали культуру зрелых нейронов (10 дней после посева), руководствуясь тем, что нейроны к 7-9 суткам культивирования формируют весь комплекс глутаматных рецепторов (NMDA, AMPA и каинатные) и являются чувствительными к эксайтотоксичности. Далее, клетки на стеклах, нагружали флуоресцентным красителем fura-2 AM (10 мкМ) в стандартный раствор Локка в течение часа при комнатной температуре. Регистрацию  $[Ca^{2+}]_i$  в индивидуальных нейронах осуществляли с помощью компьютерной системы анализа внутриклеточного содержания ионов (Intracellular Imaging & Photometry System, USA) при длине волн возбуждения 340 и 380 нм и эмиссии 510 нм. Концентрацию ионов кальция рассчитывали как соотношение интенсивностей флуоресценции ( $F_{340}/F_{380}$ ) с учетом калибровочной кривой с помощью встроенной компьютерной программы InCytIm2™. Для изучения влияния этанола на  $[Ca^{2+}]_i$  в культивируемых нейронах, этиловый спирт апплицировали в концентрации 100 мМ в течение 10 мин. Эффект этанола на активность глутаматных рецепторов оценивали по  $Ca^{2+}$  ответу на аппликацию глутамата (1 мМ, 5 мин) до и после воздействия этанолом (100 мМ, 10 мин). После каждой обработки (глутаматом или этанолом) клетки отмывали стандартным раствором.

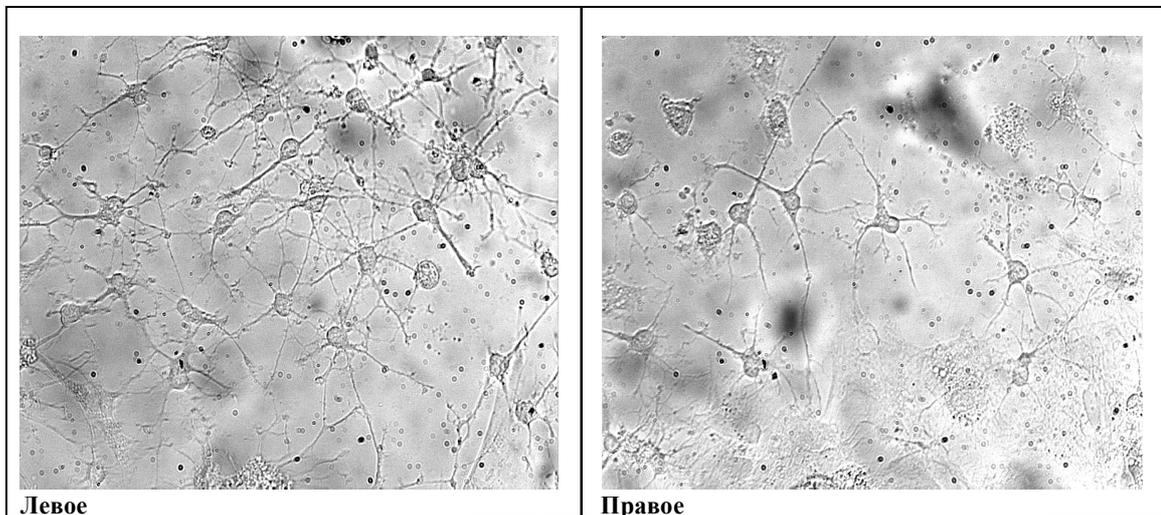
Данные, полученные для индивидуальных нейронов усредняли ( $M \pm m$ ). Достоверность различий между средними величинами оценивали по *t* критерию Стьюдента, при уровне значимости  $p < 0.05$ .

## **Результаты исследования**

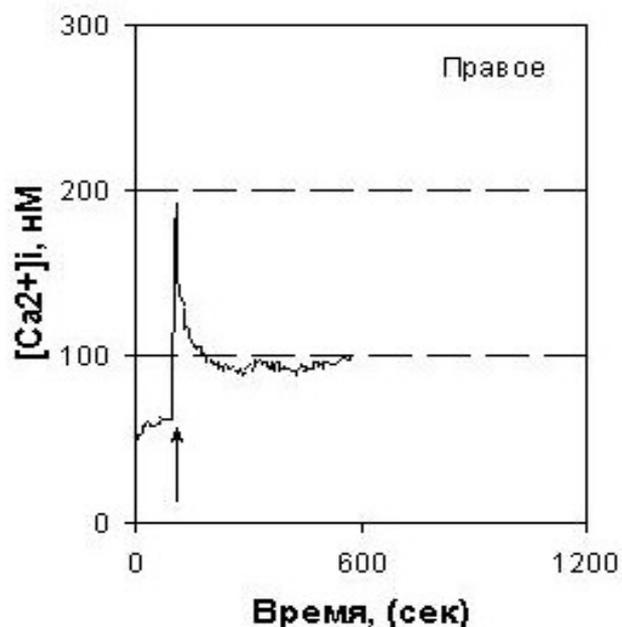
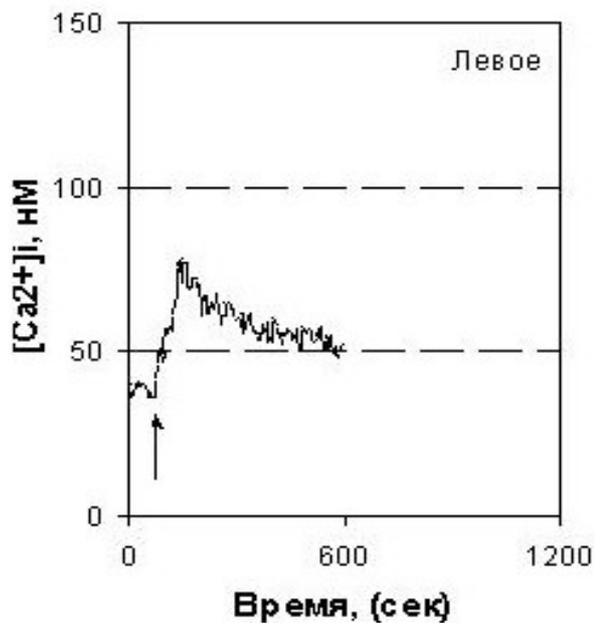
Исследования показали, что аппликация этанолом в концентрации 100 мМ в течение 10 мин вызывала существенное увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  в обоих полушариях: на 108 % и 208 % соответственно в левом и правом полушариях по сравнению с исходным уровнем (рис. 1). Воздействие глутаматом (общего неспецифического активатора глутаматных рецепторов) в концентрации 1 мМ в течение 5 мин приводило к более существенному высвобождению  $Ca^{2+}$  в обоих полушариях, что составляло для левого 338%, тогда как для правого 412% по сравнению с исходным уровнем (рис. 2). При этом, установлено, что 10 минутная экспозиция этанолом значительно снижала выброс  $Ca^{2+}$  в ответ на повторное действие глутамата. В этом случае внутриклеточная концентрация кальция увеличивалась в левом полушарии на 44%, в то время как в правом на 81% по сравнению с исходным уровнем. Сравнение величин выброса  $Ca^{2+}$  при первом воздействии глутаматом (до экспозиции этанолом) по сравнению со

вторым (после экспозиции этанолом) показало, что активность глутаматных рецепторов снижалась в левом на 78%, при этом в правом на 67,5%.

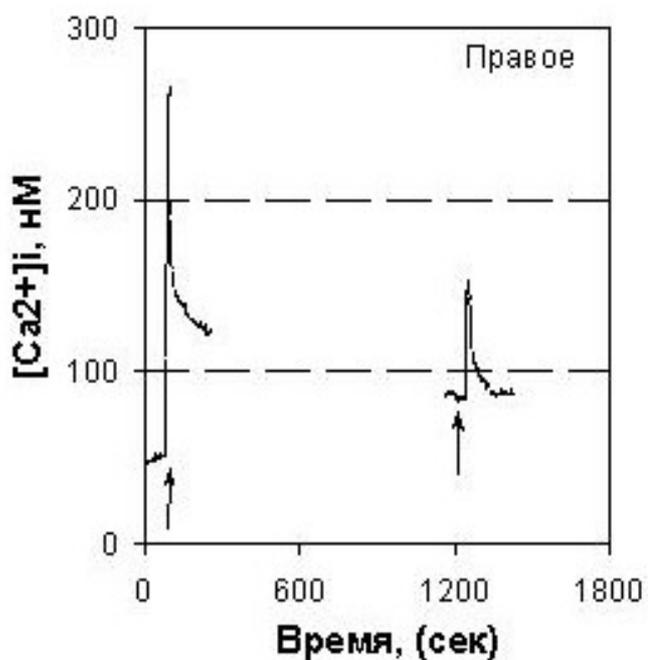
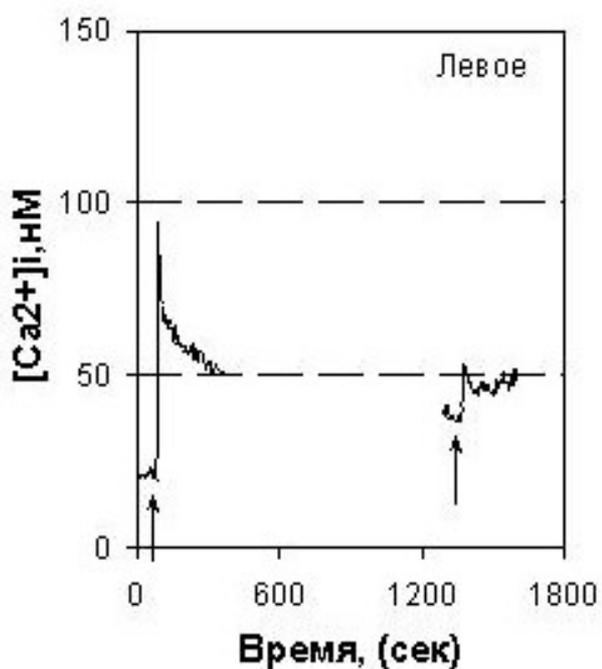
Таким образом, полученные нами данные, свидетельствуют о том, что острое действие этилового спирта в токсической концентрации, вызывающей по данным литературы гибель нейронов [6], приводила к более существенному повышению исходного уровня  $[Ca^{2+}]_i$  в правом полушарии по сравнению с левым, в то время как ингибирование активности глутаматных рецепторов оказалось выше в левом полушарии.



**Рис. 1.** Нейроны коры левого и правого полушарий мозга крыс-самцов на 10 сутки культивирования. Фотографии получены с помощью инвертированного микроскопа РИМ-III (WPI, USA), увел. 40 х, и цветной цифровой камеры Leica DFC300 FX (Germany) с разрешением 1392 x 1040 пикселей.



**Рис. 2.** Изменение  $[Ca^{2+}]_i$  в культивируемых нейронах коры левого и правого полушария мозга крыс в ответ на аппликацию этанолом (100мМ, 10 мин), среднее из  $n=12$ , где  $n$  число нейронов.



**Рис. 3.** Изменение  $[Ca^{2+}]_i$  в культивируемых нейронах коры левого и правого полушария мозга крыс в ответ на аппликацию глутаматом (1 мМ, 5 мин) до и после воздействия этанолом (100мМ, 10 мин), среднее из  $n=11$ , где  $n$  число нейронов.

## Литература

1. Максимович Я.Б., Кукуричкин Е.Р., Рыбалов С.С., Чайковская И.П. О межполушарной фармакологической асимметрии. *Фармакология и токсикология* 1985. Т.48. С. 22-25.
2. Bhave SV, Snell LD, Tabakoff B, Hoffman PL. Mechanism of ethanol inhibition of NMDA receptor function in primary cultures of cerebral cortical cells. *Alcohol Clin Exp Res.* 1996. V.20. № 5. P. 34-41.
3. Geschwind DH, Miller BL. Molecular approaches to cerebral laterality: development and neurodegeneration. *Am J Med Genet.* 2001. V.101. № 4. P.370-81.
4. Crews FT, Nixon K. Mechanisms of neurodegeneration and regeneration in alcoholism. *Alcohol Alcohol.* 2009. V. 44. №. 2. P.115-27.
5. Fischer W, Franke H, Illes P. Effects of acute ethanol on the Ca<sup>2+</sup> response to AMPA in cultured rat cortical GABAergic nonpyramidal neurons. *Alcohol Alcohol.* 2003. V. 38. №. 5. P.394-9.
6. Lustig HS, Chan J, Greenberg DA. Ethanol inhibits excitotoxicity in cerebral cortical cultures. *Neurosci Lett.* 1992. V. 135. № 2. P.259-61.
7. Meng XF, Zou XJ, Peng B, Shi J, Guan XM, Zhang C. Inhibition of ethanol-induced toxicity by tanshinone IIA in PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin.* 2006. V. 27. № 6. P. 659-64.
8. Mironov SL, Hermann A. Ethanol actions on the mechanisms of Ca<sup>2+</sup> mobilization in rat hippocampal cells are mediated by protein kinase C. *Brain Res.* 1996. V. 714. № 1-2. P. 27-37.
9. Muraoka S, Takahashi T. Primary dissociated cell culture of fetal rat central nervous tissue. I. Immunocytochemical and ultrastructural studies of cell development and synaptogenesis. *Brain Res Dev Brain Res.* 1989. V.49. № 1. P.51-62.
10. Salazar M, Pariente JA, Salido GM, Ethanol induces glutamate secretion by Ca<sup>2+</sup> mobilization and ROS generation in rat hippocampal astrocytes. *Neurochem Int.* 2008. V 52. № 6. P. 1061-7.
11. Smothers CT, Mrotek JJ, Lovinger DM. Chronic ethanol exposure leads to a selective enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor function in cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther.* 1997. V. 283. № 3. P. 1214-22.
12. Xiao ZM, Li LJ, Yu SZ, Lu ZN, Li CY, Zheng JQ. Effects of extracellular Ca(2+) influx and intracellular Ca(2+) release on ethanol-induced cytoplasmic Ca(2+) overload in

cultured superior cervical ganglion neurons. . Neurosci Lett. 2005. V. 390. № .2. P. 98-103.

Автор искренне признателен Г.Б. Белостоцкой за предоставленный для исследования флуорохром - fura-2 AM и методическую помощь.