

УДК 612.8

СПОНТАННАЯ И ВЫЗВАННАЯ ГЛУТАМАТОМ КАЛЬЦИЕВАЯ АСТРОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ В ПЕРЕЖИВАЮЩИХ СРЕЗАХ ГИППОКАМПА КРЫС

Я.И. Калинин¹, А.В. Потанина¹, А.С. Пимашкин¹, Ю.Н. Захаров¹,
И.В. Мухина^{1,2}, В.Б. Казанцев¹, А.В. Семьянов¹

⁽¹⁾Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, г. Нижний Новгород;

⁽²⁾Нижегородская государственная медицинская академия, г. Нижний Новгород;

e-mail: yasya13@mail.ru)

В данной работе с использованием конфокальной микроскопии были исследованы спонтанные и вызванные глутаматом изменения внутриклеточного Ca^{2+} в астроцитах переживающих срезов гиппокампа крыс на различных стадиях онтогенеза.

Ключевые слова: гиппокамп, астроциты, внутриклеточный Ca^{2+} , глутамат.

Обработка информации в мозге связана с активностью нейронов. Однако недавние исследования показали, что астроциты также влияют на информационный процесс [1, 2]. Астроциты — это электрически невозбудимые клетки, способные генерировать Ca^{2+} сигналы. Известно, что Ca^{2+} сигналы астроцитов могут возникать в ответ на активность нейронов [2]. Это позволило сделать предположение, что астроциты интегрируют нейронную активность. Также было показано, что астроциты экспрессируют метаболитные рецепторы глутамата [2, 3]. Поэтому глутамат рассматривается как один из основных передатчиков в нейрон-астроцитарных взаимодействиях [3]. Целью данной работы было сравнить частоты и длительности спонтанных Ca^{2+} осцилляций в астроцитах гиппокампа крыс разных возрастных групп и выявить зависимость между физиологической концентрацией глутамата (0,7 мкМ) и динамикой спонтанной Ca^{2+} активности астроцитов в срезах гиппокампа.

Материалы и методы

В работе проводились исследования спонтанной и вызванной глутаматом Ca^{2+} астроцитарной активности в срезах гиппокампа крыс. Были использованы поперечные срезы гиппокампа толщиной 350 мкм, полученные из мозга самцов крыс линии Wistar возрастом 21–30 дней. Животные были умерщвлены путем цервикальной дислокации с последующей декапитацией. Сразу после извлечения мозг помещался в постоянно карбогенизированный раствор нормального Рингера (рН 7,4; осмолярность 295 мОсм), и все дальнейшие операции по его препарированию проводились при охлаждении. Приготовленные срезы были инкубированы с двумя типами маркеров: Ca^{2+} индикатором Oregon Green-488

BAPTA-1 AM (OG) и астроцитарным маркером Sulforhodamine 101 (SR). Для аппликации глутамата использовали микропипетки ($d = 15\text{--}20$ мкм) с сопротивлением 2 МОм. В работе был использован лазерный сканирующий конфокальный микроскоп Carl Zeiss LSM 510 Duoscan. Записи изменения флуоресценции велись в режиме полного кадра, с цифровым разрешением 256×256 пикселей, частотой сканирования 1 Гц и пространственным разрешением 400×400 мкм. Флуоресценция индикаторов регистрировалась в диапазонах 500–530 (Oregon Green 488 BAPTA-1 AM), 650–710 нм (Sulforhodamine 101). Данные обрабатывали с помощью оригинального программного пакета. Достоверность статистических различий выборок проверялась с помощью t-теста Стьюдента в программе Origin 7.0. Данные представлены в виде средних значений, где n — число клеток.

Результаты

В результате проведенного исследования были получены конфокальные изображения полей CA1 и CA3 гиппокампа крыс (рис. 1).

В работе были исследованы частоты и длительности спонтанных Ca^{2+} событий в астроцитах гиппокампа крыс трех возрастных групп (5, 16, 21-й день постнатального развития). С увеличением возраста животных средняя частота и длительность Ca^{2+} событий в астроцитах уменьшаются и составляют соответственно P5: $0,123 \text{ мин}^{-1}$, 33,7 с; P16: $0,147 \text{ мин}^{-1}$, 22,7 с; P21: $0,08 \text{ мин}^{-1}$, 15,9 с ($n = 15$).

Также был оценен эффект добавления экзогенного глутамата концентрацией 0,7 мкМ на Ca^{2+} активность астроцитов гиппокампа крыс (P21) (рис. 2).

При добавлении экзогенного глутамата происходит увеличение средних частоты и длительности Ca^{2+} событий в астроцитах, которые составляют со-

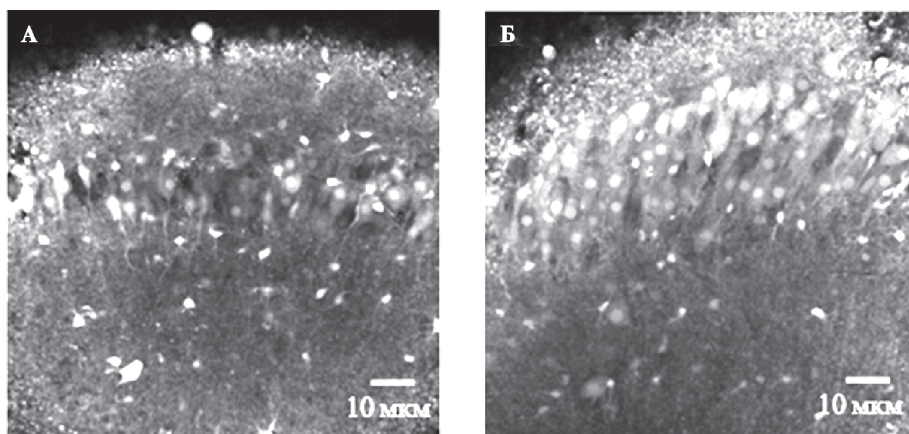


Рис. 1. Конфокальные изображения поля CA1 (А), CA3 (Б) гиппокампа крысы Р(21), полученные с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 510 DuoScan. Флуоресценция Sulforhodamine 101 (650–710 нм) и Oregon Green-488 BAPTA-1 AM (500–530 нм). Идентификация клеток: желтые — астроциты, зеленые — нейроны

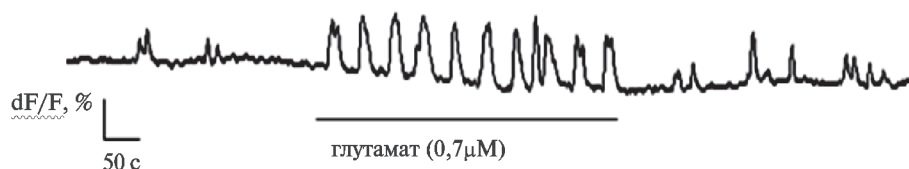


Рис. 2. Запись Ca^{2+} астроцитарной активности в переживающих срезах гиппокампа крыс Р(21) под действием глутамата (0,7 мкМ)

ответственно: контроль — $0,19 \text{ мин}^{-1}$, 16,03 с; при аппликации глутамата (0,7 мкМ) — $0,9 \text{ мин}^{-1}$, 36,86 с; при “отмывке” — $0,43 \text{ мин}^{-1}$, 17,04 с ($n = 10$).

Выводы

В работе исследована спонтанная и вызванная Ca^{2+} астроцитарная активность переживающих срезов гиппокампа крыс по данным конфокальной флуоресцентной микроскопии. Экспрессия рецепторов и транспортеров глутамата, расположенных на астроцитах гиппокампа, различна в разные периоды постнатального развития крыс. Это позволяет предположить, что изменение частоты и дли-

тельности спонтанной Ca^{2+} активности астроцитов гиппокампа крыс связано с уровнем экспрессии и плотностью распределения различных типов рецепторов и транспортеров глутамата [4]. Также показано, что добавление в перфузат глутамата в физиологических концентрациях вызывает изменение динамики внутриклеточного Ca^{2+} в астроцитах, выражающееся в увеличении длительности и частоты следования Ca^{2+} событий. Данное изменение объясняется взаимодействием глутамата с метаботропными глутаматными рецепторами на астроцитах и как следствие повышенным выходом Ca^{2+} из внутриклеточных кальциевых депо [2, 3]. Увеличение внеклеточной концентрации глутамата может происходить при повышенной активности мозга, например во время исследовательского поведения. Наши данные указывают, что такое повышение концентрации внеклеточного глутамата должно привести к повышению Ca^{2+} активности астро-

цитов. Изучение роли глутаматергической системы в регуляции нейрон-глиальной сети имеет практическую значимость для разработки тактики лечения ишемических нейродегенеративных заболеваний и новых нейропротективных фармакологических препаратов [1, 2, 3].

* * *

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (гранты № 08-02-00724, 08-04-97109, 09-04-01432, 09-04-12254-офи_м), программой МКБ Президиума РАН, грантом Роснауки 2.1.1/6223 АВЦП “Развитие научного потенциала высшей школы” (2009–2010 гг.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Agulhon C., Petravic J., McMullen, etc. What is the role of astrocyte calcium in neurophysiology? // *Neuron*. 2008. Vol. 59. P. 932–946.
2. Fiacco T.A., McCarthy K.D. Astrocyte calcium elevations: properties, propagation, and effects on brain signaling // *Glia*. 2006. Vol. 54. P. 676–690.
3. Nieden R.Z., Deitmer W. The role of metabotropic glutamate receptors for the generation of calcium oscillations in

rat hippocampal astrocytes in situ // *Cerebral Cortex*. 2006. Vol. 16. P. 676–687.

4. Vannucci S.J., Simpson I.A. Developmental switch in brain nutrient transporter expression in the rat // *Amer. Physiol. Soc.* 2003. Vol. 18. P. 1127–1134.

Поступила в редакцию
10.11.10

**SPONTANEOUS AND EVOKED CALCIUM OSCILLATIONS
IN ASTROCYTES OF HIPPOCAMPUS SLICE**

*Y.I. Kalintseva, A.V. Potanina, A.S. Pimashkin, Yu.N. Zaharov,
I.V. Mukhina, V.B. Kazantsev*

In this work we researched Ca^{2+} oscillations in astrocytes of hippocampus acute slices, using confocal laser scanning microscopy and bulk-loading of the Ca^{2+} -sensitive dye Oregon Green Bapta 1-AM. We demonstrated that frequency and duration of the calcium oscillations had reduced by the rat age, but frequency and duration of the calcium oscillations had increased by the glutamate application.

Key words: *hippocampus, astrocytes, Ca^{2+} oscillations, glutamate.*

Сведения об авторах

Калинцева Ярослава Игоревна — студентка 5-го курса биологического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского, инженер кафедры нейродинамики и нейробиологии биологического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Тел. (910)871-51-31; e-mail: yasya13@mail.ru

Потанина Александра Васильевна — студентка 5-го курса биологического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского, инженер кафедры нейродинамики и нейробиологии биологического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского. Тел. (908)168-83-06; e-mail: potaninaalexandra@gmail.com

Пимашкин Алексей Сергеевич — аспирант, кафедра нейродинамики и нейробиологии ННГУ им. Н.И. Лобачевского.

Захаров Юрий Николаевич — канд. физ.-мат. наук, доцент кафедры общей физики ННГУ им. Н.И. Лобачевского.

Мухина Ирина Васильевна — докт. биол. наук, проф. кафедры нейродинамики и нейробиологии ННГУ им. Н.И. Лобачевского, зав. кафедрой нормальной физиологии, зав. ЦНИЛ НижГМА.

Казанцев Виктор Борисович — докт. физ.-мат. наук, проф., зав. кафедрой нейродинамики и нейробиологии биологического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского.

Семьянов Алексей Васильевич — докт. биол. наук, проф. кафедры нейродинамики и нейробиологии биологического факультета ННГУ им. Н.И. Лобачевского.