

ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВВЕДЕНИЯ АНТИДЕПРЕССАНТОВ НА ПОВРЕЖДЕНИЕ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА И КОРЫ КРЫСЫ, ВЫЗЫВАЕМОЕ ДЕЙСТВИЕМ НМДА

Поступила 05.12.09

В исследованиях на суперфузируемых срезах гиппокампа и теменной коры крыс установлено, что аппликация на срезы 50 мкМ N-метил-D-аспартата (НМДА) в присутствии 10 мкМ глицина в течение 15 мин оказывает существенное повреждающее действие на нейроны данных структур. Это проявлялось в виде более чем двукратного снижения синаптической реактивности пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа и II/III слоев теменной коры, регистрируемого через 1 ч после прекращения действия НМДА. Эксайтотоксическое действие НМДА предотвращалось в условиях аппликации конкурентного (D-2-амино-5-фосфоновалериановая кислота, 50 мкМ) и неконкурентного (кетамин, 100 мкМ) блокаторов НМДА-рецепторов. Блокатор глицинсвязывающих сайтов НМДА-рецепторов (соединение ТСВ 24.15) в концентрации 10 мкМ ослаблял вызываемое НМДА повреждение нейронов. Конкурентный блокатор глутаматных AMPA-рецепторов 6,7-динитрохиокалин-2,3-дион (DNQX, 10 мкМ) и местный анестетик лидокаина гидрохлорид (50 мкМ) не влияли на эксайтотоксическое действие НМДА. Блокатор потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа верапамил (20 мкМ) обуславливал тенденцию к усилению эксайтотоксического действия НМДА. Ингибитор тирозиновых протеинфосфатаз натрия ортованадат, вводимый крысам внутрибрюшинно в дозе 15 мг/кг за 6 ч до электрофизиологического эксперимента, уменьшал повреждающее действие НМДА. Обработка срезов мозга в течение 2 ч ингибитором тирозинкиназ генистеином (1 мкМ) ослабляла нейропротективный эффект натрия ортованадата. Хроническое введение крысам в течение 14 дней антидепрессантов, относящихся к разным функциональным классам, – имипрамина, флуоксетина и пиразидола – в ежедневных дозах 20 мг/кг уменьшало эксайтотоксическое действие НМДА подобно блокаторам НМДА-рецепторов. Нейропротективные эффекты антидепрессантов ослаблялись под действием генистеина. Сделано заключение, что нейропротективная активность антидепрессантов в условиях эксайтотоксического действия НМДА в основном обусловлена повышением активности тирозинкиназ в цитоплазме и/или ядре нейронов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: гиппокамп, теменная кора, синаптическая передача, НМДА, эксайтотоксическое действие, имипрамин, флуоксетин, пиразидол, нейропротективное действие.

ВВЕДЕНИЕ

Депрессия и другие болезни настроения сопровождаются нейроатрофическими повреждениями в ряде структур головного мозга, в частности в различных участках фронтальной коры, гиппокампе,

стриатуме [1–4]. Часть исследователей считают, что в основе этих нейроатрофических процессов лежат нарушение функций гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и аномальное повышение уровня глюкокортикоидов в плазме крови и ткани мозга. Другая же группа исследователей связывают указанные нейроатрофические процессы в мозгу с избыточной активацией нейронных глутаматных рецепторов, т. е. с эксайтотоксическими эффектами [5].

¹ Донецкий национальный медицинский университет МЗ Украины (Украина).

Эл. почта: far6@yandex.ru (И. И. Абрамец).

Глутамат является основным возбуждающим медиатором в ЦНС. Медиаторные и модуляторные эффекты глутамата опосредованы активацией ряда ионотропных и метаботропных глутаматных рецепторов. К первой группе относят АМРА-, НМДА- и каинатные рецепторы; вторая группа включает в себя три подгруппы, охватывающие метаботропные глутаматные рецепторы семи типов. Среди глутаматных рецепторов важнейшую роль играют ионотропные НМДА-рецепторы. С их функционированием связаны многие физиологические процессы – межнейронная передача возбуждения, развитие и выживание нейронов, различные формы синаптической пластичности. Нарушения нормальной функции этих рецепторов являются важными или даже решающими факторами, обуславливающими развитие таких патологических феноменов, как эпилептические судороги, травматические, гипоксические и ишемические повреждения нейронов, эксайтотоксические некроз и апоптоз нейронов [6–8].

Эксайтотоксическое действие глутамата и его парциального агониста НМДА, приводящее к повреждению нейронов, связывают с аномальным повышением внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , поскольку для ионных каналов глутаматных рецепторов НМДА-типа характерна относительно высокая кальциевая проводимость [6]. В исследованиях на срезах гиппокампа крыс было установлено, что пятиминутная аппликация НМДА вызывает двухфазное повышение внутринейронной концентрации Ca^{2+} , причем неконкурентный блокатор НМДА-рецепторов МК-801 устраняет ранний компонент кальциевого транзientа, а поздний компонент указанного эффекта ослабляется блокаторами потенциалзависимых натриевых каналов и ингибитором натрий-кальциевого обменника митохондрий [9]. Следовательно, связанное с активацией глутаматных НМДА-рецепторов повышение внутринейронной концентрации Ca^{2+} обусловлено током этих ионов через ионные каналы НМДА-рецепторов, деполяризацией мембран нейронов, повышением натриевой проводимости и высвобождением Ca^{2+} из митохондрий.

Эксайтотоксическое действие глутамата и агонистов глутаматных рецепторов модулируется нейротрофинами, факторами роста, эйкозаноидами. В последнее время появились данные, согласно которым такие биогенные амины, как норадреналин и серотонин, обладают нейропротективным действием, повышая выживаемость нейронов в неблаго-

приятных условиях [10, 11]. Поскольку ряд антидепрессантов при хроническом введении вызывают четырех–шестикратное повышение уровня норадреналина и серотонина в кортикальных и подкорковых структурах головного мозга [12, 13], можно ожидать, что такие фармакологические агенты будут проявлять нейропротективные эффекты в условиях НМДА-индуцированной эксайтотоксичности.

В настоящем исследовании мы выясняли, какие влияния на вызываемое воздействием НМДА повреждение пирамидных нейронов области СА1 гиппокампа и II/III слоев теменной коры крыс будет оказывать хроническое введение антидепрессантов, относящихся к разным функциональным классам. Тестировались эффекты имипрамина (неселективного блокатора обратного захвата норадреналина и серотонина), флуоксетина (селективного блокатора обратного захвата серотонина) и пиразидола (селективного ингибитора моноаминоксидазы (МАО) типа А).

МЕТОДИКА

Эксперименты проводились на суперфузируемых срезах гиппокампа и теменной коры крыс. Детали методики были подробно изложены ранее [14]. Коротко, декапитацию крыс осуществляли под кетаминным наркозом (50 мг/кг, внутривенно). Из черепа извлекали мозг и охлаждали его; из соответствующих участков мозга с помощью вибратора готовили срезы гиппокампа и теменной коры толщиной 450 мкм. Манипуляции производили в ванночке, заполненной охлажденным раствором для препарирования, в котором большая часть Na^+ была заменена сахарозой, а концентрация Ca^{2+} снижена до 0.1 мМ. Затем срезы переносили в инкубационную камеру, где их суперфузировали раствором Кребса следующего состава (в миллимолях на 1 л): $NaCl$ – 124, $NaHCO_3$ – 26, KCl – 3, KH_2PO_4 – 1.25, $CaCl_2$ – 2, $MgSO_4$ – 1, глюкоза – 10. Раствор Кребса в инкубационной камере постоянно аэрировали карбогеном; скорость протока раствора составляла 2 мл/мин, температура 25 °С, рН раствора при насыщении карбогеном – 7.3. Через 90 мин первый срез переносили из инкубационной в рабочую камеру объемом 0.5 мл, где срез фиксировали и суперфузировали насыщенным карбогеном раствором Кребса со скоростью 2 мл/мин при температуре, поддерживаемой на уровне 28 ± 0.5 °С.

Популяционные ВПСП (пВПСП) пирамидных

нейронов области *CA1* гиппокампа и II/III слоев теменной коры отводили внеклеточно с помощью стеклянных микроэлектродов, заполненных 2.0 М раствором NaCl, с сопротивлением кончика 1–3 МОм. Фокальные потенциалы усиливали по переменному току, оцифровывали с помощью десятиразрядного АЦП и в аналоговой и цифровой формах записывали на жестком диске персонального компьютера. Исследуемые пВПСП пирамидных нейронов вызывали путем раздражения через биполярный никромовый электрод диаметром 100 мкм, имеющий сопротивление по постоянному току ~ 100 кОм. Раздражающий электрод размещали в радиальном слое области *CA1* гиппокампа или в IV слое теменной коры; через него подавали прямоугольные толчки тока длительностью 0.1 мс. Эффективность синаптической передачи оценивали по отношению амплитуды постсинаптического ответа (мВ) к интенсивности пресинаптической стимуляции (В).

Эксайтотоксическое действие НМДА («RBI», США) воспроизводили путем воздействия на срезы мозга данной аминокислоты в концентрации 50 мкМ в течение 15 мин в присутствии в растворе 10 мкМ глицина («Олайнфарм», Латвия). После определения синаптической реактивности пирамидных нейронов в условиях контроля срезы мозга подвергали воздействию НМДА и затем отмывали их в инкубационной камере раствором Кребса; через 1 ч после прекращения действия НМДА определяли изменения синаптической реактивности.

Для исследования нейрхимических механизмов эксайтотоксического действия НМДА и влияния на них хронического введения антидепрессантов использовали следующие вещества-анализаторы: неконкурентный блокатор НМДА-рецепторов кетамин («Биолек», Украина), конкурентный блокатор НМДА-рецепторов D-2-амино-5-фосфоновалериановую кислоту (D-AP5), конкурентный блокатор AMPA-рецепторов DNQX (оба вещества производства «RBI», США), блокатор высокопороговых кальциевых каналов L-типа верапамил («ЛЕК», Словения), местный анестетик лидокаина гидрохлорид («Здоровье», Украина), ингибитор фосфопротеинфосфатаз натрия ортованадат («Уралхимреактив», РФ), ингибитор тирозинкиназ генистеин («RBI», США). Исследуемые антидепрессанты имипрамин («EGIS», Венгрия), флуоксетин («Киевмедпрепарат», Украина) и пиразидол (НИИ Химфарм, РФ) предварительно вводили экспериментальным животным внутривентриально в ежедневных дозах 20 мг/кг в течение 14 дней. Срезы мозга для элект-

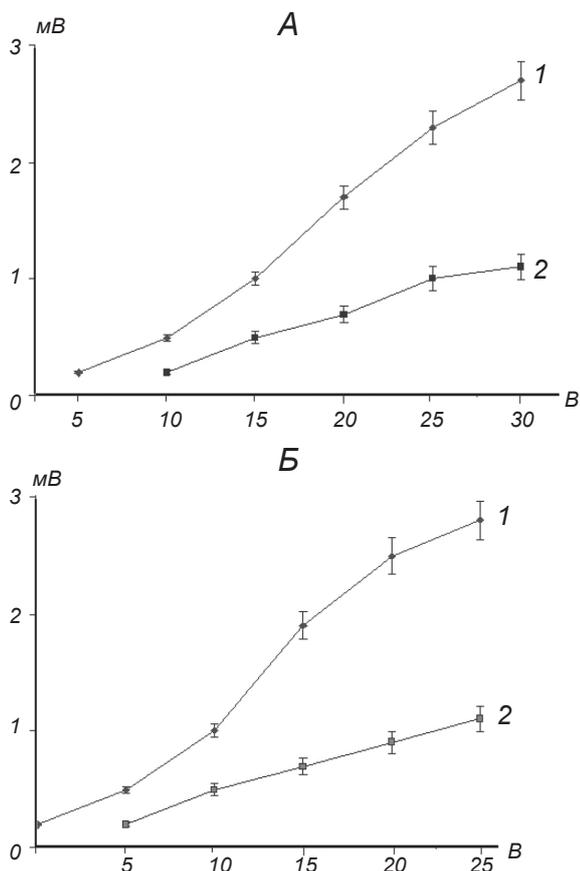
трофизиологических исследований готовили через 24 ч после последнего введения антидепрессантов.

Каждую серию исследований выполняли на четырех–шести срезах мозга, взятых от разных животных. Результаты исследований обрабатывали с использованием общепринятых методов вариационной статистики, применяя лицензионный пакет прикладных программ «Medstat». Для каждой выборки определяли среднее, ошибку среднего и доверительный интервал при $P = 0.05$. Достоверность межгрупповых различий сравниваемых величин оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

15-минутное воздействие на срезы мозга 50 мкМ НМДА в присутствии 10 мкМ глицина оказывало повреждающее действие на пирамидные нейроны области *CA1* гиппокампа и II/III слоев теменной коры. Этот эффект проявлялся как смещение вправо зависимостей амплитуды постсинаптического ответа от интенсивности стимуляции (рис. 1) и снижение синаптической реактивности нейронов (рис. 2, 2); он отчетливо регистрировался через 1 ч после прекращения действия НМДА. Наблюдаемые нами изменения следует рассматривать как наиболее ранние проявления эксайтотоксического действия НМДА. Другими исследователями в более поздние сроки были обнаружены и другие признаки вызываемого НМДА повреждения нейронов – биохимические (повышение внеклеточного уровня лактатдегидрогеназы) и морфологические (окраска поврежденных нейронов пропидиума йодидом) [15, 16].

Пирамидные нейроны коры были заметно более уязвимы в отношении эксайтотоксического действия НМДА по сравнению с нейронами гиппокампа. Воздействие НМДА в использованных экспериментальных условиях снижало синаптическую реактивность нейронов коры на 65, а нейронов гиппокампа – приблизительно на 50 % (рис. 2). Данные различия могут быть связаны с большим количеством (плотностью) НМДА-рецепторов в постсинаптическом аппарате кортикальных нейронов. Последние по сравнению с пирамидными нейронами гиппокампа обладают большим количеством возвратных аксонных коллатералей, а в синапсах, образованных этими коллатеральями, постсинаптические глутаматные рецепторы представлены преимущественно именно НМДА-рецепторами [17].

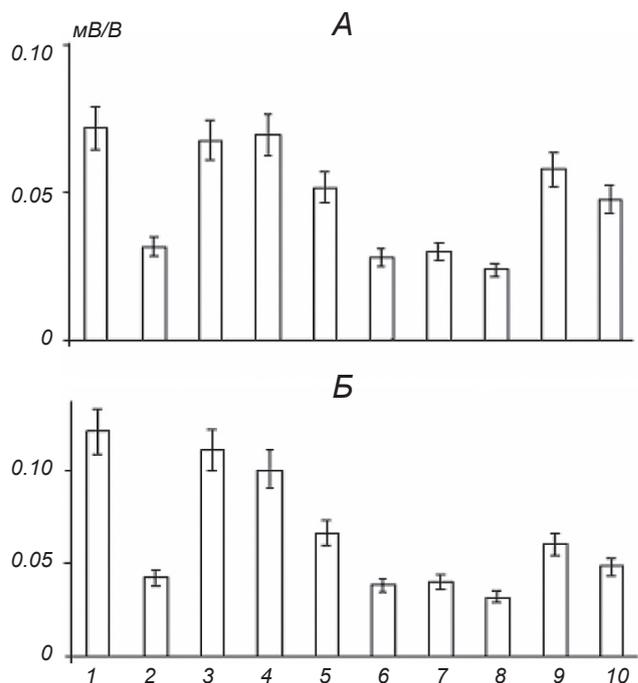


Р и с. 1. Зависимость амплитуд популяционных ВПСП (пВПСП) пирамидных нейронов области CA1 гиппокампа (А) и II/III слоев теменной коры (Б) крысы от интенсивности пресинаптической стимуляции в контроле (1) и в условиях аппликации 50 мкМ N-метил-D-аспартата через 1 ч после прекращения его действия (2). По оси абсцисс – интенсивность стимуляции, В; по оси ординат – амплитуда пВПСП, мВ.

Р и с. 1. Залежність амплітуд популяційних ВПСП (пВПСП) пірамідних нейронів ділянки CA1 гіпокампа (А) та II/III шарів тім'яної кори (Б) щура від інтенсивності пресинаптичної стимуляції в контролі (1) та в умовах аплікації 50 мкМ N-метил-D-аспартату через 1 год після припинення його дії (2).

Вызываемое воздействием НМДА повреждение пирамидных нейронов коры и гиппокампа обусловлено активацией синаптических и внесинаптических глутаматных НМДА-рецепторов. Действительно, воздействие на срезы блокаторов НМДА-рецепторов – и конкурентного (Д-АР5, 50 мкМ), и неконкурентного (кетамин, 100 мкМ) – существенно ослабляло повреждающее действие НМДА (рис. 2, 3, 4).

Открытие катионного канала нейронного НМДА-рецептора происходит в случаях связывания двух молекул глутамата НМДА с NR2-субъ-



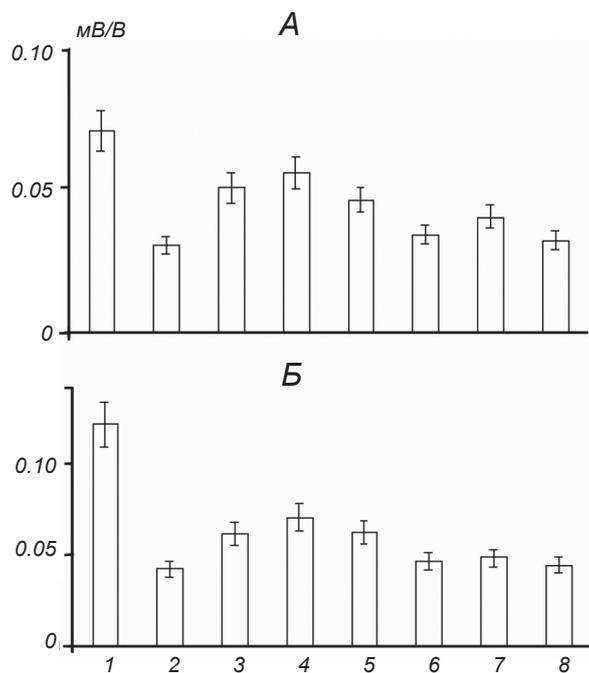
Р и с. 2. Изменения синаптической реактивности (мВ/В) пирамидных нейронов гиппокампа (А) и коры (Б) под действием N-метил-D-аспартата (НМДА) в отсутствие и в присутствии веществ-анализаторов.

1 – синаптическая реактивность в контроле, 2 – после воздействия НМДА, 3–10 – на фоне действия 50 мкМ Д-АР5 (3), 100 мкМ кетамина (4), 10 мкМ соединения ТСВ 24.15 (5), 10 мкМ DNQX (6), 50 мкМ лидокаина гидрохлорида (7), 20 мкМ верапамила (8), 15 мг/кг натрия ортованадата (9) и натрия ортованадата в присутствии 1 мкМ генистеина (10).

Р и с. 2. Зміни синаптичної реактивності (мВ/В) пірамідних нейронів гіпокампа (А) та кори (Б) під дією N-метил-D-аспартату за відсутності і в присутності речовин-аналізаторів.

единицами или двух молекул коагониста глицина с NR1-субъединицами этого рецептора [18]. Данная ситуация делает понятным факт ослабления повреждения нейронов НМДА под действием блокатора глицинсвязывающего сайта НМДА-рецепторов соединения ТСВ 24.15 [19]. Более низкая нейропротективная активность соединения ТСВ 24.15 по сравнению с таковой конкурентных и неконкурентных блокаторов НМДА-рецепторов (рис. 2, 5) обусловлена тем, что воздействие НМДА на срезы гиппокампа и коры осуществлялось в присутствии 10 мкМ глицина (см. Методику). Последний в указанной концентрации ослабляет связывание соединения ТСВ 24.15 с NR1-субъединицами НМДА-рецепторов.

Вызываемое активацией НМДА-рецепторов повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} инициирует некроз и апоптоз нейронов [20]. Повреж-



Р и с. 3. Влияние хронического введения тестируемых антидепрессантов на вызываемое N-метил-D-аспартатом угнетение синаптической реактивности пирамидных нейронов гиппокампа (А) и коры (Б).

1, 2 – то же, что и на рис. 2; 3–5 – синаптическая реактивность после хронического введения имипрамина (3), флуоксетина (4) и пиразидола (5); 6–8 – эффекты антидепрессантов при воздействии на срезы мозга генестеина. Остальные обозначения те же, что и на рис. 2.

Р и с. 3. Вплив хронічного введення тестованих антидепресантів на викликане N-метил-D-аспартатом пригнічення синаптичної реактивності пірамідних нейронів гіпокампа (А) та кори (Б).

дающее эксайтотоксическое действие НМДА на нейроны связано с рядом факторов. Во-первых, в условиях роста внутринейронной концентрации Ca^{2+} повышается активность кальцийзависимых протеаз кальпаинов [21]. Субстратами действия кальпаинов являются белки цитоскелета, в частности спектрин [22], один из белков постсинаптического уплотнения PSD-95, который связывает С-терминальный домен НМДА-рецепторов [23], и некоторые изоформы протеинкиназы С [24]. Во-вторых, повышенный внутринейронный уровень Ca^{2+} способствует активации нейронной синтетазы оксида азота (NOS) и повышению уровней NO и пероксинитрильных радикалов, которые повреждают мембраны нервных клеток [25]. В-третьих, глутамат и/или НМДА блокируют транспортную систему цистин/глутаматного обмена x_c^- , в результате чего падает уровень глутатиона и усиливаются ре-

акции перекисного окисления липидов [26].

Вызываемое воздействием НМДА на срезы мозга повреждение нейронов гиппокампа и коры не связано с деполяризацией этих нейронов и активацией глутаматных АМРА-рецепторов и потенциалзависимых натриевых каналов, поскольку конкурентный блокатор АМРА-рецепторов DNQX (10 мкМ) и местный анестетик лидокаина гидрохлорид (50 мкМ) не препятствовали вызываемому НМДА снижению синаптической реактивности (рис. 2, 6, 7).

В условиях воздействия НМДА на нейроны может наблюдаться активация потенциалзависимых кальциевых каналов [27]. В связи с этим представляется вполне возможным, что вызываемое НМДА повышение внутринейронной концентрации Ca^{2+} частично связано с повышением проводимости таких кальциевых каналов. Однако воздействие на срезы гиппокампа и коры 20 мкМ блокатора кальциевых каналов L-типа верапамила не предотвращало угнетения синаптической реактивности, вызываемого воздействием НМДА (рис. 2, 8). Более того, в таких условиях проявлялась тенденция к усилению повреждающего действия НМДА. Это согласуется с результатами других исследователей, установивших, что блокаторы потенциалзависимых кальциевых каналов L-типа усиливают эксайтотоксическое повреждение культивируемых нейронов гиппокампа [28]. По данным цитируемых исследователей, ионы кальция, поступающие в цитоплазму нейронов через ионные каналы НМДА-рецепторов, которые содержат в себе NR2A-субъединицы и имеют синаптическую локализацию, а также через кальциевые каналы L-типа, оказывают нейропротективное действие. С другой стороны, активация НМДА-рецепторов, содержащих в себе NR2B-субъединицы и имеющих преимущественно внесинаптическую локализацию, приводит к эксайтотоксическому повреждению нейронов. Нейропротективное действие Ca^{2+} , поступающих в цитоплазму нейронов через ионные каналы НМДА-рецепторов и кальциевые каналы L-типа, обусловлено активацией цАМФ-элементсвязывающего белка (CREB), который усиливает экспрессию нейротрофинов и повышает активность нейронных тирозинкиназ [29].

Для повышения тирозинкиназной активности в нейронах гиппокампа и коры мы воспользовались ингибитором тирозиновых протеинфосфатаз натрия ортованадатом. Предварительное введение этого ингибитора экспериментальным животным в дозе 15 мг/кг за 6 ч до электрофизиологических

исследований ослабляло эксайтотоксическое действие НМДА (рис. 2, 9). В то же время нейропротективный эффект натрия ортованадата ослаблялся в условиях двухчасового воздействия на срезы ингибитора тирозинкиназ генистеина (1 мкМ) перед аппликацией НМДА (10). Следовательно, не только конкурентное и неконкурентное блокирование НМДА-рецепторов или блокирование глицинсвязывающих сайтов этих рецепторов, но и повышение тирозинкиназной активности в нейронах также обуславливает эффект нейропротекции.

Клинически активные антидепрессанты, относящиеся к разным функциональным классам, – имипрамин, флуоксетин и пиразидол – в условиях их хронического введения обнаруживали, подобно конкурентным и неконкурентным блокаторам нейронных НМДА-рецепторов, достаточно отчетливую нейропротективную активность, что проявлялось в заметном ослаблении угнетения синаптической реактивности, вызываемого воздействием НМДА на срезы мозга (рис. 3, 3–5). В то же время эти антидепрессанты в условиях однократного их введения крысам не влияли на угнетение синаптической реактивности нейронов гиппокампа и коры (не иллюстрировано).

Ослабление антидепрессантами эксайтотоксического действия НМДА может быть следствием неконкурентного блокирования НМДА-рецепторов и/или М-холиноблокирующей активности данных агентов. Действительно, для трициклических антидепрессантов, к числу которых относится имипрамин, присущи оба указанных вида активности, т. е. данный антидепрессант блокирует катионные каналы НМДА-рецепторов и нейронные М-холинорецепторы [30, 31]. Однако флуоксетин не обладает ни НМДА-, ни М-холиноблокирующей активностью, а пиразидолу присуща только весьма умеренная антихолинергическая активность [30].

Хроническое введение антидепрессантов сопровождается увеличением внеклеточных уровней норадреналина и серотонина в мозгу и усилением эффективности сигнального пути аденилатциклаза – цАМФ – протеинкиназа А [12, 13]. Это достигается за счет более интенсивной стимуляции сопряженных с аденилатциклазой адрено- и серотониновых рецепторов и повышением содержания альфа-субъединиц в ГТФ-зависимом белке G_s [32]. Активность протеинкиназы А под действием антидепрессантов возрастает как во фракции микротрубочек, так и в ядрах нейронов [33]. Повышение активности протеинкиназы А в ядрах нейронов

сопровождается фосфорилированием и активацией транскрипционного фактора CREB (цАМФ-элементсвязывающего белка) [34]. Кроме того, хроническое введение антидепрессантов способствует повышению в цитоплазме нейронов активности кальций/кальмодулинзависимой протеинкиназы II [35]. Наконец, имеются данные о том, что хроническое введение антидепрессантов обуславливает позитивную регуляцию (up-regulation) каскада митогенактивируемых протеинкиназ ERK1 и ERK2 [34]. Если цАМФ- и кальций/кальмодулинзависимые протеинкиназы усиливают экспрессию нейротрофинов (BDNF, VEGF и др.) через транскрипционный фактор CREB, то активация протеинкиназ ERK1/2 является собственно компонентом сигнального пути последнего. Таким образом, хроническое введение антидепрессантов способствует генерализованному улучшению функционального состояния нейронов, облегчает реализацию в нейронах процессов синаптической пластичности, усиливает нейрогенез и повышает устойчивость нейронов к воздействию повреждающих факторов [5].

Поскольку нейропротективная активность исследуемых антидепрессантов ослаблялась в условиях предварительного воздействия ингибитора тирозинкиназ генистеина (рис. 3, 6–8), можно думать, что именно вызываемое антидепрессантами повышение тирозинкиназной активности в ядрах пирамидных нейронов гиппокампа и коры и является основным фактором, обуславливающим нейропротективное действие этих агентов. Такое действие может быть связано как с усилением экспрессии нейротрофинов и факторов роста (которые являются лигандами рецепторных тирозинкиназ [36]), так и с активацией обладающих тирозинкиназной активностью протеинкиназ ERK1/2.

В то же время следует признать, что сущность нейропротективного действия антидепрессантов в условиях их хронического введения окончательно не выяснена. Можно полагать, что подобно блокаторам нейронных НМДА-рецепторов антидепрессанты каким-то образом снижают функциональную активность данной популяции рецепторов. В исследованиях, ранее выполненных в нашей лаборатории, было установлено, что в условиях хронического введения крысам трициклических антидепрессантов имипрамина и мапротилина амплитуды ответов нейронов зубчатой извилины, вызываемых активацией как синаптических, так и (особенно) внесинаптических НМДА рецепторов, снижались [37]. Поскольку хроническое введение антиде-

прессантов сопровождается усилением экспрессии нейротрофинов и факторов роста, можно думать, что последние уменьшают количество нейронных НМДА-рецепторов. Действительно, в выполненных на мышах исследованиях было обнаружено, что хроническое введение антидепрессантов имипрамина и циталопрама угнетало экспрессию преимущественно мРНК NR2B-субъединицы НМДА-рецепторов в гиппокампе и кортикальных структурах [38]. С другой стороны, в исследованиях на культивируемых нейронах гиппокампа было показано, что основной фактор роста фибробластов угнетал экспрессию NR2-субъединицы с молекулярной массой 71 кДа и это коррелировало с ослаблением эксайтотоксического действия НМДА на нейроны гиппокампа [39]. Кроме того, было также установлено, что нейротрофины и факторы роста усиливали кальцийзависимую инактивацию НМДА-рецепторов и, следовательно, уменьшали количество таких функционально активных рецепторов в нейронах [40].

Д. С. Евдокимов¹, И. И. Абрамец¹, О. М. Талалаенко¹

ВПЛИВ ХРОНІЧНОГО ВВЕДЕННЯ АНТИДЕПРЕСАНТІВ НА УШКОДЖЕННЯ НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПА І КОРИ ЩУРА, ВИКЛИКАНЕ ДІЄЮ НМДА

¹ Донецький національний медичний університет МОЗ України (Україна).

Резюме

У дослідженнях на суперфузованих зрізах гіпокампа і тім'яної кори щурів встановлено, що внаслідок дії на зрізи 50 мкМ N-метил-D-аспартату (НМДА) у присутності 10 мкМ гліцину протягом 15 хв відбувалось ушкодження зрізів. Це проявлялось у вигляді більш ніж дворазового зниження синаптической реактивності пірамідних нейронів ділянки CA1 і II/III шарів тім'яної кори, що реєструвалось через 1 год після припинення дії НМДА. Ексайтотоксична дія НМДА відверталася в умовах аплікацій конкурентного (D-2-аміно-5-фосфоновалеріанова кислота, 50 мкМ) і неконкурентного (кетамін, 100 мкМ) блокаторів НМДА-рецепторів. Блокатор гліцинзв'язуючого сайту НМДА рецепторів (сполука ТСВ 24.15) у концентрації 10 мкМ послаблював викликане НМДА ушкодження нейронів. Конкурентний блокатор глутаматних AMPA-рецепторів 6,7-динітрохіноксалін-2,3-діон (DNQX, 10 мкМ) і місцевий анестетик лідокаїну гідрохлорид (50 мкМ) не впливали на ексайтотоксичну дію НМДА. Блокатор потенціалзалежних кальцієвих каналів L-типу верапаміл (20 мкМ) зумовлював тенденцію до посилення ексайтотоксичної дії НМДА. Інгібітор тирозинових протеїнофосфатаз натрію ортованадат, внутрішньоочеревино

уведений шурам у дозі 15 мг/кг за 6 год до електрофізіологічного експерименту, зменшував ушкоджуючу дію НМДА. Обробка зрізів мозку протягом 2 год інгібітором тирозинкіназ геністеїном (1 мкМ) послаблювала нейропротективний ефект натрію ортованадату. Хронічне введення шурам протягом 14 днів антидепресантів, що відносяться до різних функціональних класів, – іміпраміну, флуоксетину та піразидолу – в щоденних дозах 20 мг/кг зменшувало ексайтотоксичну дію НМДА на зрізи мозку подібно до блокаторів НМДА-рецепторів. Нейропротективні ефекти антидепресантів послаблювалися під дією геністеїну. Зроблено висновок, що нейропротективна активність антидепресантів в умовах ексайтотоксичної дії НМДА в основному зумовлена підвищенням активності тирозинкіназ у цитоплазмі та/або ядрі нейронів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. D. Cotter, D. Mackay, G. Chana, et al., "Reduced neuronal size and glial cell density in area 9 of the dorsolateral prefrontal cortex in subjects with major depressive disorder," *Cerebr. Cortex*, **12**, No. 2, 386-394 (2002).
2. S. C. Cook and C. L. Wellman, "Chronic stress alters dendritic morphology in rat medial prefrontal cortex," *J. Neurobiol.*, **60**, No. 2, 236-248 (2004).
3. C. A. Stockmeier, R. J. Mahajan, L. C. Konick, et al., "Cellular changes in the postmortem hippocampus in major depression," *Biol. Psychiat.*, **56**, No. 4, 640-650 (2004).
4. M. Banasr, G. W. Valentine, X. Y. Li, et al., "Chronic stress decreases cell proliferation in adult cerebral cortex of rat: reversal by antidepressant treatment," *Biol. Psychiat.*, **62**, No. 4, 496-504 (2007).
5. C. Pittenger and R. S. Duman, "Stress, depression, and neuroplasticity: a convergence of mechanisms," *Neuropsychopharmacology*, **33**, No. 1, 88-109 (2008).
6. R. Dingledine, K. Borges, D. Bovie, and S. F. Traynelis, "The glutamate receptor ion channels," *Pharmacol. Rev.*, **51**, No. 1, 7-61 (1999).
7. S. Cull-Candy, S. Brickley, and M. Farrant, "NMDA receptor subunits: diversity, development, and disease," *Current Opin. Neurobiol.*, **11**, No. 2, 327-335 (2001).
8. E. A. Waxman and D. R. Lynch, "N-methyl-D-aspartate receptor subtypes: multiple roles in excitotoxicity and neurological disease," *Neuroscientist*, **11**, No. 1, 37-49 (2005).
9. Y. Zhang and P. Lipton, "Cytosolic Ca²⁺ changes during *in vitro* ischemia in rat hippocampal slices: major roles for glutamate and Na⁺-dependent Ca²⁺ release from mitochondria," *J. Neurosci.*, **19**, No. 9, 3307-3315 (1999).
10. P. Gaspar, O. Cases, and L. Maroteaux, "The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics," *Nat. Rev. Neurosci.*, **4**, No. 10, 1002-1012 (2003).
11. L. M. Madrigal, J. C. Leza, P. Polak, et al., "Astrocyte-derived MCP-1 mediates neuroprotective effect of noradrenaline," *J. Neurosci.*, **29**, No. 1, 263-267 (2009).
12. D. S. Kreiss and I. Lucki, "Effects of acute and repeated administration of antidepressant drugs on extracellular levels of 5-hydroxytryptamine measured *in vivo*," *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **274**, No. 3, 866-876 (1999).
13. R. W. Invemizzi, S. Parini, G. Sacchetti, et al., "Chronic

- treatment with reboxetine by osmotic pumps facilitates its effect on extracellular noradrenaline and may desensitize alpha2- adrenoreceptors in the prefrontal cortex," *Br. J. Pharmacol.*, **132**, No. 1, 183-188 (2001).
14. Д. В. Евдокимов, И. И. Абрамец, А. Н. Талалаенко, "Нейротоксическое действие дексаметазона: ослабление под влиянием антидепрессантов", *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **40**, № 4, 312-321 (2008).
 15. J. Y. Koh and D. W. Choi, "Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay," *J. Neurosci. Methods*, **20**, No. 1, 83-90 (1987).
 16. J. H. Laake, F. M. Haug, T. Wieloch, and O. P. Ottersen, "A simple *in vitro* model of ischemia based on hippocampal slice cultures and propidium iodide fluorescence," *Brain Res. – Brain Res. Protoc.*, **4**, No. 2, 173-184 (1999).
 17. A. M. Thomson and S. Radpour, "Properties of synapses mediated by excitatory amino acids and their involvement in synaptic plasticity," in: *Excitatory Amino Acids and Synaptic Transmission*, H. V. Wheal and A. M. Thomson (eds.), Acad. Press, London (1991), pp. 316-332.
 18. T. G. Banke and S. F. Traynelis, "Activation of NR1/NR2B NMDA receptors," *Nat. Neurosci.*, **6**, No. 2, 144-152 (2003).
 19. И. В. Комиссаров, И. И. Абрамец, Л. Я. Зиньковская и др., "Тиенопиримидиновые производные монокарбонных аминокислот как антагонисты N-метил-D-аспартата и их антидепрессантоподобные эффекты", *Арх. клин. и эксперим. медицины*, **13**, № 1/2, 11-15 (2004).
 20. E. Bonfoco, D. Kraink, M. Ankarcona, et al., "Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intensive insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures," *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, No. 8, 7162-7166 (1995).
 21. S. Lankiewicz, L. C. Marc, B. N. Truc, et al., "Activation of calpain I converts excitotoxic neuronal death into caspase-independent cell death," *J. Biol. Chem.*, **275**, No. 19, 17064-17071 (2000).
 22. S. L. Chan and M. P. Mattson, "Caspase and calpain substrates: roles in synaptic plasticity and cell death," *J. Neurosci. Res.*, **58**, No. 2, 167-190 (1999).
 23. A. Wechsler and V. I. Teichberg, "Brain spectrin binding to NMDA receptor is regulated by phosphorylation, calcium and calmodulin," *EMBO J.*, **17**, No. 10, 3931-3939 (1998).
 24. S. L. Budd and S. A. Lipton, "Signaling events in NMDA receptor-induced apoptosis in cerebrocortical cultures," *Ann. New York Acad. Sci.*, **893**, No. 1, 261-264 (1999).
 25. F. X. Soriano and G. E. Hardingham, "Compartmentalized NMDA receptor signaling to survival and death," *J. Physiol.*, **584**, No. 2, 381-388 (2007).
 26. D. Schubert and D. Piasecki, "Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade," *J. Neurosci.*, **21**, No. 19, 7455-7462 (2001).
 27. M. Zhao, J. P. Adams, and S. M. Dudek, "Pattern-dependent role of NMDA receptors in action potential generation: consequences extracellular signal-regulated kinase activation," *J. Neurosci.*, **25**, No. 30, 7032-7039 (2005).
 28. G. E. Hardingham and H. Bading, "The Yin and Yang of NMDA receptor signaling," *Trends Neurosci.*, **26**, No. 1, 81-89 (2003).
 29. G. E. Hardingham, Y. Fukunaga, and H. Bading, "Extrasynaptic NMDA Rs oppose synaptic NMDA Rs by triggering CREB shut-off and cell death pathways," *Natl. Neurosci.*, **5**, No. 4, 405-414 (2002).
 30. М. Д. Машковский, Н. И. Андреева, А. И. Полежаева, *Фармакология антидепрессантов*, Медицина, Москва (1983).
 31. D. J. Laurie and P. H. Seeburg, "Ligand affinities at recombinant N-methyl-D-aspartate receptors depend on subunit composition," *Eur. J. Pharmacol.*, **268**, No. 2, 335-345 (1994).
 32. R. J. Donati and M. M. Rasenick, "G protein signaling and the molecular basis of antidepressant action," *Life Sci.*, **73**, No. 1, 1-17 (2003).
 33. J. Perez, D. Tinelli, N. Brunello, and G. Racagni, "cAMP-dependent phosphorylation of soluble and crude microtubule fractions of rat cerebral cortex after prolonged desmethylimipramine treatment," *Eur. J. Pharmacol.*, **172**, No. 2, 306-316 (1989).
 34. E. Tiraboshi, D. Tardito, J. Kasahara, et al., "Selective phosphorylation of nuclear CREB by fluoxetine is linked to activation of CaMK IV and MAP kinase cascades," *Neuropsychopharmacology*, **29**, No. 10, 1831-1840 (2004).
 35. E. Tiraboshi, R. Giambelli, G. D'Urso, et al., "Antidepressants activate CaMK II in neuron cell body by Thr 286 phosphorylation," *NeuroReport*, **15**, No. 11, 2393-2396 (2004).
 36. D. R. Kaplan and F. D. Miller, "Neurotrophin signal transduction in the nervous system," *Current Opin. Neurobiol.*, **10**, No. 3, 381-391 (2000).
 37. И. И. Абрамец, Ю. В. Кидин, Ю. В. Кузнецов, А. Н. Талалаенко, "Влияние поведенческой депрессии и хронического воздействия антидепрессантов на опосредуемые НМДА глутаматными рецепторами ответы нейронов зубчатой извилины крыс", *Нейрофизиология/Neurophysiology*, **37**, № 2, 124-133 (2005).
 38. P. A. Boyer, P. Skolnick, and L. H. Fossom, "Chronic administration of imipramine and citalopram alters the expression of NMDA receptor subunit mRNAs in mouse brain," *J. Mol. Neurosci.*, **10**, No. 2, 219-233 (1998).
 39. M. P. Mattson, K. N. Kumar, H. Wang, et al., "Basic FGF regulates the expression of a functional 71 kDa NMDA receptor protein that mediates calcium influx and neurotoxicity in hippocampal neurons," *J. Neurosci.*, **13**, No. 11, 4575-4588 (1993).
 40. A. L. Boxer, H. Moreno, B. Rudy, and E. B. Ziff, "FGF-2 potentiates Ca²⁺-dependent inactivation of NMDA receptor currents in hippocampal neurons," *J. Neurophysiol.*, **82**, No. 6, 3367-3377 (1999).