

Ю.И. Губский, член-корр. АМН Украины, С.В. Горбачева,
И.Ф. Беленичев, д.б.н., Е.Л. Левицкий*, д.б.н., Н.В.
Бухтиярова, к.м.н., Л.П.Бабенко**

НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ ГЛИЦИНА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГЛУТАМАТНОЙ „ЭКСАЙТОТОКСИЧ- НОСТИ“ IN VITRO

Запорожский государственный медицинский университет
*ГУ "Институт фармакологии и токсикологии" АМН Украины,
г.Киев

Перспективным направлением нейропротекции при церебральной ишемии является фармакокоррекция дисбаланса возбуждающих и тормозных нейротрансмиттерных систем с использованием в качестве лекарственных средств естественных тормозных медиаторов. В этой связи внимание привлекает естественный тормозной нейротрансмиттер глицин в аспекте установления его роли в механизмах острой церебральной ишемии. Традиционно считается, что глицин проявляет нейротрансмиттерные свойства на уровне спинного, продолговатого мозга и моста. ГАМК и глицин являются равноценными нейротрансмиттерами, обеспечивающими защитное торможение в ЦНС, роль которого возрастает в условиях повышенного выброса глутамата. Ингибирующие свойства глицина проявляет посредством взаимодействия не только с собственными глициновыми рецепторами, но и с рецепторами ГАМК. Глицин является коагонистом глутаматных NMDA-рецепторов и в субмикромолекулярных концентрациях необходим для их нормального функционирования. Активация этих рецепторов возможна лишь при условии связывания глицина со специфическими, нечувствительными к стрихнину, глициновыми сайтами [1-3].

Глицин также обладает метаболитотропным действием, проявляет противосудорожную активность, связывает низкомолекулярные токсичные продукты, образующиеся в

процессе ишемии. Являясь естественным метаболитом мозга, он не проявляет токсичности даже в высоких дозах (более 10 г/сутки). Единственным побочным эффектом препарата может считаться легкая седация [4].

Целью настоящего исследования явилось исследование нейропротективного эффекта глицина на выделенных обогащенных фракциях нейронов в условиях моделирования глутаматной „эксайтотоксичности“.

Материалы и методы исследования

Поскольку нервная ткань гетерогенна, классические модели церебральной ишемии и биохимические подходы дают лишь усредненную картину ответа нервной ткани на клеточные стимулы и последующую церебропротективную терапию. Разработанные методы получения нервных клеток в индивидуальном состоянии позволяют получить качественно новую и достоверную информацию о состоянии нервной ткани в условиях моделирования патологических процессов. Экспериментальная часть выполнена на белых крысах-самцах линии Вистар в возрасте 4 месяца и массой 80-100 г. Выделение обогащенных фракций нейронов и нейроглии проводилось в два этапа. На первом этапе мозговая ткань дезинтегрировалась с целью получения клеточной суспензии, на втором — осуществлялось дифференциальное ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы и фиксация. Для получения нейронов и нейроглии крысы декапитировали, быстро из-

лекали мозг. Кору головного мозга отделяли от белого вещества, измельчали и переносили в раствор, содержащий 7,5% поливинилпирролидона (ПВП), 1% бычий сывороточный альбумин (БСА) и 10 мМ CaCl_2 . Полученную суспензию фильтровали через три сита под незначительным давлением для уменьшения потерь нейрональных клеток. После последовательного пропускания через сита клеточную суспензию наслаивали на градиент, состоящий из 1 М и 1,75 М сахарозы. Центрифугирование проводили при 60 000 g в рефрижераторной центрифуге VAC-25. В результате центрифугирования получали два слоя и плотный осадок. Верхний слой представлен остатками миелиновых оболочек, второй слой состоит из глиальных и нейрональных клеток. Осадок представлен телами нейронов со степенью чистоты 90%. В дальнейшем проводили дополнительную очистку второго слоя путем второго фильтрования и ультрацентрифугирования. Выделенные нейрональные клетки отмывали от сахарозы и альбумина охлажденным физиологическим раствором [5]. Полученную таким образом клеточную суспензию разделяли на серии: интактная, контрольные, в которых индуцировали развитие глутаматной „эксайтотоксичности“ добавлением глутаминовой кислоты, каината и N-метил-D-аспартата в эксайтотоксических концентрациях [7,8], опытные, в которых индуцировали глутаматную „эксайтотоксичность“ с добавлением глицина в концентрации 0,1 мкМ; 10 мкМ; 100 мкМ. Суспензии инкубировали в течение 1 ч при 37 °C. Для изучения морфофункционального состояния нейронов готовили мазки, которые окрашивали галоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону для специфического выявления РНК [6]. Изображение нервных клеток получали на микроскопе Axioskop (Zeiss, Германия) и с помощью 8-битной CCD-камеры CONU-4922 (CONU Inc., США) вводили в компьютерную систему анализа изображений VIDAS-386 (Kontron Elektronik, Германия).

Для выявления экспрессии c-fos и Bcl-2-белка использовали иммуногистохимический метод непрямой

мой иммунофлюоресценции. На срезы наносили первичные антитела к белку c-fos и Bcl-2 (Sigma Chemical, USA) и инкубировали при +4 °C 24 ч. После инкубации срезы трижды промывали 0,1 М фосфатным буфером. Затем на образцы наносили вторичные антитела (флюоресцент конъюгированный козий IgG, Sigma Chemical, USA) и инкубировали при комнатной температуре 60 мин. После инкубации срезы промывали 0,1 М фосфатным буфером. На флюоресцентном микроскопе Axioskop (Zeiss, Germany) исследовали c-Fos-иммунопозитивные нейроны и Bcl-2-иммунопозитивные нейроны при помощи видеокамеры COHU — 4922 (USA) и вводили в систему цифрового анализа изображения VIDAS -386 (Kontron Elektronik, Germany). Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета статистических программ "Statistica 4.0" (Statistica Inc. USA).

Результаты и их обсуждение

В результате исследования было установлено, что инкубирование нейрональной суспензии с агонистами различных подтипов глутаминных рецепторов — глутаматом, каинатом и N-метил-D-аспартатом приводит к нейрональной гибели как по типу некроза, так и по типу апоптоза, усиленной экспрессии генов раннего реагирования c-fos и снижению антиапоптотического белка bcl-2. В механизме подобного повреждения нейронов лежит активация глутаматных, прежде всего NMDA-рецепторов, с последующим открытием Ca-каналов, Ca-зависимая активация NO — синтазы и оксидативный стресс, повышение титра провоспалительных цитокинов, апоптоз / или некроз [1,2], т.е. активация реакций глутаматной "эксайтотоксичности". Глицин в концентрации 0,1 мкМ оказывает потенцирующее действие на глутаминные рецепторы и повышает нейрональную смертность в сравнении с контролем, как по типу некроза, так и по типу апоптоза. При внесении в инкубационные пробы глицина в концентрации 10 мкМ и моделирование глутаматной "эксайтотоксичности" наблюдалась тенденция к снижению смертности

нейронов, что, возможно, связано с насыщением глициновых сайтов NMDA-рецепторов при данной концентрации глицина [1,2,8] (табл. 1). Внесение высоких концентраций глицина (100 мкМ) при моделировании "эксайтотоксичности" *in vitro* приводит к достоверному снижению гибели нейронов в пробах по сравнению с группой контроля. Причем гибель снижается в основном за счет уменьшения апоптотически измененных нейронов.

Нейропротективное действие глицина *in vitro* реализуется только посредством влияния на NMDA-рецепторы, но не на AMPA/ каинатные -рецепторы, что подтверждается нашими исследованиями (табл.1,2). Так, при добавлении глицина (100 мкМ) в пробы с агонистом NMDA-рецепторов (N-метил-D-аспартат) наблюдался наиболее выраженный нейропротективный эффект. При инкубации проб с глицином (100 мкМ) и неспецифическим агонистом глутаминных рецепторов (глутамат) процент выживших нейронов несколько снижался. В пробах с агонистом каинатных/ AMPA-рецепторов (каинат) глицин практически не оказывал защитного действия в отношении смертности нейронов. Как было отмечено выше, нейропротективное действие глицина обусловлено его способностью регулировать развитие апоптоза нейронов вследствие глутаматной "эксайтотоксичности" *in vitro*. Так, глицин в концентрации 100 мкМ повышал количество bcl-2 -позитивных нейронов в инкубационных пробах с добавлением N-метил-D-аспартата и глутамата (табл.2) В этой же концентрации глицин ограничивал повышенную экспрессию c-fos при моделировании эксайтотоксичности N-метил-D-аспартатом и глутаматом. Подобное действие связано с ограничением гиперактивности, в большей степени, NMDA-рецепторов и индукцией реакций апоптоза.

Нами было установлено, что нейропротективное действие глицина усиливается при дополнительном внесении в инкубационные пробы магния хлорида. Так, внесение в инкубационную среду комбинации глицина (100 мкМ) с хлоридом магния (15 мкМ) нейропротек-

торный эффект возрастал, что свидетельствует о взаимопотенцирующем действии исследуемых веществ (табл. 3). Совместное внесение в инкубационную смесь глицина и хлорида магния уменьшало гибель нейронов, снижало количество клеток с некрозом и апоптозом. Нейропротективный эффект ионов магния объясняется их связыванием со специфическим сайтом, расположенном в канале NMDA-рецепторно-ионоформного комплекса. В результате блокируется синаптическая передача и тормозится деполяризация пресинаптической мембраны. Кроме того, ионы магния, связываясь со специфическими сайтами NMDA-рецепторов, вызывают конформационные изменения всего рецепторно-ионоформного комплекса [2,7]. Этим можно объяснить усиление нейропротективного действия при совместном введении глицина и хлорида магния. Нейропротективный эффект глицина подтверждается и нашими предыдущими исследованиями *in vivo*, которыми показано, что при моделировании экспериментальной церебральной ишемии глицин повышал выживаемость животных, улучшал энергетический метаболизм и уменьшал проявления оксидативного стресса [9].

Таким образом, инкубирование нейрональной суспензии с агонистами глутаматных рецепторов — глутаматом, каинатом и N-метил-D-аспартатом в эксайтотоксических концентрациях приводит к гибели клеток по типу как апоптоза, так и некроза. Внесение глицина в инкубационные пробы при моделировании глутаматной эксайтотоксичности *in vitro* предупреждает клеточную гибель, уменьшает явления некроза и, особенно, апоптоза нейронов. Ингибирующее действие на процессы клеточной гибели глицин оказывает при возбуждении NMDA-рецепторов. Нейропротективное действие глицина проявляется в концентрации 100 мкМ. В низких концентрациях (ниже 0,1 мкМ) глицин усиливает процессы нейродегенерации, обусловленные глутаматной эксайтотоксичностью, так как является коагонистом NMDA-рецепторов.

Таблица 1

Влияние глицина на выживаемость (%) нейронов при моделировании эксайтотоксичности *in vitro*

Серия	Выжившие клетки	Клетки с проявлением апоптоза	Клетки с проявлением некроза
Интактная	87,9 ± 3,2	3,3 ± 0,7	6,5 ± 0,8
Глутамат (100 мкМ)	62,5 ± 2,7	19,4 ± 1,0	15,2 ± 0,8
Глутамат (100 мкМ) + глицин (100 мкМ)	71,8 ± 1,6*	15,7 ± 1,0*	12,5 ± 0,4*
Глутамат (100 мкМ) + глицин (10 мкМ)	64,5 ± 2,4	18,1 ± 1,0	17,3 ± 1,0
Глутамат (100 мкМ) + глицин (0,1 мкМ)	60,6 ± 1,8*	21,2 ± 1,1*	18,2 ± 1,0*
Каинат (200 мкМ)	69,1 ± 2,1	13,3 ± 1,7	17,6 ± 1,2
Каинат (200 мкМ) + глицин (100 мкМ)	72,8 ± 2,7	12,6 ± 1,1	14,6 ± 1,6
Каинат (200 мкМ) + глицин (10 мкМ)	70,8 ± 1,5	13,0 ± 1,1	16,5 ± 1,0
Каинат (200 мкМ) + глицин (0,1 мкМ)	67,1 ± 1,8	14,7 ± 1,1	18,2 ± 1,5
N-метил-D-аспартат (200 мкМ)	65,3 ± 2,7	18,2 ± 1,2	16,5 ± 2,0
N-метил-D-аспартат (200 мкМ) + глицин (100 мкМ)	78,0 ± 2,0*	8,3 ± 1,0*	10,1 ± 0,8*
N-метил-D-аспартат (200 мкМ) + глицин (10 мкМ)	68,2 ± 2,2	16,2 ± 0,8	15,6 ± 1,3
N-метил-D-аспартат (200 мкМ) + глицин (0,1 мкМ)	62,0 ± 1,7	21,0 ± 1,0	17,0 ± 1,1

Примечание: в этой и табл. 2,3 *- p<0,05 по отношению к контрольной серии

Таблица 2

Влияние глицина на экспрессию генов раннего реагирования c-fos и bcl-2 в условиях моделирования эксайтотоксичности *in vitro*

Серия	Количество c-fos-положительных нейронов, %	Количество Bcl-2-положительных нейронов, %
Интактная	3,3 ± 0,76	22,7 ± 1,05
Глутамат (100 мкМ)	16,2 ± 1,54	12,8 ± 1,09
Глутамат (100 мкМ) + глицин (100 мкМ)	8,9 ± 1,05*	17,8 ± 0,72*
Глутамат (100 мкМ) + глицин (10 мкМ)	15,1 ± 0,99	12,5 ± 1,45
Глутамат (100 мкМ) + глицин (0,1 мкМ)	17,1 ± 0,67	10,3 ± 0,81
Каинат (200 мкМ)	13,3 ± 1,71	10,7 ± 0,97
Каинат (200 мкМ) + глицин (100 мкМ)	12,6 ± 1,15	12,1 ± 1,4
Каинат (200 мкМ) + глицин (10 мкМ)	12,9 ± 1,12	11,5 ± 0,83
Каинат (200 мкМ) + глицин (0,1 мкМ)	12,7 ± 1,12	10,7 ± 0,89
N-метил-D-аспартат (200 мкМ)	16,0 ± 0,76	11,6 ± 1,11
N-метил-D-аспартат (200 мкМ) + глицин (100 мкМ)	8,7 ± 0,88*	19,7 ± 0,81*
N-метил-D-аспартат (200 мкМ) + глицин (10 мкМ)	15,8 ± 0,8	12,4 ± 1,31
N-метил-D-аспартат (200 мкМ) + глицин (0,1 мкМ)	16,9 ± 0,82	9,6 ± 1,46

Таблица 3

Влияние глицина и магния и их комбинации на выживаемость (%) нейронов при моделировании глутаматной эксайтотоксичности *in vitro*

Серия	Выжившие клетки	Клетки с проявлением апоптоза	Клетки с проявлением некроза
Интактные	88,4 ± 3,0	3,4 ± 0,5	7,3 ± 1,0
Глутамат (100 мкМ)	63,7 ± 2,5	19,1 ± 1,0	17,2 ± 1,0
Глутамат (100 мкМ) + магния хлорид (15 мкМ)	77,2 ± 2,0*	12,7 ± 1,0*	10,2 ± 0,5*
Глутамат (100 мкМ) + глицин (100 мкМ)	70,8 ± 1,0*	15,2 ± 1,5*	14,0 ± 1,0*
Глутамат (100 мкМ) + глицин (100 мкМ) + магния хлорид (15 мкМ)	81,1 ± 2,0*	10,6 ± 1,5*	8,3 ± 1,0*

1. Гусев Е. И., Скворцова В. И. Ишемия головного мозга. — М.: Медицина, 2001. — 328с.
2. Сергеев П.В., Шимановский Н.Л., Петров В.И. Рецепторы физиологически активных веществ. — Волгоград: Семь ветров, 1999. — 640 с.
3. Хижняк А.А., Курсов С.В. Участие возбуждающих аминокислотных трансмисмиттеров в механизмах нейродеструкции и перспективные методы патогенетической коррекции // Біль, знеболювання, інтенсивна терапія. — 2003. — №1 — С.43 — 46.
4. Астахов А. Гліцид КМП: просто амінокислота чи універсальні ліки проти стресу? // Ліки України. — 2004. — №1. — С. 35 — 36.
5. Современные методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен): Под ред. М. И. Прохоровой. — Л.: Изд-во Ленинградского ун-та, 1982. — 272с.
6. Пирс Э. Гистохимия. Москва, 1962. — 962с.
7. Болдырев А.А. Функциональное взаимодействие между глутаматными рецепторами различных классов // Бюл. exper. биол. и мед.-2000.- Т.130, №9.-С.244-251.
8. Болдырев А.А. Дискриминация между апоптозом и некрозом нейронов под влиянием окислительного стресса // Биохимия.-2000.- Т.65, №7.-С.981-990.
9. Беленічев І.Ф., Горбачова С.В., Головкін В.В., Бухтіярова Н.В. Вплив композиції „Магнелонг”, гліцину, емоксипіну та пірацетаму на розвиток оксидативного стресу в мозку щурів з гострими порушеннями мозкового кровообігу (ішемічний інсульт) // Мед. хімія. — 2006. — Т.8, №3. — С.107 — 110.

*Ю.И.Губский, С.В.Горбачева, И.Ф. Беленічев,
Е.Л.Левицкий, Н.В.Бухтиярова, Л.П.Бабенко*

**НЕЙРОПРОТЕКТИВНЫЙ ЭФФЕКТ ГЛИЦИНА
ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ГЛУТАМАТНОЙ
„ЭКСАЙТОТОКСИЧНОСТИ” IN VITRO**

Инкубация нейрональной суспензии с добавлением коагониста NMDA-рецепторов глицина способствовала сохранению жизнеспособности нейронов и предотвращала развитие в клетках дегенеративных процессов. При введении в инкубационную среду комбинации глицина с ионами магния цитопротекторный эффект возрастал, что свидетельствует о взаимопотенцирующем действии исследуемых веществ. Глицин обеспечивает нормальное функционирование NMDA-рецепторов благодаря влиянию на глициновые сайты, обладает метаболитотропным и энерготропным эффектом при отсутствии побочных действий.

*Yu.I. Gubsky, S.V. Gorbachova, I.F. Belenichev,
E.L. Levitsky, N.V. Bukhtiarova, L.P. Babenko*

**NEUROPROTECTIVE EFFECT OF GLYCINE
UNDER MODELING OF GLUTAMATE
“EXITOTOXICITY” IN VITRO**

Incubation of neuronal suspension with adding of NMDA-receptors coagonist — glycine, promoted neurone vitality saving and prevented development of degenerative processes in the cells. Adding into incubational medium combination of glycine with magnesium-iones caused increasing of cytoprotective effect, that testifies about interaction of researched substances. Glycine provides normal functions of NMDA-receptors, thanks to influence on the glycine sytes, pocesses methaboli-totropic and energotropic effects under absence of side effects.