

УДК 612.88+57.045

Растворимая гуанилатциклаза как ключевой фермент в модулирующем влиянии NO на metabotropic glutamate receptors

И. В. Рыжова*, А. Д. Ноздрачев, Т. В. Тобиас, Е. А. Вершинина

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

*E-mail: irenerzhova@mail.ru

Поступила в редакцию 06.09.2017

Принята к печати 25.04.2018

РЕФЕРАТ Синаптическая пластичность афферентного синапса вестибулярного аппарата определяется динамичным взаимодействием ионотропных и metabotropic glutamate receptors и модуляторов синаптической передачи. Показано, что оксид азота модулирует ответы iGluR. В настоящей работе исследовано влияние NO на функцию mGluR афферентного синапса. Ингибитор синтазы оксида азота понижал уровень фоновой активности, но увеличивал амплитуду ответа агониста mGluR групп I и II – ACPD. Донор NO SNAP увеличивал уровень фоновой активности. Кратковременная перфузия синаптической области низкими концентрациями SNAP приводила к уменьшению амплитуды ответов агонистов mGluR ACPD и DHPG. Ингибирующее влияние донора NO устранялось в условиях блокады растворимой гуанилатциклазы специфическим ингибитором ODQ. Длительная аппликация NO не вызывала статистически значимого изменения амплитуды ответа ACPD. Однако SNAP в концентрациях 10 и 100 мкМ увеличивал амплитуду ответов агониста mGluR через 30 и 15 мин соответственно после окончания воздействия донора NO. Полученные данные показывают разнонаправленное влияние NO на функцию mGluR и свидетельствуют о существовании сложного механизма, регулирующего афферентный поток от вестибулярных органов в центральную нервную систему.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вестибулярный аппарат, гуанилатциклаза, metabotropic glutamate receptors, оксид азота, синаптическая пластичность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ iGluR – ионотропные glutamate receptors; mGluR – metabotropic glutamate receptors; NO – оксид азота; NOS – NO-синтаза; ACPD – (±)-1-аминоциклопентан-*trans*-1,3-дикарбоновая кислота; SNAP – S-нитрозо-N-ацетил-DL-пеницилламин; DHPG – (S)-3,5-дигидроксифенилглицин; sGC – растворимая гуанилатциклаза; ODQ – 1H[1,2,4]оксадиазоло[4,3-а]квиноксалин-1; cGMP – циклический гуанозинмонофосфат; L-NAME – N-нитро-L-аргинин метиловый эфир гидрохлорид; IP3R – рецепторы инозитолтрифосфата; RyR – рианодинновые рецепторы; PKG – протеинкиназа G; AMPA – α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионовая кислота; NMDA – N-метил-D-аспарат; ЦНС – центральная нервная система; ВПСП – возбуждающий постсинаптический потенциал.

ВВЕДЕНИЕ

Волосковые клетки – вторичночувствующие рецепторы внутреннего уха, контактируют с афферентными волокнами посредством аминокислотного синапса. Пластичность глутаматергического синапса обеспечивается функциональным взаимодействием ионотропных и metabotropic glutamate receptors и модуляторов синаптической передачи, которые могут выделяться волосковыми клетками, нервными окончаниями или приноситься с током

крови. Особый интерес представляет оксид азота, газообразный нейромодулятор, который функционирует как внутриклеточный и внесинаптический сигнальный мессенджер. Источником NO у человека и животных является L-аргинин, который под действием NO-синтазы и ряда кофакторов превращается в NO и L-цитруллин. Во внутреннем ухе оксид азота может синтезироваться в нормальных условиях при активации нейрональной и эндотелиальной NO-синтазы, локализованной в волосковых клетках,

афферентных и эфферентных нервных волокнах [1–3]. Патологические процессы внутреннего уха (лабиринтэктомия, эксайтотоксичность, инфекции и воздействие ототоксических веществ) сопровождаются активацией индуцируемой NOS, что приводит к длительному синтезу высоких концентраций NO [4–9].

Важное значение NO в функционировании вестибулярного эпителия подтверждается данными клинической и экспериментальной физиологии. При помощи электрода, селективного к NO, в волосковых клетках выявлен базовый синтез оксида азота, который увеличивался при воздействии ацетилхолина, глутамата, антибиотиков, липосахаридов и цитокинов [10, 11]. В вестибулярном эпителии амфибий обнаружены эффекты доноров NO и ингибиторов NOS. Показано, что NO уменьшал входное сопротивление мембраны вестибулярных афферентных нейронов, повышал уровень фоновой активности афферентных волокон, увеличивал амплитуду ответов на адекватное раздражение и величину ответов агонистов iGluR. В противоположность эффектам доноров NO ингибиторы NOS понижали частоту суммарной фоновой активности афферентных волокон и ВПСП, но увеличивали амплитуду ответов глутамата и его агонистов AMPA и NMDA [12–14]. Предполагается, что ингибиторы NOS действуют на пресинаптическом уровне и снижают выделение нейромедиатора. Нами показано постсинаптическое влияние доноров NO и ингибиторов NOS в условиях блокады пресинаптической мембраны гипермагниевым-гипокальциевым раствором [13]. Опубликованы данные, свидетельствующие об участии NO в формировании афферентного разряда и в адаптивных изменениях вестибулярного анализатора [3, 8, 9, 11, 12, 14].

Механизм действия NO на синаптическую передачу, синаптическую пластичность и нейродегенеративные процессы, по мнению ряда исследователей, связан с модуляцией активности ионных каналов плазматической мембраны [15–18]. В вестибулярном эпителии при помощи метода патч-клампа целой и перфорированной клеток показано, что NO ингибирует Ca^{2+} -токи волосковых клеток крист полукружных каналов крыс посредством нитрозилирования Ca^{2+} -каналов и активации сигнального каскада sGC-sGMP [18]. Показано, что NO ослабляет уровень Ca^{2+} -осцилляций волосковых клеток саккулуса лягушки и увеличивает амплитуду тока, необходимого для их вызова. Этот эффект связывают не только с ингибированием Ca^{2+} -зависимых K^{+} - и Ca^{2+} -каналов, но и с уменьшением вероятности их открытия [12]. Ингибирование токов K^{+} -каналов донорами NO и мембранопроницаемым аналогом sGMP – 8-бром-sGMP – наблюдали на волосковых клетках типа I полукружных каналов крысы [19, 20].

Известно, что iGluR и mGluR колоколизированы на постсинаптической мембране. Принимая во внимание синтез NO при активации рецепторов NMDA и его быструю диффузию по градиенту концентрации, нами была выдвинута гипотеза о возможном влиянии NO и на функцию mGluR. Наши пилотные исследования показали, что донор NO SNAP уменьшал амплитуду ответов ACPD, агониста mGluR, а ингибитор NOS L-NAME оказывал противоположное действие [21]. Настоящая работа посвящена детальному изучению влияния NO на функцию mGluR.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика

Синаптические процессы в патологических и нормальных функциональных условиях характеризуются различными концентрациями NO и различным временем его действия. Нормально функционирующий синапс подвергается кратковременным воздействиям низких концентраций NO, тогда как при патологических состояниях происходит длительное влияние высоких концентраций NO. При выборе экспериментальной модели мы руководствовались данными, согласно которым содержание NO в ткани утрикулуса увеличивается через 5 мин после аппликации аминогликозидного антибиотика гентамицина [22]. Учитывая сказанное, мы исследовали: 1) кратковременное (1 мин) и длительное (9 мин) влияние донора NO SNAP (1–100 мкМ) на амплитуду ответов агонистов mGluR ACPD и DHPG; 2) специфичность влияния NO на функцию mGluR доказывали при помощи блокады рецептора NO растворимой гуанилатциклазы специфическим ингибитором ODQ.

Эксперименты выполняли на изолированном препарате вестибулярного эпителия лягушки при помощи отведения импульсной активности от целого нерва, иннервирующего ампулу заднего полукружного канала. Вестибулярный аппарат лягушки является уникальной моделью, позволяющей изучить закономерности синаптической передачи в бутонобразных синаптических окончаниях между волосковой клеткой и афферентным нервным волокном. Хрящевую капсулу с лабиринтом иссекали и помещали для последующего препарирования в камеру, непрерывно перфузируемую раствором следующего состава (в мМ): NaCl 117; KCl 2.5; $NaHCO_3$ 1.2; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.17; $CaCl_2$ 1.8; глюкоза 2.5. Исследуемые вещества растворяли в нормальном растворе в необходимых концентрациях (pH 7.4). Аппликацию исследуемых растворов осуществляли методом внешней перфузии. В опытах использовали следующие вещества фирмы Sigma-Aldrich: ингибитор NO-синтазы L-NAME; донор NO SNAP;

агонист I и II групп mGluR ACPD; селективный агонист I группы (mGlu1 и mGlu5) DHPG; селективный ингибитор sGC ODQ.

Множественную импульсную активность афферентных волокон, контактирующих с рецепторным эпителием полукружного канала, регистрировали при помощи засасывающего стеклянного электрода. Импульсную активность подавали на усилитель А-М Systems Inc 3000, преобразовывали в стандартные прямоугольные импульсы длительностью 2 мс, которые регистрировали на компьютере on-line в течение всего эксперимента при помощи оригинальной программы. Ответ агонистов mGluR ACPD и DHPG оценивался как отношение разности максимума и минимума ответа к частоте фоновой активности (Δ к фону). Сравнивали изменение амплитуды ответов агонистов mGluR ACPD и DHPG до и после аппликации ингибитора NOS и донора NO SNAP.

Данные представлены как средние значения со стандартными ошибками ($M \pm SE$). Анализ данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа для зависимых переменных ANOVA (Repeated measures) с последующими множественными парными сравнениями (Post hoc test), фактор – стадия процесса (фон/воздействие/восстановление). При отсутствии достаточного материала в стадии восстановления сравнивали только две стадии с применением *t*-теста. Все расчеты продублированы ранговым тестом Вилкоксона для зависимых переменных. Статистические решения принимали на 5% уровне значимости. Расчеты проводили с использованием программного комплекса SPSS Inc. Иллюстративный материал готовили с помощью пакета программ MS-Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние донора NO SNAP на фоновую активность афферентных волокон

Перфузия синаптической области раствором SNAP (0.01–100 мкМ) вызывала двухфазное позитивно-негативное изменение частоты фоновой активности. Воздействие донора NO SNAP характеризовалось отсутствием дозозависимости. Динамика ответа широко варьировала от опыта к опыту, что выражалось в различном соотношении амплитуды и длительности позитивной и негативной фаз ответа. Длительное воздействие высоких концентраций SNAP (100 мкМ) приводило к небольшому повышению импульсной активности, которое сменялось снижением частоты афферентных разрядов. Пониженный уровень импульсной активности не восстанавливался до первоначального уровня после 30-минутной экспозиции в нормальном растворе (рис. 1).

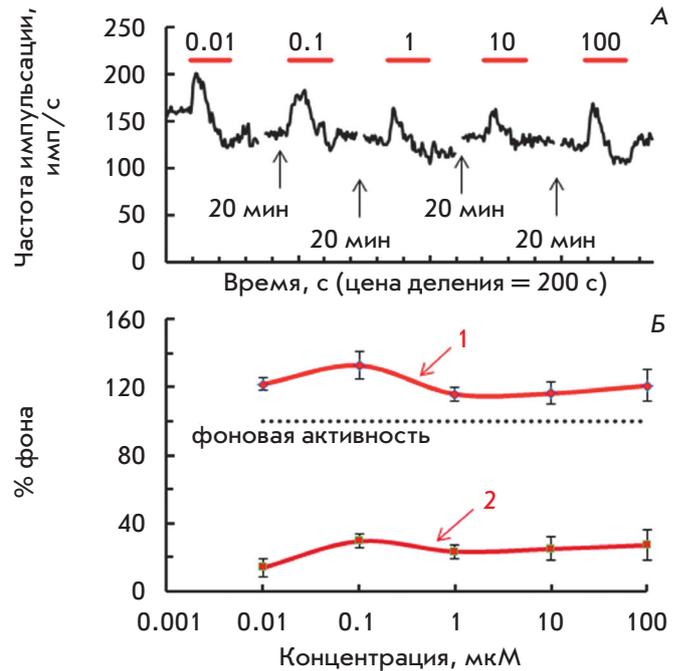


Рис. 1. Влияние различных концентраций донора NO SNAP на уровень фоновой активности нервных волокон, контактирующих с задним полукружным каналом вестибулярного аппарата лягушки. А – оригинальная запись эксперимента. По оси абсцисс – время, с; по оси ординат – средняя частота импульсной активности, имп/с. Б – кривая доза-ответ донора NO SNAP для первой максимальной (1) и второй минимальной (2) фаз ответа. $N = 5-6$

Кратковременное влияние донора NO на функцию метаботропных глутаматных рецепторов

Поскольку в вестибулярном эпителии выявлены только mGluR группы I и II [23, 24], в нашей работе мы исследовали влияние NO на амплитуду ответов агониста mGluR I и II групп ACPD и агониста mGluR I группы DHPG.

Агонист mGluR ACPD вызывал увеличение частоты импульсной активности. Для того чтобы отделить изменения возбуждающей фазы ответов агониста mGluR от возбуждающего эффекта донора NO SNAP, агонист mGluR апплицировали на фоне выраженного воздействия донора NO, при этом амплитуда ответа ACPD была меньше величины его тестового стимула. Наблюдаемые изменения были обратимы после 15-минутного отмывания в нормальном растворе (рис. 2).

Донор NO SNAP в низких концентрациях оказывал аналогичное влияние на ответы DHPG – агониста mGluR группы I. Аппликация DHPG (200 мкМ) сопровождалась увеличением частоты импульсной

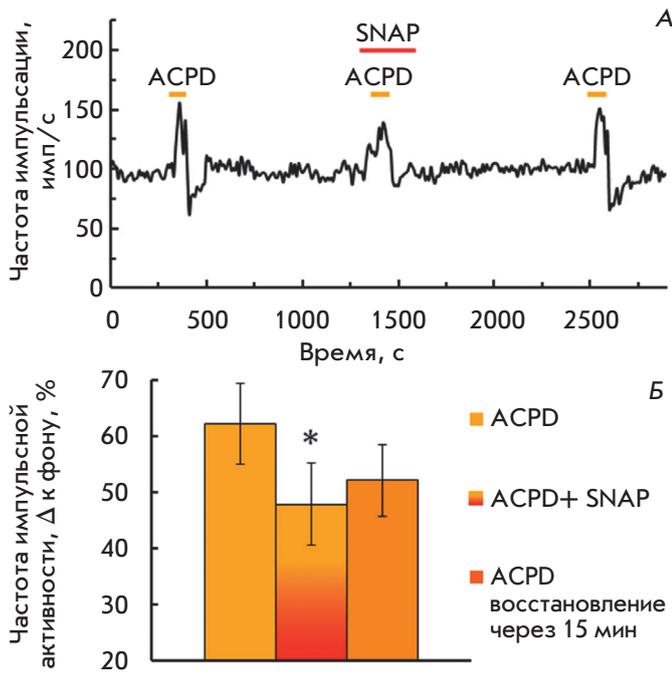


Рис. 2. Развитие возбуждающего ответа агониста mGluR ACPD (100 мкМ) на фоне увеличения частоты импульсной активности афферентных волокон после кратковременной аппликации донора NO SNAP (1 мкМ). А – оригинальная запись. По осям обозначения те же, что и на рис. 1А. Б – диаграмма ингибирования амплитуды ответа ACPD донором NO SNAP. (ANOVA $F(2,18) = 3.9, p = 0.039$; Post hoc test $p = 0.03$). Абсцисса: слева направо – ACPD-контроль, ACPD после кратковременной аппликации SNAP, ACPD-восстановление через 15 мин; ордината: величина ответа ACPD, среднее \pm ошибка среднего

активности афферентных волокон. Донор NO SNAP (1 мкМ) статистически значимо уменьшал амплитуду ответа агониста mGluR группы I DHPG (рис. 3). Таким образом, кратковременное воздействие оксида азота приводит к подавлению функции mGluR групп I и II. Ингибирующий эффект был полностью обратимым.

Длительное влияние NO на функцию mGluR

Изучение пролонгированного действия NO на функцию mGluR представляет особый интерес в связи с высокой концентрацией NO и длительным его воздействием при развитии патологических процессов внутреннего уха. В наших экспериментах первоначально апплицировали агонист mGluR ACPD (100 мкМ). После 15-минутного промывания препарата нормальным раствором проводили 5-минутную перфузию донора NO SNAP (0.1–100 мкМ), на фоне которой осуществляли повторную аппликацию агониста mGluR ACPD. Восстановление ответов ACPD в нормальном растворе контролировали через 15 и 30 мин после прекращения совместного воздействия SNAP и ACPD.

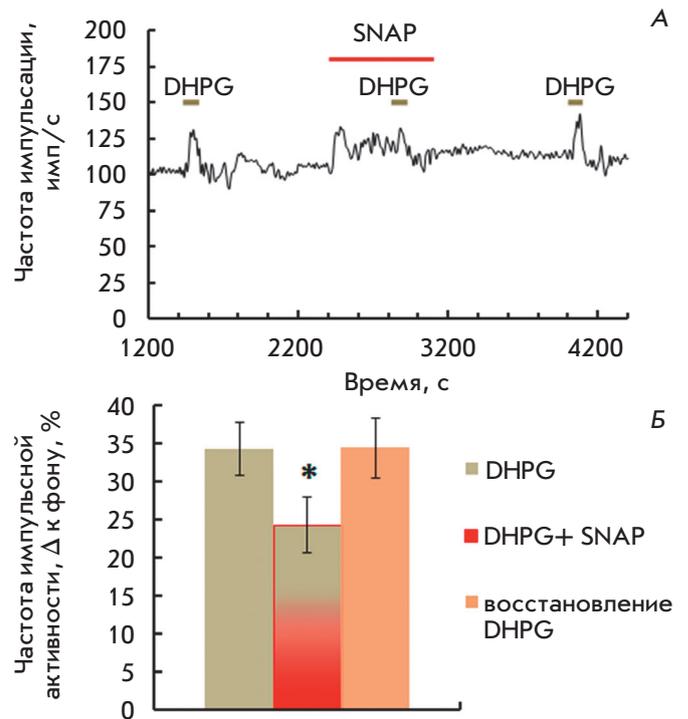


Рис. 3. Влияние донора NO SNAP (1 мкМ) на величину ответа агониста mGluR группы I DHPG (200 мкМ). А – оригинальная запись эксперимента. По осям обозначения те же, что и на рис. 1А. Б – диаграмма, отражающая уменьшение амплитуды ответа DHPG на фоне кратковременной аппликации SNAP (Wilcoxon $p = 0.025$)

Длительная перфузия синаптической области растворами низкой концентрации SNAP (0.1–1 мкМ) не влияла ни на величину ответа после 5-минутной перфузии, ни на восстановление ответа через 15 и 30 мин. SNAP в концентрации 10 мкМ не изменял ни величины ответа агониста mGluR после 5-минутной перфузии, ни амплитуды ответа агониста mGluR после 15-минутного пребывания препарата в нормальном растворе. Однако через 30 мин после прекращения воздействия SNAP (10 мкМ) наблюдали статистически значимое увеличение амплитуды ответа ACPD, которое составляло 169.9% по отношению к фону. Тенденцию к различиям наблюдали между воздействием и восстановлением через 15 мин (Post hoc test = 0.082) и через 30 мин (Post hoc test = 0.059).

SNAP (100 мкМ) также не изменял амплитуды ответа агониста mGluR ACPD по отношению к фону к концу 5-минутной аппликации, но вызывал ста-

статистически значимое увеличение амплитуды ответа агониста ACPD через 15 мин после окончания аппликации донора NO по отношению к контролю. Увеличение амплитуды ответа сохранялось на этом уровне и через 30 мин после окончания воздействия NO, хотя и было статистически незначимым (рис. 4).

Таким образом, влияние NO на функцию mGluR зависело от концентрации и длительности воздействия. Кратковременное воздействие низких концентраций NO сопровождалось ингибированием функции mGluR. Длительное воздействие высоких концентраций донора NO приводило к увеличению ответов mGluR.

Влияние специфического ингибитора sGC на депрессивный эффект донора NO SNAP

Участие ферментативного пути в модуляции функции mGluR изучали с использованием следующего протокола. Этап 1 (рис. 5А): аппликация агониста mGluR ACPD (норма 1), отмывка препарата в нормальном растворе, перфузия синаптической области раствором SNAP (1 мкМ) и ACPD (100 мкМ) (наблюдали ингибирующий эффект, воздействие 1), регистрация восстановления ответа агониста mGluR ACPD через 15 мин в нормальном растворе. Этап 2 (рис. 5Б): инкубация препарата в течение 20 мин в растворе специфического ингибитора sGC ODQ (15 мкМ), на фоне перфузии препарата раствором ODQ повтор этапа 1 [аппликация раствора ACPD 100 мкМ (контроль 2), SNAP (1 мкМ) и ACPD (100 мкМ) (воздействие 2), контроль амплитуды ответа ACPD после 15-минутной отмывки]. Этап 3: после перфузии в течение 1 ч вестибулярного аппарата в нормальном растворе тестировали сохранение эффекта ODQ (повторяли этап 1). Сравнивали статистическую значимость различий в величине ответов агониста ACPD и ACPD на фоне SNAP до и после блокады sGC между нормой 1 и воздействием 1, а также между нормой 2 и воздействием 2. Сохранение эффекта воздействия ODQ оценивали как разницу между нормой 3 и воздействием 3 третьего этапа. ANOVA с последующими парными множественными сравнениями выявил значимое уменьшение амплитуды ответов агониста mGluR ACPD под воздействием донора NO SNAP (ANOVA $F(2.18) = 3.9$, $p = 0.039$, Post hoc test – $p = 0.03$), которое исчезало после блокады sGC специфическим ингибитором ODQ (ANOVA $F(2.20) = 0.408$, $p = 0.67$). Влияние ODQ сохранялось через 1 ч (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Функциональная роль mGluR в различных структурах ЦНС изучена достаточно подробно. mGluR играют ключевую роль в процессах онтогенеза ЦНС

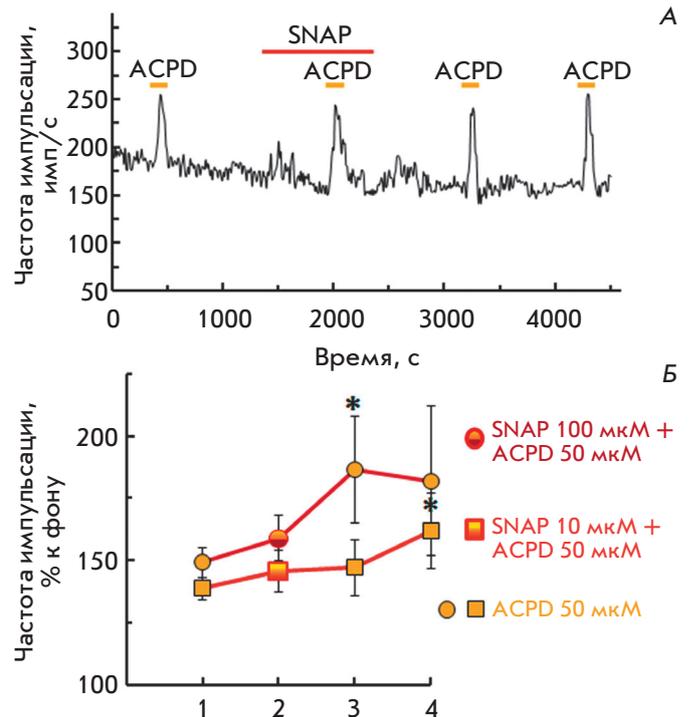


Рис. 4. Влияние длительной аппликации донора NO SNAP на амплитуду ответов агониста mGluR группы I и II ACPD (50 мкМ). А – оригинальная запись опыта (SNAP 10 мкМ). По осям обозначения те же, что и на рис. 1А. Б – суммарные кривые, отражающие изменение амплитуды ответов ACPD при длительном воздействии различных концентраций донора NO: SNAP 10 мкМ (ANOVA $F(3.18) = 4.4$, $p = 0.017$, Post hoc test $p = 0.047$) и SNAP 100 мкМ (ANOVA $F(2.16) = 4.58$, $p = 0.027$, Post hoc test $p = 0.027$). По оси абсцисс: 1 – контрольное значение ACPD, 2 – SNAP + ACPD после 5-минутной перфузии синаптической области раствором донора NO SNAP, 3 – ответ на аппликацию ACPD через 15 мин ($n = 10$) и 4 – через 30 мин ($n = 6$) после прекращения перфузии препарата раствором донора NO. По оси ординат: величина ответа ACPD, среднее \pm ошибка среднего

[25], участвуют в долговременной потенциации, депрессии, обучении и формировании долговременной памяти [26–28], выявлены на мембранах глиальных клеток, на пре- и постсинаптических мембранах в коре, стриатуме, гиппокампе и мозжечке [26, 29–31]. В настоящее время клонировано восемь подтипов mGluR, которые подразделяются на три группы в зависимости от структуры, фармакологических характеристик и связи с системами вторичных посредников [29, 32–34]. Во всех случаях активация mGluR связана с выходом Ca^{2+} из внутриклеточного

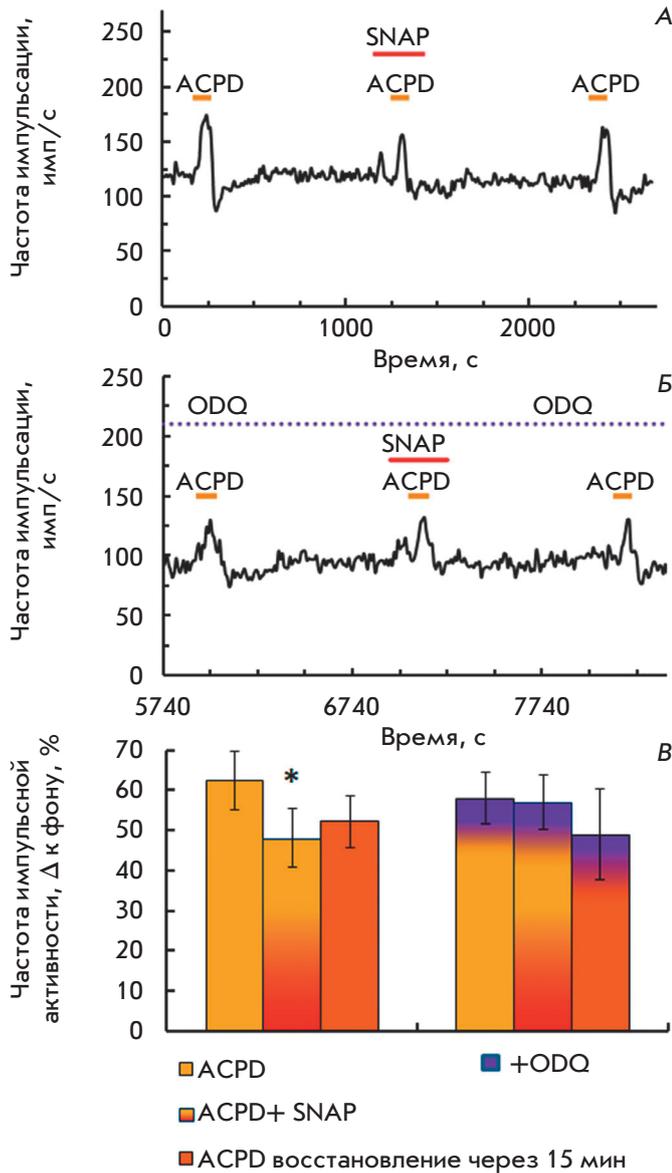


Рис. 5. Устранение модулирующего депрессивного влияния донора NO SNAP (1 мкМ) после 20-минутной блокады sGC раствором специфического ингибитора ODQ (15 мкМ). А, Б – оригинальная запись динамики ответов агониста mGluR ACPD до (А) и после (Б) аппликации ODQ. По осям обозначения те же, что и на рис. 1А. В – диаграмма, иллюстрирующая устранение ингибирующего влияния донора NO SNAP (1 мкМ) на величину ответов ACPD (100 мкМ) после 20-минутной инкубации препарата в растворе ингибитора sGC ODQ (15 мкМ). По оси абсцисс слева направо – ACPD-контроль, ACPD на фоне SNAP, ACPD-восстановление через 15 мин; далее то же на фоне воздействия ODQ. По оси ординат – величина ответа ACPD, среднее \pm ошибка среднего

депо и пролонгированием волны возбуждения, запускаемой iGluR.

На мембранах эндоплазматического ретикула локализованы два типа Ca^{2+} -каналов, которые различаются по своим функциональным и фармакологическим характеристикам. Рианодиновые рецепторы (RyR) функционально взаимодействуют с потенциал-зависимыми Ca^{2+} -каналами плазматической мембраны, активируются низкими концентрациями рианодина, АТФ, гепарином, микромолярными концентрациями катионов Ca^{2+} . Функция рианодиновых Ca^{2+} -каналов может ингибироваться миллимолярными концентрациями Ca^{2+} и рианодина, модулироваться NO, оксидантами, протеинкиназами и внутриклеточными белками [35, 36]. Рецепторы инозитолтрифосфата (IP3R) эндоплазматического ретикула активируются IP3, но ингибируются кальмодулином и киназой I, активируемой NO/cGMP [37].

Сведения о функциях mGluR и способах их модуляции в акустико-латеральной системе немногочисленны. В вестибулярном эпителии земноводных обнаружены только mGluR I и II групп, локализованные на пре- и постсинаптических мембранах. Функция mGluR 2, 3 подтипов до сих пор не изучена [23, 24]. Доказательства непосредственного участия mGluR I в афферентной синаптической передаче в вестибулярном аппарате [23] и в улитке [38, 39] получены с применением методов электрофизиологии, иммуногистохимии и молекулярной генетики.

Участие группы I mGluR в работе глутаматергического синапса показано на полукружных каналах лягушки [23, 40]. В этих исследованиях агонист mGluR I–II ACPD и специфический агонист mGluR I DHPG увеличивали частоту афферентных разрядов ампулярного нерва. Доказано, что активация пресинаптических mGluR облегчает глутаматергическую трансмиссию вследствие высвобождения внутриклеточного Ca^{2+} из IP3-чувствительных и рианодин/кофеин-чувствительных внутриклеточных Ca^{2+} -депо.

На вестибулярном аппарате лягушки с использованием иммуноцитохимических и электрофизиологических методов выявлена функциональная связь mGluR группы I с IP3R эндоплазматического ретикула, доказано участие IP3 в модуляции фоновой активности и механически вызванных ответов [41]. Совокупность опубликованных данных свидетельствует о том, что в вестибулярном аппарате земноводных присутствует гетерогенная популяция mGluR, активация которой связана с образованием IP3, запуском рецепторов рианодина и IP3 и выходом Ca^{2+} из цистерн эндоплазматического ретикула. Важно отметить, что увеличение частоты импульсной активности афферентных волокон, вызванное

аппликацией агониста mGluR ACPD, обусловлено только активностью mGluR и, следовательно, рецепторов RyR и IP3R, но не ионотропных, поскольку специфические антагонисты iGluR не изменяли амплитуду ответа агониста mGluR ACPD [23].

Афферентные волокна вестибулярного эпителия характеризуются фоновой активностью, которая отражает тоническое выделение глутамата волосковыми клетками [42]. Чувствительность вестибулярного аппарата к адекватным стимулам и информативность сигнала, поступающего в ЦНС, определяется соотношением фоновой и вызванной активности. Согласно современным представлениям, активация mGluR вестибулярного эпителия полукружных каналов формирует положительную обратную связь, увеличивая контраст между фоновой и вызванной активностью [23]. Эта гипотеза подтверждается и нашими данными, согласно которым аппликация агониста mGluR ACPD увеличивала амплитуду ответов агонистов iGluR [24].

Результаты наших пилотных экспериментов и представленные данные свидетельствуют о том, что NO может модулировать функцию mGluR. В наших экспериментах ингибитор NOS L-NAME в зависимости от концентрации уменьшал уровень фоновой активности афферентных волокон, но увеличивал амплитуду ответов агониста mGluR ACPD [21]. Эти результаты подтверждают гипотезу, согласно которой фоновая и вызванная активность афферентных волокон вестибулярного эпителия формируется за счет различных механизмов [42]. Полученные нами данные по влиянию ингибиторов NOS на фоновую активность афферентных волокон [13] соответствуют результатам, полученным на различных моделях акустико-латеральной системы: L-NAME ингибировал фоновую активность органов боковой линии [43]. Ингибиторы NOS L-NOARG и L-NAME понижали частоту фоновой активности вестибулярного нерва и ВПСР у аксолотля [1, 12]. На вестибулярном эпителии саккулюса лягушки при помощи специфического флуоресцентного зонда показано снижение синтеза NO в присутствии L-NAME [11]. Совокупность наших и опубликованных данных позволяет сделать вывод о том, что в вестибулярном эпителии в нормальных физиологических условиях выделяется незначительное количество NO, а наблюдаемый эффект понижения уровня фоновой активности и увеличения амплитуды ответов агониста mGluR ACPD на фоне блокады NOS ингибитором L-NAME является специфичным.

Ингибирующее влияние малых концентраций доноров NO на ответы агонистов mGluR изучали в двух сериях экспериментов при одновременной и последовательной аппликации NO и агонистов mGluR,

что позволило отделить возбуждающий эффект агонистов mGluR от возбуждающего эффекта донора NO на фоновую активность и сравнить влияние донора NO SNAP на iGluR и mGluR. Сопоставление данных показало, что при одновременной кратковременной аппликации донор NO увеличивал амплитуду ответов агонистов iGluR AMPA и NMDA [14], но уменьшал величину ответа агонистов mGluR ACPD и DHPG. Ингибирующий эффект SNAP на величину ответов агониста mGluR ACPD не зависел от концентрации.

Принято считать, что NO может модифицировать возбудимость нервных клеток при помощи двух основных механизмов: прямого взаимодействия непосредственно с белком ионного канала (реакция нитрозилирования) и путем активации сигнального каскада NO/sGC/cGMP/PKG [15, 44]. Оба пути выявлены в волосковых клетках внутреннего уха [18]. Для решения вопроса об участии растворимой гуанилатциклазы, а следовательно, и NO/sGC/cGMP сигнального каскада в ингибирующем влиянии NO на mGluR мы применяли специфический блокатор sGC ODQ, поскольку именно sGC является специфическим цитозольным рецептором NO [45].

В наших опытах специфический блокатор sGC ODQ подавлял запуск сигнального каскада NO-sGC-cGMP и устранял ингибирующее влияние донора NO SNAP, что предполагает участие этого пути в модуляции mGluR. На наш взгляд, ингибирование функции mGluR малыми концентрациями NO можно рассматривать как один из механизмов пластичности глутаматергического синапса, направленного на уменьшение положительной обратной связи [24]. Эта гипотеза требует дальнейших доказательств.

Прямых данных о влиянии NO на функцию mGluR нам обнаружить не удалось. Однако установлено, что NO может ингибировать сигнальный каскад, запускаемый G-белками. Принципиальная возможность фосфорилирования рецепторов IP3 и понижения концентрации внутриклеточного Ca²⁺ при активации PKG показана на клетках яичника китайского хомячка. В этих экспериментах увеличение концентрации внутриклеточного Ca²⁺, вызванное активацией сигнального каскада тромбин/G-белок/фосфолипаза C, полностью устранялось в присутствии 8-бром-cGMP, что свидетельствует о специфичности воздействия cGMP-стимулируемой киназы [46].

Аналогичные данные получены на культуре клеток, трансфицированных IP3R и инкубированных со специфическим аналогом cGKI, активируемым cGMP. Предынкубация клеток, экспрессирующих IP3R, комплекс IRAG и протеинкиназу cGKIβ, со специфическим аналогом 8-pCPT-cGMP уменьша-

ла вызванный брадикинином выход Ca^{2+} из внутриклеточного депо. Наблюдаемый эффект связывают с фосфорилированием белкового комплекса IRAG и уменьшением синтеза IP3 [37].

На разных экспериментальных моделях выявлены cGMP-зависимый и cGMP-независимый пути влияния NO на рецепторы саркоплазматического ретикулула. Предполагается, что NO может по-разному модифицировать функцию рецепторов рианодина и IP3. Эти два механизма различаются кинетикой активации и концентрацией NO, необходимой для запуска процесса модуляции. NO-активируемый ферментативный путь, ведущий к активации PKG и ингибированию синтеза IP3 (или фосфорилированию рецепторов IP3), запускается низкими концентрациями NO в течение секундного временного диапазона. Процесс нитрозилирования RyR инициируется более высокой концентрацией NO, развивается в течение нескольких минут и связан с увеличением активности Ca^{2+} -канала, ассоциированной с повышением вероятности его открытия [47, 48]. Таким образом, выход ионов Ca^{2+} из внутриклеточного депо может модулироваться во времени различными механизмами. Длительное воздействие высоких концентраций NO может вызывать нитрозилирующий стресс, приводящий к патологии [47, 49].

Наши данные подтверждают гипотезу, согласно которой NO может модифицировать функцию mGluR, причем модулирующий эффект зависит от концентрации и времени воздействия NO.

Кратковременное воздействие низких концентраций NO приводит к подавлению ответов агонистов mGluR и, следовательно, к уменьшению выхода Ca^{2+} из внутриклеточного депо. Этот механизм, на наш взгляд, может быть связан с механизмом пластичности глутаматергического синапса, с уменьшением положительной обратной связи и направлен против эксайтотоксичности [24]. Длительная активация сигнального каскада NO высокими концентрациями донора NO вызывает невысокое, но статистически значимое увеличение амплитуды ответов агонистов mGluR, что гипотетически может быть связано с активацией рецепторов рианодина. Эти предположения требуют дальнейшего экспериментального подтверждения.

Таким образом, в настоящей работе показано:

NO влияет на функцию агонистов различных групп mGluR (ACPD и DHPG).

Блокирование специфического рецептора NO устраняет ингибирующее влияние NO на функцию mGluR, что указывает на специфический эффект NO. (Доказательства участия различных звеньев пути NO в модуляции функции mGluR планируется получить в дальнейших экспериментах.)

Вектор влияния NO на функцию mGluR зависит от концентрации и времени воздействия, что указывает на динамический характер влияния NO. ●

*Работа выполнена при поддержке РФФИ
(грант № 14-04-00409).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Flores A., Leyn-Olea M., Vega R., Soto E. // *Neurosci. Lett.* 1996. V. 205. P. 131–134.
- Lysakowski A., Singer M. // *J. Comp. Neurol.* 2000. V. 427. P. 508–521.
- Takumida M., Anniko M. // *In vivo.* 2004. V. 18. P. 345–350.
- Takumida M., Anniko M. // *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 1998a. V. 60. P. 67–72.
- Popa R., Anniko M., Takumida M. // *Acta Otolaryngol.* 2000. V. 120. P. 350–358.
- Takumida M., Anniko M. // *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 1998b. V. 255. № 4. P. 184–188.
- Park J.-S., Jeong H.-S. // *Jpn. J. Pharmacol.* 2000. V. 84. P. 425–430.
- Smith P.F., Zheng Y., Paterson S., Darlington C.L. // *Acta Otolaryngol. Suppl.* 2001. V. 545. P. 57–60.
- Hong S.H., Park S.K., Cho Y.-S., Lee H.-S., Kim K.R., Kim M.G., Chung W.-H. // *Hear. Res.* 2006. V. 211. P. 46–53.
- Takumida M., Anniko M., Moncada S., Bolaños J.P. // *J. Neurochem.* 2006. V. 97. P. 1676–1689.
- lv P., Rodriguez-Contreras A., Kim H.J., Zhu J., Wei D., Choong-Ryoul S., Eastwood E., Mu K., Levic S., Song H., Petrov Y., et al. // *J. Neurophysiol.* 2010. V. 103. P. 2494–2505.
- Flores A., Vega R., Soto E. // *Neurosci.* 2001. V. 103. P. 457–464.
- Андрианов Ю.Н., Рыжова И.В., Тобиас Т.В. // *Сенс. сист.* 2011. Т. 25. № 4. С. 297–304.
- Андрианов Ю.Н., Рыжова И.В., Тобиас Т.В. // *Сенс. сист.* 2012. Т. 26. № 3. С. 204–213.
- Garthwaite J., Boulton C. // *Annu. Rev. Physiol.* 1995. V. 57. P. 683–706.
- Rand M., Li C. // *Annu. Rev. Physiol.* 1995. V. 57. P. 659–682.
- Schuman E.M., Madison D.V. // *Annu. Rev. Neurosci.* 1994. V. 17. P. 153–183.
- Almanza A., Navarrete F., Vega R., Soto E. // *J. Neurophysiol.* 2007. V. 97. P. 1188–1195.
- Behrend O., Schwark C., Kunihiro T., Strupp M. // *NeuroReport.* 1997. V. 8. P. 2687–2690.
- Chen J.W. Y., Eatock R.A. // *J. Neurophysiol.* 2000. V. 84. P. 139–151.
- Рыжова И.В., Ноздрачев А.Д., Тобиас Т.В., Орлов И.В., Чихман В.Н., Солнушкин С.Д. // *ДАН.* 2016. V. 469. P. 116–118.
- Takumida M., Anniko M. // *Acta Otolaryngol.* 2001. V. 121. P. 342–345.
- Guth P.S., Holt J.C., Perin P., Athas G., Garcia M., Puri A., Zucca G., Botta L., Valli P. // *Hear. Res.* 1998a. V. 125. P. 154–162.
- Andrianov G.N., Puyal J., Raymond J., Venteo S., Dememes D., Ryzhova I.V. // *Hear. Res.* 2005. V. 204. P. 200–209.
- Puyal J., Grassi S., Dieni C., Frondali A., Dememes D., Raymond J., Petorossi V.E. // *J. Physiol.* 2003. V. 553. P. 427–443.
- Anwyl R. // *Brain Res. Rev.* 1999. V. 29. P. 83–120.
- Bellone C., Lüscher C., Mameli M. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. V. 65. P. 2913–2923.

28. Pettorossi V.E., Dieni C.V., Scarduzio M., Grassi S. // *Neurosci.* 2011. V. 187. P. 1–14.
29. Nakanishi S. // *Neuron.* 1994. V. 13. P. 1031–1037.
30. Pin J.-P., Duvoisin R. // *Neuropharmacol.* 1995. V. 34. P. 1–26.
31. Conn P.J., Pin J.P. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997. V. 37. P. 205–237.
32. Roberts M. // *Neuropharm.* 1995. V. 34. P. 813–819.
33. Kew J.N., Kemp J.A. // *Psychopharmacol.* 2005. V. 179. P. 4–29.
34. Niswender C.M., Conn P.J. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2010. V. 50. P. 295–322.
35. Fill M., Copello J.A. // *Physiol. Rev.* 2002. V. 82. P. 893–922.
36. Kakizawa S. // *Front. Endocrinol.* 2013. V. 4. P. 1–6.
37. Schlossmann J., Ammendola A., Ashman K., Zong H., Huber A., Neubauer G., Wang G.-X., Allescher H.D., Korth M., Wilm M., et al. // *Nature.* 2000. V. 404. P. 197–201.
38. Kleinlogel S., Oestereich T.A., Ehrenberger K., Felix D. // *NeuroReport.* 1999. V. 10. P. 1879–1882.
39. Peng B.G., Li Q.X., Ren T.Y., Ahmad S., Chen S.P., Chen P., Lin X. // *Neurosci.* 2004. V. 123. P. 221–230.
40. Hendricson A.W., Guth P.S. // *Hear. Res.* 2002. V. 172. P. 99–109.
41. Rossi M.L., Prigioni I., Gioglio L., Rubbini G., Russo G., Martini M., Farinelli F., Rispoli G., Fesce R. // *Eur. J. Neurosci.* 2006. V. 23. P. 1775–1783.
42. Guth P.S., Perin P., Norris C.H., Valli P. // *Progr. Neurobiol.* 1998b. V. 54. P. 193–247.
43. Vega R., Ortega A., Almanza A., Soto E. // *Neurosci. Lett.* 2006. V. 393. P. 65–69.
44. Martines-Ruiz A., Cadenas S., Lamas S. // *Free Radical Biol. Med.* 2011. V. 51. P. 17–29.
45. Garthwaite J., Southam E., Boulton C., Nielsen E., Schmidt K., Mayer B. // *Mol. Pharmacology.* 1995. V. 48. P. 184–188.
46. Ruth P., Wang G.-X., Boekhoff I., May B., Pfeir A., Pennert R., Korth M., Breer H., Hofmann F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 2623–2627.
47. Ahern G., Klyachko V., Jackson M.B. // *Trends Neurosci.* 2002. V. 25. № 10. P. 510–517.
48. Stoyanovsky D., Murphy T., Anno P.R., Kim Y.-M., Salama G. // *Cell Calcium.* 1997. V. 21. № 1. P. 19–29.
49. Nakamura T., Lipton S.A. // *Neurochem. Res.* 2016. V. 41. № 3. P. 510–514.