

УДК 577.151

©Коллектив авторов

ВЫРАБОТКА ДОЛГОВРЕМЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ НЕЙРОНОВ К ЭКЗАЙТОТОКСИЧЕСКОМУ ПОВРЕЖДЕНИЮ С ПОМОЩЬЮ ДЕПРИВАЦИИ ТРОФИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ

А.А. Яковлев^{1,2*}, А.А. Лыжин³, О.П. Александрова³, Л.Г. Хаспеков³, Н.В. Гуляева^{1,2}

¹Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН,
117485, Москва, ул. Бутлерова, д. 5А; эл. почта: al_yakovlev@rambler.ru

²Научно-практический психоневрологический центр им. З.П. Соловьева,
115419, Москва, ул. Донская, д. 43

³Отдел исследований мозга научного центра неврологии,
105064, Москва, пер. Обуха, д. 5

Одной из стратегий выработки устойчивости нейронов к токсическим повреждениям является прекондиционирование – предварительное слабое повреждающее воздействие, в результате которого клетки вырабатывают устойчивость к последующим, более сильным воздействиям. В работе установлено, что прекондиционирование с помощью депривации трофических факторов или депривации трофических факторов и глюкозы эффективно защищает нейроны от последующего токсического действия глутамата. Определяющую роль в выработке устойчивости играет депривация трофических факторов вне зависимости от того, проходит она вместе с депривацией глюкозы или без нее. Защита нейронов достигается при продолжительности депривации от получаса до двух часов и сохраняется в течении периода от одних до пяти суток. На этапе прекондиционирования происходит секреция нейронами катепсина В, что, по-видимому, является проявлением более общего процесса экзоцитоза лизосом, запускаемого депривацией трофических факторов. Не установлено вовлечение калпаина и каспазы-3 в прекондиционирование в использованной модели.

Ключевые слова: прекондиционирование, нейроны, депривация, протеазы

DOI 10.18097/PBMC20166206656

ВВЕДЕНИЕ

Одной из моделей гибели нейронов *in vitro* является воздействие токсических концентраций глутамата. В этой модели внеклеточный глутамат связывается со своими рецепторами на клеточной поверхности и запускает вход в клетку ионов Ca^{2+} . Ионы кальция, в свою очередь, вызывают активацию ряда внутриклеточных ферментов, что при продолжающейся избыточной активации глутаматных рецепторов приводит к клеточной гибели [1]. Хотя полностью механизм эксайтотоксичности ещё не изучен, она до настоящего времени остается надёжной моделью патологической гибели нейронов *in vitro*.

Перспектива повышения толерантности нейронов к токсическому действию глутамата заманчива с точки зрения практического использования в клинике. Одной из многообещающих стратегий повышения устойчивости нейронов к гибели является прекондиционирование [2], которое заключается в том, что клетки, которые перенесли воздействие повреждающего фактора умеренной степени тяжести, в дальнейшем успешнее противостоят более тяжёлым повреждениям. При прекондиционировании в клетках запускаются механизмы выживания, которые в течении довольно длительного времени позволяют им переносить более тяжелые повреждения [2]. Прекондиционирование возникает в результате действия таких факторов как воздействие химических веществ, кратковременные ишемия, гипоксия, гипертермия и многих других, неспецифических

факторов повреждения. Одним из вариантов прекондиционирования является депривация трофических факторов, вызывающая кратковременное “голодание” клетки [2].

В настоящее время остаётся неизученным, какие факторы являются ключевыми для реализации механизмов прекондиционирования, запускаемого разными индукторами. В нашем эксперименте в качестве прекондиционирующего воздействия, индуцирующего толерантность к последующему токсическому действию глутамата, мы использовали депривацию трофических факторов, саму по себе или вместе с депривацией глюкозы. Этот экспериментальный подход позволил оценить длительность периода повышенной устойчивости нейронов к токсическому действию глутамата в результате прекондиционирования.

МЕТОДИКА

Получение первичных нейрональных культур мозжечка

Диссоциированные клетки-зёрна мозжечка 8-дневных крысят линии Wistar культивировали по описанной ранее методике в CO_2 -инкубаторе (5% CO_2 , 95% воздуха, 35,5°C) в течение 8-9 дней [3]. Клеточную суспензию распределяли по лункам планшетов, предварительно покрытых полиэтиленином (0,5 мг/мл), в дальнейшем объединяя по несколько лунок на одну экспериментальную группу. В каждой лунке при такой

постановке эксперимента было около 100 тысяч клеток (от 80 до 150 тысяч в зависимости от эксперимента). Всего было проведено 5 экспериментов. В каждом эксперименте анализировали не менее четырёх параллельных образцов сестринских культур.

Прекондиционирование к неблагоприятным условиям (депривация ростовых факторов и глюкозы) и токсическое воздействие глутамата

Нами разработана методика preconditionирования клеток-зёрен мозжечка с помощью депривации трофических факторов. На 6-7 день *in vitro* клетки помещали в солевой буферный раствор, содержащий 5 mM HEPES pH 7,4, 143,4 mM NaCl, 25 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1,2 mM NaH₂PO₄, содержащий или не содержащий 10 mM глюкозу, и выдерживали в CO₂-инкубаторе в течение разных периодов времени (от 15 мин до двух ч) при 35,5°C. После этого культуры возвращали в питательную среду и через сутки к клеткам добавляли глутамат в концентрации 500 мкМ или 1000 мкМ. В предварительных экспериментах было установлено, что число гибнущих клеток в таких условиях составляло примерно от 10 до 20% от общего числа клеток в лунке. В дальнейших экспериментах общее число клеток в лунках не подсчитывали. После внесения глутамата в течение нескольких суток считали погибшие нейроны с помощью окрашивания на пропидиум иодид. Клетки фотографировали при увеличении $\times 20$ и считали число пропидиум-позитивных клеток в поле зрения с помощью специальной компьютерной программы ImageJ. Для изучения активности протеаз собирали клетки и культуральную жидкость в разные сроки *in vitro*.

Определение активности протеаз

Активность каспазы-3 определяли флуориметрическим методом. Лизат клеток или экстракционную жидкость инкубировали при 37°C в реакционном буфере (100 mM MES pH 7,5, 10 mM дитиотреитол, 1 mM ЭДТА) в двух параллельных образцах с добавлением 50 мкМ флуорогенного субстрата (N-ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп-7-амино-4-метилкумарин, флуорогенный субстрат для каспазы-3, "Biomol", США). Флуоресценцию регистрировали в течение 60 мин на планшетном фотометре Wallac 3 ("Perkin Elmer", США) при длинах волн возбуждения и эмиссии 380 нм и 440 нм соответственно. Активность катепсина В определяли схожим образом, за исключением pH среды, который был равен 4,5. В качестве субстрата использовали Z-RR-AMC (N-бензилоксикарбонил-Арг-Арг-7-амино-4-метилкумарин, "Biomol") Активность калпаина определяли флуоресцентным методом. Лизат клеток или внеклеточную жидкость смешивали с реакционной средой следующего состава: 63 mM имидазол-HCl, pH 7,4, 2,5 mM CaCl₂, 5 mM дитиотреитол, 50 мкМ флуорогенный субстрат калпаина Ac-LY-AMC (N-ацетил-Лей-Тир-7-амино-4-метилкумарин, "Biomol"). В течение 60 мин инкубации при 37°C измеряли флуоресценцию

при длинах волн возбуждения и эмиссии 380 нм и 440 нм соответственно. Активность протеаз рассчитывали по флуоресценции известных концентраций стандарта AMC и выражали в пмоль/мин/мг белка.

Определение активности гексозаминидазы

Активность гексозаминидазы определяли флуориметрическим методом. К лизату клеток или внеклеточной жидкости добавляли три объёма 100 mM цитрата натрия pH 4,5, содержащего 1 mM субстрат гексозаминидазы 4-метилумбеллиферил N-ацетил-β-D-глюкозаминид и инкубировали при 37°C в течение 60 мин. Реакцию останавливали пятикратным избытком 0,1 M глицина pH 10,5 и определяли флуоресценцию при длинах волн возбуждения и эмиссии 365 и 440 нм, соответственно.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программе STATISTICA ver. 10, StatSoft Inc. Различия между группами определяли с помощью непараметрического теста Манна-Уитни, корреляции проводили по методу Спирмена, данные представлены в виде $M \pm SD$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Число погибших клеток после воздействия двух доз глутамата на первые сутки после депривации трофических факторов представлено на рисунке 1. Прекондиционирующее воздействие длительностью 30 мин оказалось наиболее

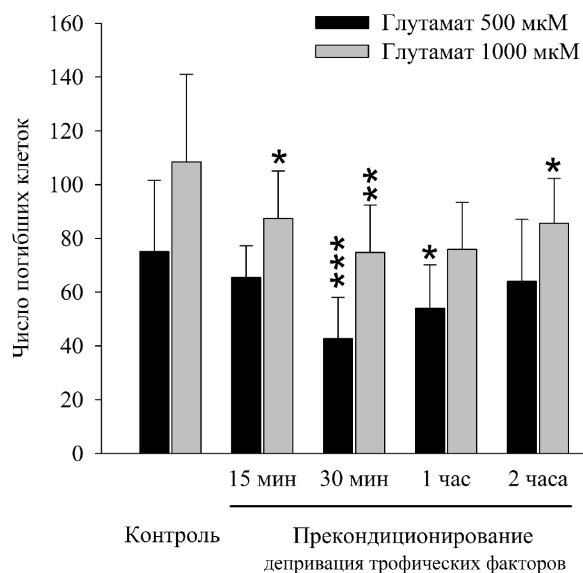


Рисунок 1. Число погибших клеток на первые сутки токсического действия глутамата. Клетки подвергали депривации трофических факторов на разные сроки и возвращали в питательную среду, а через сутки подвергали токсическому воздействию 500 мкМ или 1000 мкМ глутамата. Гибель определяли через сутки по числу клеток, окрашенных пропидиумом иодидом. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по тесту Манна-Уитни в сравнении с соответствующим контролем.

эффективно в предотвращении нейрональной гибели после воздействия двух доз глутамата. Число погибших клеток составило на этом сроке преко кондиционирования 57% от контроля при действии низкой дозы глутамата и 69% от контроля при действии высокой дозы глутамата (все отличия высокодостоверны, $p < 0,001$ и $p < 0,01$ по тесту Манна-Уитни соответственно). Число погибших клеток после воздействия двух доз глутамата на первые сутки после депривации трофических факторов и глюкозы совместно представлено на рисунке 2. В целом, картина очень напоминает депривацию только трофических факторов, и влияние глюкозы при таком типе преко кондиционирования, видимо, не является существенным.

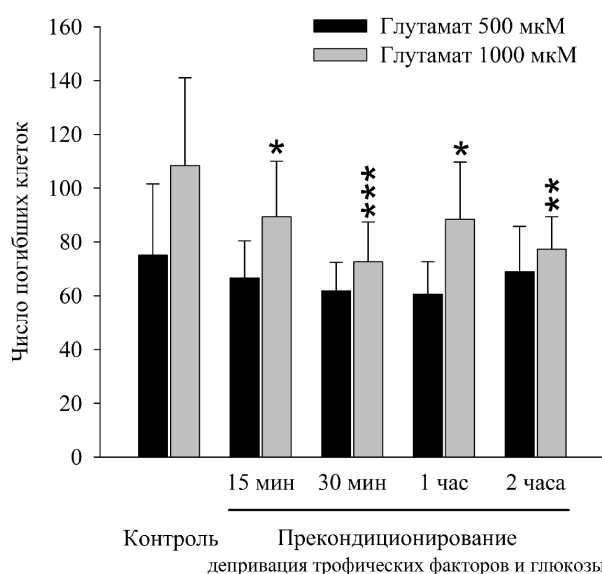


Рисунок 2. Число погибших клеток на первые сутки токсического действия глутамата. Клетки подвергали депривации трофических факторов и глюкозы на разные сроки и возвращали в питательную среду, а через сутки подвергали токсическому воздействию 500 мкМ или 1000 мкМ глутамата. Гибель определяли через сутки по числу клеток, окрашенных пропидиумом иодидом. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по тесту Манна-Уитни в сравнении с соответствующим контролем.

Гибель клеток после воздействия двух доз глутамата на вторые сутки после депривации трофических факторов представлена на рисунке 3. Преко кондиционирование остается эффективным для защиты клеток от действия низкой дозы глутамата; при этом число погибших клеток составляет 61% от контроля при преко кондиционировании продолжительностью 30 мин ($p < 0,001$ по тесту Манна-Уитни) но такой тип преко кондиционирования на вторые сутки после действия высокой дозы глутамата уже неэффективен (рис. 3). В случае совместной депривации трофических факторов и глюкозы эффекты и низкой, и высокой доз глутамата схожи с эффектами этих же доз в преко кондиционировании трофических факторов с глюкозой (ср. рис. 3 и рис. 4). На всех исследованных сроках естественная гибель клеток в культуре (то есть

без воздействия глутамата) составляет менее десяти процентов от гибели клеток после действия глутамата, поэтому естественной гибелью клеток в этих условиях пренебрегали (данные не представлены).

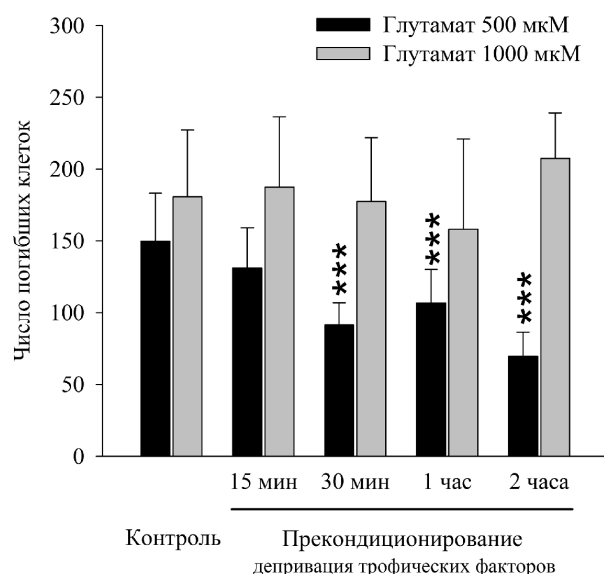


Рисунок 3. Число погибших клеток на вторые сутки токсического действия глутамата. Клетки подвергали депривации трофических факторов на разные сроки и возвращали в питательную среду, а через сутки подвергали токсическому воздействию 500 мкМ или 1000 мкМ глутамата. Гибель определяли через двое суток по числу клеток, окрашенных пропидиумом иодидом. *** - $p < 0,001$ по тесту Манна-Уитни в сравнении с соответствующим контролем.

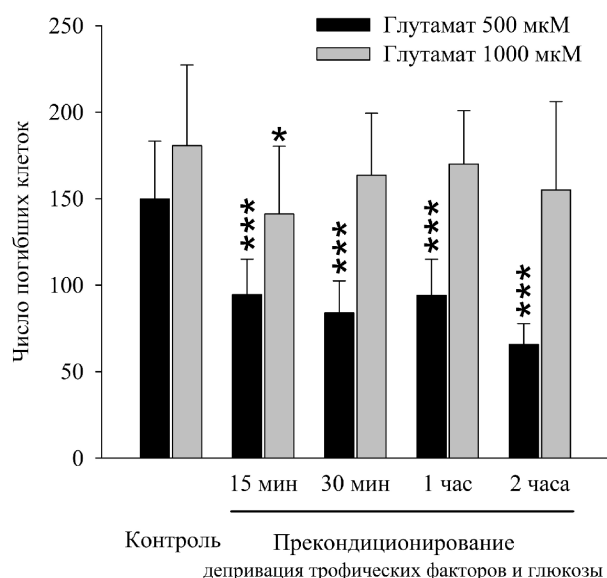


Рисунок 4. Число погибших клеток на вторые сутки токсического действия глутамата. Клетки подвергали депривации трофических факторов и глюкозы на разные сроки и возвращали в питательную среду, а через сутки подвергали токсическому воздействию 500 мкМ или 1000 мкМ глутамата. Гибель определяли через двое суток по числу клеток, окрашенных пропидиумом иодидом. * - $p < 0,05$, *** - $p < 0,001$ по тесту Манна-Уитни в сравнении с соответствующим контролем.

ПРЕКОНДИЦИОНИРОВАНИЕ НЕЙРОНОВ В КУЛЬТУРЕ

Защитное действие депривации трофических факторов против действия низкой дозы глутамата сохранилось и на пятый день (рис. 5). Число погибших клеток составило при продолжительности прекондиционирования 30 мин 67% от контроля при действии низкой дозы глутамата ($p < 0,001$ по тесту Манна-Уитни). Похожая картина получается и при совместной депривации трофических факторов и глюкозы (рис. 6).

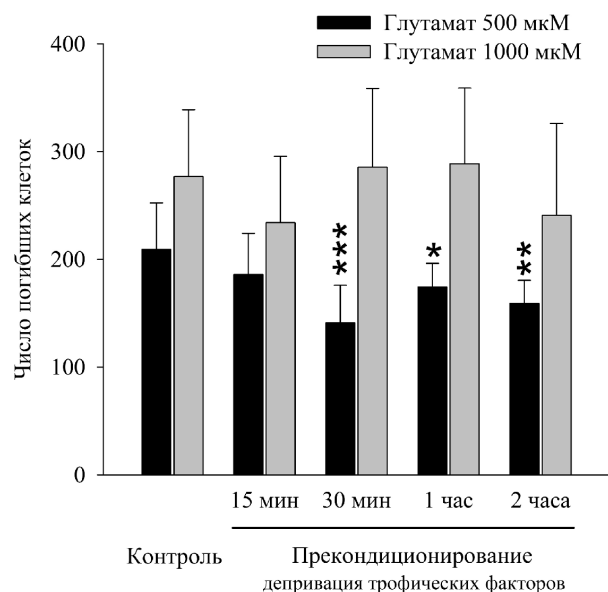


Рисунок 5. Число погибших клеток на пятые сутки токсического действия глутамата. Клетки подвергали депривации трофических факторов на разные сроки и возвращали в питательную среду, а через сутки подвергали токсическому воздействию 500 мкМ или 1000 мкМ глутамата. Гибель определяли через пять суток по числу клеток, окрашенных пропидиумом йодидом. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по тесту Манна-Уитни в сравнении с соответствующим контролем.

Эффект прекондиционирования при помощи депривации трофических факторов или депривации трофических факторов и глюкозы исчезает к восьмым суткам (рис. 7 и рис. 8). При этом гибель клеток от большой дозы глутамата даже несколько превышает гибель в контроле. Таким образом, эффективное время прекондиционирования против любой дозы глутамата составляет от 30 мин до 2 ч. Клетки, прекондиционированные депривацией трофических факторов или депривацией трофических факторов и глюкозы длительностью от 30 мин до 2 ч, сохраняют способность противостоять токсическому действию низкой дозы глутамата в течение восьми дней и могут противостоять токсическому действию высокой дозы глутамата в течение суток.

Рисунок 9 подчёркивает разницу защитного эффекта депривации трофических факторов в течение 30 мин против токсического действия низкой и высокой дозы глутамата. Защитный эффект против высокой дозы выражен только в течение суток после выработки прекондиционирования, он исчезает уже ко вторым суткам, а на восьмые сутки эффект из защитного уже переходит в токсический

(рис. 9). Гораздо эффективнее такая стратегия прекондиционирования работает против низкой дозы глутамата; в этом случае выработанный защитный эффект сохраняется с хорошей степенью выраженности до пятых суток включительно (рис. 9).

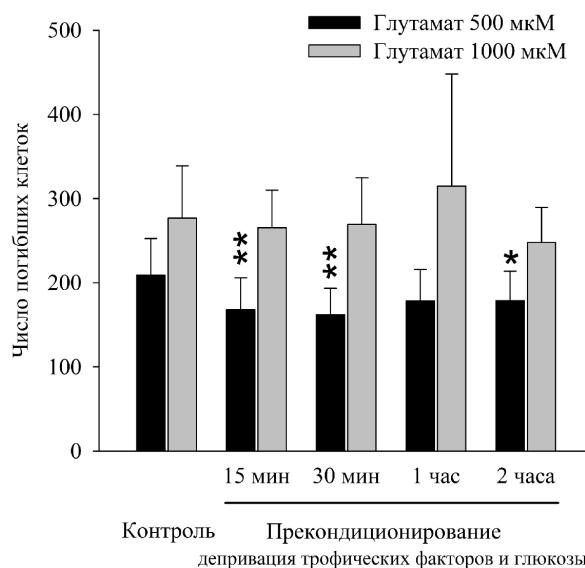


Рисунок 6. Число погибших клеток на пятые сутки токсического действия глутамата. Клетки подвергали депривации трофических факторов и глюкозы на разные сроки и возвращали в питательную среду, а через сутки подвергали токсическому воздействию 500 мкМ или 1000 мкМ глутамата. Гибель определяли через пять суток по числу клеток, окрашенных пропидиумом йодидом. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, по тесту Манна-Уитни в сравнении с соответствующим контролем.

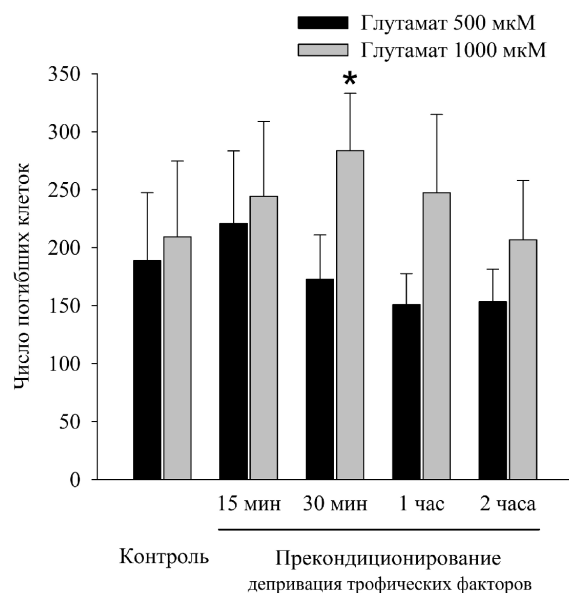


Рисунок 7. Число погибших клеток на восьмые сутки токсического действия глутамата. Клетки подвергали депривации трофических факторов на разные сроки и возвращали в питательную среду, а через сутки подвергали токсическому воздействию 500 мкМ или 1000 мкМ глутамата. Гибель определяли через восемь суток по числу клеток, окрашенных пропидиумом йодидом. * - $p < 0,05$ по тесту Манна-Уитни в сравнении с соответствующим контролем.

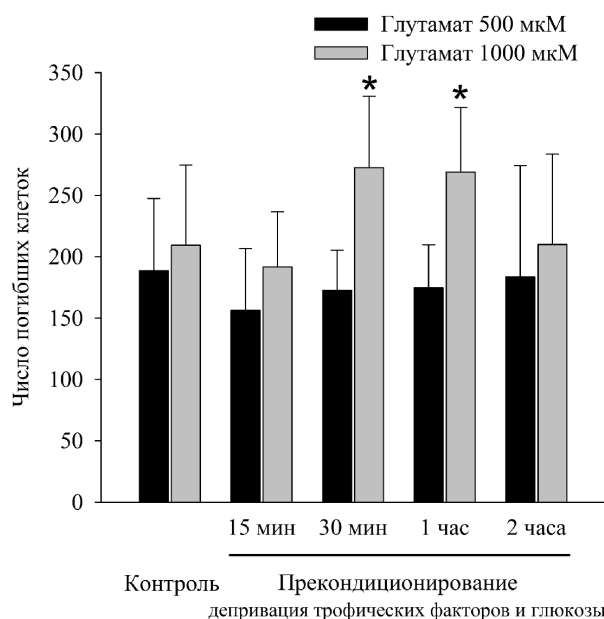


Рисунок 8. Число погибших клеток на восьмые сутки токсического действия глутамата. Клетки подвергали депривации трофических факторов и глюкозы на разные сроки и возвращали в питательную среду, а через сутки подвергали токсическому воздействию 500 мкМ или 1000 мкМ глутамата. Гибель определяли через восемь суток по числу клеток, окрашенных пропидиумом иодидом. * - $p < 0,05$ по тесту Манна-Уитни в сравнении с соответствующим контролем.

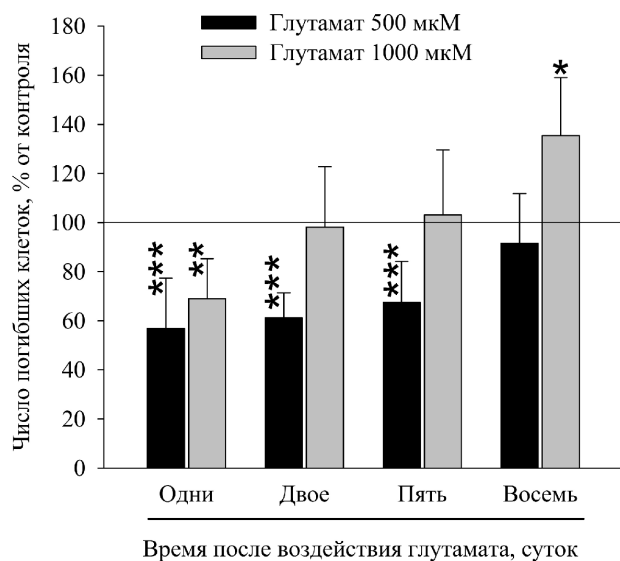


Рисунок 9. Число погибших клеток, в процентах от контроля, на разные сутки токсического действия глутамата. Клетки подвергали депривации трофических факторов на 30 мин, после чего возвращали в питательную среду, а через сутки подвергали токсическому воздействию 500 мкМ или 1000 мкМ глутамата. Гибель определяли на разных сроках после действия глутамата по числу клеток, окрашенных пропидиумом иодидом. * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по тесту Манна-Уитни в сравнении с соответствующим контролем.

Сравнение депривации трофических факторов и депривации трофических факторов и глюкозы представлено на рисунке 10. Эффекты в том и другом

случае очень схожи, и это дает основания предполагать, что для выбранной стратегии preconditionирования депривация глюкозы не является обязательной. Видимо, весь наблюдаемый защитный эффект связан с депривацией трофических факторов, в число которых входят, в первую очередь, аминокислоты и белки сыворотки, хотя не исключено, что защитный эффект может быть частично обусловлен и депривацией других компонентов сыворотки, например, липидов, и витаминов.

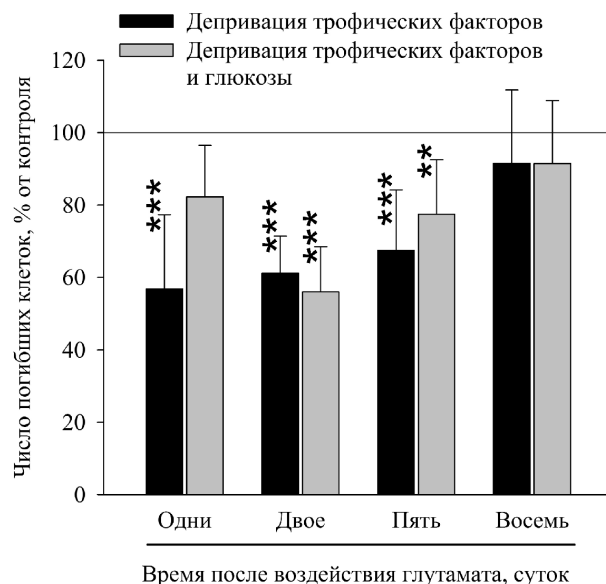


Рисунок 10. Число погибших клеток, в процентах от контроля, на разные сутки токсического действия глутамата. Клетки подвергали депривации трофических факторов или депривации трофических факторов и глюкозы на 30 мин, после чего возвращали в питательную среду, а через сутки подвергали токсическому воздействию 500 мкМ глутамата. Гибель определяли на разных сроках после действия глутамата по числу клеток, окрашенных пропидиумом иодидом. ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ по тесту Манна-Уитни в сравнении с соответствующим контролем.

Таким образом, в нашей модели депривация глюкозы сама по себе не приводит к выработке защитного эффекта против токсического действия глутамата. Однако, в некоторых экспериментальных ситуациях, наоборот, при совместной депривации аминокислот и глюкозы показана важность депривации именно глюкозы для выработки последующего защитного эффекта [4]. Скорее всего, противоречие в полученных результатах связано с разницей в использованных моделях. В первую очередь, к различию результатов могла привести разница в условиях культивации клеток. Мы использовали богатую среду на основе MEM с добавлением сыворотки, тогда как Gaspar с соавт. использовали сильно обедненную нейробазальную среду [4]. В связи с этим все время жизни *in vitro* нейроны в нейробазальной среде испытывали нехватку определенных веществ и некоторым образом уже были preconditionированы к неблагоприятным условиям. Косвенно это подтверждается и тем, что для preconditionирования в условиях обеднённой

среды нейронам требуется от трёх до девяти часов [4], тогда как в наших условиях обогащённой среды всего лишь от 30 мин до двух часов.

Сравнивая результаты этих экспериментов можно сказать, что нейроны, живущие в обеднённой среде, самым фактом выживания в таких условиях уже прекоиндированы к неблагоприятным воздействиям и для выработки дополнительной устойчивости им требуется гораздо более сильное воздействие, чем нейронам, живущим в обогащённой среде. С этой точки зрения, исследование, проведенное на нейронах в обогащённой среде, как в нашем случае, даёт более адекватное представление об устойчивости нейронов к неблагоприятным условиям и способно смоделировать депривацию трофических факторов более чисто.

Кроме того, очень важно, что сама нейробазальная среда может быть токсична для нейронов, тогда как среда MEM не обладает токсическими свойствами [5]. Токсичность нейробазальной среды опосредована, скорее всего, тем же NMDA-зависимым механизмом, как и при гибели клеток в результате действия глутамата [5]. Мы полагаем, что в нейробазальной среде выживают самые приспособленные и самые устойчивые нейроны, уже запустившие программу адаптации к повреждающим воздействиям. На этом фоне только депривация глюкозы способна вызывать увеличение устойчивости таких клеток к гибели [4]. В наших экспериментах влияние глюкозы самой по себе не очень заметно (рис. 10). Это можно объяснить тем, что нейроны, выросшие на обогащённой среде, существенно сильнее зависят от наличия в среде других факторов (аминокислот, пептидов и белков), чем от глюкозы. Эти предварительные выводы вполне логичны, хотя ещё нуждаются в подкреплении результатами последующих экспериментов.

В экспериментах по депривации мы также изучали возможную роль нескольких внеклеточных протеаз. Известно, что протеазы, а именно каспаза-3, вовлечены в прекоиндирование нейронов к различным повреждающим воздействиям [6]. Однако, механизмы вовлечения протеаз в выработку прекоиндирования до сих пор неизвестны. Одним из потенциальных механизмов участия протеаз в прекоиндировании может быть активация каспазой-3 антиапоптогической киназы Akt. Так, для некоторых тканей организма показано, что каспаза-3 активирует антиапоптогическую киназу Akt [7, 8]. С белком RasGAP также связан один из сценариев выживания клеток после активации каспазы-3 [9]. Выявлены и несколько других белков-субстратов каспазы-3 в неапоптогических ситуациях, но физиологическое значение расщепления каспазой-3 этих белков остаётся неизвестным.

Роль других протеаз в прекоиндировании остается еще менее изученной. Хотя протеасомная и лизосомальная протеолитические системы, вовлечённые в прекоиндирование, связаны с протеазами, данных о конкретном спектре протеолитических ферментов, связанных

с прекоиндированием, пока нет. Выяснение конкретных протеаз, вовлечённых в прекоиндирование, может многое дать как физиологии, так и медицине.

Мы провели эксперименты по определению активности протеаз в прекоиндированных нейронах. Оказалось, что на выбранных временах прекоиндирования активность каспазы-3, катепсина В и калпаина не отличается от контрольной (данные не представлены). Однако, во внеклеточной жидкости происходит накопление катепсина В, но не каспазы-3 и калпаина (рис. 11). Лизосомальный катепсин В секретируется клетками во внеклеточную среду пропорционально времени депривации. Мы проверили, насколько секреция затрагивает другие лизосомальные ферменты. Для этого мы определяли активность гексозаминидазы в этих же образцах (рис. 12). Стоит ещё раз отметить, что на исследованных нами интервалах времени гибели клеток не происходит; по крайней мере, гибель клеток нам не удалось детектировать с помощью пропидиум йодида. Именно поэтому мы делаем вывод, что появление ферментов во внеклеточной жидкости не связано с клеточной гибелью, а, скорее связано с секрецией.

Активности внеклеточных катепсина В и гексозаминидазы коррелируют между собой с высокой степенью достоверности ($R=0,70$, $p<0,0001$ по тесту Спирмена). Данные, представленные на рисунках 11 и 12 позволяют сделать вывод, что при депривации трофических факторов и депривации трофических факторов и глюкозы происходит секреция лизосомальных ферментов. Насколько этот феномен важен для реализации именно прекоиндирования, а также насколько он специфичен для депривации, ещё предстоит выяснить.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В работе мы выяснили, что депривация трофических факторов запускает процесс устойчивости нейронов к последующему повреждению, причем период устойчивости может продолжаться до восьми суток после воздействия. Таким образом, мы продемонстрировали возможность выработки длительной устойчивости нейронов к экзайтотоксичности, и, более того, обнаружили феномен секреции лизосомальных ферментов при выработке такой устойчивости.

Мы считаем, что обнаруженная нами секреция лизосомальных ферментов является частью более общего механизма реакции клетки на стресс и предполагаем, что таким механизмом является экзоцитоз лизосом [10]. В неблагоприятных для клетки условиях одним и тем же транскрипционным фактором TFEB запускается внутриклеточная аутофагия и секреция лизосом [11]. В процессе экзоцитоза лизосомы могут сливаться с плазматической мембраной и высвобождать содержимое во внеклеточное пространство. Процесс является Ca^{2+} -зависимым и происходит

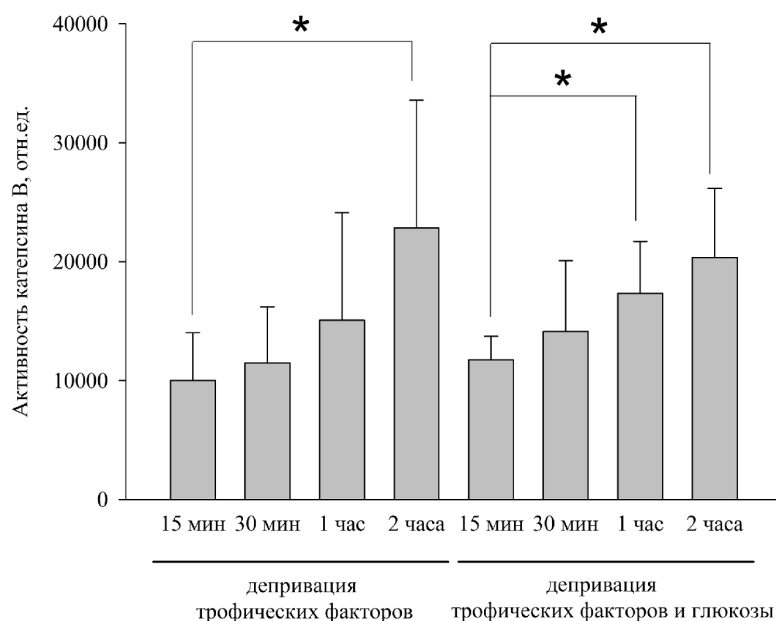


Рисунок 11. Активность катепсина В в экстраклеточной жидкости от нейрональных культур после preconditionирования. Нейроны подвергали депривации трофических факторов или депривации трофических факторов и глюкозы на разные сроки, после чего возвращали в питательную среду, а экстраклеточную жидкость собирали и определяли в ней активность ферментов. * - $p < 0,05$ по тесту Манна-Уитни в сравнении с соответствующим контролем.

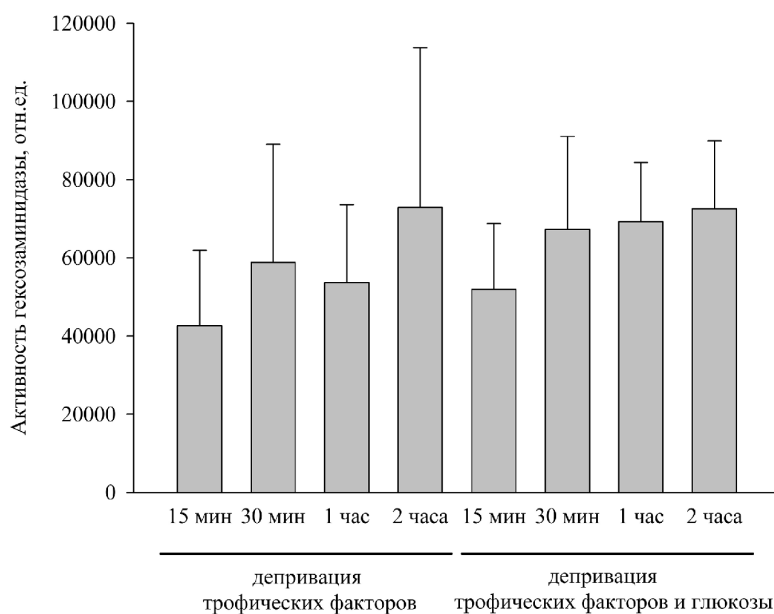


Рисунок 12. Активность гексозаминидазы в экстраклеточной жидкости от нейрональных культур после preconditionирования. Нейроны подвергали депривации трофических факторов или депривации трофических факторов и глюкозы на разные сроки, после чего возвращали в питательную среду, а экстраклеточную жидкость собирали и определяли в ней активность ферментов.

в несекреторных клетках, при этом лизосомы являются единственным компартментом, подвергающимся экзоцитозу [12, 13]. Известно, что экзоцитоз лизосом способствует восстановлению плазматической мембраны клеток [14], освобождает клетку от накопившихся токсических продуктов [11], регулирует секрецию β -амилоида [15], принимает участие в миграции клеток [16], регулирует миелинизацию аксонов [17]. Таким образом, экзоцитоз лизосом запускается синхронно с аутофагией и принимает участие в важных

для функционирования клетки процессах. С учётом того, что и аутофагия запускается при ишемическом preconditionировании [18], с высокой долей уверенности можно предположить, что и экзоцитоз лизосом также происходит при индукции preconditionирования. Функциональную значимость экзоцитоза лизосом ещё предстоит выяснить в последующих экспериментах.

Выполнено при финансовой поддержке РФФИ, грант № 14-04-01858.

ЛИТЕРАТУРА

1. Xu J., Kurup P., Zhang Y., Goebel-Goody S.M., Wu P.H., Hawasli A.H. et al. (2009) J. Neurosci., **29**, 9330-9343.
2. Obrenovitch T.P. (2008) Physiol. Rev., **88**, 211-247.
3. Andreeva N., Khodorov B., Stelmashook E., Cragoe E., Victorov I. (1991) Brain Res., **548**, 322-325.
4. Gaspar T., Kis B., Snipes J.A., Lenzser G., Mayanagi K., Bari F. et al. (2006) J. Neurochem., **98**, 555-565.
5. Hogins J., Crawford D.C., Zorumski C.F., Mennerick S. (2011) Plos One, **6**, e25633.
6. McLaughlin B., Hartnett K., Erhardt J., Legos J., White R., Barone F. et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **100**, 715-720.
7. Khalil H., Peltzer N., Walicki J., Yang J.-Y., Dubuis G., Gardiol N. et al. (2012) Mol. Cell. Biol., **32**, 4523-4533.
8. Khalil H.M., Bertrand M.J., Vandenabeele P., Widmann C. (2014) Trends Cell Biol., **24**, 83-89.
9. Yang J.Y., Michod D., Walicki J., Murphy B.A., Kasibhatla S., Martin S.J. et al. (2004) Mol. Cell. Biol., **24**, 10425-10436.
10. Яковлева А.А., Гуляева Н.В. (2015) Биохимия, **80**, 204-213.
11. Medina D.L., Fraldi A., Bouche V., Annunziata F., Mansueto G., Spanpanato C. et al. (2011) Dev. Cell, **21**, 421-430.
12. Jaiswal J.K., Andrews N.W., Simon S.M. (2002) J. Cell Biol., **159**, 625-635.
13. Li D., Ropert N., Koulakoff A., Giaume C., Oheim M. (2008) J. Neurosci., **28**, 7648-7658.
14. Reddy A., Caler E.V., Andrews N.W. (2001) Cell, **106**, 157-169.
15. Annunziata I., Patterson A., Helton D., Hu H., Moshiaich S., Gomero E. et al. (2013) Nature Comm., **4**, e2734.
16. Dou Y., Wu H.-J., Li H.-Q., Qin S., Wang Y.-E., Li J. et al. (2012) Cell Res., **22**, 1022-1033.
17. Chen G., Zhang Z., Wei Z., Cheng Q., Li X., Li W. et al. (2012) Glia, **60**, 295-305.
18. Papadakis M., Hadley G., Xilouri M., Hoyte L.C., Nagel S., McMenamin M.M. et al. (2013) Nature Med., **19**, 351-357.

Поступила: 18. 04. 2016.
Принята к печати: 13. 09. 2016.

TROPHIC FACTORS DEPRIVATION INDUCES LONG-TERM PROTECTION OF NEURONS AGAINST EXCITOTOXIC DAMAGE

A.A. Yakovlev^{1,2}, A.A. Lyzhin³, O.P. Aleksandrova³, L.G. Khaspekov³, N.V. Gulyaeva^{1,2}

¹Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences,
5A Butlerova str., Moscow, 117485 Russia; e-mail: al_yakovlev@rambler.ru

²Moscow Research & Clinical Center for Neuropsychiatry, 43 Donskaya str., Moscow, 115419 Russia

³Brain Research Center at Research Center of Neurology, 5 Obukha lane, Moscow, 105064 Russia

One of the strategies to induce tolerance of neurons to toxic injury is preconditioning. Preconditioning is caused by a weak damage of cells, which become more resistant to subsequent, more severe damage. We found that preconditioning by deprivation of trophic factors, or deprivation of trophic factor and glucose effectively protects neurons against subsequent toxic effects of glutamate. Deprivation of trophic factors plays a decisive role in the development of resistance, regardless of whether it has been combined with glucose deprivation or not. Neuronal protection is achieved when the deprivation lasts from 30 min to two hours and is kept for a period of from one to five days. Preconditioning is accompanied neuronal secretion of cathepsin B occurs. We suggest that this phenomenon is associated with a more general process of exocytosis of lysosomes triggered by deprivation of trophic factors.

Key words: preconditioning, neurons, deprivation, proteases