

Агонист сигма1-рецепторов усиливает длительную депрессию, вызванную активацией метаботропных глутаматных рецепторов в нейронах гиппокампа крысы

П.Д. Рогозин, Е.И. Солнцева, В.Г. Скребицкий

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Введение. Метаботропные глутаматные рецепторы группы 1 (mGluR1/5) являются важным компонентом тормозной системы гиппокампа. Нарушение их работы приводит к проявлению различных форм патологии нервной системы. Поиск эффективных способов регуляции работы mGluR1/5 является актуальной проблемой нейрофармакологии. В настоящей работе впервые была изучена возможность модуляции mGluR1/5 с помощью активации сигма1-рецепторов (Sig1-R) – белков-шаперонов, способных прямо взаимодействовать с другими белками и усиливать их активность.

Цель исследования: изучить воздействие специфического агониста Sig1-R – PRE-084 на эффект длительной депрессии глутаматных входов в гиппокампе, вызванный активацией mGluR1/5.

Материалы и методы. На срезах гиппокампа мозга крысы в области CA1 регистрировали популяционные спайки, вызванные стимуляцией коллатералей Шаффера. Активацию mGluR1/5 вызывали аппликацией 50 мкМ специфического агониста этих рецепторов дигидроксифенилглицина (DHPG) в течение 10 мин. Активацию Sig1-R вызывали аппликацией 10 мкМ специфического агониста PRE-084 в течение 20 мин.

Результаты. Кратковременная инкубация среза гиппокампа крысы в растворе, содержащем DHPG, вызывала длительную депрессию популяционных спайков, так что через 30 мин после отмывания среза от препарата его амплитуда составляла $60,0 \pm 14,4\%$ от контрольной величины ($n=5$). PRE-084 усиливал тормозное последствие DHPG, и амплитуда популяционных спайков через 30 мин после устранения препаратов из окружающего среза раствора составляла $16,0 \pm 1,7\%$ ($p < 0,05$).

Заключение. Впервые показано, что активация Sig1-R усиливает функциональную активность mGluR1/5.

Ключевые слова: метаботропные глутаматные рецепторы, сигма1-рецепторы, дигидроксифенилглицин, PRE-084, гиппокамп.

Адрес для корреспонденции: 105064, Россия, Москва, пер. Обуха, д. 5. ФГБНУ НЦН. E-mail: synaptology@mail.ru. Солнцева Е.И.

Для цитирования: Рогозин П.Д., Солнцева Е.И., Скребицкий В.Г. Агонист сигма1-рецепторов усиливает длительную депрессию, вызванную активацией метаботропных глутаматных рецепторов в нейронах гиппокампа крысы. *Анналы клинической и экспериментальной неврологии* 2018; 12(4): 57–61.

DOI: 10.25692/ACEN.2018.4.8

The sigma1 receptor agonist enhances long-term depression caused by activation of metabotropic glutamate receptors in rat hippocampal neurons

Pavel D. Rogozin, Elena I. Solntseva, Vladimir G. Skrebitsky

Research Center of Neurology, Moscow, Russia

Introduction. Metabotropic glutamate receptors of group 1 (mGluR1/5) are an important component of the hippocampal inhibitory system. Disturbances of their work lead to manifestation of various pathologies of the nervous system. The search for effective ways of regulating the work of mGluR1/5 is an urgent problem of neuropharmacology. In the present study, we assessed for the first time the possibility of modulating mGluR1/5 by activation of sigma1 receptors (Sig1-R), chaperone proteins capable of directly to directly interact with other proteins and to enhance their activity.

Objective. To study the effect of a specific Sig1-R agonist, PRE-084, on long-term depression of glutamate inputs in the hippocampus caused by activation of mGluR1/5.

Materials and methods. On slices of the hippocampus of rat brain in the CA1 region, population spikes (PS) caused by stimulation of Shaffer collaterals were registered. Activation of mGluR1/5 was induced by the application of 50 μ M of specific agonist of these receptors, dihydroxyphenylglycine (DHPG), for 10 min. Activation of Sig1-R was induced by the application of 10 μ M of specific agonist PRE-084 for 20 min.

Results. A short-term incubation of a rat hippocampal slice in a solution containing DHPG, caused a long-term depression of PS, so that within 30 min after the slice was washed away from the preparation, its amplitude was $60.0 \pm 14.4\%$ of the control value ($n=5$). In the second series of experiments DHPG was applied against the background of the agonist Sig1-R PRE-084. PRE-084 was found to cause an increase in the inhibitory aftereffect of DHPG, so that the amplitude of the PS measured after 30 min after removal of the preparations from the surrounding solution was $16.0 \pm 1.7\%$ ($p < 0.05$).

Conclusion. It was shown for the first time that activation of Sig1-R enhances the functional activity of mGluR1/5.

Keywords: metabotropic glutamate receptors; sigma 1 receptors; DHPG; PRE-084; hippocampus.

For correspondence: 105064, Russia, Moscow, per. Obukha, 5. Research Center of Neurology. E-mail: synaptology@mail.ru. Solntseva E.I.

For citation: Rogozin P.D., Solntseva E.I., Skrebitsky V.G. [The sigma1 receptor agonist enhances long-term depression caused by activation of metabotropic glutamate receptors in rat hippocampal neurons]. *Annals of clinical and experimental neurology* 2018; 12(4): 57–61. (In Russ.)

DOI: 10.25692/ACEN.2018.4.8

Гиппокамп является важной структурой мозга, которая играет центральную роль в механизмах начальной стадии запоминания, т.е. в формировании так называемой «рабочей памяти» [1]. В этих процессах наряду с возбуждающими ионотропными глутаматными рецепторами (AMPA и NMDAR) важную роль играют metabotropic глутаматные рецепторы первой группы (mGluR1/5), которые объединяют mGluR 1-го и 5-го типов [2, 3]. Считается, что mGluR1/5 участвуют в поддержании нормальных когнитивных функций и механизмов пластичности на протяжении всей жизни – в отличие от NMDAR, которые с возрастом эффективность утрачивают [4]. Нарушение работы генов, ответственных за экспрессию белков mGluR1/5, приводит к ухудшению обучения и памяти [5] и считается одним из механизмов нарушения когнитивных функций при таких заболеваниях, как синдром ломкой X-хромосомы и болезнь Альцгеймера [4]. Механизмы биохимических изменений в работе нейронов гиппокампа, вызванных активацией mGluR1/5, до конца не изучены. В экспериментах на животных показано, что активация mGluR1/5 с помощью селективного агониста 3,5-дигидроксифенилглицина (DHPG) [6] приводит к длительной депрессии возбуждающих глутаматных входов (DHPG-LTD) [7]. Эту депрессию объясняют как снижением количества AMPA-рецепторов в постсинаптической мембране [7], так и изменением их «качества» с заменой субъединицы GluA1 на субъединицу GluA2 и соответствующим снижением проводимости AMPA-канала [8]. Этим изменениям в активности AMPAR предшествует длинная цепочка событий, которая включает производство инозитолтрифосфата (IP₃), активацию IP₃-рецепторов мембраны эндоплазматического ретикула (ЭПР) с выбросом Ca²⁺ в цитоплазму. Повышение уровня Ca²⁺ в цитоплазме и соответствующее снижение уровня Ca²⁺ внутри ЭПР приводит к активации различных Ca²⁺-зависимых белков, работа которых и обеспечивает снижение AMPA-ответа [9, 10].

Поиск эффективных способов регуляции работы mGluR1/5 является актуальной проблемой нейрофармакологии. В настоящей работе впервые предпринята попытка модуляции mGluR1/5-ответов с помощью активации sigma1-рецепторов (Sig1-R). Предпосылкой для такой постановки вопроса послужили данные литературы, свидетельствующие о колокализации IP₃R и Sig1-R на мембране ЭПР и усилении IP₃R-индуцированного кальциевого сигнала при активации Sig1-R [11]. Рецепторы класса Sig1-R привлекают сегодня большое внимание исследователей в связи с их способностью регулировать разнообразные клеточные функции, а также их участием в патогенезе болезни Альцгеймера, депрессивного психоза, шизофрении и др. [12].

Цель исследования: изучить воздействие специфического агониста Sig1-R – PRE-084 на эффект длительной депрессии глутаматных входов в гиппокампе, вызванный активацией mGluR1/5.

Материалы и методы

Работа выполнена на срезах гиппокампа крыс-самцов Вистар в возрасте 4–6 нед. Срезы толщиной 400 мкм до использования в опыте выдерживали не менее 2 ч в растворе, насыщаемом смесью 95% O₂ + 5% CO₂, при 27–29°C. Ионный состав раствора был следующим (в мМ): 124 NaCl, 3 KCl, 2,5 CaCl₂, 1,25 Na₂HPO₄, 2,5 MgSO₄, 26 NaHCO₃ и 10 D-глюкозы, pH 7,4. После этого срез помещали в рабочую камеру, в которой этот раствор протекал со скоростью 1,5 мл/мин.

Использовали стандартную установку для регистрации биопотенциалов. Внеклеточную регистрацию потенциалов производили от пирамидального слоя области CA1 гиппокампа. В этом слое можно было регистрировать суммарный спайковый ответ популяции пирамидных нейронов (популяционный спайк – ПС). Регистрирующий электрод представлял собой стеклянную микропипетку, заполненную 1,5 М NaCl и имеющую сопротивление 2–5 МОм. Чтобы вызвать ПС в пирамидальном слое, стимулировали коллатерали Шаффера в радиальном слое CA1 одиночными прямоугольными импульсами (0,066 Гц, 0,1 мс) с помощью биполярных стеклянных электродов, заполненных перфузатом. Силу стимула подбирали так, чтобы амплитуда ПС составляла примерно половину его максимальной величины.

Препараты (S)-3,5-дигидроксифенилглицин (DHPG) и PRE-084 («Sigma», США) растворяли в перфузате и апплицировали на срез с помощью переключения системы потока на соответствующий резервуар.

Статистический анализ результатов проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни и теста one-way ANOVA (пакет прикладных программ «Statistica 12»). Полученные результаты представлены в виде средней величины и ошибки средней ($M \pm m$).

Результаты

Аппликация в течение 10 мин агониста mGluR1/5 DHPG (1–50 мкМ) на срезы гиппокампа крысы вызывала быстрое и дозозависимое уменьшение амплитуды ПС. Эти результаты соответствуют данным литературы [1, 6, 13]. При концентрации DHPG ≥ 10 мкМ ПС после отмывания препарата полностью не восстанавливался и оставался сниженным на протяжении всего эксперимента (≥ 30 мин) (DHPG-LTD).

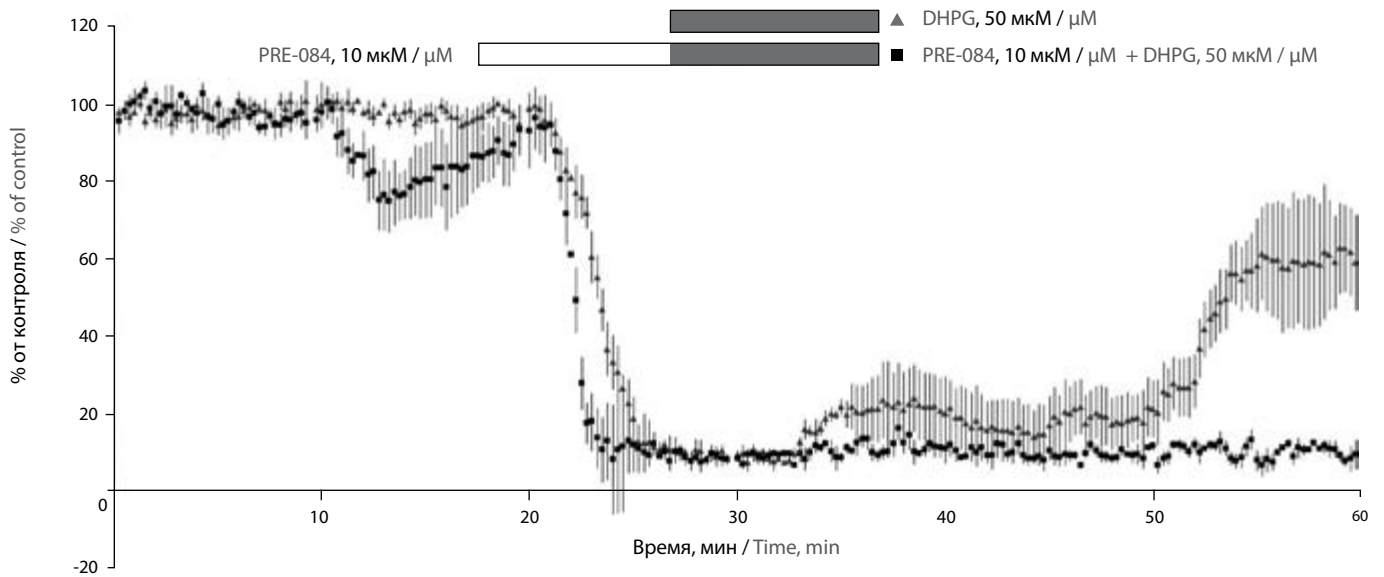


Рис. 1. Изменение усредненной амплитуды ПС при аппликации 50 мкМ DHPG ($n=5$) и 10 мкМ PRE-084 + 50 мкМ DHPG ($n=5$)
Fig. 1. Change in the average amplitude of PS during the application of 50 μ M DHPG ($n=5$) and 10 μ M PRE-084 + 50 μ M DHPG ($n=5$)

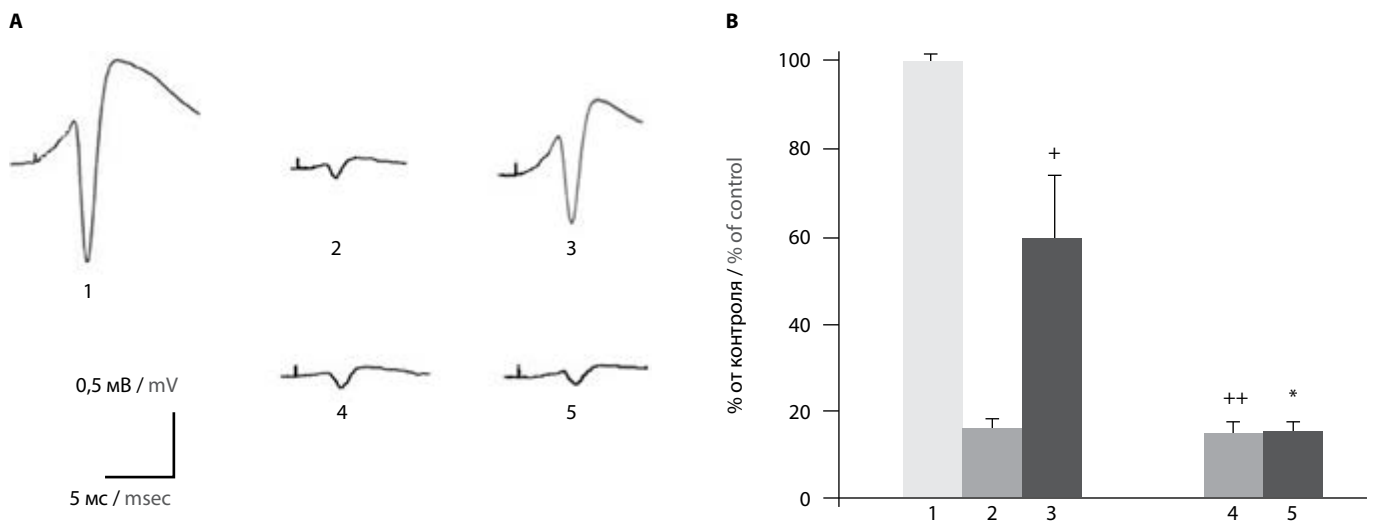


Рис. 2. Запись ПС в различных экспериментальных условиях (А) и средние значения амплитуды ПС (В).
1 – контроль; 2 – DHPG; 3 – 30 мин после удаления DHPG; 4 – PRE-084 + DHPG; 5 – 30 мин после удаления PRE-084+DHPG.
+ $p < 0,01$, ++ $p < 0,001$ по сравнению с контролем; * $p < 0,05$ по сравнению с 3

Fig. 2. PS registration in different experimental conditions (A) and mean values of the amplitude of the PS (B).
1, control; 2, DHPG; 3, 30 min after removal of DHPG; 4, PRE-084 + DHPG; 5, 30 min after removal of PRE-084 + DHPG.
+ $p < 0,01$, ++ $p < 0,001$ vs. control; * $p < 0,05$ vs. 3

В течение первых 5 мин присутствия 50 мкМ DHPG в растворе амплитуда ПС падала до $16,2 \pm 2,2\%$ от контрольной величины ($p < 0,001$) и не менялась в следующие 5 мин (рис. 1). Через 30 мин после прекращения действия DHPG амплитуда ПС составляла $60,0 \pm 14,4\%$ от контроля ($p < 0,01$; рис. 2).

PRE-084 апплицировали на срез гиппокампа в концентрации 10 мкМ в течение 20 мин ($n=5$). Установлено, что ни во время аппликации PRE-084, ни в течение последующих 30 мин отмывания среза от препарата амплитуда ПС достоверно не изменялась.

При добавлении после 10 мин аппликации 10 мкМ PRE-084 50 мкМ DHPG на 10 мин амплитуда ПС упала до $15,4 \pm 2,1\%$ от контрольной величины (рис. 1, 2). Через 30 мин отмывания среза амплитуда ПС составляла $16,0 \pm 1,7\%$ от контроля.

Обсуждение

Длительная депрессия возбуждающих глутаматергических входов, индуцированная активацией mGluR1/5 (mGluR-LTD), является формой синаптической пластичности, не зависимой от NMDA-рецепторов [7]. Считается, что mGluR-LTD участвует в поддержании нормальных когни-

тивных функций [4], и нарушение работы mGluR1/5 приводит к появлению различных патологий ЦНС [4]. Изучению механизмов mGluR-LTD посвящено большое количество работ. Обсуждаются два механизма mGluR-LTD: снижение количества AMPAR в постсинаптической мембране [7] и изменение «качества» этих рецепторов с заменой субъединицы GluA1 на субъединицу GluA2 и соответствующим снижением проводимости AMPA-канала [8].

Одним из популярных объяснений mGluR-LTD считается следующий биохимический каскад. mGluR через G-белок активирует фосфолипазу C с последующей продукцией двух вторичных посредников: диацилглицерола и инозитолтрифосфата (IP_3). Диацилглицерол посредством взаимодействия с различными протеинкиназами [14, 15] активирует транскрипционный фактор CREB [16], что приводит к экспрессии ранних генов и процессу трансляции [17]. До сих пор не изучено, какие именно белки синтезируются. Предполагается, что в эту группу входит GluA2 и некоторые другие белки, участвующие в транспорте AMPAR. Другой вторичный посредник, IP_3 , активирует IP_3 -рецепторы на ЭПР и стимулирует выброс ионов Ca^{2+} в цитоплазму с последующей активацией Ca^{2+} -зависимых белков, в частности CaMKII и PICK1, которые способствуют выводу GluA2-содержащих AMPAR из ЭПР [9, 10]. В активации Ca^{2+} -зависимых белков участвуют также ионы Ca^{2+} , которые входят в клетку по депо-управляемым Ca^{2+} -каналам. Эти каналы активируются в ответ на понижение уровня Ca^{2+} в ЭПР, вызванное активацией IP_3 -рецепторов [18].

Список литературы/References

1. Frankland P.W., Bontempi B. The organization of recent and remote memories. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 119–130. DOI: 10.1038/nrn1607. PMID: 15685217.
2. Huber K.M., Roder J.C., Bear M.F. Chemical induction of mGluR5-and protein synthesis-dependent long-term depression in hippocampal area CA1. *J Neurophysiol* 2001; 86: 321–325. PMID: 11431513.
3. Nicoletti F., Bockaert J., Collingridge G. L. et al. Metabotropic glutamate receptors: from the workbench to the bedside. *Neuropharmacology*. 2011; 60: 1017–1041. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2010.10.022. PMID: 21036182.
4. Menard C., Quirion R. Group I metabotropic glutamate receptor function and its regulation of learning and memory in the aging brain. *Front Pharmacol* 2012; 3: 182. DOI: 10.3389/fphar.2012.00182. PMID: 23091460.
5. Jia Z., Lu Y.M., Agopyan N., Roder J. Gene targeting reveals a role for the glutamate receptors mGluR5 and GluR2 in learning and memory. *Physiol Behav* 2001; 73: 793–802. PMID: 11566212.
6. Palmer M.J., Irving A.J., Seabrook G.R. et al. The group I mGlu receptor agonist DHPG induces a novel form of LTD in the CA1 region of the hippocampus. *Neuropharmacology* 1997; 36: 1517–1532. PMID: 9517422.
7. Lüscher C., Huber K.M. Group I mGluR-dependent synaptic long-term depression (mGluR-LTD): mechanisms and implications for circuitry & disease. *Neuron* 2010; 65: 445–459. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.01.016. PMID: 20188650.
8. Mamelì M., Balland B., Luján R., Lüscher C. Rapid synthesis and synaptic insertion of GluR2 for mGluR-LTD in the ventral tegmental area. *Science* 2007; 317: 530–533. DOI: 10.1126/science.1142365. PMID: 17656725.
9. Pick J.E., Ziff E.B. Regulation of AMPA receptor trafficking and exit from the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Neurosci* 2018; 91: 3–9. DOI: 10.1016/j.mcn.2018.03.004. PMID: 29545119.
10. Lu W., Khatri L., Ziff E.B. Trafficking of α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor (AMPA) receptor subunit GluA2 from the endoplasmic reticulum is stimulated by a complex containing Ca^{2+} /calmodulin-activated kinase II (CaMKII) and PICK1 protein and by release of Ca^{2+} from internal stores. *J Biol Chem* 2014; 289: 19 218–19 230. DOI: 10.1074/jbc.M113.511246. PMID: 24831007.
11. Hayashi T., Su T.P. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca^{2+} signaling and cell survival. *Cell* 2007; 131: 596–610. DOI: 10.1016/j.cell.2007.08.036. PMID: 17981125.

Настоящая работа посвящена изучению влияния активации сигма-1-рецепторов (Sig1-R) на параметры mGluR-LTD. Sig1-R привлекают сегодня большое внимание исследователей. Эти белки являются шаперонами, способными взаимодействовать с другими белками и регулировать разнообразные клеточные функции [19, 20]. Предполагается, что Sig1-R вовлечены в патогенез ряда нервно-психических заболеваний [12, 21]. Нами показано, что длительная депрессия ПС нейронов гиппокампа крысы, активированная DHPG (агонист mGluR1/5), усиливается под действием PRE-084 – агониста Sig1-R. Механизмы этого эффекта сегодня не ясны, и их раскрытие требует специальных исследований. Ввиду сложности биохимического каскада, запускаемого активацией mGluR, существует множество потенциальных мишеней для Sig1-R. При этом один из участников mGluR-каскада, для которого показано взаимодействие с Sig1-R, четко установлен – это IP_3 -рецепторы, которые локализованы с Sig1-Rs на мембране ЭПР, кальциевый выброс через IP_3 -рецепторы усиливается при активации Sig1-R [11]. На наш взгляд, именно этим механизмом можно объяснить обнаруженный нами эффект усиления DHPG-LTD под воздействием PRE-084. Однако для окончательного ответа на этот вопрос требуются дополнительные эксперименты с применением агонистов и антагонистов IP_3 -рецепторов.

**Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare there is no conflict of interest.**

12. Niitsu T., Iyo M., Hashimoto K. Sigma-1 receptor agonists as therapeutic drugs for cognitive impairment in neuropsychiatric diseases. *Curr Pharm Des* 2012; 18: 875–883. PMID: 22288409.
13. Zho W.M., You J.L., Huang C.C., Hsu K.S. The group I metabotropic glutamate receptor agonist (S)-3,5-Dihydroxyphenylglycine induces a novel form of depotentiation in the CA1 region of the hippocampus. *J Neurosci* 2002; 22: 8838–8849. PMID: 12388590.
14. Sun M.K., Alkon D.L. Pharmacology of protein kinase C activators: cognition-enhancing and antidepressant therapeutics. *Pharmacol Ther* 2010; 127: 66–77. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2010.03.001. PMID: 20382181.
15. Shepherd J.D., Bear M.F. New views of Arc, a master regulator of synaptic plasticity. *Nat Neurosci* 2011; 14: 279–284. DOI: 10.1038/nn.2708. PMID: 21278731.
16. Monti B., Berteotti C., Contestabile A. Dysregulation of memory-related proteins in the hippocampus of aged rats and their relation with cognitive impairment. *Hippocampus* 2005; 15: 1041–1049. DOI: 10.1002/hipo.20099. PMID: 16086428.
17. Yang L., Mao L., Tang Q. et al. A novel Ca^{2+} -independent signaling pathway to extracellular signal-regulated protein kinase by coactivation of NMDA receptors and metabotropic glutamate receptor 5 in neurons. *J Neurosci* 2004; 24: 10 846–10 857. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2496-04.2004. PMID: 15574735.
18. Zhang H., Sun S., Wu L. et al. Store-operated calcium channel complex in postsynaptic spines: a new therapeutic target for Alzheimer's disease treatment. *J Neurosci* 2016; 36: 11 837–11 850. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1188-16.2016. PMID: 27881772.
19. Kim F.J. Introduction to sigma proteins: evolution of the concept of sigma receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2017; 244: 1–11. DOI: 10.1007/164_2017_41. PMID: 28871306.
20. Solntseva E.I., Kapai N.A., Popova O.V., et al. The involvement of sigma1 receptors in donepezil-induced rescue of hippocampal LTD impaired by beta-amyloid peptide. *Brain Res Bull* 2014; 106: 56–61. DOI: 10.1016/j.brainresbull.2014.06.002. PMID: 24956443.
21. Penke B., Fulop L., Szucs M., Frecska E. The role of sigma-1 receptor, an intracellular chaperone in neurodegenerative diseases. *Curr Neuropharmacol* 2018; 16: 97–116. DOI: 10.2174/1570159X15666170529104323. PMID: 28554311.

**Поступила / Received 20.06.2018
Принята в печать / Accepted 31.08.2018**

Со списком литературы на русском языке можно ознакомиться на сайте журнала.

Информация об авторах: Рогозин Павел Дмитриевич – лаборант-исследователь лаб. функциональной синаптологии отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия;
Солнцева Елена Ивановна – д.б.н., в.н.с. лаб. функциональной синаптологии отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия;
Скребицкий Владимир Георгиевич – член-корр. РАН, д.б.н., проф., зав. лаб. функциональной синаптологии отдела исследований мозга ФГБНУ НЦН, Москва, Россия

Information about the authors: Pavel D. Rogozin, laboratory assistant researcher, Laboratory of functional sinaptology, Department of brain research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia;
Elena I. Solntseva, D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of functional sinaptology, Department of brain research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia;
Vladimir G. Skrebitsky, Corresponding Member of RAS, D. Sci. (Biol.), Prof., Head of Laboratory of functional sinaptology, Department of brain research, Research Center of Neurology, Moscow, Russia