

НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ ЖИЗНИ И СМЕРТИ НЕЙРОНАЛЬНОЙ КЛЕТКИ

А. А. БОЛДЫРЕВ, М. О. ЮНЕВА

Международный биотехнологический центр Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова

MODERN APPROACHES TO INVESTIGATION OF NEURON'S LIFE AND DEATH

A. A. BOLDYREV, M. O. YUNEVA

Applicability of flow cytometric approach to investigation of morphological and biochemical properties on individual neurons is described. The method allows to estimate the molecular mechanisms involved in signal transduction mechanisms, reactions resulting in oxidative stress and the early events accompanying and inducing cell death.

Обсуждаются возможности применения метода проточной цитометрии для исследования морфологических и биохимических параметров индивидуальных нейронов. Данный метод позволяет оценить молекулярные механизмы, задействованные в передаче нейронального сигнала, реакции, вызывающие состояние окислительного стресса, а также процессы, приводящие к клеточной смерти.

journal.issep.rssi.ru

Сложная организация мозга затрудняет понимание механизма взаимодействия нейронов, и одной из причин, тормозящих развитие науки о мозге, является недоступность для исследования индивидуальных нервных клеток. Биохимик с легкостью приготовит гомогенат из серого вещества, подвергнет его центрифугированию, фракционированию в градиенте плотности сахарозы, выделит мембраны, содержащие очищенные ферменты или рецепторы, но не сможет сказать, каким клеткам они принадлежали – нервным или глиальным и в какой области мозга они находились. Физиолог получит тонкие срезы той или иной области мозга, введет электрод в межклеточное пространство или даже в само тело нейрона, электрическим или химическим агентом заставит клетки генерировать волну возбуждения, но не сумеет оценить, какие нейрхимические процессы лежат в основе этой активности. Биофизик будет моделировать взаимодействие межнейронных сетей исходя из анализа языка межклеточных взаимодействий – возбуждения, торможения или потенциации, но и ему будет не хватать знаний о метаболических свойствах индивидуального нейрона – простейшей, но очень сложной ячейки межнейрональной сети.

Ушедший век завершился объявленной ЮНЕСКО десятилетней программой “Декада мозга”, которая была сконцентрирована на изучении нейрхимических процессов, протекающих в мозге и лежащих в основе высшей нервной деятельности. Одним из важных результатов этой программы явилась разработка возможностей нейрхимических исследований индивидуальной нервной клетки в живом состоянии.

ПРИНЦИП ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Техническая возможность анализировать свойства индивидуальных клеток была воплощена более 20 лет назад в идее проточного цитометра [1]. В основе метода проточной цитометрии лежит измерение параметров каждой отдельно взятой клетки. Суспензию клеток под давлением прогоняют через капилляр. При этом за счет

наличия обволакивающей жидкости по краям потока создается более высокое давление, чем в центре. Вследствие этого клетки, стремясь попасть в область наименьшего давления, образуют поток, состоящий фактически из одного ряда клеток. Когда такую струю пересекает сфокусированный лазерный луч, в точке пересечения потока и луча одновременно оказывается, как правило, только одна клетка, что позволяет избежать артефактов, связанных с разной удаленностью клеток от точки пересечения лазерного луча с потоком.

Быстродействующие датчики, расположенные вблизи измерительной ячейки, фиксируют рассеивание под углом от 2 до 19°, которое называется прямым рассеиванием и характеризует размеры клеток, и под углом 90° (боковое рассеивание, характеризующее особенности внутриклеточных структур). Измерение этих двух параметров позволяет выявлять разные типы клеток. Прибор снабжен фотодетекторами, позволяющими измерять флуоресценцию различных флуорофоров, которыми могут быть помечены клетки. Так, обработка исследуемых клеток флуоресцентными антителами на разные мембранные рецепторы позволяет одновременно измерять количество этих рецепторов на клеточной мембране.

Применение различных флуоресцентных красителей позволяет характеризовать клетки по разным биохимическим параметрам, таким, как мембранный потенциал, содержание различных ионов или свободных радикалов. Более того, оказывается возможным осуществлять сортировку клеток, различающихся по какому-либо из измеряемых параметров. В настоящее время

проточная цитометрия широко используется также и в молекулярной биологии. Принцип проточной цитометрии схематически изображен на рис. 1.

Проточная цитометрия начала успешно применяться с 70-х годов XX в. для характеристики лимфоцитов человека и оказалась исключительно эффективной для целей иммунодиагностики. Приготовление антител на различные рецепторы позволило количественно оценить распределение разнообразных рецепторов на клетках иммунной системы, определить факторы, вызывающие их экспрессию или подавление, охарактеризовать систему клеточного иммунитета при разных заболеваниях. Но как применить для исследования нейронов то, что так эффективно применяется для форменных элементов крови? Для этого надо было иметь суспензию индивидуальных нейронов, а они обладают выраженной тенденцией образовывать сложную сеть, в которой отростки нервных клеток — дендриты образуют синапсы сразу с несколькими соседними клетками.

А что, если попробовать приготовить суспензию отдельных нейронов из мозга молодых животных, где межнейрональные связи еще не успели образоваться, но сами клетки уже сформированы и готовы к действию? Эта идея и легла в основу приготовления препаратов мозга, пригодных для проточной цитометрии [2]. Для этой цели удобно использовать кусочки мозжечка, получаемого из мозга молодых (9–12-дневных) грызунов. Кратковременная обработка ткани ферментами, разрыхляющими межклеточную среду, с последующим легким взмучиванием суспензии позволяет отделить

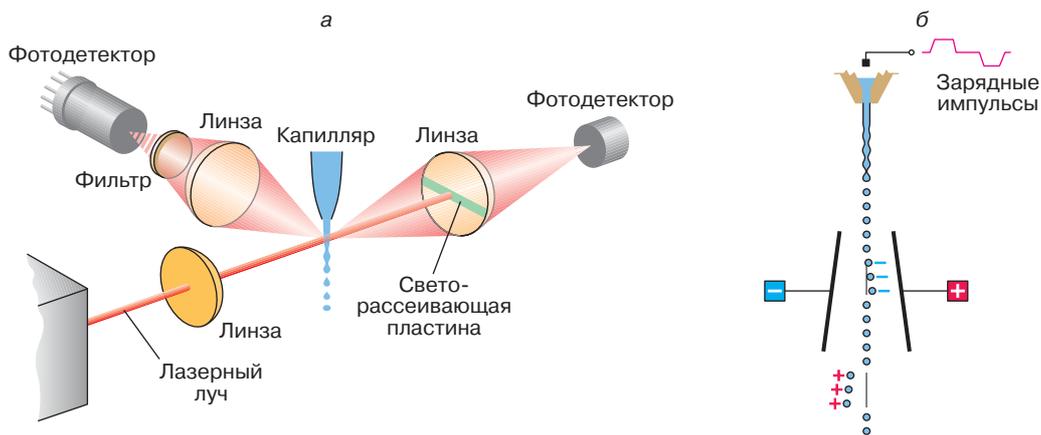


Рис. 1. Принцип работы проточного цитометра: устройство оптической системы (а) и принцип сортировки клеток по определенному параметру (б). Клетка, которая обладает необходимой характеристикой, на выходе из капилляра получает либо положительный, либо отрицательный заряд. При прохождении потока между заряженными пластинами исследуемые клетки отклоняются в сторону противоположно заряженной пластины и попадают в соответствующий приемник

клетки от общей массы. После утраты связей с соседними клетками нейроны становятся шарообразными и остаются жизнеспособными на протяжении по крайней мере нескольких часов. В течение этого времени их можно использовать в эксперименте.

ЖИВЫЕ И МЕРТВЫЕ

Часть полученных клеток все же не переносит такой процедуры, и в зависимости от искусства экспериментатора от 5 до 15% общей суспензии клеток оказываются нежизнеспособными. На получаемых изображениях таких суспензий, где клетки располагаются в зависимости от соотношения сигналов прямого и бокового рассеивания, можно видеть две разные популяции нейронов: более мелкие, съжившиеся (мертвые), и более крупные — живые (рис. 2, а).

Для определения количества мертвых и живых клеток используют два красителя: диацетильное производное дихлордигидрофлуоресцеина (DCFH₂-DA) и иодид пропидия (PI), предварительная обработка нейронов которыми позволяет пометить первой меткой живые, а второй — мертвые клетки. PI является известным маркером на нуклеиновые кислоты, образующим с ними стойкие комплексы. Он не проникает через мембрану живых клеток, и если клетка при освещении лазером окрашивается красным цветом, это является признаком накопления в ней PI, то есть клеточной смерти.

DCFH₂-DA является маркером другого сорта — он не может проникнуть в клетку самостоятельно, а должен аккумулироваться при участии мембранного фермента эстеразы, которая в процессе аккумуляции “откусывает” от молекулы ацетильные группы, что мешает образуемому дихлордигидрофлуоресцеину (DCFH₂) покинуть клетку, пока ее мембрана не нарушена. Таким образом, DCFH₂ накапливается в живых метаболизирующих нейронах. Его количество легко измерить, поскольку образующийся при метаболизме пероксид водорода H₂O₂ при участии клеточных ферментов взаимодействует с DCFH₂, образуя флуоресцирующее в зеленой области спектра окисленное производное DCF. Таким образом, живые клетки должны посылать зеленый сигнал. Если обработать суспензию нейронов двумя этими красками, мы обнаружим, что популяция клеток, ограниченная областью A-1 на рис. 2, а, генерирует зеленый сигнал, а популяция A-2 — красный.

С помощью компьютерной аналитической программы можно оценить распределение интенсивности красной и зеленой флуоресценции в обеих популяциях клеток. При представлении результатов измерения в виде гистограммы по шкале абсцисс откладывается интенсивность флуоресценции данного красителя в логарифмических координатах, а по шкале ординат — число

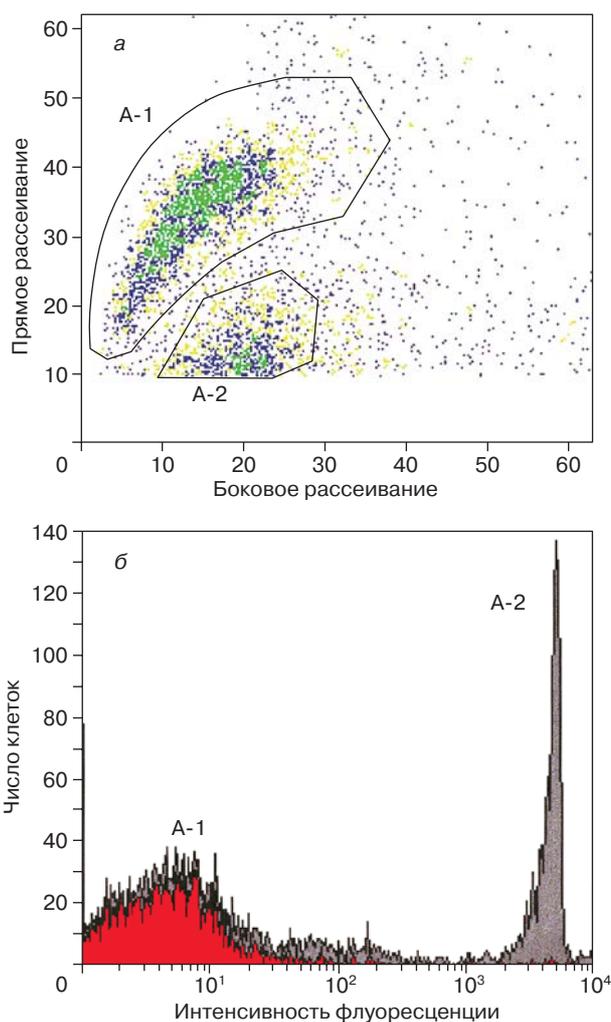


Рис. 2. Оценка состояния популяции нейронов методом проточной цитометрии: распределение нейронов в зависимости от их размеров и внутриклеточной структурированности (а) и оценка количества мертвых и живых клеток в данной популяции по флуоресценции DCF и PI (б). A-1 – живые клетки, A-2 – мертвые клетки

событий (в данном случае количество клеток). Таким образом, распределение измеряемых событий по данному параметру (интенсивность флуоресценции) имеет вид двух пиков, площадь которых характеризует количество клеток в каждой популяции. На рис. 2, б видно, что сигнал DCF присущ большому количеству клеток, что свидетельствует о том, что большинство клеток в данной популяции живые.

АКТИВАЦИЯ РЕЦЕПТОРОВ

Нейрональные клетки имеют множество рецепторов на внешней мембране, активация которых

специальными медиаторами рождает электрический сигнал и приводит к изменению клеточного метаболизма. В мозжечке широко представлена глутаматергическая система возбуждения, включающая несколько типов рецепторов для глутамата, выполняющего в этих клетках роль нейромедиатора [3]. Представляет интерес выяснить, как отражается на клеточном метаболизме активация этих рецепторов. Вопрос тем более интересен, что нейробиологам известны синтетические аналоги глутамата, раздельно активирующие разные типы глутаматных рецепторов. Даже классификация этих рецепторов была осуществлена в соответствии с названиями различных лигандов, и те, что активировались каинатом, стали называть каинатными рецепторами, а N-метил-D-аспаратом (NMDA) – NMDA-рецепторами.

Оказалось, что активация нейронов этими аналогами сопровождается увеличением сигнала DCF, что означало активацию и метаболических процессов. На рис. 3 показано, как кривая флуоресценции DCF, характерная для покоящихся нейронов, существенно сдвигается вправо после их кратковременной активации каинатом. Этот эффект отражает образование большего количества H_2O_2 активированными клетками. Поскольку пероксид водорода является стабильной формой активных радикалов кислорода, увеличение интенсивности сигнала DCF отражает их повышенное образование при активации нейронов. Такое действие каината реализуется через специфический рецептор, и применение антагониста каинатных рецепторов DNQX предотвращает рост свободных радикалов (см. рис. 3). Такие исследования позволяют оценить роль свобод-

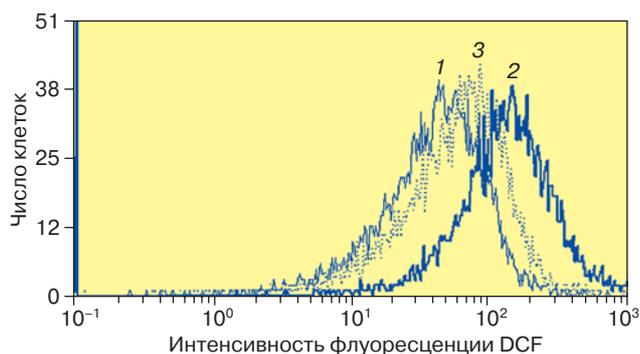


Рис. 3. Оценка действия каината и его антагониста DNQX на продукцию АФК нейронами: экспозиция клеток в присутствии каината вызывает рост внутриклеточного уровня АФК, но специфический антагонист каинатных рецепторов DNQX препятствует этому эффекту: 1 – контроль, 2 – 30-минутная экспозиция клеток с 0,5 мМ каината, 3 – то же, что 2 в присутствии 10 мкМ DNQX

ных радикалов в жизнедеятельности нейрона, что в настоящее время привлекает все больший интерес исследователей [4, 5].

Образование активных форм кислорода (АФК) осуществляется внутри клеток, но происходит в ответ на активацию наружных рецепторов. В этот процесс вовлечены ионы кальция, и стоит только удалить этот ион из внешней среды, усиления флуоресценции DCF не наблюдается (рис. 4). Таким образом, внешние сигналы должны комбинироваться определенным образом друг с другом, чтобы привести к результату, и хотя еще не вполне ясно, как этот результат (образование внутриклеточных АФК) участвует в передаче и запоминании информации, такой подход является перспективным инструментом исследования молекулярных основ этих процессов.

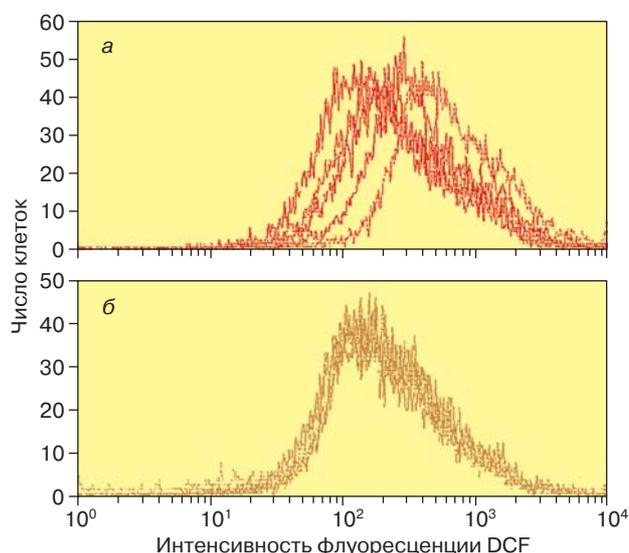


Рис. 4. Активация NMDA-рецепторов нейронов приводит к росту АФК только в присутствии ионов кальция во внешней среде: а – влияние 10-минутной инкубации клеток с нарастающими концентрациями NMDA (0, 50, 100, 250 и 500 мкМ) на распределение клеток по величинам флуоресценции DCF в контрольных условиях, б – то же самое в отсутствие ионов кальция во внешней среде

ВЫЖИВАНИЕ НЕЙРОНОВ В НЕБЛАГОПРИЯТНЫХ УСЛОВИЯХ

Существуют разные точки зрения на роль свободных радикалов в жизнедеятельности клетки. Одни ученые обращают внимание на их повреждающее действие, которое и лежит в основе так называемого окислительного стресса [5]. Другие подчеркивают их информационную и защитную роль [6, 7]. Так или иначе, АФК в

нейрональной клетке играют двойственную роль [4], и исследование этой роли становится возможным на индивидуальных нейрональных клетках.

С помощью проточной цитометрии можно измерить продукцию АФК в условиях, имитирующих нарушения мозгового кровообращения. Медикам известно, что при нарушениях кровоснабжения мозга имеются две последовательные стадии повреждения нейронов: первая — когда вследствие образования тромба в близлежащей области наблюдаются явления гипоксии (недостаток кислорода); на второй стадии восстановление кровообращения по сосудистым коллатералям приводит к реоксигенации (и как следствие к гипероксии). В общем виде понятно, что чем короче будет первая стадия, тем успешнее мозг справится с повреждением и тем полнее сумеет восстановить свои функции. Однако проточная цитометрия дает возможность количественно оценить последствия инсульта на клеточном уровне и выработать рекомендации по оптимальной терапии.

На рис. 5 представлены результаты исследования выживаемости нейронов в условиях искусственной гипоксии и последующей реоксигенации. Дозированную по времени гипоксию создавали помещая нейроны в среду, лишенную кислорода, а для более полной имитации патологических условий удаляли из среды глюкозу и закисляли ее до pH 5,8–6,2, поскольку оба фактора — нехватка питательных веществ (наиболее важной для нервных клеток является глюкоза) и ацидоз (возникающий вследствие невозможности удаления кислых метаболитов в условиях нарушения кровоснабжения) — сопутствуют гипоксическому тромбозу. Оказалось, что уже через 15 мин в суспензии нейронов значительно увеличивалась доля мертвых клеток, а в двух субпопуляциях живых наблюдалось перераспределение между левой (с относительно низким уровнем АФК) и правой (с более высоким уровнем АФК) в пользу правой (рис. 5, а, б).

Через 15 мин гипоксии клетки переносили в нормальную среду, содержащую кислород, глюкозу и имеющую нормальное значение pH (7,4). Однако это сопровождалось дальнейшим увеличением роста мертвых клеток и возрастанием доли нейронов, располагающихся в области повышенного уровня радикалообразования (рис. 5, в). Таким образом, восстановление нормальных условий функционирования на первых порах приводит к ухудшению жизнеспособности нейронов. Эта модель дает весьма полезный подход для оценки защитного действия медикаментозных средств, используемых для восстановления мозгового кровообращения, а также и природных механизмов защиты от окислительного стресса. Ведь при одном и том же способе повреждения в исследуемой популяции клеток имеются как те, что погибают в первую очередь, так и

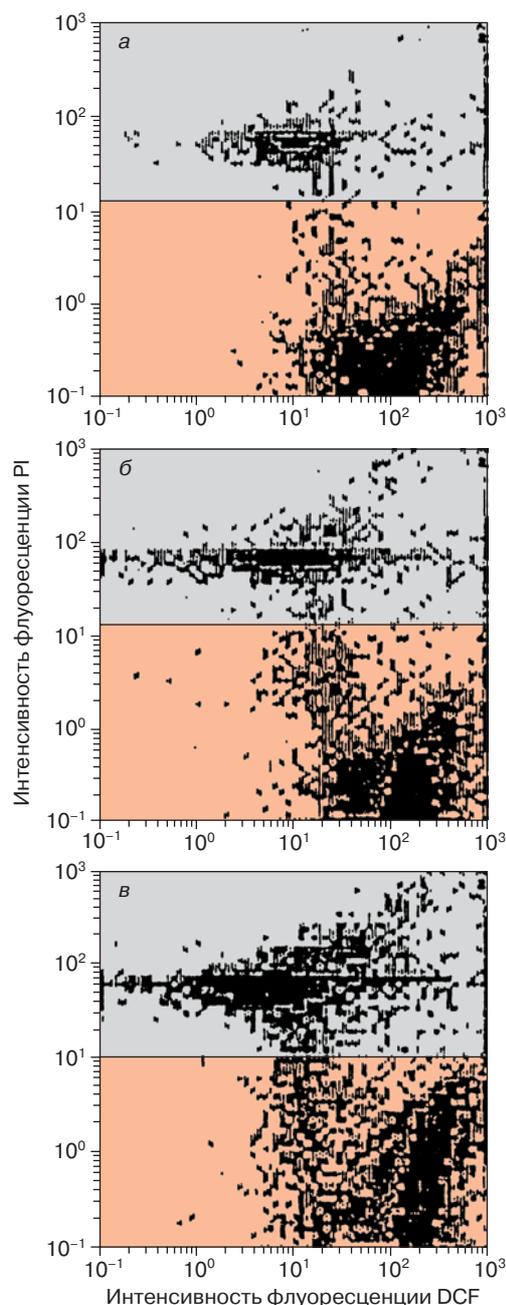


Рис. 5. Распределение нейронов по группам с разной степенью повреждения после гипоксии/реоксигенации: а — контроль, б — 15 мин гипоксия; в — 15 мин гипоксия + 60 мин реоксигенации. Верхняя часть каждой гистограммы — мертвые клетки (красятся PI), нижняя часть — живые клетки, накапливающие DCF и генерирующие АФК. Видно распределение живых клеток на две субпопуляции с меньшим (слева) и большим (справа) уровнем флуоресценции; гипоксия и в еще большей степени реоксигенация увеличивают долю клеток с более высоким уровнем АФК

те, что проявляют более высокую устойчивость к окислительному стрессу.

АПОПТОЗ ИЛИ НЕКРОЗ

Опасность окислительного стресса для клеток заключается в том, что при неблагоприятных для жизнедеятельности клеток условиях недостаток защитных механизмов не позволяет процессам репарации своевременно устранять накапливаемые повреждения клеточных структур. В такой ситуации клетке грозит смерть, которая может осуществляться по одному из двух путей: по пути апоптоза или некроза. Мы не будем касаться различий в их механизмах, чему посвящена разнообразная и обширная литература (см., например, [8]). Важно показать, что с помощью проточной цитометрии можно выявить самые ранние события любого из этих процессов, уловив стадию, на которой “принимается решение” о переходе границы жизнеспособности и самом пути клеточной смерти.

Так же, как PI является маркером для некроза (при этом типе клеточной смерти происходит фрагментация мембраны, что позволяет PI войти в клетку и связаться с ДНК), имеются и флуоресцентные красители, способные пометить клетки, “решившиеся” идти по пути апоптоза. Наиболее ранним событием, предвещающим такое решение, является окисление липидов клеточных мембран, происходящее под влиянием избыточной продукции АФК. При этом наиболее уязвимы ненасыщенные жирнокислотные хвосты кислых фосфолипидов, представленные в нейрональных мембранах в основном фосфатидилсерин. Образование гидроперекисей фосфатидилсерина нарушает его взаимодействие с белками цитоскелета аннексинами и облегчает миграцию окисленного фосфатидилсерина с внутренней стороны мембранного бислоя на наружную. По этой причине фосфатидилсерин, который в нормальной клетке практически весь локализован с внутренней стороны бислоя, при индукции апоптоза начинает появляться и с внешней стороны мембраны [9]. Этим обстоятельством и пользуются исследователи для того, чтобы отличить нормальные клетки от тех, у которых проявляется склонность к апоптозу.

В качестве соединения, маркирующего апоптозные клетки, используют выделенный белок аннексин, метя его флуоресцентными красителями (обычно для этих целей применяют флуоресцеинизотиоцианат, FITC). Таким образом, одновременное внесение в суспензию нейронов двух меток – PI (на некроз) и аннексина-FITC (на апоптоз) – позволяет количественно оценить долю разных субпопуляций нейронов в данной суспензии (рис. 6).

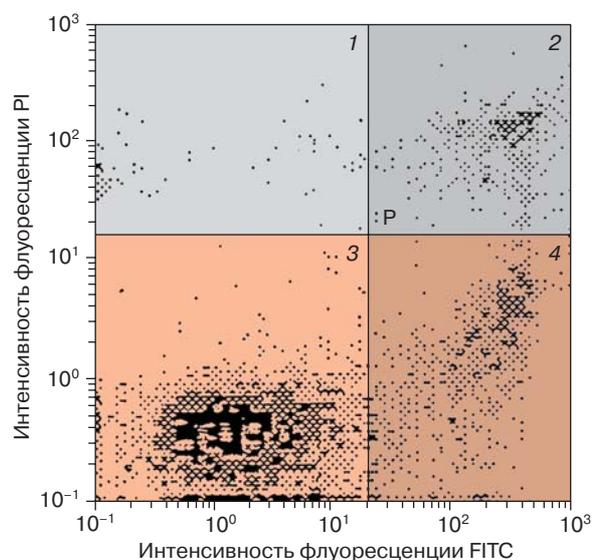


Рис. 6. Дискриминационный анализ типа клеточной смерти. 1-й квадрант – клетки, метящиеся только PI (начальная стадия некроза); 2-й квадрант – клетки, метящиеся как PI, так и аннексином-FITC (глубокий некроз); 3-й квадрант – клетки, не метящиеся ни PI, ни аннексином-FITC (живые); 4-й квадрант – клетки, метящиеся только аннексином-FITC (апоптоз)

Такой подход можно использовать, чтобы проследить во времени действия нейротоксинов, вызывающих окислительный стресс. В этих условиях нарушается аккумуляция нейромедиатора, и его избыточное действие приводит к стойкому возбуждению рецепторов и повышенной продукции АФК. Наиболее опасным является вовлечение в этот процесс NMDA-рецепторов. Эту ситуацию можно воспроизвести, активируя нейроны внесением в среду инкубации NMDA, и проследить развитие процессов, приводящих к клеточной смерти. На рис. 7 показано перераспределение нейронов между популяциями живых, некротических и апоптозных клеток под влиянием NMDA. Видно, что если исходная популяция нейронов характеризовалась преимущественно живыми и небольшой долей некротических клеток (а), то уже через 60 мин выявляется ошутимая доля клеток в области, соответствующей апоптозу, а “пятно” некротических клеток ползет вправо (б).

Это наблюдение позволяет оценить глубину некротических повреждений нейронов. Перемещение пятна клеток, чувствительных к PI, вдоль по горизонтальной оси отражает их усиливающуюся способность прокрашиваться аннексином-FITC. Будучи чувствительны к пропидию, эти нейроны остаются некротическими, но развивающийся некроз делает их мембраны проницаемыми не только для маленькой молекулы PI, но и для

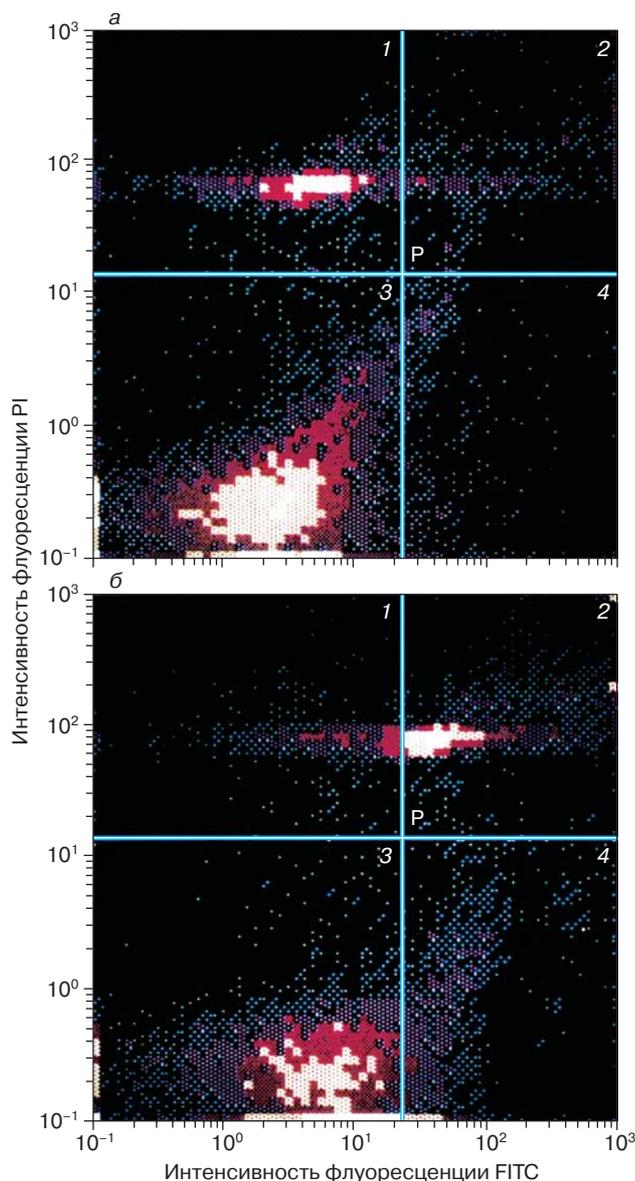


Рис. 7. NMDA вызывает смерть нейронов как по пути некроза, так и по пути апоптоза: *а* – контроль, *б* – через 60 мин после экспозиции клеток с 0,5 мМ NMDA, остальные обозначения как на рис. 6

относительно большого белка аннексина. Проникновение его внутрь клеток позволяет выявлять фосфатидилсерин и с внутренней стороны клеточной мембраны. Таким образом оказалось возможным отличать легкий некроз от далеко зашедшего тяжелого некроза.

ДАЛЬНЕЙШИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

Приведенные примеры показывают широкие возможности количественной оценки многих важных па-

раметров функционирования клеток, в том числе и нейронов. Таким же образом, как и АФК, можно регистрировать мембранный потенциал, уровень внутриклеточного кальция или pH, если использовать соответствующие флуоресцентные метки. Достоинством проточной цитометрии является возможность одновременного измерения нескольких параметров (для этого достаточно иметь несколько детекторов, настроенных на соответствующие длины волн, что и используется в современных цитометрах). При этом можно выявить корреляцию между изменениями этих параметров практически для каждой клетки, оперируя не статистическим (интегральным, усредненным) значением параметра, а конкретными измеряемыми величинами для индивидуального нейрона.

Недостатком подхода можно считать необходимость использования нейронов из ткани, еще не имеющей всех характерных свойств взрослого мозга – всегда остается возражение, что исследователь имеет дело с процессами, присущими молодым клеткам. Однако развитие современных биотехнологических приемов позволило решить и эту проблему. Разработан прибор, который называется “LazerScan”. В нем для измерений вместо прокачивания суспензии клеток через капилляр используют луч лазера, “оббегающий” монослойную культуру выращенных нейронов и проводящий те же измерения. Используя этот подход, те же закономерности можно проследить на нативных нейронах различного возраста без разрушения межклеточных контактов и дополнительной обработки нейрональных клеток.

Эти примеры иллюстрируют разнообразные возможности новых технических подходов, разработанных в конце XX в. для количественного исследования индивидуальных нейронов и сулящих в ближайшем будущем прорыв в понимании молекулярных механизмов работы нервных клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haynes J. Principles of flow cytometry // *Cytometry Suppl.* 1988. Vol. 3. P. 7–17.
2. Oyama Y., Carpenter D., Chikahisa L., Okazaki E. Flow cytometric estimation of glutamate and kainate increase in intracellular Ca in brain neurons: A technical aspect // *Brain Res.* 1996. Vol. 728. P. 121–124.
3. Болдырев А.А. Функциональное взаимодействие между глутаматными рецепторами разных классов // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* 2000. Т. 130, № 9. С. 244–251.
4. Скулачев В.П. Кислород и явления запрограммированной смерти. М.: Изд-во МГУ, 2000.
5. Болдырев А.А. Окислительный стресс // *Соросовский Образовательный Журнал.* 2001. Т. 7, № 4. С. 21–28.
6. Hancock J., Neill S. Reactive oxygen species as potential signaling molecules in both plants and animals // *Biochemist.* 1999. № 9. P. 33–37.

7. *Vojevkov V.L.* Process involving reactive oxygen species are the major source of structured energy for organismal biophotonic field pumping / Pro. II Alexander Gurwitsch Conf. and Additional Contributions: Biophotonics and Coherent Systems. Moscow: Moscow Univ. Press, 2000. P. 203–229.

8. *Агол В.И.* Генетически запрограммированная смерть клетки // Соросовский Образовательный Журнал. 1996. № 6. С. 20–25.

9. *Болдырев А.А.* Роль свободных радикалов в функциональной активности нейрона: Успехи функцион. нейробиологии. СПб.: Изд-во СПб. ун-та, 2003. С. 301–317.

Рецензент статьи Л.И. Корочкин

* * *

Александр Александрович Болдырев, доктор биологических наук, профессор Международного биотехнологического центра МГУ по кафедре биохимии, зав. ла-

бораторией нейробиологии Института неврологии РАМН. Область научных интересов – природные механизмы защиты мозга от окислительного повреждения. Автор более 300 научных публикаций, в том числе четырех монографий и трех учебников по биохимии мембран, рекомендованных Минвузом РФ для студентов высшей школы.

Мария Олеговна Юнева, аспирант кафедры биохимии МГУ, Соросовский аспирант. Кандидатская работа “Характеристика антиоксидантной системы мышей с ускоренным процессом старения линии SAM (Senescence Accelerated Mice)” выполнена под руководством профессора А.А. Болдырева. Автор 11 научных публикаций в отечественных и зарубежных научных журналах.