

УДК 612.821

ВЛИЯНИЕ СВЕРХМАЛЫХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АНТИТЕЛ К БЕЛКУ S-100 НА МОДУЛЯЦИЮ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ ГИППОКАМПА АНТАГОНИСТАМИ ГАМК_A РЕЦЕПТОРА

¹Береговой Н.А., ¹Сорокина Н.С., ¹Старостина М.В., ¹Штарк М.Б., ²Эпштейн О.И.

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, Новосибирск, e-mail: ber@soramn.ru;

²НПФ «Материа Медика Холдинг», Москва

Ранее было установлено, что антитела к белку S-100 в сверхмалой концентрации обладают анксиолитической и антидепрессивной активностью, причем в реализации анксиолитических эффектов принимает участие ГАМК-эргическая система. Одним из возможных механизмов анксиолитических и антидепрессивных эффектов сверхнизких концентраций антител к белку S-100 является их влияние на ГАМК-эргическую систему мозга. В представленной работе изучали действие этих антител на вызванную антагонистами ГАМК_A рецептора модуляцию синаптической пластичности мшистых волокон гиппокампа. Бикукулин (антагонист ГАМК_A рецептора) и пикротоксин (антагонист сопряженного с рецептором хлорного канала) вызывали фасилитацию длительной посттетанической потенциации мшистых волокон в срезах гиппокампа крыс. Преинкубация со сверхнизкими концентрациями антител к белку S-100 или длительная совместная инкубация срезов в присутствии антагонистов и антител приводила к снижению фасилитации до контрольных значений.

Ключевые слова: гиппокамп, ГАМК, пикротоксин, бикукулин, AS-100, ДПТП

THE EFFECTS OF ANTIBODIES TO S-100 PROTEIN IN ULTRA-LOW CONCENTRATIONS UPON HIPPOCAMPAL SYNAPTIC PLASTICITY MODIFIED BY ANTAGONISTS OF GABA_A-RECEPTOR

¹Beregovoy N.A., ¹Sorokina N.S., ¹Starostina M.V., ¹Shtark M.B., ²Epstein O.I.

¹Federal State Budget Institution «Institute of molecular biology & biophysics» Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, e-mail: ber@soramn.ru;

²Materia Medica Holding, Moscow

The influence on brain GABA-ergic system seems to be one of possible mechanisms for anxiolytic and antidepressive effects of antibodies to S-100 protein in ultra-low concentrations. In present paper we studied the effects of these antibodies on modulation of synaptic plasticity in hippocampal mossy fibers by antagonists of GABA_A receptor. Bicuculin (antagonist of GABA_A receptor) and picrotoxin (antagonist of chloride channel associated with receptor) induced facilitation of mossy fiber long-term potentiation in rat hippocampal slices. Preincubation with ultra-low concentrations of anti-S-100 antibodies or prolonged incubations of slices in presence of antagonist and antibodies led to the decrease of facilitation to control values.

Keywords: hippocampus, GABA, picrotoxin, bicuculine, AS-100, LTP

В серии поведенческих экспериментов на животных ранее было установлено, что антитела к белку S-100 в сверхмалой концентрации (AS-100 C6), приготовленные по гомеопатической технологии, обладают анксиолитической и антидепрессивной активностью [1, 4], причем в реализации анксиолитических эффектов принимает участие ГАМК-эргическая система [2].

В исследованиях, проведенных группой шведских исследователей, было показано, что как белок S-100, так и антитела к нему способны увеличивать проницаемость нейрональной мембраны для ГАМК и ионов хлора, вероятно, за счет взаимодействия с ГАМК_A рецептором [6]. Антитела к белку S-100 блокировали развитие длительной посттетанической потенциации (ДПТП) в срезах гиппокампа [8]. Нами было установлено, что те же антитела в сверхмалых концентрациях, не оказывая непосредственного влияния на индукцию и поддержание ДПТП, препятствуют блокирующему дей-

ствию больших доз [7]. Одним из возможных механизмов этого эффекта является регулирующее влияние сверхмалых концентраций антител на ГАМК-эргическую систему, играющую важную роль в поддержании нормальной электрической активности нейронов гиппокампа. В представленной работе мы изучали влияние AS-100 на формирование ДПТП в срезах гиппокампа крыс с использованием антагонистов ГАМК_A рецептора и сопряженного с ним хлорного канала – бикукулина и пикротоксина.

Материалы и методы исследования

В работе использовали крыс-самцов Вистар, весом 180–260 г (n = 35), полученных из вивария лаборатории экспериментальных животных Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск). Крыс содержали по 2 в клетке при световом режиме 12 часов день/ночь на стандартном комбинированном рационе питания и свободном доступе к воде.

Срезы гиппокампа толщиной 400 мкм помещали в термостатированную камеру (35–37°C) с точной средой Яомото (в мМ: NaCl, 124; KCL, 4,9;

KH_2PO_4 , 1,2; MgSO_4 , 1,3; CaCl_2 , 2,5; NaHCO_3 , 25,6; D-глюкоза, 10; pH 7,5), аэрируемой карбогеном (95% O_2 – 5% CO_2). Спустя 40 минут начинали регистрацию вызванных потенциалов, размещая электроды следующим образом: стимулирующий биполярный вольфрамовый электрод помещали в область мшистых волокон, регистрирующий стеклянный электрод (сопротивление – 3–5 МΩ, заполнен 2,5 М NaCl) – в область СА3 в зоне начальных сегментов апикальных дендритов. Тестирование проводили при помощи одиночных прямоугольных стимулов длительностью 200 мкс, наносимых не реже, чем через 5 мин. Амплитуда тестирующих стимулов находилась обычно в диапазоне 10–30 В. Вызванные потенциалы регистрировали при помощи 12-разрядного АЦП (Digidata, Axon Instruments, Inc.) и обрабатывали на ЭВМ, используя пакет программ pClamp-6 (Axon Instruments, Inc.) и Microcal Origin. Для выработки ДППП амплитуду тестирующего стимула подбирали таким образом, чтобы величина ответа составляла не более 50% от максимальной. Тетанизацию проводили тремя последовательными пачками стимулов частотой 200 Гц, длительность каждой пачки импульсов 1 с, интервал между пачками 2 с. Через 10 мин процедуру тетанизации повторяли. Регистрацию вызванных потенциалов вели не менее 60 мин после первой тетанизации, что позволяло сделать заключение о формировании или отсутствии ДППП.

При исследовании эффектов сверхмалых концентраций антител и антагонистов ГАМК_A рецептора на 1–2 контрольных срезах гиппокампа от каждого животного проводили тетанизацию и дальнейшие эксперименты со срезами из этого набора продолжали только в том случае, если наблюдали формирование ДППП.

В работе использовали антагонист ГАМК_A рецептора бикукулин и антагонист сопряженного с данным рецептором хлорного канала пикротоксин (Sigma, США) в конечной концентрации 10 мкМ. После установки электродов и регистрации ответов на тестирующие стимулы в камеру вносили исследуемые препараты и срезы инкубировали с ними в течение 20 мин. Затем, после регистрации ответа на тест,

проводили тетанизацию, как описано выше. Раствор потенцированных антител к белку S-100 (AS-100 С6) был приготовлен персоналом научно-производственной фирмы «Материя Медика Холдинг» в соответствии со стандартной процедурой.

При изучении эффектов антител в сверхмалых концентрациях (С6 – физиологическая концентрация $\times 10^{-12}$) использовали два протокола экспериментов, внося антитела за 20 минут до или после преинкубации с антагонистом. В последнем случае совместная инкубация срезов в присутствии AS-100 С6 и антагониста до тетанизации также составляла 20 мин.

В ходе экспериментов измерялась латентность и амплитуда суммарного ВПСП мшистых волокон. Относительное изменение амплитуды суммарного ВПСП после тетанизации вычисляли по формуле $((A_n - A_0)/A_0) \cdot 100\%$, где A_0 – амплитуда ответа на тестовый стимул до, A_n – после тетанизации.

При статистической обработке результатов получали среднее значение измеряемой величины и стандартную ошибку среднего ($M \pm SEM$). Оценку достоверности различий средних значений параметров проводили с использованием t-критерия Стьюдента, используя пакет программ OriginPro 8.1 (OriginLab). Различия между группами считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Пикротоксин в конечной концентрации 10 мкМ не вызывал изменения амплитуды и латентности суммарных ВПСП мшистых волокон в ответ на тестирующие стимулы в течение 20 мин преинкубации срезов. Процедура тетанизации мшистых волокон приводила к формированию полноценной ДППП, амплитуда которой через 30 и 60 мин после тетанизации превышала регистрируемую в срезах, находившихся в стандартной среде (рис. 1).

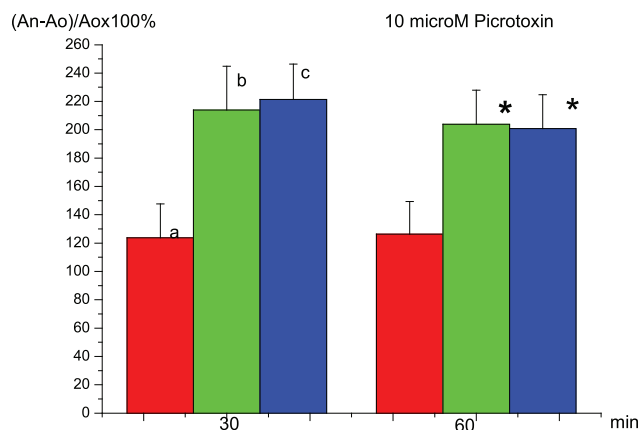


Рис. 1. Влияние преинкубации срезов гиппокампа с 10 мкМ пикротоксина на ДППП: ось ординат – изменение амплитуды суммарного ВПСП по сравнению с исходной (до тетанизации). Ось абсцисс – время, 30 мин. и 60 мин. после высокочастотной стимуляции; а – контроль; в – 20 мин преинкубация; с – 100 мин. преинкубация; * $p \leq 0,05$

Увеличение времени инкубации с пикротоксином до 100 мин имело такой же эффект. Таким образом, инактивация сопря-

женного с ГАМК_A рецептором хлорного канала приводила к фасилитации ДППП мшистых волокон в срезах гиппокампа.

Если препарат AS-100 С6 вносили в экспериментальную камеру после 20-минутной преинкубации срезов с пикротоксином и еще через 20 минут проводили тетанизацию мшистых волокон, эффекты, вызванные антагонистом, практически не изме-

нялись (рис. 2). При увеличении времени инкубации срезов в присутствии сверхмалых концентраций антител амплитуда сформированной ДПТП оказывалась выше контрольных значений, однако различия были недостоверны ($p = 0,13$).

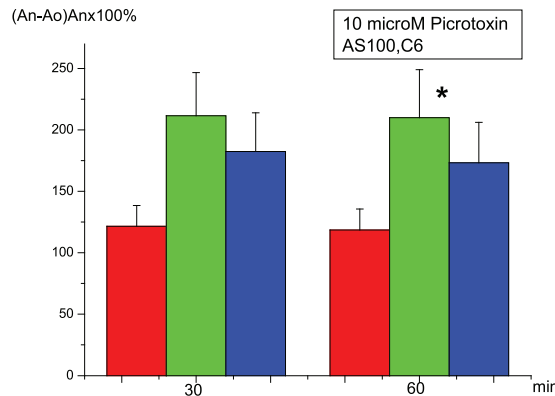


Рис. 2. Влияние на ДПТП преинкубации срезов гиппокампа с 10 μ M пикротоксином в течение 20 мин и последующей преинкубации с AS100 С6 в течение 20 мин: ось ординат – изменение амплитуды суммарного ВПСП по сравнению с исходной (до тетанизации). Ось абсцисс – время, 30 и 60 мин после тетанизации; a – контроль; b – 20 мин преинкубация; c – 100 мин преинкубация в среде Ямамото, содержащей 10 μ M пикротоксина и AS100 С6; * $p \leq 0,05$

В случае же если 20-минутная инкубация срезов с AS-100 С6 предшествовала внесению пикротоксина и последующей совместной инкубации, величина амплиту-

ды ДПТП мшистых волокон не отличалась от контрольной, то есть мы не наблюдали характерного для антагониста действия (рис. 3).

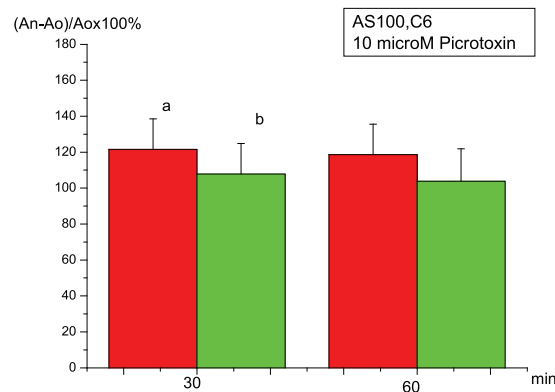


Рис. 3. Влияние на ДПТП преинкубации срезов гиппокампа с AS100 С6 в течение 20 мин и последующей преинкубации с 10 μ M пикротоксина в течение 20 мин: ось ординат – изменение амплитуды суммарного ВПСП по сравнению с исходной (до тетанизации). Ось абсцисс – время, 30 и 60 мин после тетанизации: a – контроль; b – опыт

Инкубация срезов гиппокампа с бикукулином также не влияла на величину амплитуды и латентности суммарных ВПСП мшистых волокон в ответ на тестирующие стимулы, а тетанизация приводила к выраженной фасилитации ДПТП по сравнению с контрольными срезами (рис. 4).

Нужно отметить, что в большем числе случаев на регистрируемых кривых суммар-

ных ВПСП было отмечено появление изменений, характерных для эпилептиформной активности. Эффекты AS-100 С6 в данном случае были подобны таковым для срезов, инкубируемых в присутствии пикротоксина. В частности, фасилитация ДПТП мшистых волокон, вызываемая бикукулином, полностью «отменялась» при использовании сверхмалых концентраций антител (рис. 5).

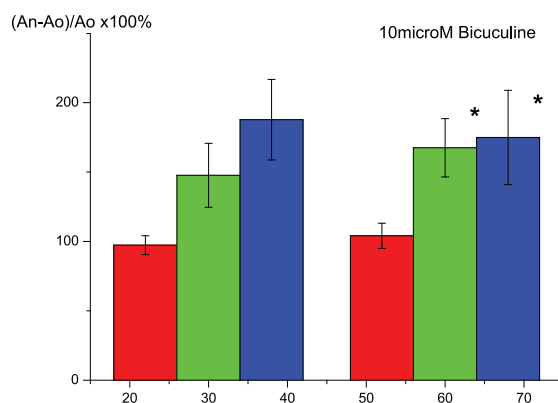


Рис. 4. Влияние на ДППП преинкубации срезов гиппокампа с 10 μ M биккукулина в течение 20 мин: ось ординат – изменение амплитуды суммарного ВПСП по сравнению с исходной (до тетанизации). Ось абсцисс – время, 30 и 60 мин после тетанизации; а – контроль; в – 20 мин с биккукулином; с – 100 мин в растворе содержащем биккукулин; * $p \leq 0,05$

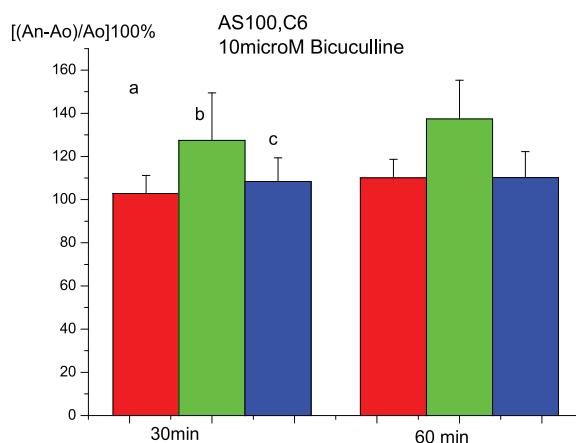


Рис. 5. Влияние на ДППП преинкубации срезов гиппокампа с AS100 C6 в течение 20 мин и последующей преинкубации с 10 μ M биккукулина в течение 20 мин: ось ординат – изменение амплитуды суммарного ВПСП по сравнению с исходной (до тетанизации). Ось абсцисс – время, 30 и 60 мин. после тетанизации: а – контроль; в – 20 мин. С AS100 C6 + 20 мин с биккукулином; с – 100 мин в растворе содержащем AS100 C6 и биккукулин

ГАМК-эргическая система играет важную роль в поддержании нормальной электрической активности нейронов гиппокампа и, прежде всего, в предупреждении возникновения судорожной активности. Тормозные ГАМК-содержащие волокна поступают в гиппокамп в составе перфорантного пути от крупных нейронов энторинальной коры, и большинство полиморфных интернейронов гиппокампа (корзинчатые, моховидные, клетки канделябры) также содержат ГАМК [3].

Основное количество работ по изучению ГАМК-эргических сигналов в срезах гиппокампа посвящено эпилептиформной активности и участию интернейронов в функционировании внутренних сетей гиппокампа, число же работ по исследованию роли ГАМК в ДППП относительно невелико и выполнены они в основном на системе синаптических связей «коллатерали Шаффера – пирамидные нейроны области

CA1» [9]. Показано, что антагонисты ГАМК_A рецептора биккукулин и пикротоксин усиливают ДППП за счет отмены гиперполяризующего влияния ГАМК на пирамиды CA1 и активации NMDA-рецептора глутамата [5]. Синапсы мшистых волокон содержат небольшие количества ГАМК [10], участвующей, вероятно, в ауторегуляции вызываемого глутаматом возбуждения.

Инкубация с биккукулином или пикротоксином приводила к усилению ДППП мшистых волокон по сравнению с контрольными срезами, содержащимися в стандартной среде, что выражалось в существенно большем увеличении амплитуды суммарного ВПСП через 60 минут после тетанизации. Хотя в наших экспериментах мы намеренно использовали сравнительно низкие концентрации антагонистов ГАМК_A-рецептора, в ряде случаев на регистрационных кривых было отмечено появление эпилептиформной активности.

Антитела к белку S-100 в сверхмалых концентрациях практически «отменяли» вызванные применением антагонистов эффекты, что позволяет предположить модулирующий эффект препарата на активность ГАМК-А-рецептора. Поскольку действие AS-100 С6 выявлено только в случае преинкубации до внесения антагониста или пролонгированной совместной инкубации, очевидно, временной интервал модуляции активности рецептора составляет несколько десятков минут (в нашем случае – 20 мин).

Тот же временной интервал был характерен для эффекта «отмены» AS-100 С6 блокирования индукции ДПП антителами к белку S-100 в высоких концентрациях, то есть эффект мог быть обусловлен частично или полностью модуляцией состояния ГАМК_A рецептора сверхмалыми дозами антител. В то же время вопрос о механизмах модулирующего влияния сверхмалых концентраций антител к белку S-100 на ГАМК_A рецептор, а именно является ли эта модуляция прямой или опосредованной, остается открытым.

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о способности сверхмалых концентраций антител к белку S-100 нормализовать модифицированную антагонистами ГАМК_A рецептора синаптическую пластичность мшистых волокон гиппокампа. Это, в свою очередь, может являться дополнительным подтверждением того, что анксиолитическая и антидепрессивная активность препарата антител связана с его действием на ГАМК-эргическую систему мозга.

Список литературы

1. Воронина Т.А., Молодавкин Г.М., Сергеева С.А., Эпштейн О.И. Анксиолитический эффект «Пропротена» в условиях наказуемого и ненаказуемого поведения // *Бюлл. экпер. биол. мед.* – 2003а. – Приложение 1. – С. 31–33.
2. Воронина Т.А., Молодавкин Г.М., Сергеева С.А., Эпштейн О.И. ГАМК-эргическая система в реализации анксиолитического действия «Пропротена»: экспериментальное исследование // *Бюлл. экпер. биол. мед.* – 2003б. – Приложение 1. – С. 37–39.
3. Отмахов Н.А. Нейрональная сеть гиппокампа: морфологический анализ // *Усп. физиол. наук.* – 1992. – Т. 24. – № 4. – С. 79–101.
4. Эпштейн О.И., Молодавкин Г.М., Воронина Т.А., Сергеева С.А. Антидепрессивные свойства «Пропротена» и ампитриптилина: сравнительное экспериментальное исследование // *Бюлл. экпер. биол. мед.* – 2003а. – Приложение 1. – С. 34–36.
5. Asztely F., Gustafsson B. Dissociation between long-term potentiation and associated changes in field EPSP waveform in the hippocampal CA1 region: an in vitro study in guinea pig brain // *Hippocampus.* – 1994. – Vol. 4. – № 2. – P. 148–156.
6. Cupello A., Rapallino M.V., Hyden H. Stimulation of 36 Cl-influx into rabbit cerebral cortex microsacs by the endogenous antigen S-100 // *Int. J. Neurosci.* – 1990. – Vol. 54. – № 3–4. – P. 253–258.

7. Epstein O.I., Beregovoy N.A., Sorokina N.S., Starostina M.V., Shtark M.B., Gainutdinov Kh. L., Gainutdinova T. Kh., Muhamedshina D.I. Membrane and synaptic effects of anti-S-100 are prevented by the same antibodies in low concentrations // *Front. Biosci.* – 2003. – Vol. 8. – P. A79.

8. Melani R., Rebaudo R., Balestrino M., Cupello A., Haglid K., Hyden H. Involvement of S-100 protein in anoxic long-term potentiation // *Brain Res.* – 1999. – Vol. 840. – № 1–2. – P. 171–174.

9. Steele P.M., Mauk M.D. Inhibitory control of LTP and LTD: stability of synapse strength // *J. Neurophysiol.* – 1999. – Vol. 81. – № 4. – P. 1559–1566.

10. Walker M.C., Ruiz A., Kullmann D.M. Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapse // *Neuron.* – 2001. – Vol. 29. – P. 703–715.

References

1. Voronina T.A., Molodavkin G.M., Sergeeva S.A., Jepshtejn O.I. Anksioliticheskiy jeffekt «Proprotena» v uslovijah nakazuemogo i nenakazuemogo povedeniya, *Bjull. jeksper. biol. med.* 2003a. Prilozhenie 1. pp. 31–33.

2. Voronina T.A., Molodavkin G.M., Sergeeva S.A., Jepshtejn O.I. GAMK-jergicheskaja sistema v realizacii anksioliticheskogo dejstvija «Proprotena»: jeksperimental'noe issledovanie, *Bjull. jeksper. biol. med.* 2003b. Prilozhenie 1. pp. 37–39.

3. Otmahov N.A. Nejronal'naja set' gippokampa: morfologicheskij analiz, *Usp. fiziol. nauk.* 1992. T. 24. no. 4. pp. 79–101.

4. Jepshtejn O.I., Molodavkin G.M., Voronina T.A., Sergeeva S.A. Antidepressivnye svojstva «Proprotena» i ampitriptilina: sravnitel'noe jeksperimental'noe issledovanieju, *Bjull. jeksper. biol. med.* 2003a. Prilozhenie 1. pp. 34–36.

5. Asztely F., Gustafsson B. Dissociation between long-term potentiation and associated changes in field EPSP waveform in the hippocampal CA1 region: an in vitro study in guinea pig brain, *Hippocampus.* 1994. Vol. 4. no. 2. pp. 148–156.

6. Cupello A., Rapallino M.V., Hyden H. Stimulation of 36 Cl-influx into rabbit cerebral cortex microsacs by the endogenous antigen S-100, *Int. J. Neurosci.* 1990. Vol. 54. no. 3–4. pp. 253–258.

7. Epstein O.I., Beregovoy N.A., Sorokina N.S., Starostina M.V., Shtark M.B., Gainutdinov Kh.L., Gainutdinova T.Kh., Muhamedshina D.I. Membrane and synaptic effects of anti-S-100 are prevented by the same antibodies in low concentrations, *Front. Biosci.* 2003. Vol. 8. pp. A79.

8. Melani R., Rebaudo R., Balestrino M., Cupello A., Haglid K., Hyden H. Involvement of S-100 protein in anoxic long-term potentiation, *Brain Res.* 1999. Vol. 840. no. 1–2. pp. 171–174.

9. Steele P.M., Mauk M.D. Inhibitory control of LTP and LTD: stability of synapse strength, *J. Neurophysiol.* 1999. Vol. 81. no. 4. pp. 1559–1566.

10. Walker M.C., Ruiz A., Kullmann D.M. Monosynaptic GABAergic signaling from dentate to CA3 with a pharmacological and physiological profile typical of mossy fiber synapse, *Neuron.* 2001. Vol. 29. pp. 703–715.

Рецензенты:

Ратушняк А.С., д.б.н., зав. лабораторией «Биомедицинская информатика», ФГБУН «Конструкторско-технологический институт вычислительной техники Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск;

Запара Т.А., д.б.н., ведущий научный сотрудник, ФГБУН «Конструкторско-технологический институт вычислительной техники Сибирского отделения Российской академии наук», г. Новосибирск.

Работа поступила в редакцию 11.04.2013.