

АКТИВАЦИЯ КАННАБИНОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ ПОДАВЛЯЕТ ГИПЕРВОЗБУЖДЕНИЕ НЕЙРОНАЛЬНЫХ СЕТЕЙ ГИППОКАММПА КРЫСЫ *IN VITRO*

© 2023 г. С. А. Майоров^а, Б. К. Кайрат^б, С. Г. Гайдин^а,
А. М. Косенков^а, В. П. Зинченко^{а, *}

^аИнститут биофизики клетки РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН,
Пушино, Московская обл., 142290 Россия

^бКазахский национальный университет имени аль-Фараби,
Алматы, 050040 Республика Казахстан

*e-mail: vprz@mail.ru

Поступила в редакцию 27.12.2022 г.

После доработки 03.02.2023 г.

Принята к публикации 06.02.2023 г.

Каннабиноидные (CB) рецепторы играют ключевую роль в различных физиологических процессах в организме, включая нейрогенез, синаптическую пластичность, иммунную модуляцию, апоптоз, а также участвуют в регуляции метаболизма, деятельности сердечно-сосудистой и репродуктивной систем. Поскольку многие каннабиноидные рецепторы подавляют гипервозбуждение и защищают клетки от гибели, то методы модуляции их активности имеют терапевтические перспективы при лечении таких патологий нервной системы, как психические расстройства, эпилепсия, болезни Паркинсона и Гентингтона, рассеянный склероз, травмы спинного и головного мозга. В данной работе приведены экспериментальные данные, демонстрирующие эффекты агониста каннабиноидных рецепторов WIN 55,212-2 на индуцированные осцилляции внутриклеточной концентрации Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) в двух клеточных моделях эпилептиформной активности. Для исследования нейропротекторных свойств WIN 55,212-2 гипервозбуждение вызывали добавлением антагониста ГАМК(A)-рецепторов, бикукуллина, или возбуждающих доз хлорида аммония. Как показали эксперименты, WIN 55,212-2 в концентрации от 100 нМ и выше заметно подавляет частоту кальциевых колебаний и снижает базальный уровень $[Ca^{2+}]_i$. При этом амплитуда колебаний в присутствии агониста также снижалась. WIN 55,212-2 в концентрации 2 мкМ подавлял вызванные хлоридом аммония кальциевые колебания во всех нейронах, но вызывал импульсное бифазное повышение базального уровня $[Ca^{2+}]_i$ в 20% астроцитов. Таким образом, в данной работе с использованием различных моделей гипервозбуждения нейрональных сетей продемонстрировано потенциальное противоэпилептическое действие агониста каннабиноидных рецепторов WIN 55,212-2.

Ключевые слова: каннабиноидные рецепторы, внутриклеточный кальций, астроциты, нейроны, гипервозбуждение нейрональных сетей

DOI: 10.31857/S0233475523030076, **EDN:** EWTFEV

ВВЕДЕНИЕ

Гипервозбуждение в нейрональных сетях головного мозга возникает вследствие травм или дегенеративных процессов и является ключевым патофизиологическим механизмом при некоторых неврологических заболеваниях, таких как эпилепсия, начальная стадия инсульта, болезнь Альцгеймера [1, 2]. Длительное гипервозбуждение может быть причиной повреждения и гибели отдельных популяций нейронов в мозге [3]. На сегодняшний день стратегия лечения многих нейродегенеративных нарушений основана на снятии гипервозбуждения путем прямого подавления активности опосредующих возбуждение нейронов ионных

каналов и рецепторов. Эта стратегия не всегда работает успешно, поскольку некоторые пациенты с неврологическими расстройствами невосприимчивы к традиционному медикаментозному лечению, что требует разработки нового более селективного неинвазивного терапевтического подхода [4, 5]. Альтернативными кандидатами для использования в качестве терапевтических соединений рассматриваются агонисты каннабиноидных (CB) рецепторов.

Каннабиноидные рецепторы представляют собой класс сопряженных с G_i -белками рецепторов, которые опосредуют биологические эффекты фитоканнабиноидов, эндоканнабиноидов и

синтетических каннабимиметических соединений [6]. Рецепторы этого семейства широко распространены в организме человека и их разделяют на два типа: СВ₁-рецепторы и СВ₂-рецепторы. СВ₁-рецепторы в основном экспрессируются в центральной нервной системе (ЦНС) [7]. Они привлекают к себе большое внимание, поскольку участвуют в модуляции различных функций мозга, включая формирование памяти и эмоционального компонента поведения, либо посредством прямого воздействия продуктов эндоканнабиноидной системы, либо через воздействие на глутаматергическую, ГАМКергическую и дофаминергическую системы. Нокаут гена СВ₁-рецептора у мышей вызывает спонтанные судороги и оказывает проконвульсантный эффект в каинатной и пилокарпиновой моделях эпилепсии [8, 9]. Ранее считалось, что в отличие от СВ₁-рецептора, СВ₂-рецепторы преимущественно экспрессируются в тканях/органах иммунной системы, таких как селезенка, миндалина, тимус и лимфоидные ткани [10]. Однако при определенных заболеваниях СВ₂-рецепторы индуцибельно экспрессируются в ЦНС. Вначале было показано, что при нейродегенеративных расстройствах, например, при болезни Гентингтона, экспрессия СВ₂-рецепторов в головном мозге значительно повышается [11]. Затем функциональные СВ₂-рецепторы были обнаружены во всей ЦНС. СВ₂-рецепторы в основном локализованы постсинаптически, и их активация приводит к гиперполяризации нейронов и, следовательно, к снижению возбудимости [12–15].

Доказано, что каннабиноиды обладают противосудорожными свойствами [16]. СВ₁-рецепторы могут модулировать нейротрансмиссию, подавляя высвобождение ГАМК и глутамата из пресинаптических терминалей. Этот ретроградный процесс был предложен в качестве основного механизма нейропротекторного действия эндогенных каннабиноидов против глутаматной эксайтотоксичности – патологического процесса, характерного для многих неврологических расстройств, включая эпилепсию и нейродегенеративные заболевания [7, 17–19]. Несмотря на многочисленные публикации, демонстрирующие участие СВ-рецепторов в защите мозга от гипервозбуждения, полное понимание механизмов противоэпилептического действия каннабиноидов отсутствует. Проблема состоит не только в том, что известны не все эндогенные каннабиноиды (ECBs), рецепторы и ферменты (фосфодиэстеразы), производящие ECBs, но и в том, что СВ-рецепторы мозга могут быть локализованы в разных типах тормозных [20] и возбуждающих [21] нейронов как пресинаптически, так и постсинаптически. СВ-рецепторы нейронов сопряжены с G_{i/o}-белками, мишенями которых являются аденилатциклаза,

потенциал-зависимые кальциевые и калиевые каналы. В зависимости от локализации рецептора, тормозной потенциал их активаторов будет преимущественно реализовываться либо через уменьшение концентрации Ca²⁺, либо через изменение электрического потенциала. Также стоит отметить, что СВ-рецепторы обнаружены и на астроцитах, где они активируют каскад кальциевой сигнализации с участием фосфолипазы C [22]. Показано, что кальциевый сигнал в астроцитах вызывает секрецию глутамата, ГАМК, АТР [23, 24], которые модулируют функциональную активность нейронов.

На сегодняшний день синтезировано большое количество агонистов каннабиноидных рецепторов, в том числе и полных агонистов (активируют СВ₁- и СВ₂-рецепторы), таких как WIN 55,212, mAEA, HU210 и другие, однако их применение в качестве лекарственных средств все еще ограничено, что объясняется не только до конца неизученными молекулярными механизмами, но и наркотическим потенциалом, способностью нарушать когнитивные функции, в том числе кратковременную память, а также сравнительно быстрым развитием толерантности в отношении их наиболее важных эффектов [25]. К тому же известные агонисты СВ-рецепторов не обладают специфичностью в отношении отделов головного мозга. Данная работа посвящена изучению эффектов наиболее часто используемого в исследованиях и демонстрирующего умеренную селективность по отношению к СВ₁-рецепторам агониста каннабиноидных рецепторов WIN 55,212-2 на индуцированные осцилляции внутриклеточной концентрации Ca²⁺ в различных клеточных моделях эпилептиформной активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все эксперименты в данном исследовании были проведены в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях.

Приготовление культуры клеток. В экспериментах использовались смешанные культуры клеток гиппокампа, выделенные из головного мозга новорожденных крыс линии Wistar (1–3 дневного возраста). Извлеченный после декапитации гиппокамп помещали в холодный раствор Версена, не содержащий ионов Ca²⁺ и Mg²⁺, и измельчали ножницами. Для ферментативной деградации фрагментов ткани, измельченный биоматериал инкубировали с добавлением 1% раствора трипсина в течение 10 мин при 37°C при постоянном перемешивании на шейкере (600 об/мин). После этого ткань отмывали холодной средой Neurobasal-A для инактивации трипсина. Затем фрагмен-

ты ткани осторожно пипетировали, а крупные неизмельченные фрагменты осторожно удаляли. Полученную суспензию клеток центрифугировали в течение 3 мин при 500g и удаляли супернатант. Клетки ресуспендировали в среде Neurobasal-A с добавлением бессывороточного супплемента B-27 (2%), глутамина (0.5 mM), пенициллина-стрептомицина (1 : 100). После этого клетки высеивали на круглые покровные стекла диаметром 25 мм, предварительно покрытые полиэтиленмином и помещенные в стерильные чашки Петри диаметром 35 мм. Клетки культивировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в среде с содержанием 5% CO₂ и влажности 95%. Одну треть объема среды для культивирования клеток заменяли свежей средой каждые 3–4 дня. В экспериментах использовали культуры клеток в возрасте 13–14 дней *in vitro* (DIV).

Флуоресцентная визуализация изменений [Ca²⁺]_i.

Для регистрации изменений [Ca²⁺]_i в клетках гиппокамп использовали ратиометрический Ca²⁺-чувствительный зонд Fura-2. Клетки загружали зондом (5 мкМ), растворенным в сбалансированном солевом растворе Хэнкса (HBSS), содержащем (в mM): 156 NaCl, 3 KCl, 2 MgSO₄, 1.25 KH₂PO₄, 1.5 CaCl₂, 10 глюкозы, 10 HEPES, pH 7.35. Культуру клеток инкубировали с зондом в течение 40 мин при 37°C с последующей отмывкой. Для визуализации флуоресценции Fura-2 использовали моторизованный инвертированный микроскоп Leica DMI6000B (Leica Microsystems, Германия) с объективом HC PL APO 20×/0.7 IMM. Микроскоп был оснащен высокоскоростной монохромной CCD-камерой Hamamatsu C9100 и системой быстрой замены фильтров возбуждения Leica's Ultra-Fast Filter Wheels (период переключения 10–30 мс), которая позволяет обнаруживать быстрые изменения [Ca²⁺]_i. В качестве источника возбуждения использовался осветитель Leica EL6000 с ртутной лампой высокого давления HBO 103 W/2. Возбуждение и регистрацию флуоресценции Fura-2 осуществляли с помощью набора фильтров FU2 (Leica Microsystems) с фильтрами возбуждения BP340/30 и BP387/15, светоделителем FT410 и фильтром эмиссии BP510/84. Изменения [Ca²⁺]_i представлены в виде соотношения 340/387, полученного из кадровых серий изображений после вычитания фона. *N* — количество клеток, проанализированных в каждом индивидуальном эксперименте, *n* — количество независимых повторов.

Индукция колебаний [Ca²⁺]_i в нейронах. В работе использовали две модели индукции регулярных высокоамплитудных колебаний [Ca²⁺]_i (кальциевых колебаний) в нейронах для изучения влияния агониста каннабиноидных рецепторов на активность нейрональных сетей. Первая модель предполагает использование конкурентного антаго-

ниста ГАМК(А)-рецепторов, бикукуллина (10 мкМ). Блокирование ГАМК(А)-рецепторов приводит к гипервозбуждению нейрональных сетей. Вторая модель основана на использовании высоких доз ионов аммония. Аммоний (NH₃/NH₄⁺) является токсичным веществом и его концентрация в головном мозге может повышаться до 5 mM при дисфункции печени [26]. Кроме того, концентрация аммония может достигать 16 mM при абсцессах головного мозга [27]. В предыдущей работе мы показали, что концентрация 8 mM хлорида аммония (NH₄Cl) может вызывать высокочастотные кальциевые колебания в нейронах [28]. Исходя из этого, мы использовали эту концентрацию в наших экспериментах для получения регулярных кальциевых колебаний.

Иммуноцитохимическое окрашивание. Для идентификации астроцитов использовали иммуноцитохимический метод. Поскольку измерения [Ca²⁺]_i и регистрацию флуоресценции антител проводили на разных микроскопах, то для совмещения изображений на обратную сторону круглого покровного стекла с культурой клеток тонким маркером наносили сетку с шагом 2 мм. В обоих микроскопах изображение сетки совмещалось с изображением перекрестия окуляра. После регистрации кальциевого сигнала клетки фотографировали в режиме фазово-контрастной микроскопии и каждую клетку нумеровали. Затем клетки фиксировали и анализировали иммуноцитохимически с использованием антител против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP). Клетки фиксировали 4% параформальдегидом в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 20 мин и трижды промывали ледяным PBS в течение 5 мин. Для пермеабилзации клетки обрабатывали 0.1% раствором Тритона X-100 в течение 15 мин. Для блокирования неспецифических сайтов связывания антител фиксированные клетки инкубировали в 10% сыворотке козы в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем клетки инкубировали с первичными антителами мыши против GFAP в течение 12 ч при 4°C (1 : 200 в 1% сыворотке козы). Фиксированные клетки затем промывали PBS (3 раза в течение 5 мин) и обрабатывали вторичными антителами козы против антител мыши, конъюгированными с Alexa Fluor 647 (1 : 200 в PBS) в соответствии с руководством производителя (Abcam, Великобритания). Для окрашивания ДНК в фиксированных клетках использовали ДНК-специфический флуоресцентный зонд Hoechst 33342. Флуоресценцию антител регистрировали с помощью инвертированного конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия) при возбуждении HeNe-лазером с длиной волны возбуждения 633 нм и регистрации при 655–700 нм.

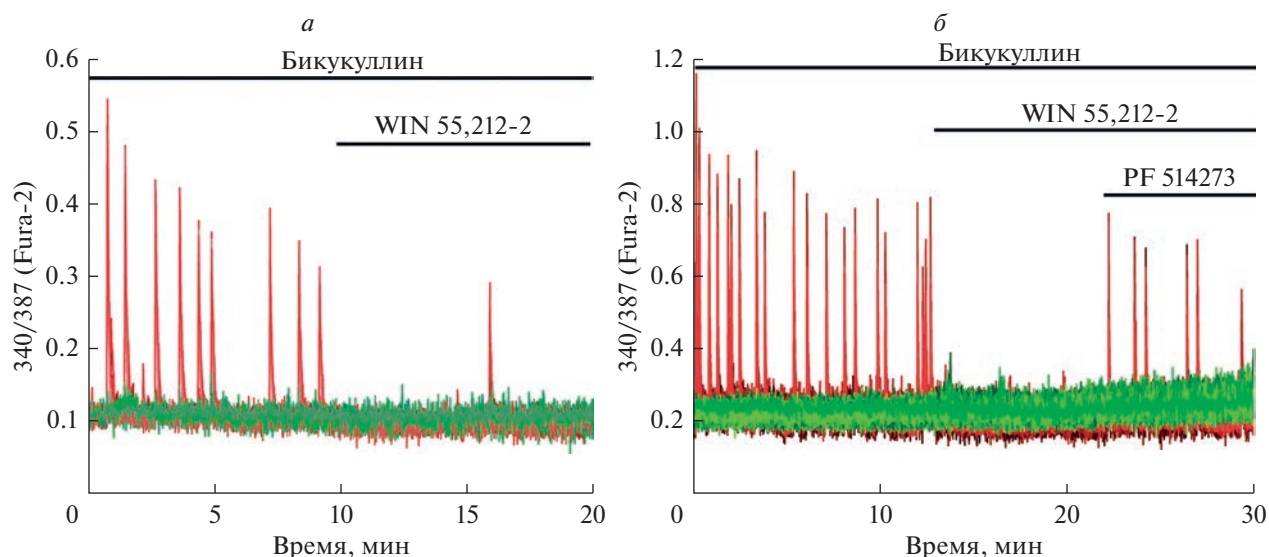


Рис. 1. *а* – Влияние агониста каннабиноидных рецепторов WIN 55,212-2 (1 мкМ) на индуцированные бикикуллином (10 мкМ) осцилляции внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в нейронах (красные кривые). ($N = 100$, $n = 4$). *б* – Антагонист CB_1 -рецепторов PF 514273 (500 нМ) отменяет действие WIN 55,212-2 (1 мкМ) на индуцированные бикикуллином кальциевые осцилляции. ($N = 100$, $n = 4$). Зеленые кривые – не отвечающие на аппликацию бикикуллина глиальные клетки.

Реагенты. В экспериментах использовались следующие реагенты: NaCl, KCl, MgSO_4 , KH_2PO_4 , CaCl_2 , глюкоза, полиэтиленгликоль, пенициллин-стрептомицин, глутамин, хлорид аммония (Sigma-Aldrich, США); среда Neurobasal-A, суплемент B-27, трипсин (1%), сыворотка козы (Life Technologies, США); Fura-2 AM, Hoechst 33342 (Molecular Probes, США); (–)-Bicuculline methochloride, WIN 55,212-2, PF 514273 (Tocris Bioscience, Великобритания); HEPES (Диаэм, Россия); антитело мыши к GFAP, антитело козы к антителам мыши (Alexa Fluor 647, Abscam, Великобритания).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как отмечено выше, для исследования нейротрофических свойств агониста CB -рецепторов WIN 55,212-2 в данной работе использовались модели гипервозбуждения, индуцированного бикикуллином и высокими дозами хлорида аммония. Концентрация бикикуллина во всех сериях экспериментов составляла 10 мкМ, а аммония (NH_4Cl) 8 мМ, так как оба соединения в этих концентрациях могут вызывать регулярные кальциевые колебания на определенной стадии развития нейрональной сети. Однако концентрация аммония 8 мМ считается относительно высокой и может вызывать побочные эффекты, в том числе сдвиг значения pH внутриклеточной среды в кислую сторону. Чтобы свести к минимуму влияние изменений pH, добавление WIN 55,212-2 проводили через 3 мин после добавления аммония, так

как после этого временного интервала значения внутриклеточного pH выходят на стационарный уровень [29].

На рис. 1 показано, что бикикуллин вызывает кальциевые колебания, а добавление в среду WIN 55,212-2 в концентрации от 100 нМ и выше заметно подавляет эти колебания. Полное подавление индуцированных бикикуллином осцилляций $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в случае бикикуллина наблюдалось при концентрации WIN 55,212-2 ≥ 1 мкМ. В свою очередь антагонист каннабиноидных CB_1 -рецепторов PF 514273 (значения K_i 1 и >10000 нМ для CB_1 - и CB_2 -рецепторов соответственно) отменял действие WIN 55,212-2, демонстрируя, что эффект подавления осцилляций был обусловлен активацией CB_1 -рецепторов.

Из рис. 2а видно, что добавление хлорида аммония также индуцировало высокочастотные кальциевые колебания и увеличение базальной $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нейронах. Кроме того, небольшое повышение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ наблюдалось в группе клеток, которые методом иммуноцитохимического окрашивания были идентифицированы как астроциты (рис. 2а, зеленые стрелки; рис. 2б, белые стрелки). Следует отметить, что добавление в среду WIN 55,212-2 в концентрации ≥ 2 мкМ на фоне хлорида аммония вызывало подавление кальциевых колебаний во всех нейронах, в то время как в астроцитах (приблизительно 20% всех GFAP-положительных клеток в культуре) наблюдалось бифазное повышение базального уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

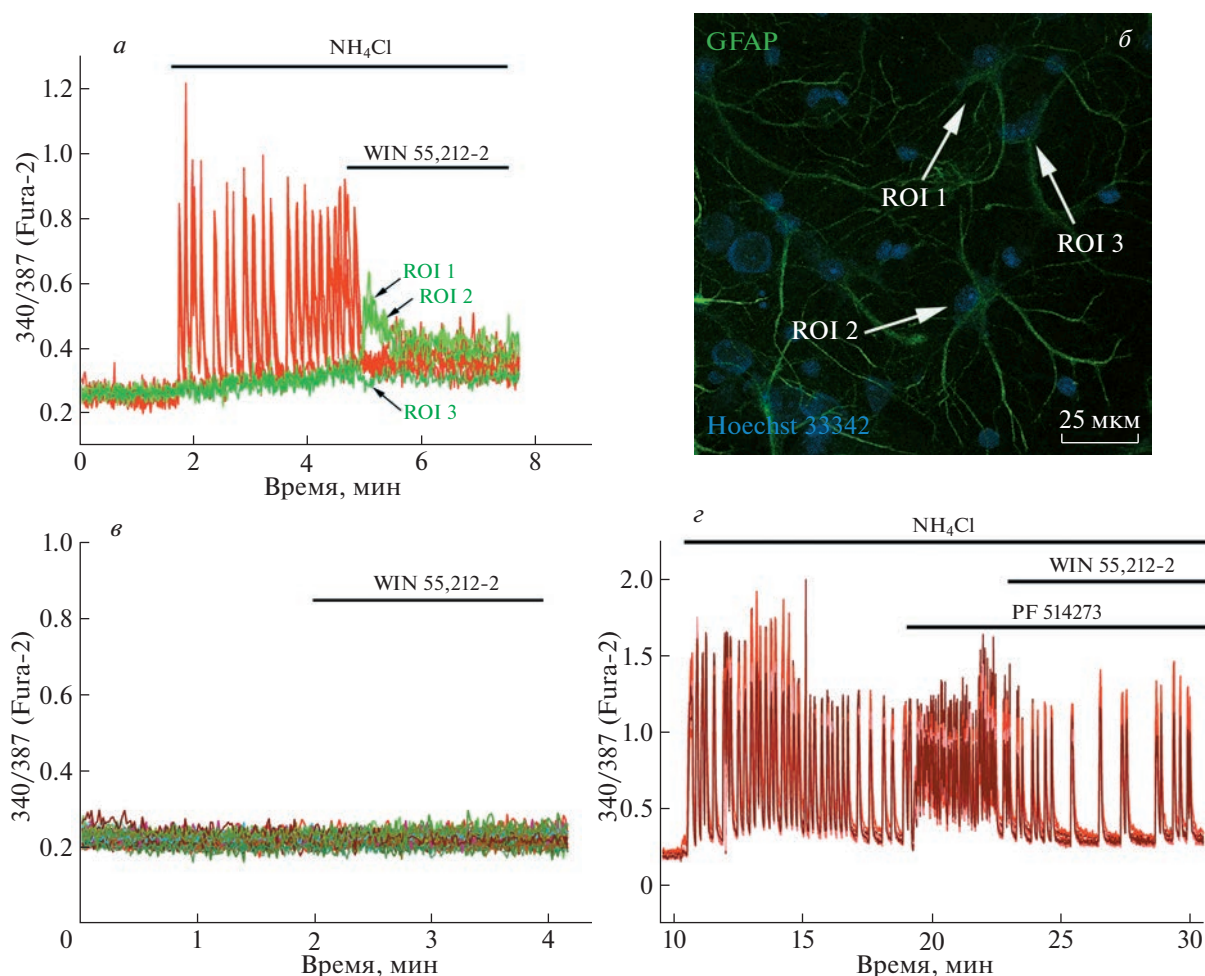


Рис. 2. *a* – Аппликация WIN 55,212-2 (2 мкМ) подавляет индуцированные хлоридом аммония осцилляции $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и вызывает импульсное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроцитах ($N = 100$, $n = 5$). *б* – Иммуноцитохимическое окрашивание клеточных культур антителами к селективному маркеру астроцитов, глияльному кислому фибриллярному белку (GFAP). Стрелками указаны астроциты, изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в которых показаны на панели *a*. Для окрашивания ядер клеток использовали краситель Hoechst 33342. *в* – Аппликация WIN 55,212-2 (2 мкМ) в отсутствие каких-либо воздействий ($N = 100$, $n = 3$). *г* – Частичная отмена активирующего действия антагониста СВ₁-рецепторов PF 514273 (500 нМ) агонистом СВ₁- и СВ₂-рецепторов WIN 55,212-2 (2 мкМ). ($N = 100$, $n = 3$).

СВ₁- и СВ₂-рецепторы сопряжены с G_i-белком, альфа субъединица которого ингибирует аденилатциклазу и уменьшает продукцию cAMP [10, 19]. В свою очередь, как было показано ранее, в том числе и нами, бета-гамма субъединица G_i-сопряженных рецепторов может быть вовлечена в высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо при участии фосфолипазы C [30–33]. Активация этого сигнального каскада может объяснить бифазный ответ астроцитов на аппликацию WIN 55,212-2, представленный на рис. 2. Интересным является тот факт, что бифазный ответ наблюдается только в случае гипервозбуждения, индуцированного хлоридом аммония, тогда как в случае биккуллина (рис. 1) и без каких-либо воздействий (рис. 2в) астроциты не отвечают би-

фазным увеличением $[\text{Ca}^{2+}]_i$ на аппликацию WIN 55,212-2. Согласно устоявшейся концепции, в условиях острой гипераммониемии аммоний проникает в клетки в первые секунды воздействия в виде молекулы аммиака (NH_3) [34], достаточно легко проходящей через липидный бислой цитоплазматической мембраны. По причине того что молекулы аммиака являются акцепторами протонов, их быстрое накопление в клетках должно сопровождаться резким повышением внутриклеточного pH. Ранее в экспериментах с острой гипераммониемией мы продемонстрировали кратковременное защелачивание внутриклеточной среды, которое затем сменялось значительным длительным закислением [29]. Причиной закисления является медленный вход NH_4^+

через ионные каналы и транспортеры. Ионы аммония, в свою очередь, являются донорами протонов, которые, высвобождаясь при диссоциации, приводят к понижению pH. Как показали наши эксперименты, закисление внутриклеточной среды в условиях гипераммониемии происходит уже через 2–3 мин воздействия аммония [29]. Добавление WIN 55,212-2 происходило спустя 3 мин воздействия хлорида аммония. Следовательно, можно предположить, что ответ астроцитов на WIN 55,212-2 в условиях гипераммониемии и его отсутствие в экспериментах без каких-либо дополнительных воздействий связано с изменениями внутриклеточного pH. Следует отметить, что для сопряженных с G-белками рецепторов показана pH-чувствительность и зависимость активируемого сигнального каскада от pH среды [35, 36]. Этот факт может свидетельствовать в пользу выдвинутого предположения.

Астроциты передают информацию, полученную от соседних клеток ЦНС, и генерируют сигналы на локальном или сетевом уровне с помощью Ca^{2+} -зависимой секреции глioneйротрансмиттеров [23, 37]. Кальциевые импульсы и волны в астроцитах рассматриваются в качестве основного способа передачи сигналов внутри астроцитарного синцития. Однако механизмы и последствия астроцитарной Ca^{2+} -сигналикации все еще недостаточно изучены. Эндоканнабиноиды, активируя внутриклеточные Ca^{2+} -сигнальные каскады, вовлекают астроциты в модуляцию синаптической пластичности [38]. Ранее увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в астроцитах в ответ на добавление WIN 55,212-2 было показано для астроцитов супрахиазматического ядра. Этот эффект, как сообщают авторы, опосредован активацией CB_1 -рецепторов [39]. Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в астроцитах может приводить к секреции различных глioneйротрансмиттеров, включая глутамат, АТР и ГАМК [23]. Как было показано ранее, Ca^{2+} -зависимая секреция ГАМК астроцитами может объяснить подавление агонистами α_2 -адренергических рецепторов индуцированных аммонием колебаний [30]. Можно предположить, что подавление колебаний WIN 55,212-2 (рис. 2) также происходит за счет ГАМК, секретруемого астроцитами. Однако ингибирующее действие WIN 55,212-2 связано не только с астроцитами. Подавление колебаний, индуцированных биккуллином, по всей видимости, связано с действием WIN 55,212-2 на нейрональные рецепторы.

Чтобы выявить возможное участие CB_2 -рецепторов в регуляции активности нейрональной сети при действии хлорида аммония, агонист CB_1 -/ CB_2 -рецепторов WIN 55,212-2 добавляли на фоне селективного антагониста CB_1 -рецепторов PF 514273. PF 514273 в избыточной концен-

трации ≥ 200 нМ, существенно увеличивал частоту осцилляций $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и повышал базальный уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рис. 2e), что указывает на резидентную роль CB_1 -рецепторов в торможении сети нейронов при аппликации хлорида аммония. Концентрация 200 нМ также в 50 раз меньше его K_i к CB_2 -рецептору, что практически исключает воздействие на этот рецептор. Дальнейшая аппликация WIN 55,212-2 (2 мкМ) привела к уменьшению частоты осцилляций $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и понижению базального уровня $[\text{Ca}^{2+}]_i$. В сумме эти факты указывают на участие и CB_2 -рецепторов в торможении активности сети нейронов при гипервозбуждении, индуцированном хлоридом аммония. Следует отметить, что активация CB_2 -рецепторов не прерывает колебания, но понижает уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Научные открытия в области исследования каннабиноидов продемонстрировали, что, действуя через CB_1 - и CB_2 -рецепторы, они облегчают симптомы, связанные с гипервозбуждением нейронов в сети. В моделях рассеянного склероза и болезни Гентингтона активация CB_1 -рецепторов значительно снижала спазм и тремор, а экзогенное применение агониста каннабиноидных рецепторов 2-арахидоноилглицерина (2-AG) оказывало нейропротекторное действие после черепно-мозговой травмы [6, 7, 40]. Кроме того, в *in vitro* и *in vivo* исследованиях ишемии каннабиноиды значительно снижали эксайтотоксическую гибель нейрональных клеток, вызванную избыточной секрецией глутамата. Считается, что эти эффекты каннабиноидов связаны с подавлением секреции этого нейротрансмиттера за счет ингибирования активности пресинаптических потенциал-зависимых кальциевых каналов [41]. На молекулярном уровне противосудорожный механизм действия каннабиноидов все еще недостаточно изучен. Модуляция высвобождения нейротрансмиттеров за счет активации пресинаптических CB_1 -рецепторов может рассматриваться в качестве одного из механизмов противосудорожных свойств каннабиноидов. Известно, что активация CB_1 -рецептора уменьшает вход ионов кальция через N- и P/Q-типы Ca^{2+} -каналов, результатом чего является снижение Ca^{2+} -зависимого высвобождения глутамата [42], при этом не исключается влияние на секрецию ГАМК. Хотя глутамат имеет ключевое значение для нормальной нейротрансмиссии, повышение его уровня в межклеточном пространстве приводит к эксайтотоксичности. Поэтому для снижения высвобождения данного нейромедиатора можно использовать каннабиноиды. Активация CB_1 -рецептора также увеличивает проводимость пре- и постсинаптических K^+ -каналов [43]. Повышенная проницаемость K^+ -каналов приводит к снижению мембранного потенциала (гиперполяризации),

что способствует подавлению эпилептиформной активности.

Было также показано, что активация CB_1 -рецепторов в ГАМКергических нейронах ослабляет процессы торможения глутаматергических нейронов в гиппокампе за счет ретроградного действия эндогенных каннабиноидов, высвобождающихся при деполяризации последних. При этом происходит растормаживание постсинаптического нейрона и, следовательно, облегчение передачи возбуждения [44]. Кроме того, Cohen и коллеги продемонстрировали, что ГАМК, которая обычно является ингибирующим нейромедиатором, может в некоторых случаях усиливать возбуждение, синхронизуя аномальные разряды, возникающие при эпилепсии в срезах височной доли мозга человека [45]. Несмотря на то, что механизм этого явления не ясен, наиболее вероятное объяснение противосудорожного действия каннабиноидов при эпилепсии заключается в возможности CB_1 -рецепторов вызывать компенсаторный сдвиг в балансе между ингибированием пресинаптического высвобождения глутамата и ГАМК.

Психоактивные побочные эффекты каннабиноидов усложняют их использование в лечении нейродегенеративных заболеваний, однако понимание молекулярных механизмов действия каннабиноидов может привести к разработке новых соединений, которые не влияют на поведенческую активность. Таким образом, дальнейшее исследование каннабиноидного противосудорожного феномена может пролить свет на новые терапевтические мишени для лечения различных нейродегенеративных нарушений, сопровождаемых гипервозбуждением, а также более четко определить физиологическую функцию, механизмы и сигнальные пути эндоканнабиноидной системы в головном мозге.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источники финансирования. Работа выполнялась в рамках государственного задания ИБК РАН, № 122041300005-4 “Функционирование рецепторов, ионных каналов и внутриклеточных сигнальных систем, механизмы межклеточных коммуникаций в различных типах клеток в норме и при патологиях. Поиск потенциальных мишеней для фармакотерапии”.

Соответствие принципам этики. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vossel K.A., Tartaglia M.C., Nygaard H.B., Zeman A.Z., Miller B.L. 2017. Epileptic activity in Alzheimer's disease. *Lancet Neurology*. **16** (4), 311–322.
2. Chai Z., Ma C., Jin X. 2019. Homeostatic activity regulation as a mechanism underlying the effect of brain stimulation. *Bioelectron Med*. **5**, 16.
3. Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Gaidin S.G., Zinchenko V.P. 2017. Cytokine IL-10, activators of PI3-kinase, agonists of α -2 adrenoreceptor and antioxidants prevent ischemia-induced cell death in rat hippocampal cultures. *Archives Biochem. Biophys.* **615** (1), 35–43.
4. Finnerup N.B., Attal N., Haroutounian S., McNicol E., Baron R., Dworkin R.H., Gilron I., Haanpää M., Hansson P., Jensen T.S., Kamerman P.R., Lund K., Moore A., Raja S.N., Rice A.S.C., Rowbotham M., Sena E., Siddall P., Smith B.H., Wallace M. 2015. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults. *Lancet Neurology*. **14** (2), 162–173.
5. Yoo J.Y., Panov F. 2019. Identification and treatment of drug-resistant epilepsy. *Continuum (Minneapolis, Minn.)*. **25** (2), 362–380.
6. Wu J. 2019. Cannabis, cannabinoid receptors, and endocannabinoid system. *Acta Pharmacol. Sin.* **40** (3), 297–299.
7. Montero-Oleas N., Arevalo-Rodriguez I., Nuñez-González S., Viteri-García A., Simancas-Racines D. 2020. Therapeutic use of cannabis and cannabinoids: An evidence mapping and appraisal of systematic reviews. *BMC Complement. Med. Ther.* **20** (1), 2456.
8. Kow R.L., Jiang K., Naydenov A.V., Le J.H., Stella N., Nathanson N.M. 2014. Modulation of pilocarpine-induced seizures by cannabinoid receptor 1. *PLoS One*. **9** (4), e95922.
9. Marsicano G., Goodenough S., Monory K., Hermann H., Eder M., Cannich A., Azad S.C., Cascio M.G., Gutiérrez S.O., van der Stelt M., López-Rodríguez M.L., Casanova E., Schütz G., Ziegglänsberger W., Di Marzo V., Behl C., Lutz B. 2003. CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science*. **302** (5642), 84–88.
10. Zou S., Kumar U. 2018. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: Signaling and function in the central nervous system. *Int. J. Mol. Sci.* **19** (3), 833.
11. Sagredo O., González S., Aroyo I., Pazos M.R., Benito C., Lastres-Becker I., Romero J.P., Tolón R.M., Mechoulam R., Brouillet E., Romero J., Fernández-Ruiz J. 2009. Cannabinoid CB2 receptor agonists protect the striatum against malonate toxicity. *Glia*. **57** (11), 1154–1167.
12. Chen D.-J., Gao M., Gao F.-F., Su Q.-X., Wu J. 2017. Brain cannabinoid receptor 2. *Acta Pharmacol. Sin.* **38** (3), 312–316.
13. Stempel A.V., Stumpf A., Zhang H.-Y., Özdoğan T., Pannasch U., Theis A.-K., Otte D.-M., Wojtalla A., Rácz I., Ponomarenko A., Xi Z.-X., Zimmer A., Schmitz D. 2016. Cannabinoid type 2 receptors mediate a cell type-specific plasticity in the hippocampus. *Neuron*. **90** (4), 795–809.

14. Stumpf A., Parthier D., Sammons R.P., Stempel A.V., Breustedt J., Rost B.R., Schmitz D. 2018. Cannabinoid type 2 receptors mediate a cell type-specific self-inhibition in cortical neurons. *Neuropharmacology*. **139**, 217–225.
15. Ma Z., Gao F., Larsen B., Gao M., Luo Z., Chen D., Ma X., Qiu S., Zhou Y., Xie J., Xi Z.-X., Wu J. 2019. Mechanisms of cannabinoid CB2 receptor-mediated reduction of dopamine neuronal excitability in mouse ventral tegmental area. *EBioMedicine*. **42**, 225–237.
16. Mason R., Cheer J.F. 2009. Cannabinoid receptor activation reverses kainate-induced synchronized population burst firing in rat hippocampus. *Front. Integr. Neurosci.* **3**, 13.
17. Milano W., Capasso A. 2018. Neuroprotection by cannabinoids in neurodegenerative diseases. *Alzheimers Dement. Cogn. Neurol.* **2** (1), 1–7.
18. Casillas-Espinosa P.M., Ali I., O'Brien T.J. 2020. Neurodegenerative pathways as targets for acquired epilepsy therapy development. *Epilepsia Open*. **5** (2), 138–154.
19. Kendall D.A., Yudowski G.A. 2017. Cannabinoid receptors in the central nervous system. *Front. Cell. Neurosci.* **10**, 9790.
20. Mitchell V.A., Jeong H.-J., Drew G.M., Vaughan C.W. 2011. Cholecystokinin exerts an effect via the endocannabinoid system to inhibit GABAergic transmission in midbrain periaqueductal gray. *Neuropsychopharmacology*. **36** (9), 1801–1810.
21. Sánchez-Blázquez P., Rodríguez-Muñoz M., Garzón J. 2014. The cannabinoid receptor 1 associates with NMDA receptors to produce glutamatergic hypofunction. *Front. Pharmacol.* **4**, 169.
22. Navarrete M., Araque A. 2008. Endocannabinoids mediate neuron-astrocyte communication. *Neuron*. **57** (6), 883–893.
23. Bazargani N., Attwell D. 2016. Astrocyte calcium signaling. *Nat. Neurosci.* **19** (2), 182–189.
24. Navarrete M., Araque A. 2010. Endocannabinoids potentiate synaptic transmission through stimulation of astrocytes. *Neuron*. **68** (1), 113–126.
25. Hryhorowicz S., Kaczmarek-Ryś M., Andrzejewska A., Staszak K., Hryhorowicz M., Korcz A., Słomski R. 2019. Allosteric modulation of cannabinoid receptor 1-current challenges and future opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **20** (23), 5874.
26. Bosoi C.R., Rose C.F. 2009. Identifying the direct effects of ammonia on the brain. *Metab. Brain Dis.* **24** (1), 95–102.
27. Dahlberg D., Ivanovic J., Hassel B. 2016. Toxic levels of ammonia in human brain abscess. *J. Neurosurg.* **124** (3), 854–860.
28. Dynnik V.V., Kononov A.V., Sergeev A.I., Teplov I.Y., Tankanag A.V., Zinchenko V.P., Abulseoud O.A. 2015. To break or to brake neuronal network accelerated by ammonium ions? *PLoS ONE*. **10** (7), e0134145.
29. Gaidin S.G., Zinchenko V.P., Kosenkov A.M. 2020. Mechanisms of ammonium-induced neurotoxicity. Neuroprotective effect of alpha-2 adrenergic agonists. *Archives Biochem. Biophys.* **693**, 108593.
30. Gaidin S.G., Zinchenko V.P., Sergeev A.I., Teplov I.Y., Mal'tseva V.N., Kosenkov A.M. 2020. Activation of alpha-2 adrenergic receptors stimulates GABA release by astrocytes. *Glia*. **68** (6), 1114–1130.
31. Zhu X., Birnbaumer L. 1996. G protein subunits and the stimulation of phospholipase C by Gs- and Gi-coupled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93** (7), 2827–2831.
32. Madukwe J.C., Garland-Kuntz E.E., Lyon A.M., Smrcka A.V. 2018. G protein $\beta\gamma$ subunits directly interact with and activate phospholipase C ϵ . *J. Biol. Chem.* **293** (17), 6387–6397.
33. Enkvist M.O., Hämäläinen H., Jansson C.C., Kukkonen J.P., Hautala R., Courtney M.J., Akerman K.E. 1996. Coupling of astroglial alpha 2-adrenoreceptors to second messenger pathways. *J. Neurochem.* **66** (6), 2394–2401.
34. Ott P., Vilstrup H. 2014. Cerebral effects of ammonia in liver disease. *Metab. Brain Dis.* **29** (4), 901–911.
35. Huang Y., Thathiah A. 2015. Regulation of neuronal communication by G protein-coupled receptors. *FEBS Lett.* **589** (14), 1607–1619.
36. Wang T., Zhou G., He M., Xu Y., Rusyniak W.G., Xu Y., Ji Y., Simon R.P., Xiong Z.-G., Zha X.-M. 2020. GPR68 is a neuroprotective proton receptor in brain ischemia. *Stroke*. **51** (12), 3690–3700.
37. Poskanzer K.E., Yuste R. 2016. Astrocytes regulate cortical state switching in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **113** (19), E2675–84.
38. Bindocci E., Savtchouk I., Liaudet N., Becker D., Carriero G., Volterra A. 2017. Three-dimensional Ca²⁺ imaging advances understanding of astrocyte biology. *Science*. **356** (6339), eaai8185.
39. Hablitz L.M., Gunesch A.N., Cravetich O., Moldavan M., Allen C.N. 2020. Cannabinoid signaling recruits astrocytes to modulate presynaptic function in the suprachiasmatic nucleus. *eNeuro*. **7** (1), ENEURO.0081-19.2020.
40. Abo Youssef N., Schneider M.P., Mordasini L., Ineichen B.V., Bachmann L.M., Chartier-Kastler E., Panicker J.N., Kessler T.M. 2017. Cannabinoids for treating neurogenic lower urinary tract dysfunction in patients with multiple sclerosis. *B.J.U. Int.* **119** (4), 515–521.
41. Abood M.E., Rizvi G., Sallapudi N., McAllister S.D. 2001. Activation of the CB1 cannabinoid receptor protects cultured mouse spinal neurons against excitotoxicity. *Neurosci. Lett.* **309** (3), 197–201.
42. Twitchell W., Brown S., Mackie K. 1997. Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J. Neurophysiol.* **78** (1), 43–50.
43. Ohno-Shosaku T., Kano M. 2014. Endocannabinoid-mediated retrograde modulation of synaptic transmission. *Current Opinion Neurobiol.* **29**, 1–8.
44. Monory K., Polack M., Remus A., Lutz B., Korte M. 2015. Cannabinoid CB1 receptor calibrates excitatory synaptic balance in the mouse hippocampus. *J. Neurosci.* **35** (9), 3842–3850.
45. Cohen I., Navarro V., Clemenceau S., Baulac M., Miles R. 2002. On the origin of interictal activity in human temporal lobe epilepsy in vitro. *Science*. **298** (5597), 1418–1421.

Activation of the Cannabinoid Receptors Suppresses Hyperexcitation of Rat Hippocampal Neuronal Networks *in vitro*

S. A. Maiorov¹, B. K. Kairat², S. G. Gaidin¹, A. M. Kosenkov¹, V. P. Zinchenko¹, *

¹*Institute of Cell Biophysics RAS, FRC PSCBR RAS, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

²*Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, 050040 Kazakhstan*

*e-mail: vpz@mail.ru

Cannabinoid receptors (CBRs) play a key role in various physiological processes, including neurogenesis, synaptic plasticity, immune modulation, cell apoptosis, metabolism regulation, cardiovascular and reproductive systems activity. Since activation of CBRs suppresses hyperexcitation and protect cells from death, their modulation may have therapeutic prospects in the treatment of such pathologies of the nervous system as mental disorders, epilepsy, Parkinson's and Huntington's disease, multiple sclerosis, spinal cord and brain injuries. This paper presents experimental data on the effects of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 on the induced oscillations of intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) in two *in vitro* models of epileptiform activity. To study the neuroprotective properties of WIN 55,212-2, hyperexcitation was induced by the application of a GABA(A) receptor antagonist, bicuculline, or depolarizing doses of ammonium chloride. As experiments have shown, WIN 55,212-2 at a concentration of 100 nM and above significantly suppresses the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillation frequency and reduces the basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ level. At the same time, the amplitude of calcium oscillations also decreased in the presence of the agonist. WIN 55,212-2 at a concentration of 5 μM suppressed NH_4Cl -induced $[\text{Ca}^{2+}]_i$ oscillations in all neurons but caused a transient biphasic increase in the basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ level in 20% of astrocytes. Thus, in this work, using various models of hyperexcitation of neuronal networks, we have demonstrated the potential antiepileptic effect of the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2.

Keywords: cannabinoid receptors, cell calcium, astrocytes, neurons, hyperexcitation of the neuronal networks