

УДК 577.354

## АЦИДОЗ И 5-(*N*-ЭТИЛ-*N*-ИЗОПРОПИЛ)АМИЛОРИД (EIPA) СНИЖАЮТ ЦИНК/КАИНАТНУЮ ТОКСИЧНОСТЬ В КУЛЬТУРАХ ЗЕРНИСТЫХ НЕЙРОНОВ МОЗЖЕЧКА КРЫС

© 2015 Е.В. Стельмашук<sup>1\*</sup>, С.В. Новикова<sup>1</sup>, Г.А. Амелкина<sup>1</sup>,  
Е.Г. Ивашкин<sup>1</sup>, Е.Е. Генрихс<sup>1</sup>, Л.Г. Хаспеков<sup>1</sup>, Н.К. Исаев<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Научный центр неврологии РАМН, 125367 Москва;  
электронная почта: estelmash@mail.ru

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,  
119991 Москва

Поступила в редакцию 10.12.14

ZnCl<sub>2</sub> (0,005 мМ, 3 ч) или каинат (0,1 мМ, 3 ч) оказывали слабое токсическое действие на культивированные зернистые нейроны мозжечка (КЗН), однако одновременная обработка КЗН этими веществами вызвала интенсивную гибель нейронов, которая достоверно снижалась внешним ацидозом (рН 6,5) или 5-(*N*-этил-*N*-изопропил)амилоридом (EIPA, блокатор Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> обмена, 0,03 мМ). Токсическое действие каинат+ZnCl<sub>2</sub> вызывало повышение внутриклеточной концентрации ионов цинка и кальция ([Zn<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> и [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>), что достоверно снижалось ацидозом и усиливалось в присутствии EIPA. Регистрация [Zn<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в отдельных нейронах продемонстрировала, что EIPA усиливает цинковую перегрузку цитозоля нейронов при инкубации в растворе, содержащем Zn<sup>2+</sup>. Предполагается, что ацидоз уменьшает ZnCl<sub>2</sub>/каинатную токсичность посредством снижения входа Zn<sup>2+</sup> в нейрон, тогда как EIPA предотвращает перегрузку цинком систем депонирования этого иона.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** цинк, кальций, каинат, зернистые нейроны мозжечка, ацидоз, EIPA.

Значительная часть глутаматергических синапсов в центральной нервной системе содержат ионы цинка, которые в большей своей части находятся в синаптических везикулах и колокализуются с глутаматом. Высвобождение Zn<sup>2+</sup> при нейрональной активности важно для нормальной физиологической функции головного мозга [1]. Недавно было показано, что Zn<sup>2+</sup> (подобно Ca<sup>2+</sup>) может рассматриваться как вторичный передатчик сигнала клеточной гибели при гипоксии/ишемии и ряде других патофизиологических состояниях головного мозга [2–4]. В норме уровень цитозольного Zn<sup>2+</sup> в нейронах очень низкий по сравнению с суммарным внутриклеточным содержанием этого иона [5], в то время как большая часть внутриклеточного цинка связана со специфическими белками и собрана внутри синаптических везикул. В патофизиологических условиях [Zn<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в нейронах может внезапно возрастать [6–7]. Цинк, вышедший в синаптическую щель транспортируется большей частью через постсинаптическую мембрану, используя Zn<sup>2+</sup>- и Ca<sup>2+</sup>-

проницаемые каналы, ассоциированные с AMPA-рецепторами и потенциал-зависимыми Ca<sup>2+</sup>-каналами [6, 8]. Однако гипоксия/ишемия сопровождается вне- и внутриклеточным ацидозом, который может влиять на проницаемость ионных каналов и внутриклеточный гомеостаз цинка. Показано, что в добавление к кальциевому дисбалансу аккумуляция Zn<sup>2+</sup> системами внутриклеточного депонирования блокируется ацидозом [9]. Внеклеточный ацидоз сопровождается прогрессивным увеличением [Zn<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> в КЗН [10, 11]. Умеренный ацидоз увеличивает опосредованную AMPA/каинатными рецепторами мобилизацию внутриклеточного цинка в кортикальных нейронах [12]. Однако в настоящее время остается неизвестным, как ацидоз может влиять на гибель нейронов, которая опосредована входом цинка в нейроны при активации AMPA/каинатных рецепторов, что может происходить при гипоксии/ишемии головного мозга. Эта проблема была рассмотрена в нашем исследовании, используя КЗН, подвергнутые ацидозу, инициированному закислением инкубационной среды или ингибированием Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-обмена.

\* Адресат для корреспонденции.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Первичные культуры мозжечка крыс.** В работе использовали 7–9-дневные культуры зернистых нейронов мозжечка, полученные из мозга 8-суточных крыс линии Wistar методом ферментно-механической диссоциации [10], которую проводили следующим образом: выделенные мозжечки переносили в пластиковую чашку Петри, заполненную фосфатным буфером, лишенным ионов кальция и магния. Фрагменты ткани инкубировали 15 мин при 37° в фосфатном буфере, который содержал 0,05%-ный трипсин и 0,02%-ную ЭДТА. После инкубации ткань промывали в двух сменах фосфатного буфера и один раз средой культивирования, далее подвергали механической диссоциации в среде культивирования. Культивирование производили в 96-луночных пластиковых планшетах, покрытых полилизинном, или на круглых стеклах, помещенных в пластиковые чашки диаметром 35 мм. Питательная среда содержала: 90% минимальной среды Игла на солях Эрла, 10%-ную эмбриональную телячью сыворотку, 2 мМ глутамин и 10 мМ буфера HEPES, pH 7,2–7,4. В каждую ячейку добавляли 0,1 мл суспензии клеток. Культуры развивались в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 36,5° и относительной влажности 98%. На второй день среда заменялась свежей, содержащей 25 мМ KCl, в которой культивирование клеток продолжали до 7–8 дня *in vitro*.

Все экспериментальные протоколы были одобрены Этическим комитетом «НЦН» РАМН (протокол № 05/10).

**Фармакологическая обработка.** Эксперименты по выживаемости КЗН проводили в сбалансированном солевом растворе следующего состава (в мМ): NaCl 154, KCl 25, CaCl<sub>2</sub> 2,3, MgCl<sub>2</sub> 1, NaHCO<sub>3</sub> 3,6, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,35, HEPES 10, pH 7,3. Умеренный ацидоз создавали, понижая pH солевого раствора до 6,5. Непосредственно в инкубационный раствор вносили 10 мкл на мл ZnCl<sub>2</sub> (0,5 мМ в деионизированной воде), 10 мкл на мл каината (10 мМ в деионизированной воде) и блокатор Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> обмена 5-(*N*-этил-*N*-изопропил)амилорид (30 мМ ЕІРА в DMSO) 1 мкл на мл. Культуры были разделены на 12 групп: без добавок, с добавлением Zn<sup>2+</sup> (0,005 мМ, 3 ч), с добавлением каината (0,1 мМ, 3 ч), с добавлением одновременно Zn<sup>2+</sup> и каината (каинат + ZnCl<sub>2</sub>), причем все вышеперечисленные группы инкубировали в трех вариантах: 1) pH 7,3; 2) pH 6,5; и 3) с добавлением ЕІРА (0,03 мМ), pH 7,3.

**Оценка выживаемости нейронов.** Выживаемость КЗН оценивали как было опубликовано ранее [13]. После эксперимента культуры фиксировали в смеси этанол–формальдегид–уксус-

ная кислота (7 : 2 : 1) и окрашивали трипановым синим. Процент выживших нейронов оценивали подсчетом морфологически интактных ядер КЗН в пяти полях зрения при увеличении объектива ×40. Выживаемость нейронов в необработанных контрольных культурах принимали за 100%, выживаемость в экспериментальных культурах выражали в процентах относительно контроля.

**Определение [Zn<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>.** Клетки загружали 0,005 мМ FluoZin-3 AM или 0,005 мМ Fluo-4 AM 30 мин при 36,5 ± 0,5° с последующим трехкратным отмывом сбалансированным солевым раствором, pH 7,3. Для определения относительного уровня [Zn<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> или [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> использовали микропланшетный флуоресцентный сканер (CytoFluor II, «PerSeptive Biosystems», США). Измерение флуоресценции FluoZin-3 или Fluo-4 производили в 96-луночных культуральных планшетах при возбуждении синим светом с длиной волны 488 нм и регистрировали эмиссию 530 нм. Регистрацию ионов цинка и кальция в отдельных КЗН производили с использованием инвертированного флуоресцентного микроскопа («Olympus», Япония) с имидж-системой в культурах, выращенных на тонких стеклах. Эти культуры помещали в перфузионную камеру (объем 0,2 мл), наблюдение в которой осуществляли с помощью инвертированного микроскопа (объектив ×60, NA 1.42, масляная иммерсия). Изображение регистрировали с помощью 12-битной цифровой камеры и анализировали с использованием программы «Fiji Is Just ImageJ». Изображения регистрировали каждые 5 с при температуре 30°. Вещества вносили и удаляли из камеры с помощью проточной системы. В качестве зоны регистрации использовали все тело отдельного нейрона. Кинетика изменения флуоресценции была исследована в 40–50 нейронах с использованием программы «Microsoft Excell». Флуоресцентные изображения клеток при регистрации Zn<sup>2+</sup> были выполнены при эмиссии 530 нм (ширина полосы пропускания 15 нм) и возбуждении 485 нм (продолжительность импульса освещения 100–200 мс).

**Реагенты.** Питательные среды и их компоненты получены от «Biochrom KG» (Германия). FluoZin-3 AM и Fluo-4AM «Molecular Probes» (США), ЕІРА и другие реагенты «Sigma Chemicals» (Германия).

**Статистический анализ.** Для статистического анализа использовали тест ANOVA с посттестом Newman–Keuls. Отличия между группами считали достоверными при *p* < 0,05. Результаты выражали как среднее ± SEM. Все данные получены на 9 культурах в трех независимых экспериментах.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Влияние EIPA, ацидоза, Zn и каината на выживание КЗН.** Воздействие EIPA (0,03 мМ, 3 ч), ацидоза и  $ZnCl_2$  (0,005 мМ) (каждое в отдельности) оказывало слабое влияние на выживаемость нейронов (рис. 1). Подсчет нейронов с нормальной морфологией после 3 ч обработки культур каинатом (рН 7,3) показал, что выживало  $78 \pm 4\%$  КЗН. Изменение выживаемости КЗН ацидозом (рН 6,5) и EIPA при токсическом действии каината было недостоверно. Добавление в сбалансированный солевой раствор, содержащий  $Zn^{2+}$  (0,005 мМ рН 7,3), каината (0,1 мМ) вызывало интенсивную гибель нейронов в культуре (рис. 1, а, б, пикнотические ядра погибших нейронов показаны стрелками). После 3 ч инкубации в таких условиях выживало только  $26 \pm 2\%$  КЗН. Ацидоз (рН 6,5) или добавление EIPA (0,03 мМ) защищали КЗН от совместного токсического действия каината и  $ZnCl_2$  (каинат +  $ZnCl_2$ , рис. 1).

**Измерение  $[Zn^{2+}]_i$  в культурах.** Изучение влияния добавления цинка в раствор инкубации на  $[Zn^{2+}]_i$  в КЗН производили с помощью микропланшетного флуоресцентного сканера. Обнаружено, что добавление в сбалансированный солевой раствор (рН 7,3) одного  $ZnCl_2$  или совместно с каинатом вызывало возрастание интенсивности флуоресценции FluoZin-3 в культурах через 90 мин в среднем до  $176 \pm 10\%$  и  $210 \pm 22\%$  соответственно, в сравнении с базальным уровнем (рис. 2, а). Внешний ацидоз (рН 6,5) достоверно снижал, а EIPA увеличивал  $[Zn^{2+}]_i$  при экспозиции культур с  $ZnCl_2$  или каинат +  $ZnCl_2$  (рис. 2, а).

**Измерение  $[Ca^{2+}]_i$  в культурах.** Анализ влияния добавления цинка в раствор инкубации на флуоресценцию Fluo-4 в нейрональных культурах производили с помощью микропланшетного флуоресцентного сканера. Обнаружено, что добавление в инкубационный раствор при рН 7,3 как отдельно  $ZnCl_2$  или каината, так и совместно каината +  $ZnCl_2$  вызывало возрастание интенсивности флуоресценции Fluo-4, что указывает на увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  в КЗН через 90 мин в среднем до  $130 \pm 4$ ,  $109 \pm 4$  и  $163 \pm 4\%$  соответственно, в сравнении с базальным уровнем без добавок (рис. 2, б). Внешний ацидоз (рН 6,5) достоверно снижал  $[Ca^{2+}]_i$  при экспозиции культур как с  $ZnCl_2$ , так и с каинат +  $ZnCl_2$ , тогда как EIPA увеличивал интенсивность флуоресценции Fluo-4 в культурах при действии каината или каината +  $ZnCl_2$  (рис. 2, б).

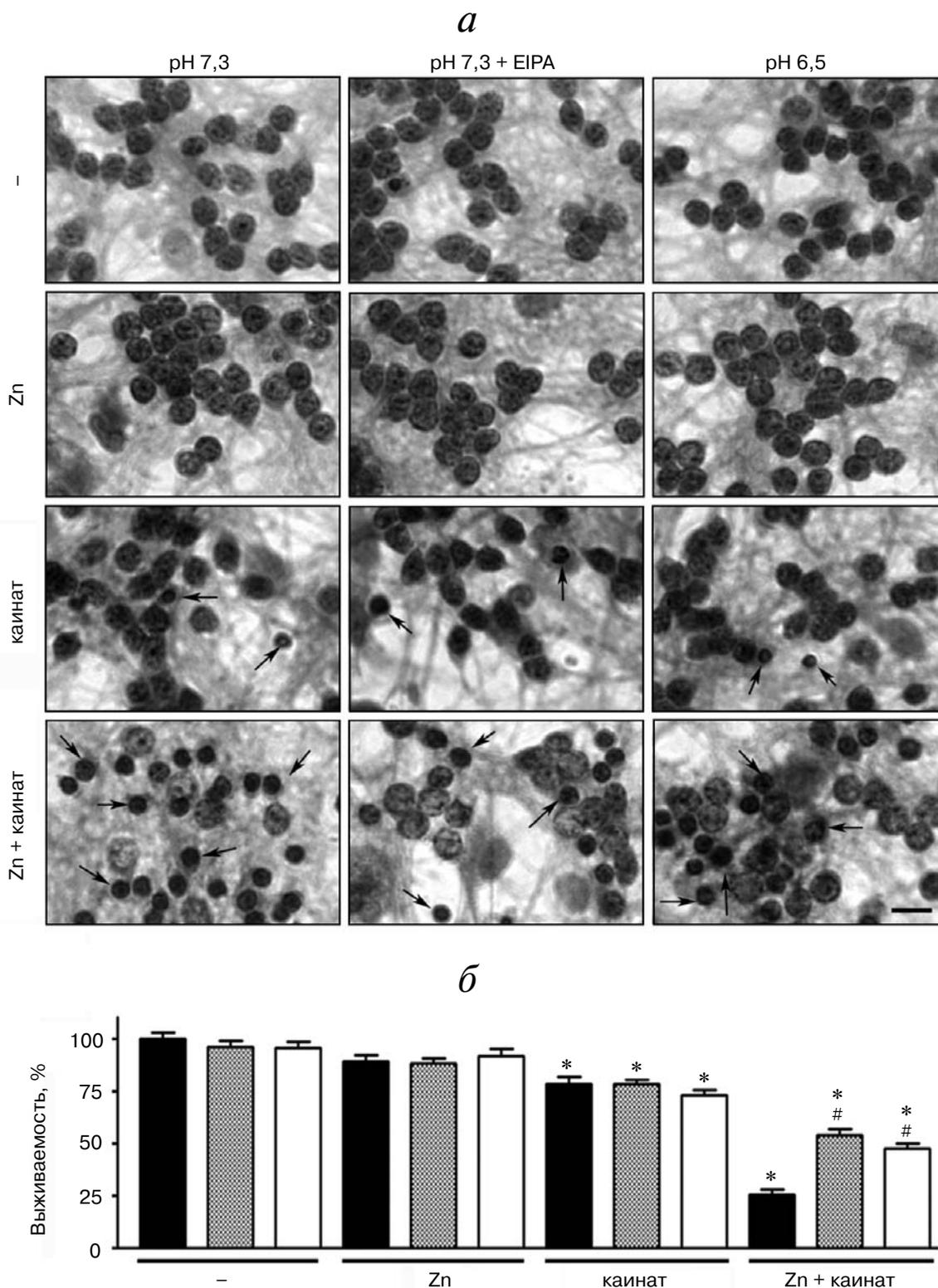
**Измерение динамики  $[Zn^{2+}]_i$  в отдельных нейронах.** Измерение динамики флуоресценции FluoZin-3 в отдельных нейронах производили с помощью флуоресцентной микроскопии с систе-

мой регистрации и анализа изображений. Добавление  $ZnCl_2$  в сбалансированный солевой раствор при рН 7,3 вызывало быстрый рост  $[Zn^{2+}]_i$  в цитоплазме КЗН, по сравнению с базальным уровнем (рис. 3, см. цветную вклейку). Обработка культур EIPA в сбалансированном солевом растворе, содержащем  $Zn^{2+}$ , еще более увеличивала скорость возрастания флуоресценции FluoZin-3 в нейронах (рис. 3). DMSO (растворитель EIPA) в растворе, содержащем  $Zn^{2+}$ , не вызывал подобного эффекта (рис. 4, см. цветную вклейку). Добавление в раствор инкубации только одного EIPA сопровождалось небольшим кратковременным увеличением  $[Zn^{2+}]_i$  (флуоресценции FluoZin-3) в цитоплазме нейронов (рис. 5).

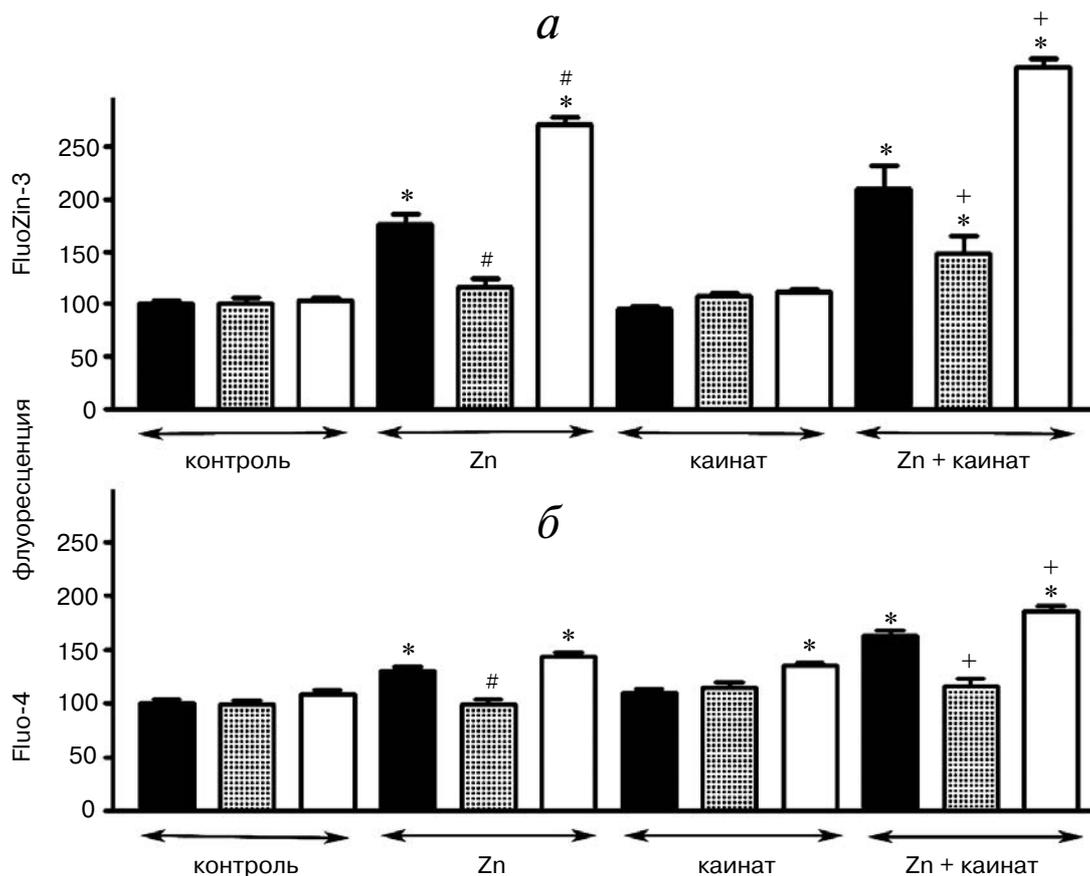
## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Многие терминалы глутаматергических нейронов содержат ионы цинка. Этот катион важен не только для нормального физиологического функционирования головного мозга, но и принимает участие в процессах нейрональной гибели при гипогликемии и ишемии [14–15].  $Zn^{2+}$  вовлечен в развитие и других нейродегенеративных заболеваний таких как болезни Альцгеймера и Паркинсона, а также латерального амиотрофического склероза [16–19].

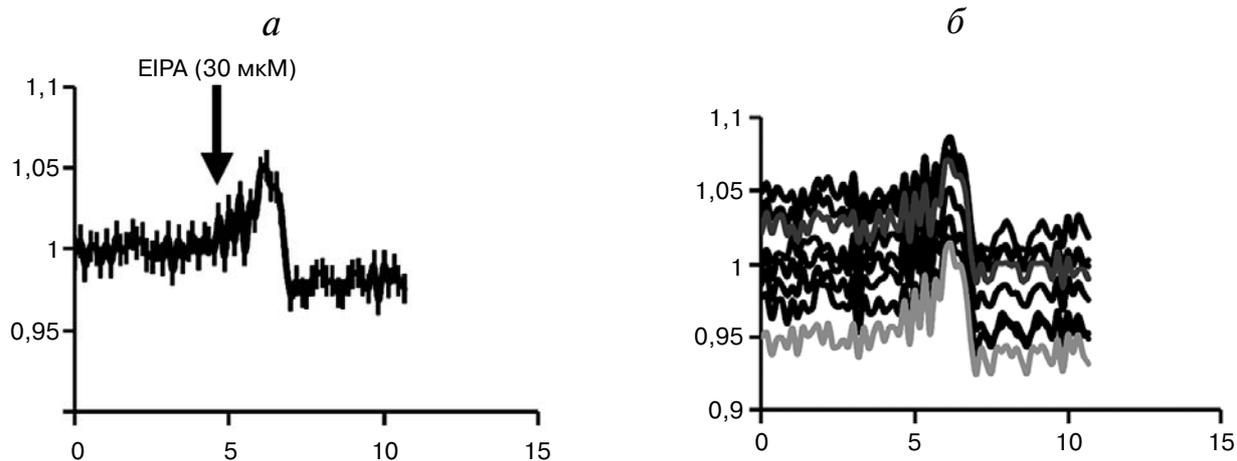
Известно, что каналы, ассоциированные с AMPA/каинатными рецепторами (подтип ионотропных глутаматных рецепторов), являются одним из важных путей поступления ионов цинка в нейроны при ишемии [6]. Ранее мы показали, что одновременная обработка КЗН каинатом и  $ZnCl_2$  в субтоксических концентрациях вызывает интенсивную гибель нейронов, которая предотвращается NBQX, блокатором AMPA/каинатных рецепторов [20]. Однако, следует принимать во внимание, что гипоксия и ишемия сопровождаются вне- и внутриклеточным ацидозом, который может изменять проницаемость ионных каналов и влиять на внутриклеточный гомеостаз цинка. Было показано, что в добавление к кальциевому дисбалансу, накопление ионов цинка в клетке блокируется ацидозом [9]. Также было продемонстрировано, что умеренный ацидоз повышает внутриклеточную мобилизацию цинка в нейронах, опосредованную AMPA/каинатными рецепторами [12]. В этом исследовании мы показали, что нейрональная гибель, инициированная одновременной обработкой КЗН каинатом и цинком, в значительной степени предотвращалась внешним ацидозом (рН 6,5) или EIPA (блокатором  $Na^+/H^+$  обмена). Защитный эффект ацидоза сопровождался снижением  $[Zn^{2+}]_i$  и  $[Ca^{2+}]_i$ , что свидетель-



**Рис. 1.** Ацидоз и EIPA снижают токсичность совместного действия цинка и каината (Zn + каинат) в КЗН мозжечка. *a* – Фиксированные культуры, окрашенные трипановым синим. Пикнотические ядра указаны стрелками. Масштаб 10 мкм; *b* – количественная оценка выживаемости нейронов. Черный столбик – pH 7,3, серый столбик – ацидоз pH 6,5, белый столбик – EIPA (0,03 мМ, pH 7,3). \* –  $p < 0,01$  по сравнению с соответствующим контролем (pH 7,3, первые три столбца),  $n = 45$ , где  $n$  – количество полей зрения. # –  $p < 0,01$  по сравнению с Zn + каинат при pH 7,3 (четвертый черный столбец),  $n = 45$ , где  $n$  – количество полей зрения



**Рис. 2.** Влияние нормального pH (черный столбик pH 7,3), ацидоза (серый столбик, pH 6,5) и EIPA (белый столбик, 0,03 мМ EIPA, pH 7,3) на флуоресценцию FluoZin-3 (а) и Fluo-4 (б) в КЗН без обработки (контроль); при добавлении  $ZnCl_2$  (0,005 мМ); каината (0,1 мМ);  $ZnCl_2$  + каината (0,005 и 0,1 мМ соответственно). \* –  $p < 0,01$  по сравнению с соответствующим контролем (pH 7,3, первые три столбца)  $n = 9$ , где  $n$  – количество культур; # –  $p < 0,01$  по сравнению с Zn (pH 7,3, второй черный столбец)  $n = 9$ , где  $n$  – количество культур; + –  $p < 0,01$  по сравнению с Zn + каинат (pH 7,3, четвертый черный столбец),  $n = 9$ , где  $n$  – количество культур



**Рис. 5.** Добавление в среду инкубации нейрональных культур EIPA сопровождается небольшим транзитным увеличением концентрации свободного цитоплазматического  $Zn^{2+}$ . а – Усредненная кривая флуоресценции FluoZin-3. Значения показаны как средние  $\pm$  SEM,  $n = 7$ ,  $n$  – число нейронов; б – кривые динамики флуоресценции FluoZin-3 в отдельных нейронах

ствуется о том, что кислые значения pH способны не только инактивировать NMDA-рецепторы [21], но также снижать ток ионов в клетку через потенциал-зависимые кальциевые каналы [22–23], которые являются важным путем поступления в нейрон ионов кальция и цинка.

Таким образом, защита ацидозом КЗН от совместного токсического действия каината +  $ZnCl_2$  может быть опосредована блокадой низкими значениями pH потенциал-зависимых кальциевых каналов, что снижает кальциевую и цинковую перегрузку цитоплазмы и систем депонирования этих ионов в нейронах.

Ингибирование  $Na^+/H^+$  обмена с помощью ЕРА является одной из возможностей снизить  $pH_i$  в нейронах [24]. Генетическое нарушение NHE1 изоформы  $Na^+/H^+$ -обменника в значительной степени снижает дегенерацию культивируемых нейронов коры головного мозга мышей при кислородно-глюкозной депривации [25]. Эти данные поддерживают предположение, что увеличение концентрации протонов в цитоплазме при ингибировании  $Na^+/H^+$ -обменника может повышать выживаемость нейронов при ишемии. Мы обнаружили, что в противоположность внеклеточному ацидозу ЕРА увеличивает  $[Zn^{2+}]_i$  при действии одного  $ZnCl_2$  или совместно каинат +  $ZnCl_2$ . Влияние ЕРА на каинат +  $ZnCl_2$ -вызванное повышение  $[Ca^{2+}]_i$  было достоверно, но менее выражено.

Ранее было показано, что ЕРА и тапсигаргин являются неконкурентными ингибиторами

$Ca^{2+}$  АТФазе эндоплазматического ретикулума [26], что может индуцировать истощение кальциевых запасов эндоплазматического ретикулума в клетках [27] и более того, тапсигаргин вызывает истощение запасов  $Zn^{2+}$  во внутриклеточных системах депонирования [28]. Мы предполагаем, что ЕРА, подобно тапсигаргину, может вызывать уменьшение запасов внутринейронального  $Zn^{2+}$ , так как наши данные по флуоресцентной детекции  $Zn^{2+}$  в нейронах, демонстрируют, что ЕРА вызывает транзиторное возрастание  $[Zn^{2+}]_i$  в нейронах (рис. 5) и стимулирует увеличение цинковой перегрузки цитоплазмы нейронов при поступлении в них внеклеточного цинка.

Представленные нами данные позволяют заключить, что ацидоз уменьшает токсичность каината +  $ZnCl_2$ , снижая вход  $Zn^{2+}$  в нейроны, тогда как ЕРА предотвращает избыточную перегрузку системы внутриклеточного депонирования цинка. Цинк и кальций могут не только входить в нейрон, но и в дальнейшем поступать в митохондрии, чтобы проявилась токсичность ионов цинка [20], причем кальций увеличивает токсичность ионов цинка. Известно, что ингибирование  $Na^+/H^+$ -обмена ослабляет перегрузку митохондрий  $Ca^{2+}$  [29], что может вести к снижению токсического действия каината +  $ZnCl_2$ .

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 15-04-00010-а, 14-04-00030-а).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Toth, K. (2011) Zinc in neurotransmission, *Annu. Rev. Nutr.*, **31**, 139–153.
- Shuttleworth, C.W., and Weiss, J.H. (2011) Zinc: new clues to diverse roles in brain ischemia, *Trends Pharmacol. Sci.*, **32**, 480–486.
- Pivovarova, N.B., Stanika, R.I., Kazanina, G., Villanueva, I., and Andrews, S.B. (2014) The interactive roles of zinc and calcium in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration, *J. Neurochem.*, **128**, 592–602.
- Zhao, Y., Pan, R., Li, S., Luo, Y., Yan, F., Yin, J., Qi, Z., Yan, Y., Ji, X., and Liu, K.J. (2014) Chelating intracellularly accumulated zinc decreased ischemic brain injury through reducing neuronal apoptotic death, *Stroke*, **45**, 1139–1147.
- Dineley, K.E., Votyakova, T.V., and Reynolds, I.J. (2003) Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration, *J. Neurochem.*, **85**, 563–570.
- Sensi, S.L., Paoletti, P., Bush, A.I., and Sekler, I. (2009) Zinc in the physiology and pathology of the CNS, *Nature Rev. Neurosci.*, **10**, 780–791.
- Sheline, C.T., Zhu, J., Zhang, W., Shi, C., and Cai, A.L. (2013) Mitochondrial inhibitor models of Huntington's disease and Parkinson's disease induce zinc accumulation and are attenuated by inhibition of zinc neurotoxicity *in vitro* or *in vivo*, *Neurodegener. Dis.*, **11**, 49–58.
- Weiss, J.H., Hartley, D.M., Koh, J.Y., and Choi, D.W. (1993) AMPA receptor activation potentiates zinc neurotoxicity, *Neuron*, **10**, 43–49.
- Colvin, R.A. (2002) pH dependence and compartmentalization of zinc transported across plasma membrane of rat cortical neurons, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **282**, 317–329.
- Isaev, N.K., Stelmashook, E.V., Lukin, S.V., Freyer, D., Mergenthaler, P., and Zorov, D.B. (2010) Acidosis-induced zinc-dependent death of cultured cerebellar granule neurons, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **30**, 877–883.
- Kiedrowski, L. (2014) Proton-dependent zinc release from intracellular ligands, *J. Neurochem.*, **130**, 87–96.
- Frazzini, V., Rapposelli, I.G., Corona, C., Rockabrand, E., Canzoniero, L.M.T., and Sensi, S.L. (2007) Mild acidosis enhances AMPA receptor-mediated intracellular zinc mobilization in cortical neurons, *Mol. Med.*, **13**, 356–361.
- Stelmashook, E.V., Isaev, N.K., Plotnikov, E.Y., Uzbekov, R.E., Alieva, I.B., Arbeille, B., and Zorov, D.B. (2009) Effect of transitory glucose deprivation on mitochondrial structure and functions in cultured cerebellar granule neurons, *Neurosci. Lett.*, **461**, 140–144.

14. Medvedeva, Y.V., Lin, B., Shuttleworth, C.W., and Weiss, J.H. (2009) Intracellular Zn<sup>2+</sup> accumulation contributes to synaptic failure, mitochondrial depolarization, and cell death in an acute slice oxygen-glucose deprivation model of ischemia, *J. Neurosci.*, **29**, 1105–1114.
15. Zhu, L., Tang, Y., Wang, H.D., Zhang, Z.Y., and Pan, H. (2012) Immersion autometallographic demonstration of pathological zinc accumulation in human acute neural diseases, *Neurol. Sci.*, **33**, 855–861.
16. Suh, S.W., Garnier, P., Aoyama, K., Chen, Y., and Swanson, R.A. (2004) Zinc release contributes to hypoglycemia-induced neuronal death, *Neurobiol. Dis.*, **16**, 538–545.
17. Bitanhirwe, B.K.Y., and Cunningham, M.G. (2009) Zinc: The brain's dark horse, *Synapse*, **63**, 1029–1049.
18. Sensi, S.L., Paoletti, P., Koh, J.Y., Aizenman, E., Bush, A.I. and Hershfinkel, M. (2011) The neurophysiology and pathology of brain zinc, *J. Neurosci.*, **31**, 16076–16085.
19. Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Генрихс Е.Е., Амелкина Г.А., Хаспекров Л.Г., Скребицкий В.Г., Иллариошкин С.Н. (2014) Роль ионов цинка и меди в механизмах патогенеза болезней Альцгеймера и Паркинсона, *Биохимия*, **79**, 501–508.
20. Lozier, E.R., Stelmashook, E.V., Uzbekov, R.E., Novikova, S.V., Zorov, S.D., Alieva, I.B., Arbeille, B., Zorov, D.B., and Isaev, N.K. (2012) Stimulation of kainate toxicity by zinc in cultured cerebellar granule neurons and the role of mitochondria in this process, *Toxicol. Lett.*, **208**, 36–40.
21. Andreeva, N., Khodorov, B., Stelmashook, E., Sokolova, S., Gragoe, E., Jr., and Victorov, I. (1992) 5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl)amiloride and mild acidosis protect cultured cerebellar granule cells against glutamate-induced delayed neuronal death, *Neuroscience*, **49**, 175–181.
22. Ou-Yang, Y., Kristian, T., Møllergaard, P., and Siesjö, B.K. (1994) The influence of pH on glutamate- and depolarization-induced increases of intracellular calcium concentration in cortical neurons in primary culture, *Brain Res.*, **646**, 65–72.
23. Tombaugh, G.C., and Somjen, G.G. (1996) Effects of extracellular pH on voltage-gated Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> currents in isolated rat CA1 neurons, *J. Physiol.*, **493**, 719–732.
24. Schneider, D., Gerhardt, E., Bock, J., Müller, M.M., Wolburg, H., Lang, F., and Schulz, J.B. (2004) Intracellular acidification by inhibition of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-exchanger leads to caspase-independent death of cerebellar granule neurons resembling paraptosis, *Cell Death Differ.*, **11**, 760–770.
25. Luo, J., Chen, H., Kintner, D.B., Shull, G.E., and Sun, D. (2005) Decreased neuronal death in Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoform 1-null mice after *in vitro* and *in vivo* ischemia, *J. Neurosci.*, **25**, 11256–11268.
26. Rogers, T.B., Inesi, G., Wade, R., and Lederer, W.J. (1995) Use of thapsigargin to study Ca<sup>2+</sup> homeostasis in cardiac cells, *Biosci. Rep.*, **15**, 341–349.
27. Park, K.S., Poburko, D., Wollheim, C.B., and Demareux, N. (2009) Amiloride derivatives induce apoptosis by depleting ER Ca<sup>2+</sup> stores in vascular endothelial cells, *Br. J. Pharmacol.*, **156**, 1296–1304.
28. Stork, C.J., and Li, Y.V. (2010) Zinc release from thapsigargin/IP3-sensitive stores in cultured cortical neurons, *J. Mol. Signal.*, **5**, DOI: 10.1186/1750-2187-5-5.
29. Toda, T., Kadono, T., Hoshiai, M., Eguchi, Y., Nakazawa, S., Nakazawa, H., Higashijima, N., and Ishida, H., (2007) Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitor cariporide attenuates the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> overload and PTP opening, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **293**, 3517–3523.

## ACIDOSIS AND 5-(*N*-ETHYL-*N*-ISOPROPYL)AMILORIDE (EIPA) ATTENUATE ZINC/KAINATE TOXICITY IN CULTURED CEREBELLAR GRANULE NEURONS

**E. V. Stelmashook<sup>1\*</sup>, S. V. Novikova<sup>1</sup>, G. A. Amelkina<sup>1</sup>,  
E. G. Ivashkin<sup>1</sup>, E. E. Genrikhs<sup>1</sup>, L. G. Khaspekov<sup>1</sup>, N. K. Isaev<sup>1,2\*</sup>**

<sup>1</sup> *Research Center of Neurology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow 125367, Russia*

<sup>2</sup> *M. V. Lomonosov Moscow State University, A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991, Russia*

Received December 10, 2014

Cultured cerebellar granule neurons (CGNs) were insensitive to the toxic effect of ZnCl<sub>2</sub> (0,005 mM, 3 h) and slightly sensitive to kainate (0,1 mM, 3 h). Simultaneous treatment of CGNs with kainate and ZnCl<sub>2</sub> caused substantial neuronal death, which was attenuated by external acidosis (pH 6,5) or 5-(*N*-ethyl-*N*-isopropyl)amiloride (EIPA, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange blocker, 0,03 mM). Intraneuronal zinc and calcium ion concentrations ([Zn<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) increased under the action of kainate+ZnCl<sub>2</sub>. External acidosis significantly decreased and EIPA increased [Zn<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> and [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> under these conditions. Neuronal Zn<sup>2+</sup> imaging demonstrated that EIPA increases the cytosolic concentration of free Zn<sup>2+</sup> in Zn<sup>2+</sup>-containing solution. We speculate that EIPA can induce depletion of intraneuronal Zn<sup>2+</sup> stores. These data imply that acidosis hampers ZnCl<sub>2</sub>/kainate toxic effects by decreasing Zn<sup>2+</sup> entry into neurons, and EIPA prevents zinc stores from being overloaded with zinc.

*Key words:* zinc, calcium, kainate, cerebellar granule neurons, acidosis, EIPA