

УДК 577.32

ЗАВИСИМОСТЬ ЭПИЛЕПТИФОРМНЫХ ТОКОВ НЕЙРОНОВ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС ОТ СРОКОВ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *in vitro*

© 2016 г. Д. А. Сибаров*, П. А. Абушик, С. М. Антонов

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223, Санкт-Петербург, просп. Тореза, 44

*e-mail: dsibarov@gmail.com

Поступила в редакцию 17.05.2016

Нами показано, что в первичной культуре нейронов коры головного мозга крысы с увеличением срока культивирования наблюдается рост числа нейронов, в которых регистрируются эпилептиформные токи (ЭТ) при удалении из среды ионов магния. Показано, что использование агонистов NMDA-рецепторов в низких концентрациях вызывает рост частоты миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов и их постепенную синхронизацию, приводящую к формированию ЭТ. Отсутствие блокирования ифенпродилем ЭТ при сохранении его подавляющего эффекта на токи целой клетки, вызываемые NMDA, говорит о ключевой роли резистентных к его действию синаптических NMDA-рецепторов, содержащих GluN2A, в генерации ЭТ. Мы полагаем, что возникновение ЭТ в культуре нейронов и постепенный рост их амплитуды с увеличением срока культивирования идет параллельно с ростом числа синаптических связей и заменой субъединицы GluN2B на GluN2A NMDA-рецепторов в синапсах.

Ключевые слова: эпилептиформные токи, первичная культура, нейроны, кора, NMDA-рецепторы

DOI: 10.7868/S0233475516050078

ВВЕДЕНИЕ

Ранее нами было показано, что с увеличением срока культивирования нейронов коры мозга крыс возрастает частота генерации спонтанных миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (мВПСТ) [1]. Начиная с 10–12-го дня культивирования *in vitro* (10–12 DIV), в результате удаления Mg^{2+} из внеклеточного раствора, что предотвращает блок каналов NMDA-рецепторов Mg^{2+} , может происходить синхронизация освобождения везикул нейромедиатора из пресинаптических терминалей, сопровождающаяся появлением многоквантовых мВПСТ в нейронах. Генерацию эпилептиформных токов (ЭТ) можно также спровоцировать путем ингибирования ГАМК_A-рецепторов, т.е. снятия ГАМК-ергического торможения. Подобная электрическая активность была описана нами как эпилептиформная, так как длительная синаптическая деполяризация нейронов сопровождается генерацией спайковых разрядов [2]. Генерация ЭТ характеризуется высокой зависимостью от концентрации внутриклеточного свободного кальция и от его выхода из внутриклеточных депо. В целом, первичная культура является удобным объектом для изучения эпилептиформной активности нейронов, характерной

для ранних периодов развития ЦНС вплоть до стадии P7 (7 день постнатального развития). Процесс дифференцировки нейронов в культуре имеет сходство с нормальным развитием и дифференцировкой нервной ткани в ходе онтогенеза и сопровождается возрастным увеличением числа синаптических связей и изменением субъединичного состава постсинаптических NMDA-рецепторов в сторону взрослого фенотипа, характеризующегося преобладанием в постсинапсе NMDA-рецепторов, содержащих GluN2A [3, 4]. В настоящей работе на нейронах коры в первичной культуре получены новые данные о возрастной динамике генерации ЭТ и их зависимости от подтипа NMDA-рецепторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на первичной культуре нейронов коры большого мозга крыс породы Вистар, полученной из эмбрионов на 16-й день пренатального развития [5, 6]. Клетки культивировали в среде Neurobasal (Gibco Inc., США) на стеклах, покрытых поли-D-лизинем. Регистрацию постсинаптических токов проводили в конфигурации “целая клетка” на нейронах на 7, 12, 15, 21, 30 DIV методом локальной фиксации мем-

бранного потенциала (patch-clamp). В опытах использовали внеклеточный перфузионный раствор следующего состава (концентрации указаны в мМ): 140 NaCl; 2.8 KCl; 2.0 CaCl₂; 10 HEPES, при pH 7.2–7.4 и температуре 22–24°C. Перфузионный раствор не содержал Mg²⁺ для инициации эпилептиформных токов. Внутриклеточный раствор для заполнения микроэлектродов имел следующий состав (мМ) 9 NaCl, 17.5 KCl, 121.5 К-глюконат, 1 MgCl₂, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 2 MgATP, 0.5 NaGTP. Для регистрации токов применяли усилитель MultiClamp 700 В с системой сбора данных Digidata 1440А и программное обеспечение pClamp v10.2 (Molecular Devices, США). Сигнал в полосе от 0 до 1.4 кГц оцифровывали с частотой 20000 Гц. Тестовые вещества апплицировали с использованием системы быстрой смены растворов на базе BPS-4 (Ala Scientific Instruments, США). Ниже приведен список реагентов и их концентрации 5 или 100 мкМ N-метил-D-аспартата (NMDA, агонист NMDA-рецепторов) применялся совместно с 30 мкМ глицина; также в опытах применяли 50 мкМ (2R)-амино-5-фосфопентаноата (AP5, специфический конкурентный антагонист NMDA-рецепторов) и 2 мкМ ифенпродила (селективный блокатор NMDA-рецепторов, содержащих GluN2B-субъединицу). Вещества поставлены фирмой Sigma-Aldrich (США). Детекцию постсинаптических токов, а также анализ их частоты и амплитуды выполняли в программе Clampfit 10.2, входящей в пакет pClamp 10.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

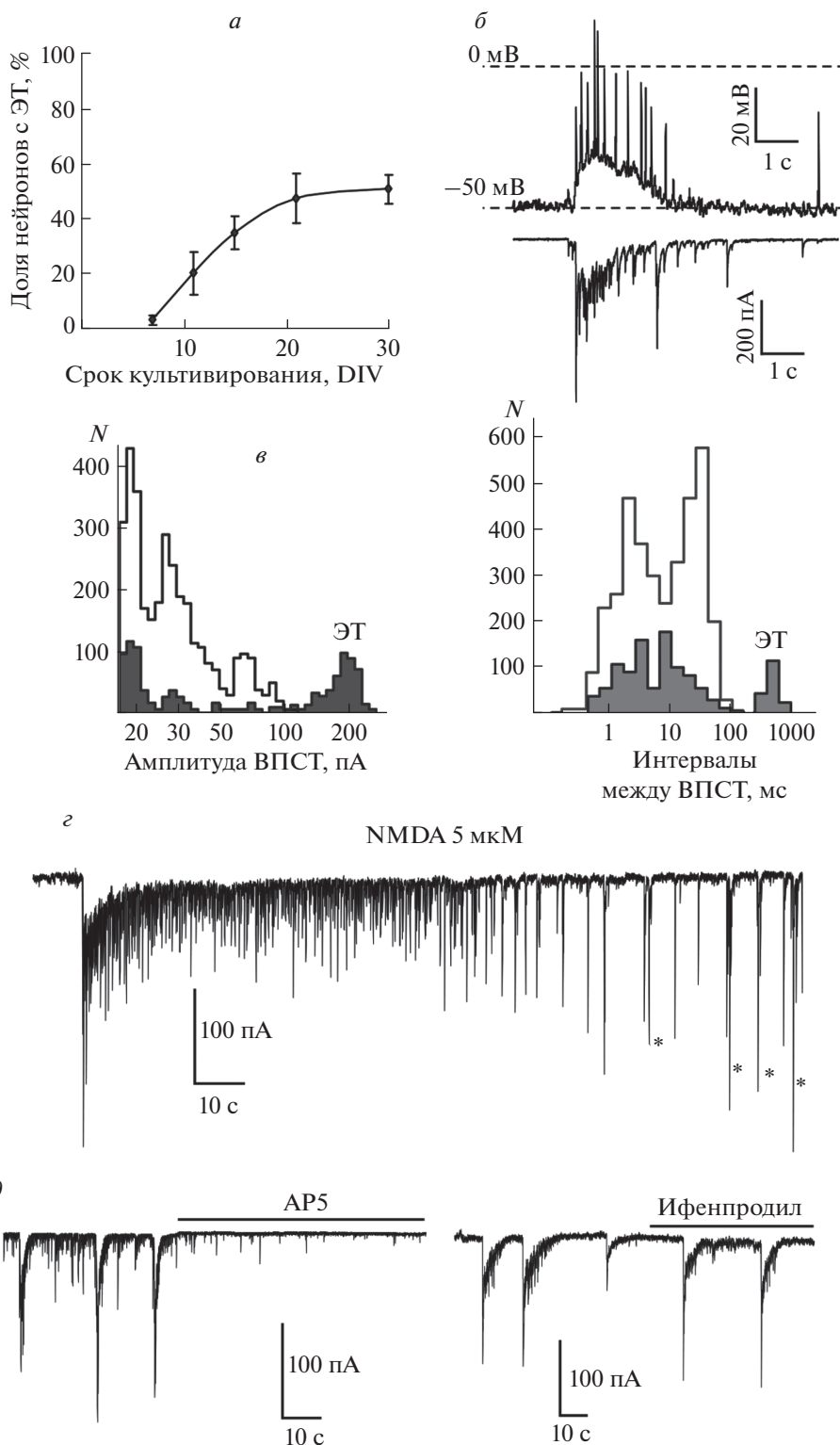
В период 7–30 DIV наблюдается рост числа нейронов, в которых регистрируются ЭТ при помещении клеток в среду, не содержащую ионов магния. ЭТ проявлялись как регулярно генерируемые нейронами медленные входящие токи длительностью до 10 с и амплитудой, на порядки превышающей таковую для одноквантовых мВПСТ. На каждом сроке культивирования исследовано не менее 60 нейронов. Если на 7 DIV нейроны с ЭТ практически отсутствуют, то, начиная с 15 DIV, ЭТ выявляются уже в трети исследованных нейронов. С 20 DIV ЭТ наблюдаются практически в половине нейронов (рисунок а). Распределение амплитуд мВПСТ у нейронов изменяется с возрастом. На 30 DIV по сравнению с 14 DIV увеличивается число многоквантовых мВПСТ, а средняя амплитуда ЭТ возрастает по мере увеличения срока культивирования с 220 ± 54 пА на 14 DIV до 685 ± 130 пА на 30 DIV. ЭТ развиваются в результате периодически возникающих волн асинхронного (в течение около 3–10 с) массивного выброса синаптических везикул [2]. На рисунке б видна временная структура ЭТ, являющегося суммой токов множества одно- и многоквантовых мВПСТ. Всплески частоты мВПСТ при суммации токов вызывают

значительную деполяризацию постсинаптической мембраны и могут провоцировать генерацию серий потенциалов действия. При этом в одном и том же нейроне амплитудно-частотные характеристики мВПСТ (рисунок в) до и после возникновения ЭТ значительно различаются. Так в норме в нейронах регистрируются преимущественно одно- и двухквантовые мВПСТ амплитудой до 50 пА, следующие с небольшими интервалами. Группировка мВПСТ в ЭТ приводит к резкому падению доли одно- и двухквантовых мВПСТ и возникновению больших периодов “молчания” между эпизодами ЭТ (рисунок в).

В культуре нейронов возрастом 14 DIV длительная активация NMDA-рецепторов ненасыщающими концентрациями NMDA (5 мкМ) вызывала ожидаемый рост частоты спонтанных мВПСТ, которые спустя несколько минут проявляли тенденцию к синхронизации в высокоамплитудные ЭТ (рисунок г). Ингибирование NMDA-рецепторов аппликацией 50 мкМ AP5 блокировало ЭТ (рисунок д). Напротив, применение ифенпродила (2 мкМ) как селективного блокатора NMDA-рецепторов, содержащих субъединицу GluN2B [7], не оказывало заметного влияния на генерацию ЭТ (рисунок д), хотя ифенпродил блокировал 30–80% тока, вызываемого в нейронах аппликацией 100 мкМ NMDA.

Дифференцировка нейронов в первичной культуре сопровождается увеличением числа синаптических связей и проявлением фенотипа нейронов соответствующего отдела ЦНС [4], однако синаптические связи между нейронами анатомически не структурированы. Во взрослом мозге присутствие aberrантных глутаматергических синапсов может приводить к возникновению замкнутых самовозбуждающихся цепочек нейронов и формировать очаги эпилепсии [8]. В культуре нейронов, имеющей случайный характер связей, весьма вероятно формирование таких очагов возбуждения, способствующих генерации ЭТ нейронами.

В гиппокампе и коре головного мозга активация GluN2B-содержащих NMDA-рецепторов критически важна для установления синаптических связей [9]. Как *in vivo* [3], так и *in vitro* [10] развитие нейронной сети сопровождается заменой GluN2B на GluN2A на зрелых синапсах, в то время как GluN2B остаются преимущественно экстрасинаптическими. Мы полагаем, что, возникновение ЭТ в культуре нейронов и постепенный рост их амплитуды с увеличением срока культивирования идет параллельно с ростом числа синаптических связей и заменой субъединицы GluN2B на GluN2A постсинаптических NMDA-рецепторов. Резистентность ЭТ к действию ифенпродила говорит о ключевой роли синаптических GluN2A-содержащих NMDA-рецепторов в генерации ЭТ.



Зависимость генерации ЭТ от срока культивирования и активации NMDA-рецепторов. *а* – Доля нейронов, в которых выявлены ЭТ, в зависимости от срока культивирования. *б* – Внутренняя структура отдельного ЭТ и соответствующая деполяризация в нейроне. *в* – Гистограммы распределения амплитуд спонтанных ВПСТ и межимпульсных интервалов спонтанных токов до и после генерации ЭТ. Белый цвет – до возникновения ЭТ, черный – после возникновения ЭТ. Пики, соответствующие мВПСТ и многоквантовым ВПСТ, обозначены одной или двумя стрелками соответственно. Данные получены для фрагментов записей длительностью 4 мин. *z* – Токи, зарегистрированные в нейроне при 70 мВ, вызванные длительным действием 5 мкМ NMDA (в присутствии 30 мкМ глицина). По мере действия NMDA происходит синхронизация спонтанных ответов и формирование ЭТ (обозначены звездочками). *д* – ЭТ до и после применения конкурентного антагониста NMDA-рецепторов – AP5 (50 мкМ) и GluN2B селективного антагониста NMDA-рецепторов – ифенпродила (2 мкМ).

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 16-15-10201.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сибаров Д.А., Антонов С.М. 2013. Особенности постсинаптических токов в первичной культуре нейронов коры головного мозга крыс. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова*, **99** (6), 763–775.
2. Сибаров Д.А., Абушик П.А., Большаков А.Е., Карелина Т.В., Кривой И.И., Антонов С.М. 2014. Эпилептиформные постсинаптические токи в первичной культуре нейронов коры головного мозга крысы: кальциевые механизмы регуляции. *Биол. мембраны*. **31** (1), 33–43.
3. Stocca G., Vicini S. 1998. Increased contribution of NR2A subunit to synaptic NMDA receptors in developing rat cortical neurons. *J. Physiol.* **507**, 13–24.
4. Абушик П.А., Большаков А.Е., Сибаров Д.А., Антонов С.М. 2011. Гетерогенность механизмов кальциевого ответа на каинат и типы нейронов в первичной культуре коры мозга крыс. *Биол. мембраны*. **28** (1), 25–34.
5. Antonov S.M., Johnson J.W. 1996. Voltage-dependent interaction of open channel blocking molecules with gating of NMDA receptors in rat cortical neurons. *J. Physiol.* **493**, 425–445.
6. Миронова Е.В., Лукина А.А., Бровцына Н.Б., Кривченко А.И., Антонов С.М. 2006. Типы рецепторов глутамата, определяющие концентрационную зависимость его нейротоксического действия на нейроны коры головного мозга крыс. *Журн. эвол. биохим. физиол.* **42**, 559–566.
7. Williams K. 1993. Ifenprodil discriminates subtypes of the N-methyl-D-aspartate receptor: selectivity and mechanisms at recombinant heteromeric receptors. *Mol. Pharmacol.* **44**, 851–859.
8. Modo M., Hitchens T.K., Liu J.R., Richardson R.M. 2016. Detection of aberrant hippocampal mossy fiber connections: *Ex vivo* mesoscale diffusion MRI and microtractography with histological validation in a patient with uncontrolled temporal lobe epilepsy. *Hum. Brain Mapp.* **37**, 780–795.
9. Tovar K.R., Westbrook G.L. 1999. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses *in vitro*. *J. Neurosci.* **19**, 4180–4188.
10. Rao A., Craig A.M. 1998. Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons. *Neuron*. **19**, 801–812.

Generation of Epileptiform Currents in Rat Cortical Neurons Depends on Neuron Culturing Time

D. A. Sibarov[#], P. A. Abushik, S. M. Antonov

Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, pr. Toreza 44, St.-Petersburg, 194223 Russia

[#]*e-mail: dsibarov@gmail.com*

Here we demonstrate that the number episodes of epileptiform current (EC) caused by removal of extracellular magnesium increases over time of growth in primary culture of rat cortical neurons. In our experiments, NMDA receptor agonists at low concentrations induce an elevation of frequency of miniature postsynaptic currents, which is followed in time by their synchronization and the ECs generation. Ifenprodil did not block ECs but strongly inhibited NMDA-evoked whole-cell currents. These observations suggest a key role of ifenprodil-resistant synaptic GluN2A-containing NMDA receptors in the ECs generation. We suppose that in cultured neurons the appearance of ECs and gradual increase of their amplitudes over time of culturing are directed by synaptogenesis. The increase in the number of synaptic connections is accompanied by the displacement of GluN2A for the GluN2B subunits in the excitatory synapses.

Keywords: epileptiform currents, primary culture, neurons, cortex, NMDA receptors