

УДК 57.053+577.352.5

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ДИНАМИКА МЕМБРАННЫХ ТОКОВ В НЕЙРОНАХ И АСТРОЦИТАХ СРЕЗОВ ГИППОКАМПА КРЫСЫ ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ГЛУТАМАТЭРГИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ

© 2013 г. М. Ю. Инюшин, Д. А. Сибаров, А. Б. Вольнова

Представлено академиком В.Л. Свицерским 26.10.2011 г.

Поступило 28.04.2012 г.

DOI: 10.7868/S086956521307030X

Одна из важнейших функций астроцитов в ЦНС заключается в захвате медиатора, выделяемого нейронами в синаптическую щель, посредством специфических переносчиков [1, 2]. В глутаминергических синапсах астроциты возвращают медиатор нейронам в рамках глутамат-глутаминового обменного цикла [3], и клиренс глутамата определяет величину синаптического ответа [4]. Амплитуда транспортного тока в астроцитах при синаптической передаче позволяет оценить количество захваченного астроцитами медиатора [2, 4], и этот ток значительно возрастает при стимуляции нейронов парными импульсами тока. В ответ на синаптическую стимуляцию в астроцитах регистрируется также входящий ток с медленной (несколько секунд) динамикой [5, 6]. В литературе выдвинута гипотеза [5] о том, что медленный синаптический ток в астроцитах вызывается выбросом калия из пресинаптических нейронов.

Цель настоящей работы – выяснить природу медленного астроцитарного ответа на синаптическую стимуляцию соседних нейронов. Для этого на переживающих срезах гиппокампа крыс одновременно регистрировали мембранные токи постсинаптического нейрона и связанных с ним астроцитов в зоне CA1 при стимуляции коллатералей Шаффера.

МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на срезах гиппокампа толщиной 350 мкм, полученных от 16–24-дневных крыс. Срезы инкубировали при 36°C в течение 30 мин в растворе, насыщенном карбогеном (в мМ:

127 NaCl, 2.5 KCl, 1.25 NaH₂PO₄, 25 NaHCO₃, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 D-глюкоза, pH 7.4). Для отведения от целой клетки использовали стеклянные электроды ($R = 6–7$ МОм), заполненные раствором (в мМ: 127 K gluconate, 4 KCl, 2 Mg-АТФ, 0.3 tris GTP, 0.2 EGTA, 10 HEPES и 10 фосфокреатин, pH 7.3, 295 мОсм). Мембранные токи или потенциалы нейронов, а также токи астроцитов регистрировали двухканальным патч-кламп-усилителем MultiClamp 700A (“Axon Instruments”, США). Коллатерали Шаффера (отростки пирамидальных нейронов CA3, дающие глутаматэргические синапсы на дендриты пирамидальных нейронов CA1) стимулировали коаксиальным стальным электродом парными стимулами длительностью 0.1 мс, межстимульный интервал 20 мс, 20 с между испытаниями. Положение астроцита, от которого проводилась регистрация, выбирали в stratum radiatum под контролем интерференционно-контрастной оптики так, чтобы тело клетки располагалось как можно ближе к видимому отростку пирамидального нейрона, от тела которого проводилась одновременная регистрация синаптических токов в ответ на стимуляцию (рис. 1а). Регистрацию тока астроцитов осуществляли на так называемых “зрелых” астроцитах с низким (5.2 ± 4.0 МОм) входным сопротивлением и линейной вольт-амперной характеристикой мембраны, составляющих до 91% у крыс старше 15 дней [7]. Сравнение групп измерений выполняли с использованием критерия Стьюдента при $p < 0.05$. Указанные в тексте погрешности измерений являются ошибкой среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ответ на стимуляцию коллатералей Шаффера в астроцитах ($n = 43$) регистрировали входящие токи, представляющие собой сумму нескольких компонент. При этом парная стимуляция позво-

Институт эволюционной физиологии и биохимии
им. И.М. Сеченова
Российской Академии наук, Санкт-Петербург
Санкт-Петербургский государственный университет

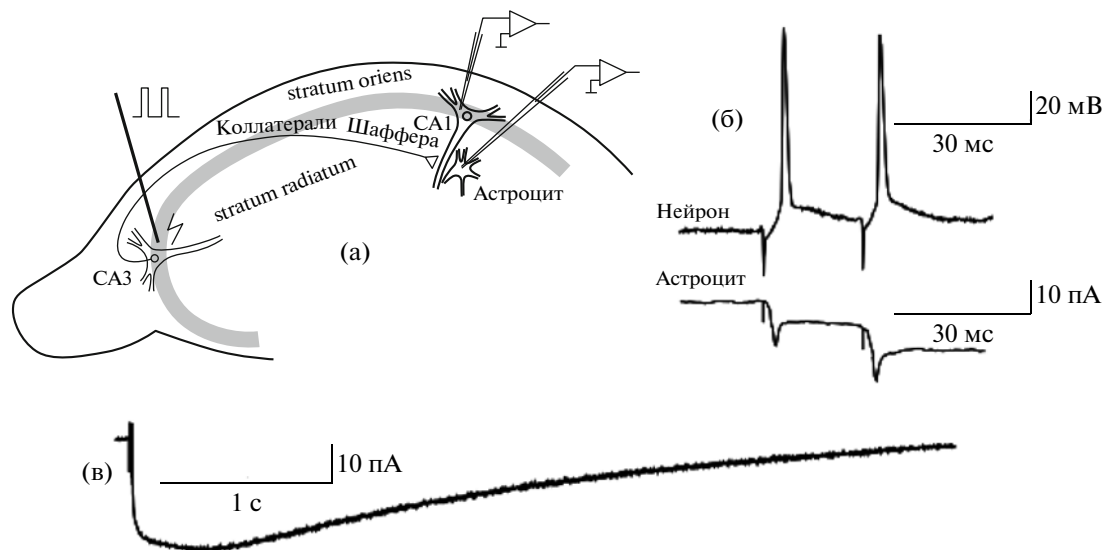


Рис. 1. Парная регистрация ответов нейрона и астроцита при стимуляции коллатералей Шаффера; а – расположение электродов; б – ПД в нейроне в отсутствие фиксации потенциала и “быстрый” транспортный ток в астроцитах при мембранном потенциале -90 мВ; в – “медленная” компонента тока астроцита.

ляла добиться большей амплитуды регистрируемых токов.

Быстрая компонента тока величиной $4\text{--}40$ пА возникала в ответ на каждый стимул с задержкой менее 1 мс и продолжалась $5\text{--}7$ мс (рис. 1б). Как видно из рисунка, эта компонента тока заканчивалась непосредственно перед началом потенциала действия в нейроне. Величина быстрой компоненты тока была постоянна для каждого астроцита, не изменяясь по амплитуде в течение часа регистрации. Добавление дигидрокаината (400 мкМ), являющегося нетранспортируемым субстратом астроцитарного переносчика глутамата (GLT-1 или EAAT2), подавляло быстрый ответ в астроцитах на $53 \pm 12\%$ ($n = 6, p < 0.05$). Блокатор ионотропных рецепторов глутамата NBQX (10 мкМ) (2,3-dihydroxy-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo(F)quinoxaline) не оказывал действия на быструю компоненту астроцитарного ответа. Таким образом, быстрая компонента тока отражала работу исключительно астроцитарных электрогенных переносчиков глутамата, как это и предполагалось ранее [5, 8]. Блокирование GLT-1 продлевает время нахождения глутамата в синаптической щели и может увеличивать амплитуду синаптических токов на интернейронах более чем в 15 раз [4], что говорит о критической важности GLT-1 для нормальной синаптической передачи. В использованной концентрации дигидрокаинат не полностью подавляет работу GLT-1 и совсем не ингибирует нейрональный переносчик глутамата EAAT3, что указывает на существенно меньший вклад нейрона в клиренс глутамата в синаптической щели по сравнению с астроцитом.

Кроме быстрого ответа, в астроцитах stratum radiatum нами наблюдался медленно развиваю-

щийся входящий ток, также возникающий в ответ на синаптическую стимуляцию пирамидных нейронов гиппокампа (рис. 1в). “Медленный” ток достигал максимума $10\text{--}50$ пА через $0.4\text{--}0.5$ с после стимуляции, постепенно уменьшаясь в течение $4\text{--}8$ с.

При аппликации 10 мкМ NBQX амплитуда медленного ответа снижалась на $61 \pm 21\%$ ($n = 6, p < 0.05$), что, вероятно, объясняется блокированием выхода калия из нейронов через AMPA-каналы. Ингибирование работы GLT-1 дигидрокаинатом (400 мкМ) также подавляло амплитуду медленного входящего тока в астроцитах на $43 \pm 13\%$ ($n = 5, p < 0.05$), так как работа GLT-1 сопровождается выходом K^+ из астроцитов. Таким образом, блокада как AMPA каналов, так и GLT-1 снижает выход K^+ во внеклеточную среду, что приводит к уменьшению амплитуды медленной компоненты тока, регистрируемой в астроцитах.

Фиксация потенциала нейрона на уровне -70 мВ и одновременно потенциала астроцита на уровне -90 мВ практически исключает выход калия из обеих клеток через ионные каналы. Тем не менее в силу того, что астроциты объединены в синцитий щелевыми контактами, проницаемыми для K^+ , мы можем регистрировать ток обмена ионами калия с соседними астроцитами, причем диффузия ионов калия через синцитий – существенно более медленный процесс, чем вход или выход K^+ через каналы плазматической мембраны. На рис. 2а мы видим существенную временную задержку начала “медленной” компоненты тока в астроците, которая начинает развиваться только после окончания второго стимула, в то время как пики, соответству-

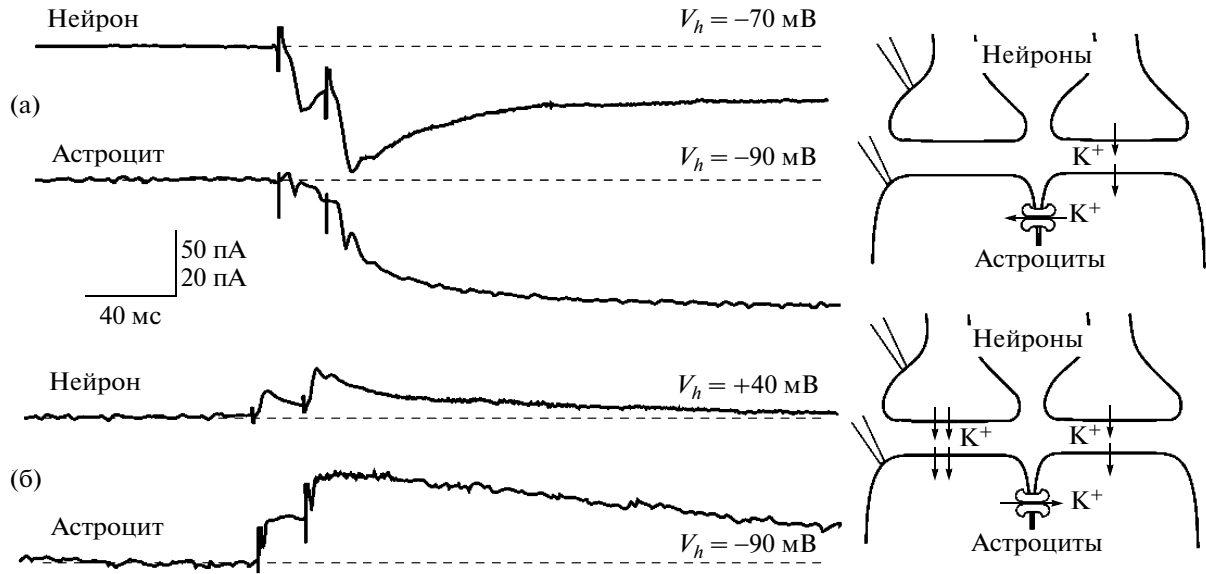


Рис. 2. Одновременная регистрация токового ответа на парную стимуляцию коллатералей Шаффера в нейроне и астроците; а: вверху – синаптические токи в пирамидальной клетке, внизу – ответ астроцита, состоящий из быстрой и медленной компонент; б – то же, но при деполяризации нейрона до +40 мВ; наблюдается инверсия “медленной” компоненты тока в астроците при сохранении направления “быстрого” транспортного тока. На схеме справа стрелками показано соответствующее случаям (а) и (б) направление движения ионов калия между нейронами и астроцитами.

ющие быстрому току через GLT-1, возникают немедленно после каждого стимула. В данном случае выход K^+ из ближайшего к исследуемому астроциту нейрона не происходил, поэтому мы наблюдали не вход K^+ в астроцит из синаптической щели, а его медленное поступление из синцития через щелевые контакты.

В случае фиксации потенциала нейрона на уровне +40 мВ при открывании ионотропных рецепторов глутамата происходил активный выход K^+ из нейрона, ток которого мы и видим на регистрации (рис. 2б). Ток в астроците инвертирован, возникает без задержки, сразу после первого стимула и усиливается в ответ на второй. В данном случае из-за деполяризации нейрона в щель рядом с исследуемым астроцитом происходил активный выброс K^+ , удаляемый астроцитом за миллисекунды [8]. Избыток K^+ выходил через щелевые контакты в синцитий, что приводило к инверсии медленной компоненты тока (рис. 2б).

Мы полагаем, что в обоих случаях продолжительная динамика спада медленной компоненты тока определялась скоростью диффузии K^+ между астроцитами через щелевые контакты.

Следует заметить, что инверсии быстрой компоненты тока в астроците, связанной с работой GLT-1 при деполяризации нейрона до +40 мВ, не происходило, так как этот транспортер работает за счет градиента Na^+ , а не K^+ . По литературным данным [5], блокада тетродотоксином ПД в нейронах подавляла медленную компоненту тока в

астроцитах, что можно объяснить отсутствием выхода K^+ из нейронов при деполяризации.

Эффективность клиренса K^+ астроцитами сильно зависит от их мембранного потенциала, поддерживаемого работой Na/K-АТФазы. В частности, блокада Na/K-АТФазы убаином (100 мкМ) в течение 2 мин вызывает значительное уменьшение амплитуды (на $67.2 \pm 23\%$, $n = 5$, $p < 0.05$) медленного входящего тока в астроците в ответ на стимуляцию. Однако при регистрации только от астроцита (без патча нейрона) фиксация его потенциала в широких пределах от -180 до +100 мВ не вызывала реверсии медленной компоненты тока. Это может быть связано с невозможностью фиксации потенциала мембраны астроцита в области отростков из-за огромных токов утечки через щелевые контакты.

Таким образом, показано, что медленная токочная компонента в астроцитах, возникающая при стимуляции коллатералей Шаффера, определяется параметрами скорости перераспределения калия между астроцитами через щелевые контакты. Длительное (до нескольких) секунд локальное изменение концентрации калия внутри астроцитов может являться основой механизма фасилитации нейронов при стимуляции сериями импульсов, т.е. при частой генерации ПД, в частности, в очагах эпилепсии. Параметры исследованной в данной работе медленной компоненты тока в астроцитах характеризуют возможности сети астроцитов по утилизации и транспорту калия, что, в

свою очередь, является одним из факторов, регулирующих вероятность деполяризации нейронов.

Поддержано грантами РФФИ 11-04-00397 и National Center for Research Resources G12RR003035.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kanai Y., Smith C.P., Hediger M.A. // FASEB J. 1993. V. 7. P. 1450–1459.
2. Schousboe A., Westergaard N., Hertz L. // Biochem. Soc. Trans. 1993. V. 21. P. 49–53.
3. Sonnewald U., Qu H., Aschner M. // J. Pharmacol. and Exp. Therap. 2002. V. 301. P. 1–6.
4. Huang Y.H., Sinha S.R., Tanaka K., et al. // J. Neurosci. 2004. V. 24. P. 4551–4559.
5. Bergles D.E., Jahr C.E. // Neuron. 1997. V. 19. P. 1297–1308.
6. Diamond J.S., Jahr C.E. // J. Neurophysiol. 2000. V. 83. P. 2835–2843.
7. Zhou M., Schools G.P., Kimelberg H.K. // J. Neurophysiol. 2006. V. 95. P. 134–143.
8. Скачков С.Н., Кучерявых Ю.В., Антонов С.М. и др. // Биол. мембраны. 2006. Т. 23. № 2. С. 85–100.