

МОЛЕКУЛЯРНАЯ И КЛЕТОЧНАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

**ОСОБЕННОСТИ ПОСТСИНАПТИЧЕСКИХ ТОКОВ
В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕЙРОНОВ КОРЫ
ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫС**

© Д. А. Сибаров, С. М. Антонов

Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН,
Россия, 194223, Санкт-Петербург, пр. Тореза, 44,
e-mail: dsibarov@gmail.com;
Санкт-Петербургский государственный политехнический университет,
Россия, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 5

В нейронах коры головного мозга крыс в первичной культуре с 7-го по 20-й день культивирования (DIV) изучали особенности генерации постсинаптических токов. Применение специфических блокаторов постсинаптических ионных каналов показало, что с 10 DIV в нейронах генерируются все типы электрической активности, характерные для взрослой коры: спонтанные миниатюрные тормозные (мТПСТ) и возбуждающие (мВПСТ), а также гигантские возбуждающие токи и потенциалы действия (ПД). Частота мВПСТ экспоненциально росла с 7 по 20 DIV параллельно с изменением характера генерации ПД. Выявлены мВПСТ, генерируемые активацией NMDA- и AMPA- или только AMPA-рецепторов. Показана роль ингибирования пресинаптических NMDA-рецепторов ионами магния или AP5 в модуляции частоты и амплитуды мВПСТ, что является отличием культуры нейронов от срезов мозга, по-видимому, связанной с отсутствием глиального контроля синаптической передачи.

Ключевые слова: первичная культура, нейроны, кора, постсинаптические токи, AMPA-, NMDA-рецепторы.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 99. № 6. С. 763—775. 2013

D. A. Sibarov, S. M. Antonov. THE FEATURES OF POSTSYNAPTIC CURRENTS IN PRIMARY CULTURE OF RAT CORTICAL NEURONS. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of the Russian Academy of Sciences, Saint-Peterburg, 194223, Toreza Ave., B. 44, Russia, e-mail: dsibarov@gmail.com; Laboratory of Molecular Neurodegeneration, Saint-Petersburg State Polytechnical University, Saint-Petersburg, 194021, Hlopina St., B. 5, Russia.

The generation features of postsynaptic currents were studied in primary culture of cortical neurons at 7—20 days in vitro (DIV). The use of specific blockers of postsynaptic ion channels after 10 DIV revealed all types of electrical activity found in adult cortex including miniature inhibitory (mIPSCs), excitatory (mEPSCs) and spontaneous giant excitatory currents and spikes. The frequency of mEPSCs increased exponentially from 7 to 20 DIV doubling every 2.2 days in parallel with changes in action potentials generation. The mEPSCs generated by NMDA and AMPA or by only AMPA receptor activation were found. The inhibition of NMDA receptors by magnesium ions or AP5 were shown to modulate the frequency and amplitude of mEPSCs, which

differ primary culture from brain slices possibly because of the lack of glial control of synaptic transmission.

Key words: primary neuronal culture, cortex, postsynaptic currents, AMPA, NMDA

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 99. N 6. P. 763—775. 2013

Первичные культуры нейронов различных отделов мозга являются часто используемой экспериментальной моделью для исследования физиологии нейронов уже не одно десятилетие. Огромное количество данных по механизмам нейротоксичности, электрической активности нейронных сетей, процессам дифференцировки и экспрессии белков, а также анализу внутриклеточных сигналов нейронов было получено именно на первичных культурах. Несмотря на сходство функциональных характеристик нейронов в первичной культуре с таковыми на срезах мозга или *in vivo*, гомеостаз нервной ткани в первичной культуре имеет свои особенности, определяемые плоскостной организацией нейронной сети и глиальным дефицитом. При работе с первичной культурой нейронов следует учитывать ее отличия от, например срезов мозга [27], связанные с «возраст-зависимым» процессом ее созревания, начинающегося с момента посева. В ходе культивирования происходит установление синаптических связей и увеличение их плотности, усиление экспрессии рецепторов глутамата и ГАМК [17], а также специфических для нейронов цитоскелетных белков [14], проявление фенотипа пирамидных нейронов и интернейронов [1], пролиферация глиальных клеток и установление нейроглиальных взаимоотношений. Постепенность созревания культуры определяет также возраст-зависимое увеличение генерации потенциалов действия в культуре [14], а также рост частоты миниатюрных постсинаптических токов [30].

Возбуждающая синаптическая передача в ЦНС является преимущественно глутаматергической [11]. Соответственно генерация возбуждающих постсинаптических токов в ЦНС диктуется кинетикой активации и скоростью десенситизации ионотропных рецепторов глутамата в основном NMDA- и AMPA-типов [16,22]. Соотношение экспрессии этих типов рецепторов, обладающих различными кинетическими параметрами активации и скоростями десенситизации, специфично для разных отделов мозга и определяет функциональные параметры возбудимости нейронов и характер генерации ими потенциалов действия [23]. При нормальных физиологических значениях мембранного потенциала покоя нейронов NMDA-рецепторы блокированы ионами магния и активируются только в момент деполяризации, вызванной потенциалом действия или деполяризующими постсинаптическими токами большой амплитуды [5]. Активация глутаматом AMPA-рецепторов не зависит от мембранного потенциала и ионов магния и обязательна для генерации возбуждающих постсинаптических токов в ЦНС.

Внеклеточная [12] и внутриклеточная [10] регистрация электрической активности первичной культуры нейронов коры применяется исследователями уже не одно десятилетие для изучения процессов, происходящих в нейронных сетях. Тем не менее для нейронов коры в первичной культуре существует крайне мало публикаций, посвященных кинетическим и фармакологическим характеристикам постсинаптических токов, по сравнению с количеством работ на нейронах гиппокампа или мозжечка. При этом имеющиеся публикации относительно нейронов коры касаются либо исключительно частот постсинаптических токов [30], либо посвящены исследованию механизмов синаптической пластичности нейронов в культуре, проявляющиеся в ответ на блокаду генерации нейронами ПД [13]. Генерация постсинаптических токов в результате некантового освобождения медиатора [7, 15, 29] является важнейшим фактором, определяющим формирование синаптических связей как *in vivo*, так и в культуре нейронов [13]. Имеются также существенные функциональные отличия нейронов различных отделов мозга, что может приводить и к функциональным отличиям культур нейронов, выделенных из этих отделов [23].

Целью настоящего исследования было описание особенностей спонтанных постсинаптических токов в нейронах коры большого мозга крыс в первичной культуре, наблюдаемых на различных сроках культивирования. В работе также приведены характеристики основных типов постсинаптических токов, оценена роль различных рецепторов в их генерации и изучены механизмы регуляции их частоты, амплитуды и формы.

МЕТОДИКА

Исследования проводили на первичной культуре нейронов коры большого мозга крыс линии Вистар при температуре 23—26 °С. Для процедуры приготовления первичной культуры нейронов, описанной ранее [3, 4], использовали эмбрионы на 16-й день пренатального развития (E16). Кору головного мозга эмбрионов выделяли на чашке Петри со льдом. Клетки культивировали в питательной среде на стеклах, предварительно обработанных поли-D-лизинном. Патч-кламп регистрацию постсинаптических токов проводили в конфигурации «целая клетка» на нейронах с 7-го по 21й день культивирования (7—21 days in vitro, DIV). В опытах использовали внеклеточный перфузионный раствор следующего состава (мМ): NaCl 140; KCl 2.8; CaCl₂ 1.0; MgCl₂ 1.0; HEPES 10, при pH 7.2—7.4. В зависимости от задач в ряде опытов из раствора был исключен Mg²⁺, что описано в результатах экспериментов. Внутриклеточный раствор для заполнения микроэлектрода 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 [13]. Для регистрации токов применяли патч-кламп усилитель MultiClamp 700B с системой сбора данных Digidata 1440A и программное обеспечение pClamp v10.2 (Molecular Devices, США). Частота дискретизации составляла 20 000 изм/с с предварительной аналоговой фильтрацией (эквивалент фильтра Бесселя 8 порядка) с частотой среза 1.4 КГц для удаления высокочастотных шумов. Позиционирование кончика микроэлектрода выполняли микроманипулятором MP-85 (Sutter Inc, США) под визуальным контролем на инвертированном микроскопе Nikon Diaphot TMD (Nikon, Япония). Для аппликации тестовых веществ использовали систему быстрой смены растворов на базе BPS-4 (Ala Scientific Instruments, США). Ниже приведены концентрации использованных реагентов: 50 мкМ AP5 [(2R)-амино-5-фосфопентаноат, специфический антагонист NMDA-рецепторов]; 30 мкМ CNQX (6-циано-7-нитрокиноксалин-2,3-дион, антагонист AMPA-каинатных рецепторов); 20 мкМ бикуккуллин (антагонист рецепторов типа А гамма-аминомасляной кислоты, ГАМК_A); 0.5 мкМ тетродотоксин (ТТХ, блокатор натриевых каналов). Все среды для приготовления культур ткани приобретены в фирме Биолот, Россия; остальные вещества поставлены фирмой Sigma Aldrich, США.

Поиск постсинаптических токов, а также анализ их частоты и формы выполняли в программе Clampfit 10.2, входящей в пакет pClamp. Оценку формы миниатюрных постсинаптических токов проводили по фазе спада в промежутке от 10 до 90 % амплитуды. Для определения постоянной времени спада (τ) выполняли аппроксимацию фазы спада одной или суммой двух экспонент [$f(t) = A_1 \cdot \exp(-t/\tau_1) + A_2 \cdot \exp(-t/\tau_2) + C$] методом Левенберга—Марквардта с минимизацией по сумме квадратов отклонений.

Статистическую обработку полученных результатов, регрессионный анализ и построение графиков выполняли в программе GraphPad Prism v5.0. Сравнение групп измерений выполняли при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с post-hoc обработкой Тьюки. Достоверными считались отличия групп измерений при уровне вероятности $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Миниатюрные возбуждающие постсинаптические токи (мВПСТ) в первичной культуре нейронов коры большого мозга крыс удается стабильно регистрировать приблизительно с 6 DIV. По мере созревания культуры происходит экспоненциальный рост частоты мВПСТ (рис. 1, А). В среднем частота мВПСТ удваивается за 2.2 дня. Наблюдаются также различия в возбудимости нейронов разных возра-

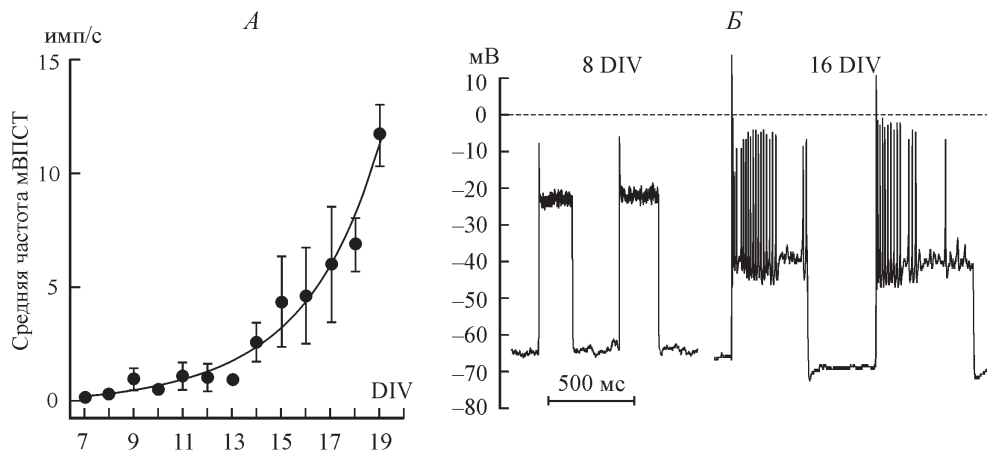


Рис. 1. Генерация нейронами мВПСТ и потенциалов действия в зависимости от срока культивирования коры большого мозга крыс.

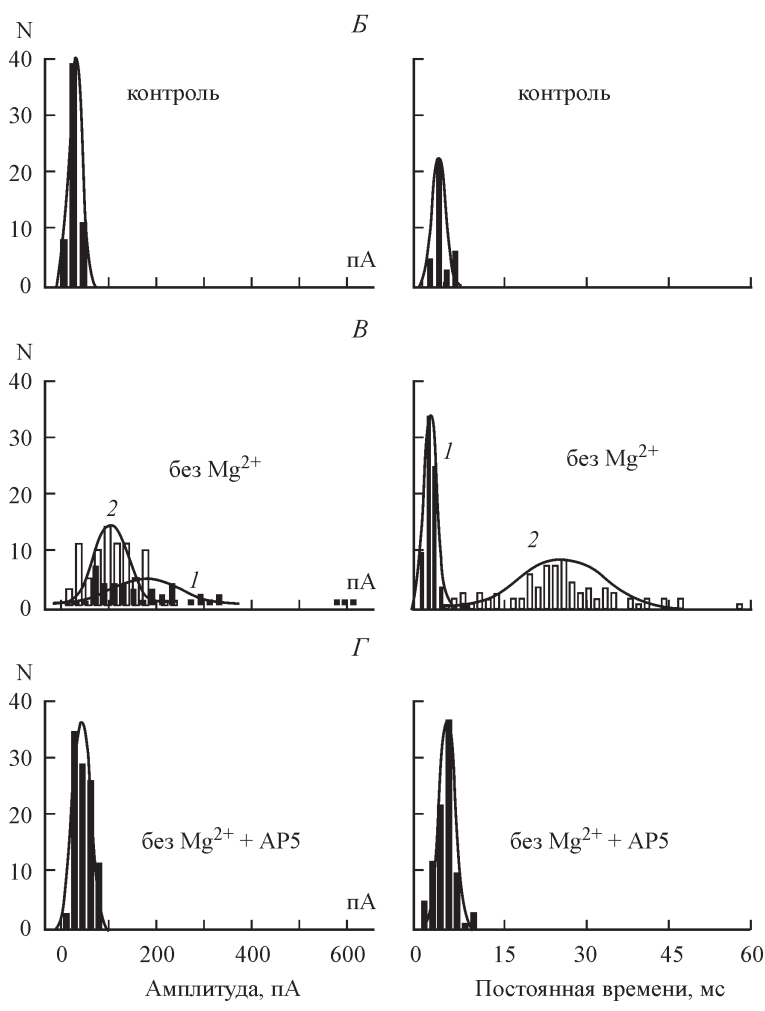
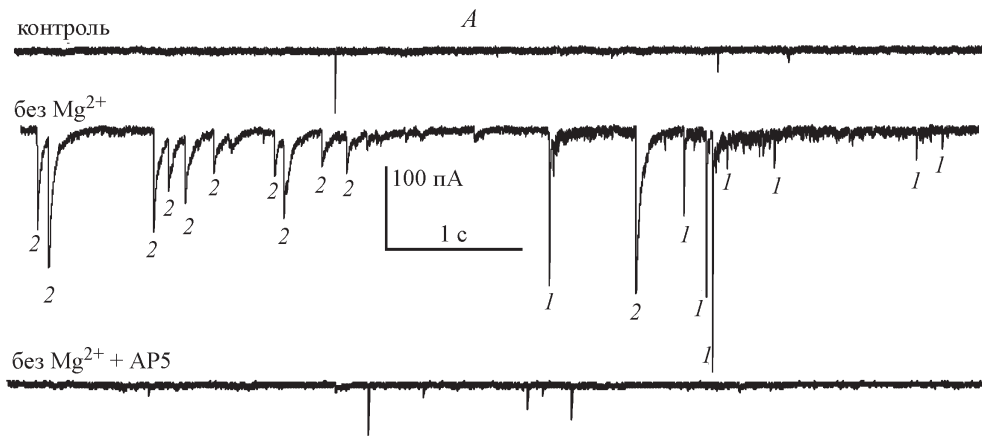
A — зависимость средней частоты миниатюрных постсинаптических токов в первичной культуре нейронов коры от срока культивирования. С 7-го по 20-й день культивирования наблюдается экспоненциальный рост частоты мВПСТ. Регрессионный анализ показывает удвоение частоты каждые 2.2 ± 0.1 дня ($n = 51$); *B* — генерация потенциалов действия нейронами коры в первичной культуре в ответ на ступеньку тока $+50$ пА. Для 8-го дня характерна генерация одиночных ПД, не достигающих овершута. На 16-й день в культуре присутствуют нейроны, генерирующие серии ПД, причем деполяризация достигает овершута.

стов и способности их генерировать потенциал действия (ПД) в ответ на стимуляцию (рис. 1, *B*). Так, большинство клеток возраста 8 DIV в ответ на деполяризующую ступеньку тока в 50 пА генерировали только один ПД, редко достигающий овершута. Нейроны 16 DIV в ответ на такую же стимуляцию часто генерировали серии ПД. Нейроны со спонтанной периодической генерацией ПД наблюдались в культуре примерно с 10 DIV. С 10—12 DIV частота мВПСТ в записях становится достаточной для статистического анализа формы синаптических токов, поэтому приведенные далее данные соответствуют возрасту культуры с 10 по 21 DIV.

В контрольном перфузионном растворе в большинстве нейронов регистрировались мВПСТ со средней амплитудой около 40 пА и постоянной времени спада 3.6 мс (рис. 2, *A, B*). Генерация мВПСТ носила нерегулярный характер. Фаза спада мВПСТ описывалась одной экспонентой.

В перфузионном растворе, не содержащем ионы магния, существенно возрастала средняя частота мВПСТ (рис. 2, *A*), а также достоверно выделялись два кластера токов, различающиеся по продолжительности, хотя и сходные по амплитуде (рис. 2, *B*). Короткие по продолжительности мВПСТ имели постоянную времени спада 3.5 ± 0.1 мс (1 на рис. 2, *A* и *B*) и их форма соответствовала токам, наблюдаемым в контроле. Более длительные мВПСТ (2 на рис. 2, *A* и *B*) при аппроксимации одной экспонентой имели среднюю постоянную времени спада 25.5 ± 1.5 мс, однако их форма лучше всего описывалась суммой двух экспонент с постоянными времени 1.2 ± 0.1 и 39.1 ± 4.6 мс (рис. 3, *A*). На рис. 2, *A* приведен фрагмент записи, в котором оба типа токов (1 и 2) регистрируются на одном нейроне, что указывает на существование нескольких синаптических входов в этой клетке.

Для изучения вклада известных типов ионотропных рецепторов глутамата в форму мВПСТ были проведены эксперименты с избирательным блокированием NMDA- или AMPA-рецепторов в безмагниевоm растворе.



Добавление в перфузионный раствор антагониста NMDA-рецепторов AP5 (50 мкМ) приводило к исчезновению длительных двухкомпонентных постсинаптических токов (рис. 2, *Г*) и снижению средней частоты мВПСТ (рис. 2, *А*). Оставшиеся однокомпонентные мВПСТ имели постоянную времени спада около 5.4 мс. Добавление в перфузионный раствор 30 мкМ антагониста AMPA-рецепторов CNQX на фоне действия AP5 приводило к полному исчезновению мВПСТ. Таким образом, необходимым условием регистрации мВПСТ, содержащих медленную токовую компоненту (2' на рис. 3, *А*), являлось отсутствие в растворе антагонистов NMDA-рецепторов — магния и AP5.

Сопоставление усредненной формы мВПСТ, зарегистрированных в контроле, в безмагниевого раствора и при блокировании NMDA-каналов AP5 (рис. 3, *Б*), показывает вклад тока через каналы NMDA-рецепторов в амплитуду и форму постсинаптических токов. Однокомпонентные токи, зарегистрированные в контроле, в безмагниевого раствора или в безмагниевого раствора в присутствии AP5 имели постоянную времени спада 3.5—5.6 мс и достоверно не различались по продолжительности (рис. 3, *В*). Длительные двухкомпонентные токи (постоянная времени спада 25.5 ± 1.5 мс при аппроксимации одной экспонентой) регистрировались только в безмагниевого раствора.

Средняя амплитуда мВПСТ в контроле составляла около 41.2 пА (рис. 3, *В*) с некоторой тенденцией к снижению при действии AP5. В безмагниевого раствора амплитуда постсинаптических токов существенно возрастала до 111 пА для двухкомпонентных мВПСТ, содержащих компоненту NMDA-рецепторов, и до 173 пА для однокомпонентных быстрых мВПСТ.

С увеличением возраста культуры, особенно после 10 DIV, усиливается способность спонтанной генерации нейронами ПД, в связи с чем регистрировались гигантские ВПСТ (амплитудой от 300—400 пА). Добавление в перфузионный раствор 0.5 мкМ тетродотоксина вызывало исчезновение гигантских ВПСТ, но не оказывало влияния на миниатюрные ВПСТ (рис. 4). Таким образом, генерация гигантских ВПСТ связана с синхронным выбросом множества синаптических везикул в ответ на ПД, спонтанно генерируемые пресинаптическими нейронами.

Миниатюрные тормозные постсинаптические токи (мТПСТ) были зарегистрированы в части нейронов (рис. 5). Для идентификации мТПСТ нами был применен подход, основанный на значительной разнице потенциалов реверсии катионных и анионных токов, ранее использованный в при работе на нейронах гиппокампа [9]. мТПСТ имели существенно большую длительность, чем ВПСТ, и блокировались биккулином (20 мкМ), что подтверждает их генерацию вследствие активации в этой клетке рецепторов γ -аминомасляной кислоты А-типа (ГАМК_A). Потенциал реверсии мТПСТ составил около -42 мВ (рис. 5, *А*), т. е. был более положительным, чем мембранный потенциал покоя большинства нейронов. При фиксации напряжения мембраны (V_h) на -30 мВ тормозные и возбуждающие токи регистрируются как разнонаправленные (рис. 5, *Б*). При $V_h = -70$ мВ мТПСТ оказываются выходящими, однако их значительно меньшая амплитуда и большая длительность по сравнению с ВПСТ позволяет отличать их при анализе.

Рис. 2. Два типа миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов (мВПСТ), различающихся по динамике спада (1 — однокомпонентные и 2 — двухкомпонентные).

А — примеры регистраций мВПСТ в контроле, в отсутствие ионов магния и при блокировании каналов NMDA-рецепторов AP5 в безмагниевого раствора; *Б* — распределение амплитуды и постоянной времени спада мВПСТ в контроле. мВПСТ не различаются по длительности ($n = 72$); *В* — распределение амплитуды и постоянной времени спада мВПСТ в безмагниевого раствора ($n = 326$); *Г* — распределение амплитуды и постоянной времени спада мВПСТ в безмагниевого раствора, но при блокировании NMDA-рецепторов AP5 ($n = 180$). Отсутствуют длительные мВПСТ.

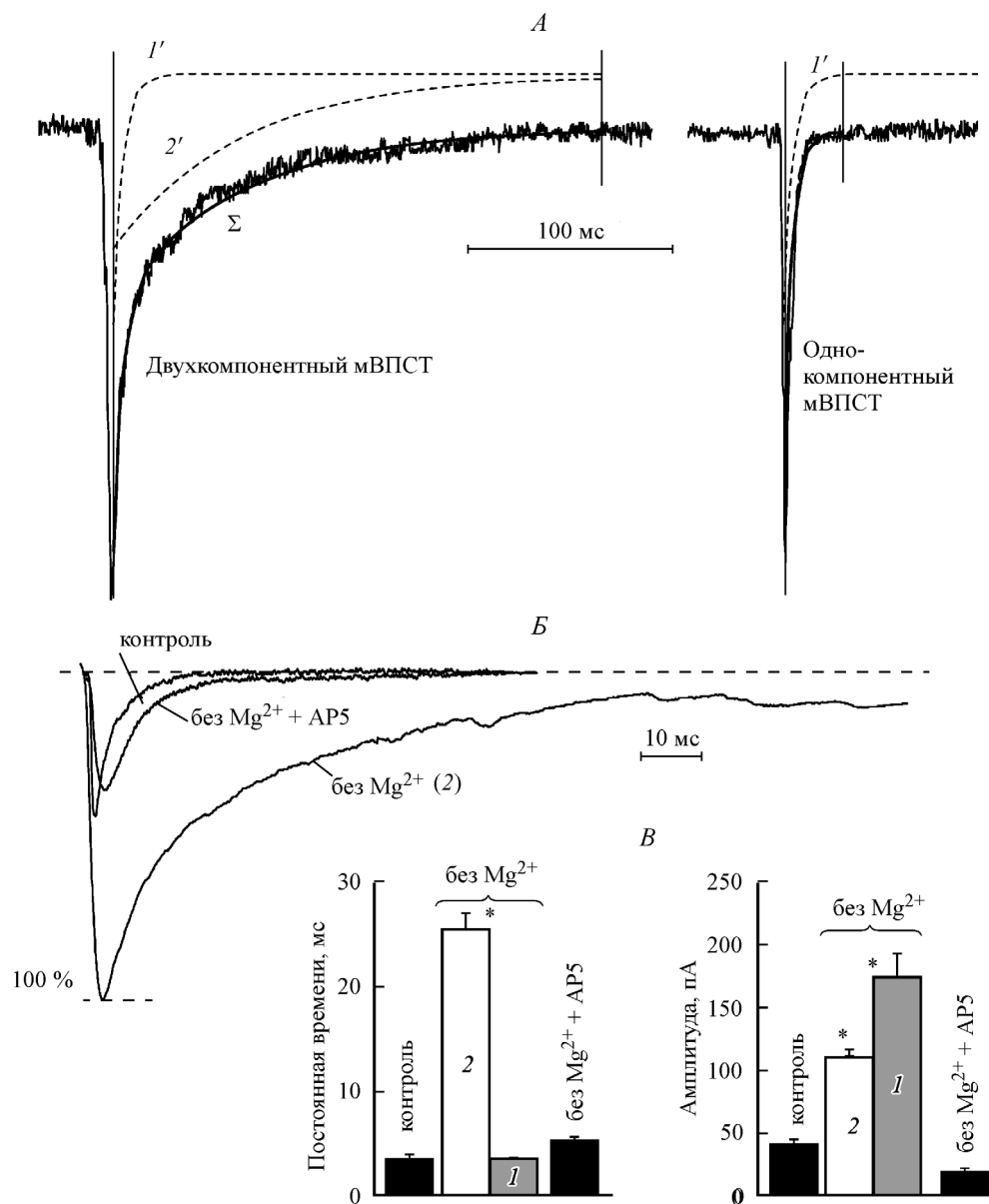


Рис. 3. Вклад NMDA-рецепторов в амплитуду и форму миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов.

A — анализ формы возбуждающих одно- и двухкомпонентных миниатюрных возбуждающих постсинаптических токов, регистрируемых от одного нейрона в безмагниевого раствора. Форма двухкомпонентных мВПСТ описывается суммой двух экспонент *1'* и *2'* с постоянными времени спада 1.2 ± 0.1 мс и 39.1 ± 4.6 мс ($n = 60$) соответственно. Форма однокомпонентных мВПСТ описывалась одной экспонентой с постоянной времени спада 3.6 ± 0.1 мс ($n = 40$); *B* — наложение усредненной формы мВПСТ в контроле ($n = 72$), в безмагниевого раствора ($n = 326$) и в безмагниевого раствора, когда каналы NMDA-рецепторов блокированы AP5 ($n = 180$); *B* — средние значения постоянной времени спада и амплитуды мВПСТ в контроле, в безмагниевого раствора и при действии антагониста NMDA-рецепторов (число опытов 6). *1* — однокомпонентные мВПСТ; *2* — двухкомпонентные мВПСТ; * обозначает достоверное отличие от остальных групп ($p < 0.05$, ANOVA, post-hos обработка Тьюки).

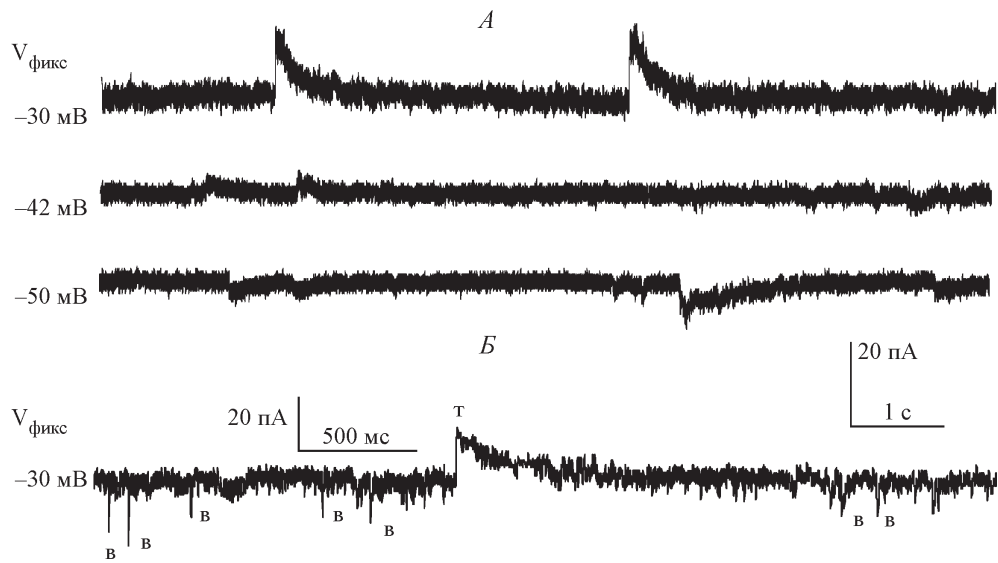


Рис. 4. Тормозные постсинаптические токи в нейронах коры в первичной культуре.
A — определение потенциала реверсии тормозных токов; *B* — противоположная направленность тормозных токов при деполяризации нейрона до -30 мВ (в — возбуждающие токи, т — тормозные).

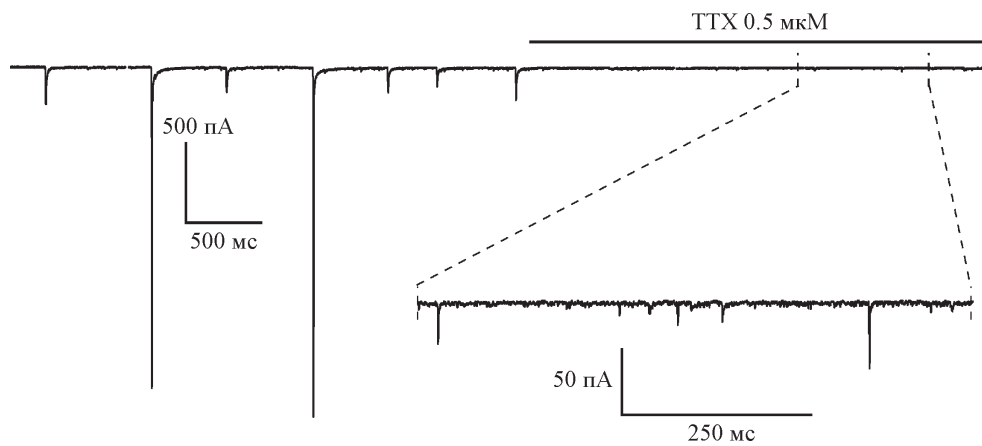


Рис. 5. Спонтанные гигантские постсинаптические токи в культуре нейронов первичной коры, регистрируемые в ответ на ПД в пресинаптическом нейроне. Апликация тетродотоксина подавляет гигантские, но не влияет на миниатюрные постсинаптические токи.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Возможность регистрации постсинаптических токов в культуре нейронов определяется процессом формирования синаптических связей, а также постепенным увеличением количества экспрессированных в мембране NMDA и AMPA-рецепторов [17]. Экспоненциальное увеличение частоты мВПСТ, наблюдаемое в первичной культуре нейронов коры с 7 по 21 DIV (рис. 1, А), идет параллельно с возрастным ростом частоты ПД, регистрируемых внеклеточными массивами микроэлектродов, а также с усилением экспрессии цитоскелетных дендритных белков MAP2 и NF200 [14]. Разница в характере генерации ПД между 8 и 16 DIV (рис. 1, Б) хорошо иллюстрирует процесс созревания нейронов в культуре. Только в культуре нейронов с возрастом культивирования более 10 DIV удавалось найти нейроны, генерирующие серии ПД спонтанно или в ответ на стимуляцию током.

Абсолютные частоты мВПСТ, измеренные в безмагниевом растворе, были значительно выше, чем в растворе с магнием в наших экспериментах и данных других авторов [30], в одни и те же сроки культивирования. Такая разница вполне ожидаема, если предполагать существование ауторецепторов NMDA-типа, блокада каналов которых магнием [5] снижает частоту мВПСТ (рис. 2, А). Возрастное увеличение экспрессии нейронами ионотропных рецепторов глутамата в кортикальной культуре начиная с 5 DIV [17], делает нейроны все более чувствительными к эксайтотоксическому воздействию. Так, до 6—8 DIV глутамат в концентрации 100 мкМ еще не вызывает апоптоза корковых нейронов [20] и не приводит к преапоптозной деполяризации митохондрий нейронов гиппокампа [28]. На более поздних сроках созревания нейронов в первичной культуре эксайтотоксичность глутамата значительно выше. Так, сильный нейротоксический эффект при действии насыщающих концентраций агонистов ионотропных рецепторов глутамата (100 мкМ глутамата или 30 мкМ NMDA или 30 мкМ КА) показан на нейронах гиппокампа (>11 DIV) [28] и нейронах коры [20]. Это обусловлено тем, что количественное увеличение экспрессии NMDA-рецепторов, включающих GluN2B (или $\epsilon 2$, NR2B) и GluN1 (или $\zeta 1$, NR1) субъединицы, происходит на сроках около 10—12 DIV [21].

В контроле концентрация ионов магния в растворе составляла 1 мМ, что в норме определяет потенциал-зависимый блок NMDA-каналов [5]. При этом каналы NMDA рецепторов в нейронах блокированы при мембранном потенциале покоя, но не блокированы при деполяризации мембраны до положительных значений, вызываемой генерацией ПД. Высокая кальциевая проницаемость NMDA-каналов вносит существенный вклад во вход кальция в нейрон при деполяризации [1, 26]. В искусственных экспериментальных условиях в безмагниевом растворе каналы NMDA-рецепторов при -70 мВ не блокированы, поэтому в ответ на спонтанное высвобождение отдельных синаптических везикул с глутаматом наблюдается входящий ток не только через каналы AMPA-, но и через каналы NMDA-рецепторов. В силу того, что скорость десенситизации AMPA-рецепторов составляет около 1 мс [22], а скорость десенситизации NMDA-рецепторов десятки мс [16], форма мВПСТ при активации обоих типов рецепторов становится двухкомпонентной (рис. 3, А).

Таким образом, использование в наших экспериментах безмагниевого раствора позволяет различать типы мВПСТ: однокомпонентные с динамикой тока, соответствующей скорости десенситизации AMPA-рецепторов и двухкомпонентные токи, форма которых наилучшим образом описывается как сумма компонент «быстрых» (постоянными времени спада 1.2 ± 0.1 мс) каналов AMPA-рецепторов и «медленных» (постоянными времени спада 39.1 ± 4.6 мс) каналов NMDA-рецепторов (рис. 3, А). Одновременная регистрация на некоторых нейронах обоих типов токов (рис. 2, А) указывает на существование на них нескольких синаптических входов, отличающихся по рецепторному составу постсинаптической

мембраны. В результате мВПСТ, регистрируемые на нейронах в безмагниево-м растворе, представлены двумя кластерами, различающимися по длительности (рис. 2, *В*). Наблюдаемое различие мВПСТ, возникающих в различных синаптических зонах, характерно и для постнатального мозга, в котором рецепторный состав постсинаптических зон меняется в зависимости от типа нейронов, активности синаптического входа [8] и количества синаптических входов на нейроне [6].

Блокирование NMDA-рецепторов ионами магния в контроле (рис. 2, *Б*) или при действии AP5 (рис. 2, *Г*) сокращает фазу спада мВПСТ до 3.6 мс. При этом длительность однокомпонентных мВПСТ в безмагниево-м растворе достоверно не отличалась от длительности мВПСТ в контроле. На рис. 2, *А* также видно, что устранение магниевого блока каналов NMDA-рецепторов вызывает не только появление длительных мВПСТ, но и увеличение их частоты и амплитуды в несколько раз. Средняя амплитуда мВПСТ, зарегистрированная нами в контроле, составляла 41 пА, что совпадает с данными Хана и Стивенса [13]. Вероятнее всего, именно эта амплитуда тока соответствует освобождению в синаптическую щель содержимого одной синаптической везикулы [2]. Более чем вдвое большая амплитуда мВПСТ наблюдается в безмагниево-м растворе. При этом кластер мВПСТ с короткой постоянной времени спада (3.6 мс) характеризуется наибольшей средней амплитудой 173 пА, что заставляет считать их многоквантовыми, т. е. вызванными синхронизированным спонтанным высвобождением нескольких синаптических везикул. Кластер двухкомпонентных мВПСТ, имеющих в составе ток NMDA-рецепторов, демонстрирует несколько меньшую среднюю амплитуду (111 пА), чем кластер однокомпонентных мВПСТ, генерируемых исключительно током через AMPA-рецепторы. Возможным объяснением этой разницы может быть преимущественное связывание медиатора на постсинаптической мембране с NMDA-рецепторами, имеющими большую константу связывания глутамата по сравнению с AMPA-рецепторами. Известно, что высвобождение отдельных синаптических везикул не создает насыщающей концентрации для постсинаптических рецепторов глутамата [18], поэтому NMDA-рецепторы, имеющие высокое сродство к глутамату конкурируют за медиатор с AMPA-рецепторами, которые преимущественно определяют амплитуду мВПСТ. В результате с постсинаптической области, несущей только AMPA-рецепторы, регистрируются мВПСТ большей амплитуды, чем с постсинаптической области смешанного рецепторного состава.

Одно- и двухкомпонентные мВПСТ в безмагниево-м растворе, вероятнее всего, являются многоквантовыми. Количество синаптических везикул, которые синхронно выбрасываются в синаптическую щель, регулируется, в частности, концентрацией внутриклеточного свободного кальция в пресинапсе [2, 25]. Учитывая тот факт, что NMDA-каналы экспрессированы не только на постсинаптической, но и на пресинаптической мембранах и высокопроницаемы для кальция, увеличение частоты мВПСТ будет приводить к увеличению концентрации свободного кальция в пресинапсе [24–26]. Отсутствие в физиологическом растворе ионов магния может вызывать усиление входа кальция в пресинапс через NMDA-каналы и, таким образом, увеличивать вероятность как одиночного, так и многоквантового спонтанного выброса синаптических везикул, приводя к росту частоты и амплитуды постсинаптических токов (рис. 3, *В*). Таким образом, в культуре нейронов в безмагниево-м растворе наблюдается положительная обратная связь между частотой постсинаптических токов и их амплитудой.

Увеличение амплитуды и квантового состава мВПСТ при снятии блока NMDA-рецепторов, по-видимому, является особенностью первичной культуры, отличающей ее от срезов мозга. В работах, выполненных на срезах коры [23], также применяли безмагниево-й раствор, чтобы выявить в постсинаптических токах компоненты NMDA- и AMPA-каналов. Однако ингибирование тока через каналы NMDA-рецепторов при помощи AP5 на срезах влияло только на продолжитель-

ность мВПСТ, но не на амплитуду. В работе, выполненной на срезах гиппокампа [19], также показано, что блокирование токовой компоненты NMDA-каналов не влияет на амплитуду мВПСТ, в то время как блокирование токовой компоненты AMPA-каналов снижает амплитуду мВПСТ в несколько раз.

В первичной культуре нейронов блокирование NMDA-рецепторов ионами магния снижает не только продолжительность, но и амплитуду мВПСТ. Причиной такой особенности, вероятно, является то, что первичная культура нейронов коры развивается в условиях дефицита глиальных клеток и имеет отличный от срезов мозга метаболизм. Астроциты в культуре нейронов не принимают участия в удалении медиатора из синаптической щели, а также в регулировании ионного баланса в пресинапсе. Именно вход кальция в пресинапс через пресинаптические NMDA-рецепторы может определять вероятность одновременного высвобождения нескольких синаптических везикул и кратного роста амплитуды мВПСТ. Это также подтверждается экспериментами, в которых связывание внутриклеточного кальция хелатором вызывало концентрационно-зависимое снижение частоты и амплитуды мВПСТ как в контрольном физиологическом растворе, так и при действии NMDA [26].

В контроле магниевый блок NMDA-каналов заставляет предполагать преимущественный вклад AMPA-рецепторов в амплитуду мВПСТ. Блокирование AMPA-рецепторов при помощи CNQX подавляло или многократно снижало амплитуду мВПСТ практически во всех исследованных нейронах. Для постсинаптических зон, не несущих NMDA-рецепторы, применение CNQX снижает амплитуду мВПСТ ниже уровня шума. Таким образом, как и на срезах, на первичной культуре амплитуда одноквантового мВПСТ определяется током через AMPA-каналы.

Увеличение же амплитуды ВПСТ за счет многоквантового выброса медиатора наиболее ярко проявляется в случае вызванных ВПСТ. Гигантские ВПСТ (рис. 4), регистрируемые на некоторых нейронах, после 10 DIV достигали микроамперных амплитуд и являлись результатом массового синхронного выброса синаптических везикул в ответ на ПД, что подтверждается их полным исчезновением при блокировании генерации ПД в пресинаптических нейронах тетродотоксином. На фрагменте записи рис. 4 видны гигантские ВПСТ, в несколько раз различающиеся по амплитуде и, вероятнее всего, генерирующиеся в разных синаптических зонах двух синаптических входов. Вставка с увеличенным масштабом позволяет визуально сравнить амплитуду гигантских и миниатюрных ВПСТ.

Постепенное усиление экспрессии ГАМК-рецепторов по мере созревания культуры нейронов связано с формированием тормозной синаптической передачи. мВПСТ регистрировались в первичной культуре нейронов, начиная с 9—10 DIV, и определялись током через ГАМК_A-рецепторы, что подтверждается блокированием мВПСТ бикакуллином. Таким образом, в процессе созревания первичной культуры нейронов коры происходит формирование полноценной возбуждающей и тормозной синаптической передачи, аналогичной постнатальному мозгу.

Следует также упомянуть, что в культуре нейронов коры после 10 DIV периодически регистрировали синхронизированное возбуждение нейронов, вызывающее появление гигантских входящих эпилептиформных токов. Аналогичные явления были показаны и на срезах мозга. Анализ их природы требует дополнительных исследований и не является предметом рассмотрения в настоящей статье.

Таким образом, сеть нейронов коры в культуре ткани воспроизводит все известные типы электрической активности мозга, которые при этом имеют некоторые особенности, связанные в первую очередь с отсутствием активных систем удаления нейромедиаторов из синаптической щели. Широкое использование первичных культур нейронов коры в современных нейробиологических исследованиях во всем мире требует знания особенностей электрогенеза синаптических взаимодействий.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе созревания в нейронах первичной культуры коры большого мозга крыс с 7-го по 20-й день происходит экспоненциальный рост частоты спонтанных постсинаптических токов, идущий параллельно с увеличением плотности синаптических связей и усилением экспрессии всех типов рецепторов, принимающих участие в синаптической передаче. Начиная примерно с 9—10 DIV, в нейронах уверенно регистрируются постсинаптические токи определяемые активацией AMPA-, NMDA- и ГАМК-рецепторов. Снятие магниевого блока каналов NMDA-рецепторов, в том числе пресинаптических, обеспечивает вход кальция в пресинапс и увеличение вероятности выброса синаптических везикул, выражающееся в росте частоты, и появлении спонтанных многоквантовых мВПСТ. Регистрация в одном нейроне одно- и двухкомпонентных мВПСТ указывает на существование постсинаптических зон, несущих как исключительно AMPA-рецепторы, так и имеющих смешанный состав из NMDA- и AMPA-рецепторов. Блокирование NMDA-рецепторов AP5 в безмагниевого растворе устраняет медленную компоненту мВПСТ, уменьшает амплитуду и частоту мВПСТ до контрольного уровня. Это предполагает, что квантовый выброс медиатора регулируется пресинаптическими NMDA-рецепторами, обеспечивающими вход кальция в пресинапс.

В целом рецепторные механизмы синаптической передачи в нейронной сети первичной культуры коры возрастом более 12 DIV сходны с таковыми, показанными для срезов мозга. Обнаруженные особенности синаптического электрогенеза, по-видимому, определяются отсутствием изолированности синапсов от внесинаптического пространства глиальными клетками и активных систем удаления нейромедиаторов из синаптической щели.

Авторы статьи выражают благодарность П. А. Абушику за огромную помощь в выращивании первичной культуры нейронов. Работа поддержана грантом РФФИ № 11-04-00397 и Федеральной целевой программой Минобрнауки (соглашение № 8476).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Абушик П. А., Большаков А. Е., Сибаров Д. А., Антонов С. М. Гетерогенность механизмов кальциевого ответа на каинат и типы нейронов в первичной культуре коры мозга крыс. Биологические мембраны. 28 (1) : 25—34. 2011.
- [2] Зефирова А. Л., Черанов С. Ю. Молекулярные механизмы квантовой секреции медиатора в синапсе. Успехи физиол. наук. 31 (3) : 3—22. 2000.
- [3] Миронова Е. В., Лукина А. А., Бровцына Н. Б., Кривченко А. И., Антонов С. М. Типы рецепторов глутамата, определяющие концентрационную зависимость его нейротоксического действия на нейроны коры головного мозга крыс. Журн. эволюц. биохимии и физиологии. 42 : 559—566. 2006.
- [4] Antonov S. M., Johnson J. W. Voltage-dependent interaction of open channel blocking molecules with gating of NMDA receptors in rat cortical neurons. J. Physiol. 493 : 425—445. 1996.
- [5] Antonov S. M., Johnson J. W. Permeant ion regulation of N-methyl-D-spartate receptor channel block by Mg²⁺. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96 : 14571—14576. 1999.
- [6] Antonov S. M., Kalinina N. I., Kurchavyj G. G., Magazanik L. G., Shupliakov O. V., Veselkin N. P. Identification of two types of excitatory monosynaptic inputs in frog spinal motoneurons. Neurosci. Lett. 109: 82—87. 1990.
- [7] Antonov S. M., Magazanik L. G. Intense non-quantal release of glutamate in an insect neuromuscular junction. Neurosci. Lett. 93 (2—3) : 204—208. 1988.
- [8] Ashby M. C., Daw M. I., Isaac J. T. R. AMPA receptors. In: R. W. Gereau, G. T. Swanson (eds). The glutamate receptors. Totowa, NJ. Humana Press. 2008.

- [9] *Buldakova S. L., Tikhonov D. B., Magazanik L. G.* Analysis of the excitatory and inhibitory components of postsynaptic currents recorded in pyramidal neurons and interneurons in the rat hippocampus. *Neurosci. Behav. Physiol.* 35 (8) : 835—843. 2005.
- [10] *Dichter M. A.* Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology, and synapse formation. *Brain Res.* 149 (2) : 279—293. 1978.
- [11] *Fonnum F.* Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42 (1) : 1—11. 1984.
- [12] *Gross G. W., Wen W. Y., Lin J. W.* Transparent indium-tin oxide electrode patterns for extracellular, multisite recording in neuronal cultures. *J. Neurosci. Methods.* 15 (3) : 243—252. 1985.
- [13] *Han E. B., Stevens C. F.* Development regulates a switch between post- and presynaptic strengthening in response to activity deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 106 : 10 817—10 822. 2009.
- [14] *Ito D., Tamate H., Nagayama M., Uchida T., Kudoh S. N., Gohara K.* Minimum neuron density for synchronized bursts in a rat cortical culture on multi-electrode arrays. *Neuroscience.* 171 : 50—61. 2010.
- [15] *Katz B., Miledi R.* Does the motor nerve impulse evoke 'non-quantal' transmitter release? *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 212 (1186) : 131—137. 1981.
- [16] *Lester R. A., Clements J. D., Westbrook G. L., Jahr C. E.* Channel kinetics determine the time course of NMDA receptor-mediated synaptic currents. *Nature.* 346 : 565—567. 1990.
- [17] *Lesuisse C., Martin L. J.* Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *J. Neurobiol.* 51 (1) : 9—23. 2002.
- [18] *McAllister A. K., Stevens C. F.* Nonsaturation of AMPA and NMDA receptors at hippocampal synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 (11) : 6173—6178. 2000.
- [19] *McBain C. J., Dingledine R.* Heterogeneity of synaptic glutamate receptors on CA3 stratum radiatum interneurons of rat hippocampus. *J. Physiol.* 462 : 373—392. 1993.
- [20] *Mironova E. V., Evstratova A. A., Antonov S. M.* A fluorescence vital assay for the recognition and quantification of excitotoxic cell death by necrosis and apoptosis using confocal microscopy on neurons in culture. *J. Neurosci. Methods.* 163 (1) : 1—8. 2007.
- [21] *Mizuta I., Katayama M., Watanabe M., Mishina M., Ishii K.* Developmental expression of NMDA receptor subunits and the emergence of glutamate neurotoxicity in primary cultures of murine cerebral cortical neurons. *Cell. Mol. Life Sci.* 54 : 721—725. 1998.
- [22] *Mosbacher J., Schoepfer R., Monyer H., Burnashev N., Seeburg P. H., Ruppertsberg J. P.* A molecular determinant for submillisecond desensitization in glutamate receptors. *Science.* 266 (5187) : 1059—1062. 1994.
- [23] *Myme C. I. O., Sugino K., Turrigiano G. G., Nelson S. B.* The NMDA-to-AMPA ratio at synapses onto layer 2/3 pyramidal neurons is conserved across prefrontal and visual cortices. *J. Neurophysiol.* 90 (2) : 771—779. 2003.
- [24] *Petrov K. A., Malomouzh A. I., Kovyazina I. V., Krejci E., Nikitashina A. D., Proskurina S. E., Zobov V. V., Nikolsky E. E.* Regulation of acetylcholinesterase activity by nitric oxide in rat neuromuscular junction via N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Eur. J. Neurosci.* 37 (2) : 181—189. 2013.
- [25] *Pinheiro P. S., Mulle C.* Presynaptic glutamate receptors: physiological functions and mechanisms of action. *Nat. Rev. Neurosci.* 9 : 423—436. 2008.
- [26] *Sibarov D. A., Bolshakov A. E., Abushik P. A., Krivoi I. I., Antonov S. M.* Na⁺,K⁺-ATPase functionally interacts with the plasma membrane Na⁺,Ca²⁺-exchanger to prevent Ca²⁺ overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343 (3) : 596—607. 2012.
- [27] *Szczot M., Wojtowicz T., Mozrzymas J. W.* GABAergic and glutamatergic currents in hippocampal slices and neuronal cultures show profound differences: A clue to a potent homeostatic modulation. *J. Physiol. Pharmacol.* 61 (4) : 501—506. 2010.
- [28] *Vergun O., Keelan J., Khodorov B. I., Duchon M. R.* Glutamate-induced mitochondrial depolarisation and perturbation of calcium homeostasis in cultured rat hippocampal neurons. *J. Physiol.* 519 (Pt 2) : 451—466. 1999.
- [29] *Vyskocil F., Malomouzh A. I., Nikolsky E. E.* Non-quantal acetylcholine release at the neuromuscular junction. *Physiol. Res.* 58 (6) : 763—784. 2009.
- [30] *Wang J., Jiang Y., Cao H., Yu L., Bo T., Ni H., Jiang Q., Wu X.* Long-term effect of early discharge on sEPSC and [Ca²⁺]_i in developing neurons. *Neurosci. Lett.* 397 (1—2) : 104—109. 2006.

Поступила 15 V 2013