

УДК 577.352.5;57.085

## ЭПИЛЕПТИФОРМНЫЕ ПОСТСИНАПТИЧЕСКИЕ ТОКИ В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕЙРОНОВ КОРЫ ГОЛОВНОГО МОЗГА КРЫСЫ: КАЛЬЦИЕВЫЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ

© 2014 г. Д. А. Сибаров<sup>1,2\*</sup>, П. А. Абушик<sup>1,2</sup>, А. Е. Большаков<sup>1</sup>, Т. В. Карелина<sup>1,2</sup>, И. И. Кривой<sup>3</sup>, С. М. Антонов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, 194223, пр. Тореза, 44;

\*электронная почта: dsibarov@gmail.com

<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный политехнический университет, лаборатория молекулярной нейродегенерации, 194021, Санкт-Петербург, ул. Хлопина, 5

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9  
Поступила в редакцию 20.07.2013 г.

Показано, что первичная культура нейронов коры головного мозга крысы является удобной моделью для изучения механизмов эпилептогенеза, в частности, эпилептиформных постсинаптических токов (ЭТ), отражающих периодический массовый асинхронный выброс глутамата. Установлено, что в первичной культуре нейронов головного мозга крысы ЭТ могут генерироваться спонтанно, либо вызываться снятием магниевого блока каналов NMDA-рецепторов, а также ГАМКергического торможения. ЭТ зависят от осцилляций внутриклеточного кальция, происходящих с участием NMDA-рецепторов, причем вторичный выход кальция из внутриклеточных депо обязателен для синхронизации ЭТ. Воздействие, вызывающие кальциевую перегрузку нейронов или снижение концентрации свободного внутриклеточного кальция, подавляют генерацию ЭТ. Так, вход кальция в нейроны при гиперактивации NMDA-рецепторов или при действии кальциевого ионофора иономицина нарушал генерацию ЭТ. Аналогичное подавление ЭТ происходило при снижении концентрации внутриклеточного кальция с помощью ВАРТА, загруженного в нейроны, или путем стимуляции выведения кальция  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменником с помощью убаина в концентрации 1 нМ. Показана также частичная зависимость ЭТ от генерации потенциалов действия. Таким образом, самоподдерживающаяся генерация ЭТ в нейронах существует только в условиях периодического обратимого повышения концентрации внутриклеточного кальция в ограниченных концентрационных рамках.

**Ключевые слова:** эпилептиформные токи, первичная культура, нейроны, кора, кальций, убаин.

DOI: 10.7868/S0233475514010101

Онтогенез коры головного мозга эмбриона сопровождается значительными структурными перестройками нейронной сети. В этот период в мозге существует высокая вероятность развития эпилептиформной активности. Даже в более поздние сроки – в раннем постнатальном развитии – очаг эпилептической активности чаще расположен в коре [1]. В модели первичной культуры нейронов аналогичное состояние наблюдается приблизительно на 12-й день культивирования, что, вероятно, связано с тем, что в этот период нейроны характеризуются минимальной экспрессией субъединицы GluR2 AMPA-рецепторов и, соответственно, высокой долей кальций-проницаемых AMPA-каналов [2, 3]. Первичная культура нейронов коры головного мозга является

удобной моделью для изучения физиологии нейронной сети. В отличие от срезов мозга культура нейронов имеет особенности, связанные с плоскостной организацией и дефицитом глиального контроля синаптической передачи [4]. Тем не менее на культуре нейронов коры и гиппокампа с помощью внеклеточной микроэлектродной регистрации была показана эпилептиформная спайковая активность нейронов, сходная с наблюдаемой на срезах мозга [5].

Регистрация внеклеточными микроэлектродными массивами показала, что повторяющиеся спонтанные эпилептиформные разряды в кортикальной культуре могут быть вызваны инкубированием в безмагниевого раствора в течение нескольких часов, и сохраняться в последующие не-

сколько дней [5, 6]. Кратковременное (несколько минут) снятие тормозной синаптической передачи бикукуллином также вызывает самоподдерживающуюся эпилептоподобную спайковую активность нейронов, что показано на срезах мозга [7] и тканевых эксплантатах [8].

Обе упомянутые модели инициации эпилептиформной активности предусматривают периодическое возрастание концентрации внутриклеточного кальция ( $[Ca^{2+}]_i$ ) [9]. Это может быть как прямое увеличение вероятности входа кальция через NMDA-рецепторы, так и гиперактивация возбуждающей синаптической передачи, вовлекающая все типы кальций-проницаемых ионотропных рецепторов глутамата в отсутствие торможения. В нейронах  $[Ca^{2+}]_i$  регулируется множеством механизмов, так как является ключевым внутриклеточным сигнальным мессенджером. Так, небольшие повышения  $[Ca^{2+}]_i$  происходят при нормальных физиологических процессах, связанных с выбросом медиатора, изменением пластичности, долговременной потенциацией и т.п. Чрезмерное необратимое повышение  $[Ca^{2+}]_i$  наблюдается при эксайтотоксическом воздействии глутамата, что случается при инсультах, травмах мозга и некоторых нейродегенеративных заболеваниях. Кальциевая гипотеза эпилептогенеза предполагает, что в основе явления эпилепсии лежит длительное субкритическое обратимое возрастание  $[Ca^{2+}]_i$ , приводящее к патологической нейронной активности и некоторому повышению вероятности гибели нейронов [5].

Миниатюрные возбуждающие постсинаптические токи (мВПСТ) возникают в результате спонтанного выброса возбуждающего нейромедиатора из везикул в синаптическую щель [10, 11]. Частота, амплитуда и длительность мВПСТ в первичной культуре нейронов коры зависят от концентрации свободного кальция в пресинапсе [4], которая может регулироваться некантовой секрецией глутамата [12]. В безмагниевой среде частота и амплитуда мВПСТ больше, чем в контроле [13], что связано с увеличением квантового состава спонтанных токов [4]. Функциональные характеристики возбуждающей синаптической передачи в различных отделах головного мозга отличаются в силу различий в экспрессии подтипов глутаматных рецепторов [14]. В связи с этим возможно существование отличий в генерации постсинаптических токов разными отделами мозга. Несмотря на многочисленные исследования миниатюрных постсинаптических токов, выполненные на первичной культуре нейронов гиппокампа, работы, касающиеся постсинаптических токов в нейронах коры, единичны, а эпилептиформные постсинаптические токи в модели первичной культуры нейронов коры прежде не изучались.

В связи с этим в настоящей работе изучали роль различных механизмов регуляции внутриклеточного кальция в генерации эпилептиформных постсинаптических токов в первичной культуре нейронов коры головного мозга крыс.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводили на первичной культуре нейронов коры большого мозга крыс линии Вистар при температуре 23–26°C. Для приготовления первичной культуры нейронов, описанной ранее [15, 16], использовали эмбрионы на 16-й день пренатального развития (E16). Кору головного мозга эмбрионов выделяли при низких температурах на чашке Петри со льдом. Клетки культивировали в питательной среде на стеклах, предварительно обработанных поли-D-лизинном. Пэтч-кламп-регистрацию постсинаптических токов проводили в конфигурации “целая клетка” на нейронах с 10-го по 16-й день культивирования (10–16 days *in vitro*, DIV). В опытах использовали внеклеточный перфузионный раствор следующего состава (концентрации указаны в мМ): 140 NaCl; 2.8 KCl; 2.0 CaCl<sub>2</sub>; 1.0 MgCl<sub>2</sub>; 10 HEPES, при pH 7.2–7.4. В ряде опытов для инициации эпилептиформных токов из раствора был исключен Mg<sup>2+</sup>, что описано в результатах экспериментов. Кроме того, в безмагниевоом растворе выполнены все эксперименты с использованием блокаторов NMDA-рецепторов. Внутриклеточный раствор для заполнения микроэлектрода имел следующий состав (мМ) 9 NaCl, 17.5 KCl, 121.5 К-глюконат, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 0.2 EGTA, 2 MgATP, 0.5 NaGTP [17]. Для регистрации токов применяли усилитель MultiClamp 700B с системой сбора данных Digidata 1440A и программное обеспечение pClamp v10.2 (Molecular Devices, США). Частота дискретизации составляла 20000 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: 30 мкМ NMDA (N-метил-D-аспартат, агонист NMDA-рецепторов) применялся совместно с 30 мкМ глицина; 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 бикукуллин (антагонист рецепторов типа A γ-аминомасляной кислоты, ГАМК<sub>A</sub>); 0.5 мкМ тетродо-

токсин (ТТХ, блокатор натриевых каналов), 1 нМ убаин (специфический лиганд  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -АТФазы), 2 мкМ иономицин (кальциевый ионофор), 2–5 мкМ ВАРТА-АМ (мембранопроницаемая форма внутриклеточного кальциевого хелатора ВАРТА). Все среды для приготовления культур ткани приобретены в фирме Биолот (Россия); остальные вещества поставлены фирмой Sigma Aldrich (США).

Детекцию постсинаптических токов, а также анализ их частоты выполняли в программе Clampfit 10.2, входящей в пакет pClamp.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

На 12-й день культивирования и позднее на некоторых нейронах коры в первичной культуре удавалось зарегистрировать спонтанно возникающие волны возбуждения, связанные с периодическим массовым выбросом медиатора, что приводило к возникновению входящих токов очень высокой амплитуды (пик мог достигать 5 нА) (рис. 1) с фазой спада, достигающей 5 с. Подобные токи регистрируются в мотонейронах при раздражении дорзальных корешков [18], т.е. при синхронной активации множества синаптических входов. В культуре нейронов коры генерация таких волн возбуждения наблюдалась как в перфузионном растворе, содержащем магний (рис. 1а), так и в безмагниевого растворе (рис. 1б). Следует заметить, что вероятность регистрации этих высокоамплитудных токов в безмагниевого растворе существенно возрастала. Такие постсинаптические токи (ЭТ) носили периодический характер и являлись результатом суммации множества мВПСТ (рис. 1в). ЭТ вызывали сильную деполяризацию нейронов (рис. 1г), часто приводящую к генерации ими потенциала действия (ПД). На некоторых нейронах генерация ЭТ полностью подавлялась 0.5 мкМ тетродотоксина (рис. 2а). Однако это подавление наблюдалось лишь в 12 из 24 протестированных клеток. По-видимому, появление ЭТ лишь частично связано с генерацией нейронами ПД. В свою очередь, ЭТ вполне могут вызывать ПД: регистрация в режиме повторителя напряжения зафиксировала генерацию ПД в ответ на значительную (до 30 мВ) деполяризацию нейронов, вызываемую ЭТ.

При регистрации в безмагниевого растворе блокирование NMDA-рецепторов специфическим антагонистом AP5 (50 мкМ) полностью подавляло генерацию спонтанных ЭТ во всех 14 протестированных клетках (рис. 2б). Аналогичный эффект наблюдался при добавлении 1 мМ  $\text{MgCl}_2$  в перфузионный раствор ( $n = 12$ ) (рис. 2в). AP5, будучи конкурентным антагонистом, предотвращает активацию NMDA-рецепторов, а ионы магния блокируют проницаемость их каналов, т.е. в конечном счете оба фармакологических воздей-

ствия ингибируют вход  $\text{Ca}^{2+}$  в нейроны, что говорит о критической важности NMDA-рецепторов для генерации ЭТ.

Антагонист AMPA-рецепторов CNQX (30 мкМ) в безмагниевого растворе снижал амплитуду мВПСТ, но в 9 из 11 исследованных клеток не влиял на частоту и амплитуду ЭТ (рис. 2г). Очевидно, генерация спонтанных ЭТ слабо зависит от AMPA-рецепторов, несмотря на их ключевое значение в возбуждающей синаптической передаче.

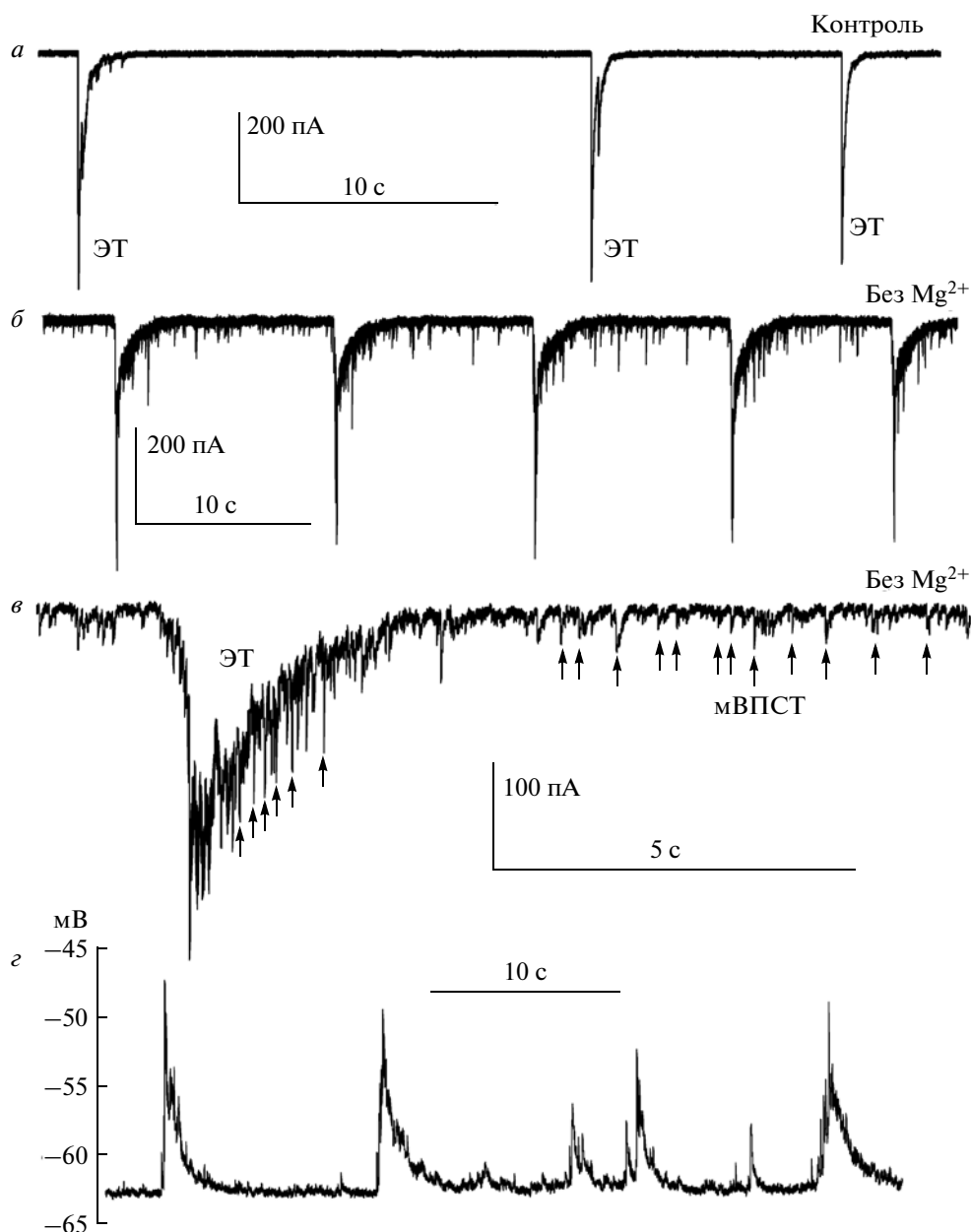
В одном из пяти опытов ЭТ удавалось вызвать блокированием ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов бикукуллином. Аппликация бикукуллина (20 мкМ) приводила к повышению частоты спонтанных ВПСТ с последующей синхронизацией и появлением гигантских ЭТ, генерация которых сохранялась даже после отмывки бикукуллина (рис. 3). ЭТ, вызванные бикукуллином, полностью подавлялись тетродотоксином в отличие от ЭТ, возникающих спонтанно, которые не всегда подавлялись тетродотоксином.

Учитывая принципиальное значение концентрации внутриклеточного кальция для процесса везикулярного высвобождения нейромедиатора и, соответственно, для генерации всех видов постсинаптических токов, была проведена проверка возможности модуляции ЭТ фармакологическими воздействиями, повышающими или снижающими концентрацию кальция в цитоплазме.

На фоне регистрируемых в нейроне спонтанных ЭТ аппликация NMDA (рис. 4а) в насыщающей рецепторы концентрации (30 мкМ, + 30 мкМ глицина как коагониста NMDA-рецепторов) вызывала стабильный входящий ток и полное исчезновение ЭТ ( $n = 22$ ). Такой входящий ток сопровождается в нейронах повышением  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  [19]. При этом частота мВПСТ возрастала в несколько раз, как показано ранее [20]. В некоторых экспериментах (в двух нейронах) отмывка агониста приводила к частичному восстановлению генерации ЭТ.

Для принудительного повышения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в цитоплазме нейронов использовали кальциевый ионофор иономицин (2 мкМ). Загрузка кальция в цитоплазму вызывала постепенную рассинхронизацию ЭТ, плавное снижение их амплитуды и последующее исчезновение (рис. 4б). В то же время частота мВПСТ при действии иономицина многократно возрастала.

Физиологическое возрастание  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в цитоплазме может быть результатом активации инозитолтрифосфат ( $\text{IP}_3$ )-чувствительных кальциевых каналов, локализованных на внутриклеточных кальциевых депо и вызывающих вторичное высвобождение кальция [19, 21]. В нейронах этот процесс вовлечен в синхронизацию выброса си-

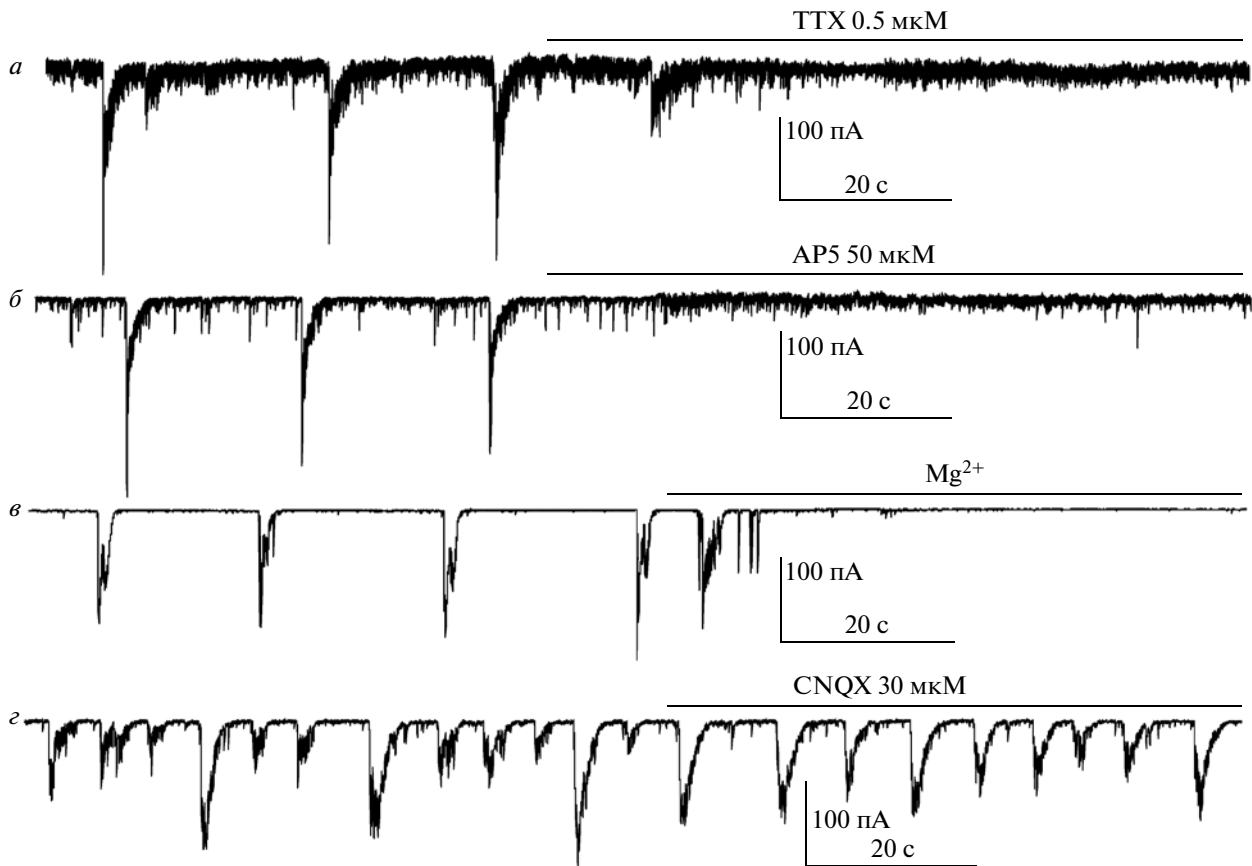


**Рис. 1.** Эпилептиформные токи (ЭТ), регистрируемые в нейронах коры в первичной культуре. Периодичность спонтанной генерации ЭТ в контроле (*a*) и в безмагниеовом растворе (*б*). Структура ЭТ (*в*), представляющих собой суперпозицию множества миниатюрных ВПСТ. Деполаризация мембраны нейронов, вызываемая ЭТ (*г*).

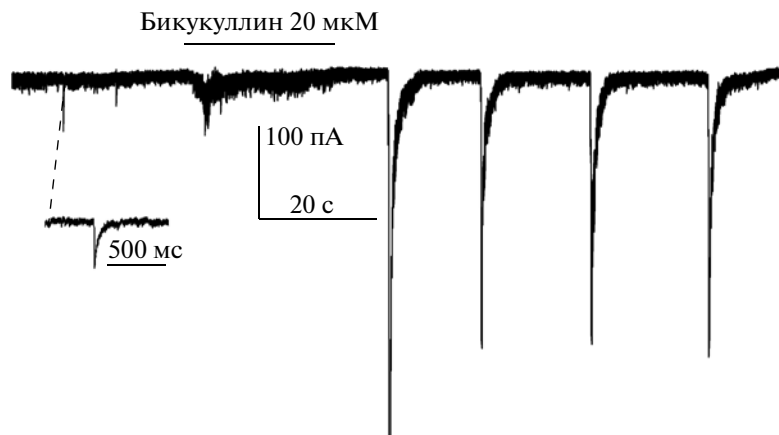
наптических везикул. Блокирование  $IP_3$ -рецепторов при помощи ингибитора 2-АРВ (4 мкМ), проникающего через мембрану, вызывало десинхронизацию ЭТ (рис. 4в) ( $n = 6$ ). Мы применяли 2-АРВ в концентрации, достаточной для блокирования  $IP_3$ -рецепторов, но существенно меньшей, чем требуется для проявления его неспецифических эффектов, связанных с ингибированием TRP-каналов, стимуляцией TRPV-каналов и ингибированием ряда кальций-проницаемых каналов митохондрий и эндоплазматического ретикула [22]. Редкие ЭТ большой длительности и

амплитуды на фоне действия 2-АРВ распались на множество ЭТ меньшей амплитуды с дальнейшим постепенным снижением их амплитуды до уровня мВПСТ. Таким образом, выход кальция из внутриклеточных депо необходим для синхронизации мВПСТ и формирования периодических ЭТ.

Ранее нами также было показано, что связывание внутриклеточного кальция хелатором ВАРТА в первичной культуре нейронов коры снижает частоту мВПСТ пропорционально степени связывания кальция [20]. В настоящей работе показано,



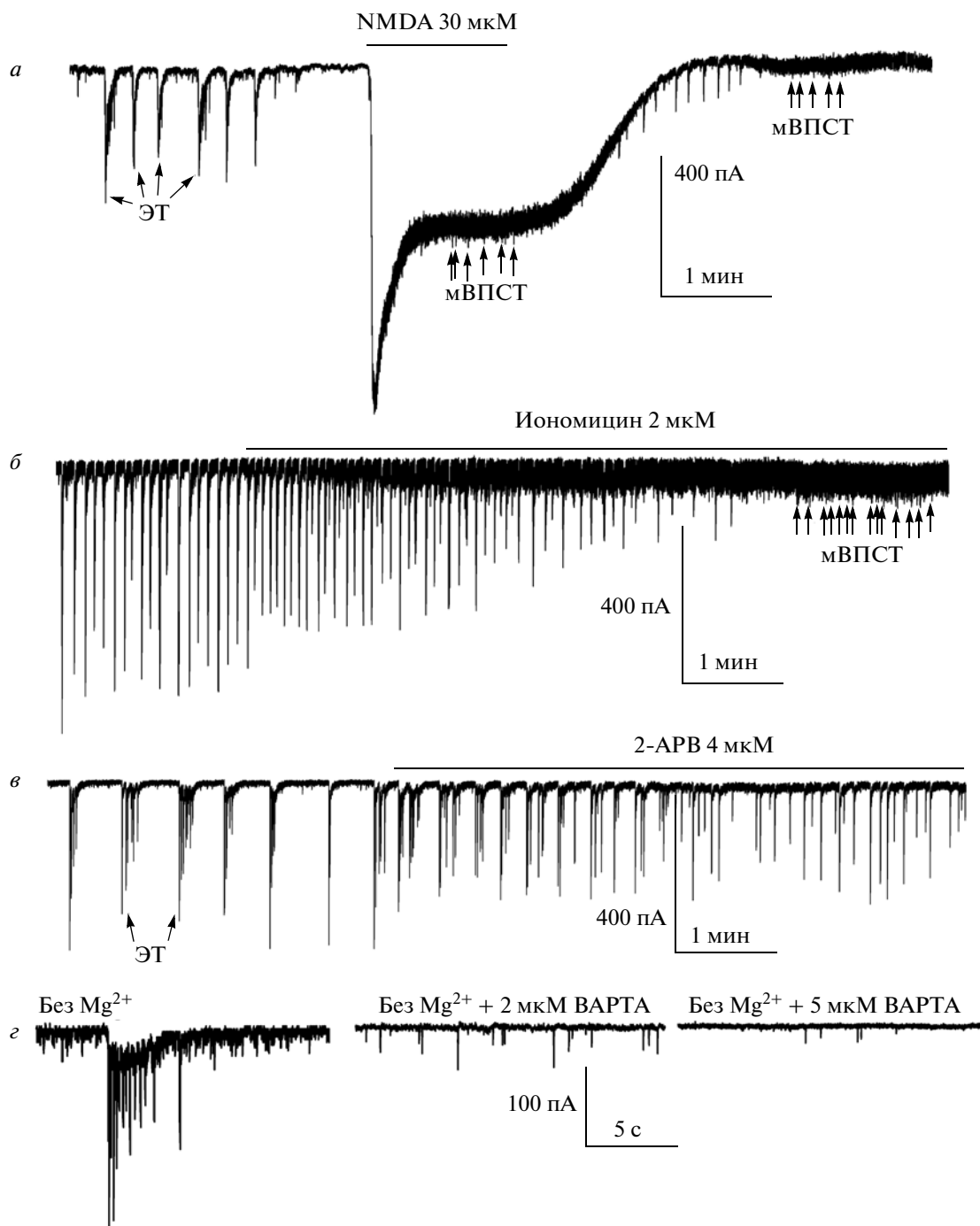
**Рис. 2.** Роль различных ионных каналов в генерации epileptiformных токов (ЭТ) нейронами в безмагниевоm растворе. *a* – Блокирование генерации потенциалов действия тетродотоксином устраняет ЭТ. Блокирование NMDA-рецепторов AP5 (*б*) или ионов магния (*в*) останавливает генерацию ЭТ. *г* – Блокирование AMPA-рецепторов при помощи CNQX не привело к исчезновению ЭТ.



**Рис. 3.** Индуцирование epileptiformных токов (ЭТ) кратковременным воздействием бикукуллина в контрольном физиологическом растворе. Увеличение частоты ВПСТ и их последующая синхронизация в ЭТ. Небольшой фрагмент записи слева показывает растянутый по времени отдельный мВПСТ для сравнения амплитуды.

что полное подавление генерации ЭТ происходит при хелатировании внутриклеточного кальция с помощью ВАРТА, загруженного в нейроны при помощи инкубации в течение 30 мин в физиологическом растворе, содержащем 2 или 5 мкМ ВАРТА-АМ (рис. 4з).

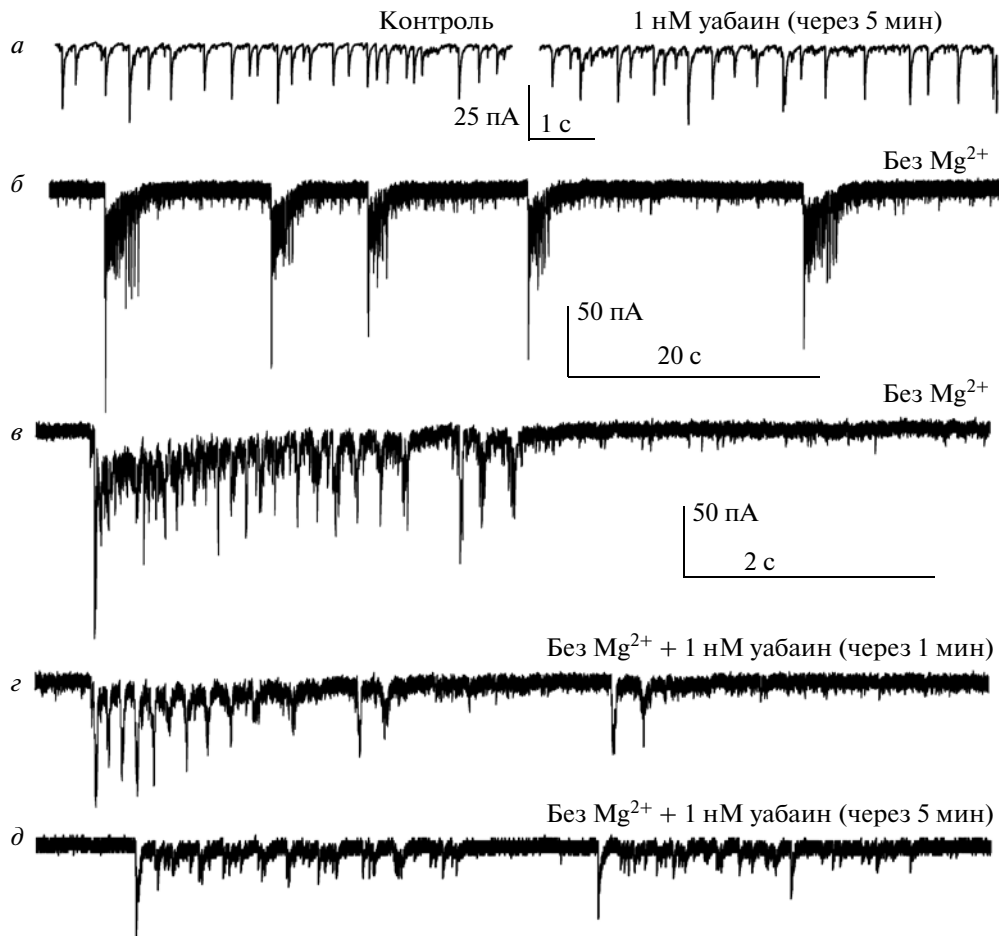
Выведение свободного кальция из цитоплазмы наружу за счет работы Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-обменника – жизненно важный механизм поддержания кальциевого гомеостаза нейронов. Ранее мы показали [20], что в субнанолярных концентрациях убаин не вызывает ингибирования насосной



**Рис. 4.** Подавление генерации эпилептиформных токов (ЭТ), спонтанно возникающих в культуре нейронов в безмагниевоом растворе при различных нарушениях кальциевого гомеостаза. *а* – Прекращение генерации ЭТ при действии NMDA, вызывающего вход кальция через ионотропные рецепторы глутамата. Частичное возобновление генерации ЭТ после отмывки NMDA. *б* – Кальциевый ионофор вызывает рост частоты мВПСТ, но разрушает периодическую генерацию ЭТ. *в* – Ингибитор  $IP_3$ -рецепторов подавляет выход кальция из внутриклеточных депо, вызывая рассинхронизацию ЭТ. *г* – Хелатирование внутриклеточного кальция снижает частоту мВПСТ и полностью подавляет генерацию ЭТ.

функции  $Na^+, K^+$ -АТФ-азы, а вступает с ней в лиганд-рецепторное взаимодействие, инициирующее несколько внутриклеточных сигнальных путей. Самым быстрым сигнальным эффектом

$Na^+, K^+$ -АТФ-азы в нейронах является увеличение эффективности работы  $Na^+/Ca^{2+}$ -обменника и выброса  $Ca^{2+}$  из нейронов, что эффективно противодействует даже кальциевой перегрузке, вы-



**Рис. 5.** Подавление epileptiformных токов (ЭТ) убаином в наномолярных концентрациях, не влияющих на насосную функцию  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -АТФ-азы. *a* – Отсутствие влияния убаина на частоту мВПСТ в контроле. *б* – ЭТ, индуцированные в нейронах безмагниевым раствором. *в* – Структура отдельного ЭТ в безмагниевом растворе. *г* – Уменьшение количества мВПСТ в составе ЭТ и нарушение их синхронизации через 1 мин после аппликации убаина. *д* – Рассинхронизация и почти полное исчезновение ЭТ через 5 мин после аппликации убаина.

зываемой гиперактивацией рецепторов глутамата [20, 23]. Этот эффект проявляется только на фоне вызванной кальциевой перегрузки, но не влияет на фоновую  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в контроле.

В наших экспериментах убаин в концентрации 1 нМ не влиял на частоту спонтанных мВПСТ (рис. 5*a*) в нормальном физиологическом растворе ( $n = 9$ ). Смена раствора с контрольного на безмагниевый вызвала появление спонтанных ЭТ в некоторых нейронах (рис. 5*б*). При этом отдельные ЭТ (рис. 5*в*) имели характерную сложносоставную форму. Аппликация 1 нМ убаина во всех протестированных нейронах ( $n = 9$ ) вызвала уменьшение количества мВПСТ в составе ЭТ уже через 1 мин (рис. 5*г*), а через 5 мин привела к рассинхронизации и постепенному угасанию ЭТ (рис. 5*д*).

Таким образом, генерация ЭТ нейронами коры в первичной культуре может происходить спонтанно, либо вызываться снятием либо маг-

ниевого блока каналов NMDA-рецепторов, либо ГАМКергического торможения. ЭТ проявляют зависимость от осцилляций внутриклеточного кальция, происходящих с участием NMDA-рецепторов, причем вторичный выход кальция из внутриклеточных депо обязателен для синхронизации ЭТ. Воздействия, вызывающие кальциевую перегрузку (NMDA, иономицин) или снижение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (ВАРТА, убаин), подавляют генерацию ЭТ.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Опубликованы многочисленные данные, согласно которым инкубирование культуры нейронов коры [8] или гиппокампа в безмагниевом растворе [24] приводит к синхронизированной генерации нейронами потенциалов действия с периодическими волнами аномально высокой частоты спайков [24]. С использованием внеклеточных микроэлектродных массивов такие волны

возбуждения наблюдали как на срезах головного мозга [25], так и на культурах нейронов [26, 27].

В наших экспериментах использование безмагниевого раствора, т.е. снятие магниевого блока NMDA-рецепторов [28], оказалось эффективным приемом для инициации постсинаптических ЭТ в первичной культуре нейронов коры примерно с 12-го дня культивирования.

На срезах мозга и культурах нейронов подавление эпилептиформной спайковой активности нейронов при добавлении антагонистов NMDA-рецепторов описано многими авторами [29–31]. Однако нами рассмотрено подавление не спайковой активности, а постсинаптических ЭТ на культуре нейронов коры. Подавление ЭТ при помощи AP5 и ионов магния, наблюдаемое нами, было вполне ожидаемым. При этом CNQX, антагонист AMPA-рецепторов, не оказывал заметного влияния на спонтанно генерируемые ЭТ. Вероятно, для поддержания ритмики ЭТ не требуется активация AMPA-рецепторов. Аналогичные данные об отсутствии подавления спайковой эпилептиформной активности нейронов в культуре ингибиторами AMPA, каинатных и метаботропных рецепторов получены и ранее [5, 23, 31]. Однако следует заметить, что в наших опытах предобработка нейронов CNQX делала невозможным начальное индуцирование ЭТ безмагниевым раствором в культуре нейронов. Можно предположить, что возникновение ЭТ вовлекает кальций-проницаемые AMPA-рецепторы, в то время как поддержание ритмики ЭТ осуществляется преимущественно активацией NMDA-рецепторов. Вероятно, это связано с различной динамикой  $[Ca^{2+}]_i$ , наблюдаемой при активации NMDA- и AMPA-рецепторов [32].

Кроме того, на первичной культуре нейронов коры, использованной в нашей работе, возвращение магния в перфузионный раствор после индукции ЭТ привело к их исчезновению. Это отличает культуру нейронов коры от нейронов гиппокампа, в которых самоподдерживающаяся эпилептиформная активность (всплески генерации ПД) сохранялась после возвращения 1 мМ магния в раствор [30].

Уже довольно давно на срезах гиппокампа [7] и тканевых эксплантатах неокортекса [8] было показано, что блокирование тормозной ГАМКергической передачи бикикуллином приводит к возникновению эпилептиформных волн деполяризации нейронов. В наших экспериментах бикикуллин вызывал временное повышение частоты спонтанных мВПСТ, за которой сразу следовало возникновение ЭТ (рис. 3), причем отмывка бикикуллина и восстановление работоспособности ГАМКергической системы не подавляло ЭТ. Следует заметить, что во всех опытах тетродотоксин подавлял ЭТ, вызванные бикикуллином в нормальном физиоло-

гической растворе. В опытах, где ЭТ были вызваны безмагниевым раствором, тетродотоксин не всегда блокировал генерацию ЭТ. Таким образом, отсутствие магниевого блока каналов NMDA-рецепторов приводит к тому, что ЭТ генерируются регулярно даже при блокировании потенциалов действия.

Появление синхронизированных волн возбуждения и сопровождаемых ЭТ в нейронной сети – это периодический процесс, связанный с волной деполяризации нейронов, приводящей к генерации ПД и синхронизированному выбросу везикул медиатора группами нейронов, что, в свою очередь, вызывает осцилляции концентрации внутриклеточного кальция в нейронах, определяющие их возбудимость [9]. ЭТ носят периодический характер, соответственно, для их генерации необходима обратимость кальциевых осцилляций, сопровождающих эпилептиформную активность [5]. Вследствие этого, вызванные внешними воздействиями отклонения  $[Ca^{2+}]_i$  как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения, должны искажать эпилептиформные кальциевые волны. Принудительная загрузка кальция в нейроны при помощи ионофора вызывала необратимое повышение  $[Ca^{2+}]_i$  и постепенное исчезновение ЭТ. При этом частота мВПСТ, напротив, резко возрастала (рис. 4б).

Другое условие автогенерации ЭТ – периодическая активация NMDA-рецепторов. Гиперактивация NMDA-рецепторов насыщающей концентрацией агониста поддерживала их в преимущественно открытом состоянии и нарушала обратимость эпилептиформной волны, приводя к исчезновению ЭТ (рис. 4а).

На первичной культуре нейронов гиппокампа показано [33], что блокирование  $IP_3$ -чувствительных кальциевых каналов при помощи 2-APB вызывает снижение свободного внутриклеточного кальция, причем эффект более выражен именно в нейронах, обладающих эпилептиформной спайковой активностью. Существует мнение [33] о ведущей роли активации  $IP_3$ -рецепторов в возникновении эпилептиформных разрядов нейронов. Опосредованный  $IP_3$ -рецепторами вторичный выход кальция из внутриклеточных депо имеет существенное значение для синхронизации выброса большого количества медиатора из синаптических везикул. В наших опытах блокирование  $IP_3$ -рецепторов при помощи 2-APB приводило к рассинхронизации ЭТ (рис. 4в). Таким образом, нарушение работы внутриклеточных кальциевых депо десинхронизирует везикулярный выброс нейромедиатора. На фоне действия 2-APB постсинаптические токи не согласованы по времени и перестают суммироваться в гигантские ЭТ. В результате происходит постепенное снижение ам-



плитуды ЭТ даже на фоне отсутствия магниевого блока.

Снижение  $[Ca^{2+}]_i$  также оказалось эффективным для подавления ЭТ (рис. 4з). Хелатирование внутриклеточного кальция при помощи ВАРТА вполне ожидаемо подавляло не только генерацию ЭТ, но вообще всех видов постсинаптических токов. Вызываемое хелатированием уменьшение вероятности спонтанного высвобождения медиатора из синаптических везикул прямо зависело от степени связывания кальция [20]. Действие ВАРТА аналогично работе собственных буферных систем нейрона, таких как кальций-связывающие белки.

Однако у нейронов существует и другой эффективный механизм снижения  $[Ca^{2+}]_i$ , связанный с удалением кальция из цитоплазмы за счет работы  $Na^+/Ca^{2+}$ -обменника. Ранее нами было показано, что субнанолярные концентрации кардиотонических стероидов, в частности убаина, не вызывающие ингибирования насосной функции  $Na^+, K^+$ -АТФ-азы, оказывают нейропротекторное действие за счет снижения  $[Ca^{2+}]_i$  до безопасного уровня, близкого к контрольному [20, 22]. Этот механизм значительно повышает выживаемость нейронов при эксайтотоксическом стрессе [34] и зависит от работы  $Na^+/Ca^{2+}$ -обменника. Следует заметить, что эффект кардиотонических стероидов проявляется только в условиях повышенной  $[Ca^{2+}]_i$ , но не в контроле. Так убаин не изменял частоту мВПСТ в контроле (рис. 5а). В случае индукции ЭТ безмагниевым раствором убаин в течение нескольких минут подавлял их генерацию (рис. 5в–д). Интересно, что действие 1 нМ убаина выражалось не в рассинхронизации ЭТ, как при блокировании выхода кальция из внутриклеточных депо, а в плавном снижении их амплитуды. Таким образом, можно предположить существование в нейронах эффективного защитного механизма, противодействующего ЭТ и кальциевой перегрузке, который может быть активирован кардиотоническими стероидами в субнанолярных концентрациях. Эндогенные кардиотонические стероиды присутствуют в плазме крови и ликворе именно в таких концентрациях [35–37], что заставляет предполагать их важную роль в поддержании кальциевого гомеостаза нервной ткани.

ЭТ в культуре нейронов могут возникать спонтанно, а также вызываться ингибированием тормозной синаптической передачи или снятием магниевого блока NMDA-рецепторов. При этом периодичность активации NMDA-рецепторов обязательна для поддержания эпилептиформной активности. Блокада NMDA рецепторов или, напротив, их гиперактивация полностью подавляют генерацию ЭТ. Существенный вклад в генерацию ЭТ вносит квантовый выброс медиатора в результате ПД. Тем не менее, блокирование генерации

ПД не всегда останавливало эпилептиформную активность. Условием синхронизации мВПСТ в ЭТ является выход кальция из внутриклеточных депо. Снижение  $[Ca^{2+}]_i$  путем хелатирования кальция или путем индукции механизмов его удаления из нейронов также подавляет генерацию ЭТ. Таким образом, эпилептиформная активность нейронов коры в первичной культуре напрямую связана с периодическими обратимыми возрастаниями концентрации внутриклеточного кальция, возникающими в результате активации NMDA-рецепторов.

Работа поддержана РФФИ (13-04-00973, 11-04-00397, 14-04-00227, 14-04-31707), НИР СПбГУ (1.37.118.2011), а также Федеральной целевой программой Минобрнауки (Соглашение № 8476).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wong M., Yamada K.A. 2001. Developmental characteristics of epileptiform activity in immature rat neocortex: a comparison of four *in vitro* seizure models. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **128** (2), 113–120.
2. Jiang Q., Wang J., Wu Y., Wu X., Qin J., Jiang Y. 2008. Early-life epileptiform discharges exert both rapid and long-lasting effects on AMPAR subunit composition and distribution in developing neurons. *Neurosci. Lett.* **444** (1), 31–35.
3. Friedman L.K., Velísková A. 1999. GluR2 antisense knockdown produces seizure behavior and hippocampal neurodegeneration during a critical window. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **868**, 541–545.
4. 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.
5. DeLorenzo R.J., Sun D.A., Deshpande L.S. 2005. Cellular mechanisms underlying acquired epilepsy: the calcium hypothesis of the induction and maintenance of epilepsy. *Pharmacol. Ther.* **105** (3), 229–266.
6. Cao H.Y., Jiang Y.W., Liu Z.W., Wu X.R. 2003. Effect of recurrent epileptiform discharges induced by magnesium-free treatment on developing cortical neurons *in vitro*. *Brain Res. Dev. Brain Res.* **142** (1), 1–6.
7. Swartzwelder H.S., Anderson W.W., Wilson W.A. 1988. Mechanism of electrographic seizure generation in the hippocampal slice in  $Mg^{2+}$ -free medium: the role of GABA<sub>A</sub> inhibition. *Epilepsy Res.* **2** (4), 239–245.
8. Gutnick M.J., Wolfson B., Baldino F. 1989. Synchronized neuronal activities in neocortical explant cultures. *Exp. Brain Res.* **76** (1), 131–140.
9. Domijan A.-M., Kovac S., Abramov A.Y. 2012. Impact of Fumonisin B1 on glutamate toxicity and low magnesium-induced seizure activity in neuronal primary culture. *Neuroscience.* **202**, 10–16.
10. Катц Б. 1968. *Нерв, мышца и синапс*. М.: Мир. 220 с.
11. Зефилов А.Л., Черанов С.Ю. 2000. Молекулярные механизмы квантовой секреции медиатора в синапсе. *Усп. физиол. наук.* **31** (3), 3–22.

12. Antonov S.M., Magazanik L.G. 1988. Intense non-quantal release of glutamate in an insect neuromuscular junction. *Neurosci. Lett.* **93** (2–3), 204–208.
13. Wang J., Jiang Y., Cao H., Yu L., Bo T., Ni H., Jiang Q., Wu X. 2006. Long-term effect of early discharge on sEPSC and  $[Ca^{2+}]_i$  in developing neurons. *Neurosci. Lett.* **397** (1–2), 104–109.
14. Myme C.I.O., Sugino K., Turrigiano G.G., Nelson S.B. 2003. 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.
15. 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.
16. 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.
17. Han E.B., Stevens C.F. 2009. Development regulates a switch between post- and presynaptic strengthening in response to activity deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 10817–10822.
18. Antonov S.M., Kalinina N.I., Kurchavyj G.G., Magazanik L.G., Shupliakov O.V., Vesselkin N.P. 1990. Identification of two types of excitatory monosynaptic inputs in frog spinal motoneurons. *Neurosci. Lett.* **109** (1–2), 82–87.
19. Khodorov B. 2004. Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurones. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **86**, 279–351.
20. Sibarov D.A., Bolshakov A.E., Abushik P.A., Krivoi I.I., Antonov S.M. 2012.  $Na^+, K^+$ -ATPase functionally interacts with the plasma membrane  $Na^+, Ca^{2+}$ -exchanger to prevent  $Ca^{2+}$  overload and neuronal apoptosis in excitotoxic stress. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **343** (3), 596–607.
21. McPherson P.S., Kim Y.K., Valdivia H., Knudson C.M., Takekura H., Franzini-Armstrong C., Coronado R., Campbell K.P. 1991. The brain ryanodine receptor: a caffeine-sensitive calcium release channel. *Neuron.* **7** (1), 17–25.
22. Bootman M.D., Collins T.J., Mackenzie L., Roderick H.L., Berridge M.J., Peppiatt C.M. 2002. 2-aminoethoxydiphenyl borate (2-APB) is a reliable blocker of store-operated  $Ca^{2+}$  entry but an inconsistent inhibitor of InsP3-induced  $Ca^{2+}$  release. *FASEB J.* **16** (10), 1145–1150.
23. Abushik P.A., Sibarov D.A., Eaton M.J., Skatchkov S.N., Antonov S.M. 2013. Kainate-induced calcium overload of cortical neurons *in vitro*: dependence on expression of AMPAR GluA2-subunit and down-regulation by subnanomolar ouabain. *Cell Calcium.* **54** (2), 95–104.
24. DeLorenzo R., Pal S., Sombati S. 1998. Prolonged activation of the N-methyl-D-aspartate receptor- $Ca^{2+}$  transduction pathway causes spontaneous recurrent epileptiform discharges in hippocampal neurons in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**, 14482–14487.
25. Mao B.Q., Hamzei-Sichani F., Aronov D., Froemke R.C., Yuste R. 2001. Dynamics of spontaneous activity in neocortical slices. *Neuron.* **32**, 883–898.
26. Jimbo Y., Tateno T., Robinson H.P.C. 1999. Simultaneous induction of pathway-specific potentiation and depression in networks of cortical neurons. *Biophys. J.* **76**, 670–678.
27. Ito D., Tamate H., Nagayama M., Uchida T., Kudoh S.N., Gohara K. 2010. Minimum neuron density for synchronized bursts in a rat cortical culture on multi-electrode arrays. *Neuroscience.* **171**, 50–61.
28. Antonov S.M., Johnson J.W. 1999. Permeant ion regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channel block by  $Mg^{2+}$ . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96** (25), 14571–14576.
29. Tancredi V., Hwa G.G., Zona C., Brancati A., Avoli M. 1990. Low magnesium epileptogenesis in the rat hippocampal slice: electrophysiological and pharmacological features. *Brain Res.* **511** (2), 280–290.
30. Sombati S., DeLorenzo R.J. 1995. Recurrent spontaneous seizure activity in hippocampal neuronal networks in culture. *J. Neurophysiol.* **73** (4), 1706–1711.
31. Sun D.A., Sombati S., Blair R.E., DeLorenzo R.J. 2004. Long-lasting alterations in neuronal calcium homeostasis in an *in vitro* model of stroke-induced epilepsy. *Cell Calcium.* **35** (2), 155–163.
32. Абушик П.А., Большаков А.Е., Сибаров Д.А., Антонов С.М. 2011. Гетерогенность механизмов кальциевого ответа на кайнат и типы нейронов в первичной культуре коры мозга крыс. *Биол. мембраны.* **28** (1), 25–34.
33. Pal S., Sun D., Limbrick D., Rafiq A., DeLorenzo R.J. 2001. Epileptogenesis induces long-term alterations in intracellular calcium release and sequestration mechanisms in the hippocampal neuronal culture model of epilepsy. *Cell Calcium.* **30** (4), 285–296.
34. Большаков А.Е., Сибаров Д.А., Абушик П.А., Кривой И.И., Антонов С.М. 2012. Дозозависимый характер антиапоптотического и токсического действия убаина в первичной культуре нейронов коры крысы. *Биол. мембраны.* **29** (6), 422–428.
35. Blaustein M.P. 1993. Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular  $Ca^{2+}$  stores and cell responsiveness. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **264**, C1367–C1387.
36. Schoner W., Scheiner-Bobis G. 2007. Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* **7**, 173–189.
37. Bagrov A.Y., Shapiro J.I. 2008. Endogenous digitalis: pathophysiologic roles and therapeutic applications. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.* **4**, 378–392.

## Epileptiform Postsynaptic Currents in Primary Culture of Rat Cortical Neurons: Calcium Mechanisms

D. A. Sibarov<sup>1,2</sup>, P. A. Abushik<sup>1,2</sup>, A. E. Bolshakov<sup>1</sup>, T. V. Karelina<sup>1,2</sup>, I. I. Krivoi<sup>3</sup>, S. M. Antonov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences,  
pr. Toreza, 44, St. Petersburg, 194223 Russia;*

*e-mail: dsibarov@gmail.com*

<sup>2</sup>*Laboratory of Molecular Neurodegeneration, St. Petersburg State Polytechnical University,  
ul. Khlopina, 5, St. Petersburg, 194021 Russia*

<sup>3</sup>*St. Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia*

In this study we demonstrate that the primary culture of rat cortical neurons is a convenient model for investigations of epileptogenesis mechanisms and specifically, of the postsynaptic epileptiform currents (EC) reflecting periodical asynchronous glutamate release. In particular, we have revealed that in primary culture of cortical neurons EC can appear spontaneously or can be triggered by the withdrawal of magnesium block of NMDA receptor channels or by shutting down GABAergic inhibition. EC were found to depend on intracellular calcium oscillations. The secondary calcium release from intracellular stores was needed for EC synchronization. EC were suppressed by the influences causing either neuronal calcium overload or decrease of intracellular calcium concentration. Calcium entry into neurons in the case of NMDA receptor hyperactivation or in the case of calcium ionophore ionomycin treatment eliminated EC. The suppression of EC occurred also after decrease of intracellular calcium concentration by BAPTA loaded into the neurons or by stimulation of calcium removal from cells via  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger by 1 nM ouabain. Only partial dependence of EC on action potential generation was found. Thus, EC in neurons are activated by periodic calcium waves within a limited concentration window.