

РЕГУЛЯЦИЯ ЧАСТОТЫ И АМПЛИТУДЫ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ Ca^{2+} -КАНАЛАМИ Т-ТИПА ПРИ СПОНТАННОЙ СИНХРОННОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА

© 2018 г. И.Ю. Теплов*, С.Т. Тулеуханов**, В.П. Зинченко*

*Институт биофизики клетки РАН, 142290, Пущино Московской области, ул. Институтская, 3

**Казахский национальный университет им. аль-Фараби,
050040, Алматы, пр. аль-Фараби, 71, Республика Казахстан

E-mail: vpz@mail.ru

Поступила в редакцию 30.05.18 г.

Исследованы закономерности изменения частоты и амплитуды потенциалов действия на фоне деполяризации, вызванной активностью Ca^{2+} -каналов во время спонтанной синхронной активности нейронов гиппокампа в культуре. Известно, что пейсмекерная электрическая активность нейрона может носить как тонический, так и пачечный характер. Используя систему анализа изображения для измерения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и метод пэтч-кламп для регистрации мембранного потенциала, мы показали, что при снятии торможения ингибитором ГАМК(А)-рецепторов в нейрональной сети возникает режим спонтанной синхронной активности, при котором тонические высокочастотные (2–3 Гц) потенциалы действия, генерируемые нейроном без изменения концентрации цитоплазматического Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), сменяются пачечной активностью, которая сопровождается импульсом медленной деполяризации и генерацией кальциевого сигнала. Ингибитор Т-типа кальциевых каналов ML218 подавляет этот процесс. Частота и амплитуда потенциалов действия в пачке регулируется импульсами медленной деполяризации следующим образом: на переднем фронте деполяризации частота потенциалов действия увеличивается, а амплитуда падает за счет инактивации Na^+ -каналов. Чем выше скорость нарастания деполяризации, тем выше частота генерации потенциалов действия. Если амплитуда медленной деполяризации превышает потенциал реактивации Na^+ -каналов, импульсная активность нейронов прекращается. По мере повышения концентрации Ca^{2+} в цитозоле и активации Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов, амплитуда деполяризации медленно уменьшается, а Na^+ -каналы реактивируются, что приводит к постепенному росту амплитуды потенциалов действия на фоне уменьшения деполяризации. Частота потенциалов действия на заднем фронте импульса медленной деполяризации замедляется до 3–4 Гц за счет возникновения более быстрых колебаний кальциевого потенциала (микропачек потенциалов действия). В этих условиях ввиду малой длительности микроимпульса быстрой деполяризации на переднем фронте последнего может генерироваться только один потенциал действия, после которого генерация потенциалов действия подавляется из-за инактивации Na^+ -канала. Частота потенциалов действия при этом совпадает с частотой активации Ca^{2+} -канала (3–4 Гц). Терминация пачки потенциалов действия происходит за счет роста $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и активации Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов, закрытия потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов и их инактивации. В результате мембрана еще больше гиперполяризуется (на 10 мВ ниже критического потенциала), что приводит к подавлению генерации потенциалов действия, активации HCN-подобных каналов и реактивации Na^+ - и потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов. Активность HCN-подобных каналов возрастает, мембрана медленно деполяризуется и достигает критического потенциала возбуждения, при котором начинается генерация тонических потенциалов действия, а затем открываются Ca^{2+} -каналы и вновь генерируется кальциевый потенциал и Ca^{2+} -сигнал. Следовательно, кальциевые каналы, определяющие импульс медленной деполяризации, управляют частотой и амплитудой потенциалов действия во время спонтанной синхронной активности, регулируя условия активации и инактивации Na^+ -каналов. Подавление активности Т-типа Ca^{2+} -каналов уменьшает длительность Ca^{2+} -импульса при спонтанной синхронной активности нейронов, что может способствовать выживанию нейронов при гипервозбуждении и ишемии. Таким образом, уменьшение длительности Ca^{2+} -импульса при действии ингибиторов Т-типа Ca^{2+} -каналов может быть одной из причин известного нейропротекторного действия данных соединений.

Ключевые слова: спонтанная синхронная активность нейронов, кальциевый импульс, Ca^{2+} -каналы Т-типа, потенциал-зависимые кальциевые каналы, потенциал действия, генез пачечной активности, пачки потенциалов действия, деполяризационный сдвиг, критический потенциал.

DOI: 10.1134/S0006302918040105

Сокращения: ПД – потенциал действия, ССА – спонтанная синхронная активность, ПЗКК – потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы, ГАМК(А) – гамма-аминомасляная кислота, АМРА – альфа-аминометилзоксазолпропионовая кислота, NBQX – 2,3-дигидрокси-6-нитро-7-сульфамоил-бензо[*f*]хиноксалин.

Генез пачечной активности. Основная функция нейронов состоит в генерации потенциалов действия (ПД). Выделяют два типа генерации ПД – фоновую, или тоническую, и пачечную [1]. Считается, что тоническая активность ПД возникает при определенной деполяризации, когда Ca^{2+} -каналы еще инактивированы, а Na^{+} -каналы уже реактивированы. Однако однозначного критерия выделения пачек в настоящее время не существует. В разных областях электрофизиологии под пачечной активностью нейронной сети подразумевают различные явления [2]. В настоящей работе пачкой ПД мы будем называть последовательность ПД, сопровождаемую Ca^{2+} -импульсом (или Ca^{2+} -деполяризующим током), во время спонтанной синхронной активности (ССА) нейронов в культуре клеток гиппокампа крысы. При этом показано, что различные типы нейронов генерируют различные по форме Ca^{2+} -импульсы [3]. Различия в форме кальциевых сигналов подразумевают различия в импульсе медленной деполяризации. В настоящее время не ясно, насколько эти различия определяют форму пачечной активности и каковы механизмы влияния импульсов медленной деполяризации на структуру ПД в пачке.

Переход от тонической к пачечной активности включает сдвиг потенциала покоя в сторону деполяризации (деполяризационный сдвиг) до величин, превышающих критический потенциал (потенциал, при котором генерируется ПД). Возникновение деполяризационного сдвига мембраны в определенной популяции нейронов мозга сопровождается развитием гипервозбудимости этих нейронов в форме вызванных и спонтанных эпилептиформных спайковых разрядов [4]. Явление гипервозбуждения наблюдается также при деполяризации, происходящей на начальном этапе ишемии и подавляется ингибиторами Т-типа Ca^{2+} -каналов [5,6]. В общем случае этот деполяризационный сдвиг может быть результатом не только открытия кальциевых каналов, но и закрытия хлорных или калиевых каналов. Диапазон длительности импульса деполяризации достаточно широк и зависит от природы деполяризующих каналов. Так, потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы (ПЗКК) способны генерировать быстрые импульсы деполяризации, а калиевые каналы, регулируемые кальцием или G-белками, могут генерировать очень медленные импульсы деполяризации.

Т-тип Ca^{2+} -каналов играет важную роль в генезисе пачечной активности. Длительной истории открытия и изучения Ca^{2+} -каналов Т-типа посвящено множество публикаций [7]. Деполяризация, обусловленная этими медленными, низкопороговыми, ПЗКК малой проводимости (8 пСм), запускает ПД, понижая порог возбуждения [8,9], регулирует частоту генерации ПД и степень инактивации Na^{+} -канала [10]. Низкопороговые каналы активируются при слабой деполяризации (при потенциалах, более положительных, чем -70 мВ), затем быстро и потенциал-зависимо инактивируются [8,11] с $t \approx 20\text{--}50$ мс. Считается, что только каналы Т-типа при таких отрицательных потенциалах могут обеспечить вход Ca^{2+} и пейсмекерную активность нейрона [12]. Для сравнения, дигидропиридинчувствительные Ca^{2+} -каналы L-типа активируются при высоких потенциалах на мембране (свыше 10 мВ), характеризуются более высокой проводимостью (25 пСм) и очень медленной кинетикой инактивации ($t \approx 500\text{--}2000$ мс) [12]. К тому же они регулируются G-белками, что может обеспечить более длительную деполяризацию [13].

Кроме деполяризации ПЗКК повышают $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [14], что не только запускает процессы секреции нейротрансмиттеров, но и приводит к закрытию самого канала и его инактивации. Для реактивации Ca^{2+} -каналов Т-типа необходима гиперполяризация до $-70\text{--}-85$ мВ [15]. Гиперполяризация, необходимая для реактивации каналов и терминации пачки ПД, может происходить за счет активации кальций-зависимых K^{+} -каналов [16] при поступлении Ca^{2+} в клетку через ПЗКК. В некоторых клетках Ca^{2+} -каналы Т-типа сопряжены с калиевыми каналами BK- [17] и SK-типа. [18]. Поэтому регуляторы гиперполяризующих K^{+} -каналов определяют частоту пачечной активности и частоту Ca^{2+} -импульсов [19]. Закрытие K^{+} -каналов происходит после терминации пачки ПД при снижении внутриклеточной концентрации ионов кальция.

Кроме потенциала существуют и другие эндогенные механизмы регуляции Т-типа кальциевых каналов. Каналы типа $\text{Ca}_v3.2$ активируется при фосфорилировании киназами САМКП [20], РКС и РКА [21]. Эндоканабиноиды [22,23] и арахидоновая кислота ингибируют эти каналы [24,25]. $\beta\gamma$ -субъединица G-белков селективно ингибирует $\text{Ca}_v3.2$ [26], вызывая гиперполяризационный сдвиг потенциала инактивации [27]. Активация мускариновых ацетилхолиновых рецепторов, сопряженных с $\text{G}\alpha_q/11$, также селективно ингибирует $\text{Ca}_v3.3$ [28].

Кроме потенциала существуют и другие эндогенные механизмы регуляции Т-типа кальциевых каналов. Каналы типа $\text{Ca}_v3.2$ активируется при фосфорилировании киназами САМКП [20], РКС и РКА [21]. Эндоканабиноиды [22,23] и арахидоновая кислота ингибируют эти каналы [24,25]. $\beta\gamma$ -субъединица G-белков селективно ингибирует $\text{Ca}_v3.2$ [26], вызывая гиперполяризационный сдвиг потенциала инактивации [27]. Активация мускариновых ацетилхолиновых рецепторов, сопряженных с $\text{G}\alpha_q/11$, также селективно ингибирует $\text{Ca}_v3.3$ [28].

Показано, что Т-каналы участвуют в регуляции ритмов при эпилепсии [29], боли [30], болезни Паркинсона [31], ишемии [5]. Блокаторы каналов применяются при лечении этих заболеваний [31]. Нейропротекторное действие блокаторов каналов показано также *in vitro* на

клеточном уровне [16,27,30]. При исследовании сигнальных путей, регулирующих активность каналов, обращает внимание подавление каналов Т-типа рецепторами, сопряженными с различными Gi-белками [14,29] и активаторами cGMP сигнального пути [32].

Нейроны ЦНС при развитии образуют многочисленные синаптические контакты и формируют нейрональную сеть, в которой возникает спонтанная синхронная активность пачек ПД и Ca^{2+} -импульсов. Нарушение ССА наблюдается при многих нервных расстройствах и нейродегенеративных заболеваниях [33]. Основной причиной нарушений является деполяризация (поскольку многие каналы, определяющие возбудимость, потенциал-зависимы). Если околопороговая деполяризация может увеличить частоту разрядов, то избыточная деполяризация может привести к подавлению активности за счет инактивации Na^+ -каналов. Переход от тонических ПД к пачечной активности ранее был описан для дофаминергических пейсмекерных нейронов [34]. Считается, что ритмическая пейсмекерная активность дофаминергических нейронов черной субстанции необходима для поддержания базального уровня дофамина в стриатуме [35,36] и в то же время является одной из важных причин высокой уязвимости этих нейронов [37–39], связанной с длительностью Ca^{2+} импульса. Длительность пачки ПД и Ca^{2+} -импульса в данном случае определяется электрофизиологическими свойствами субъединиц $Ca_v1.3$ Ca^{2+} -каналов L-типа. Однако общей теории генеза пачек ПД и механизмов управления ритмами пока нет. В настоящей работе исследована зависимость частоты и амплитуды ПД от медленной деполяризации, создаваемой Ca^{2+} -каналами, и от $[Ca^{2+}]_i$ в клетке. Кроме того, показаны способы кодирования информации, передаваемой ПД, импульсами медленной деполяризации.

МЕТОДЫ

Измерение мембранного потенциала. Для анализа изменений мембранного потенциала и активности ионных каналов в работе применяется электрофизиологический метод («пэчк-кламп») в конфигурации «whole cell». При этом система электрофизиологических измерений (Molecular Devices, США) встроена в флуоресцентную станцию Axio Imager Z1 (Carl Zeiss, Germany), оснащенную высокоскоростной камерой Hamamatsu ORCA-Flash, что позволило исследовать одновременно с оптическими характеристиками и электрофизиологические характеристики живых клеток.

Для регистрации токов использовали усилитель Axopatch 200B (Molecular Devices, США), АЦП Digidata 1440A и программное обеспечение pClamp10.2 (Molecular Devices, США). Изменения потенциала мембраны регистрировали в режиме фиксации тока. Данные электрофизиологии анализировали с помощью программного обеспечения Clampfit 10.2.

Измерения уровня цитозольного кальция. Для регистрации быстрых изменений $[Ca^{2+}]_i$ использовали систему анализа изображений на основе инвертированного моторизованного микроскопа DMI6000 (Leica Microsystems, Германия), оснащенного высокоскоростной монохромной CCD-камерой Hamamatsu C9100 и высокоскоростной системой смены фильтров Leica's Ultra-Fast Filter Wheels (время переключения 10–30 мс). Для работы использовали объектив Leica HC PL APO 20×/0.7 IMM. В качестве источника возбуждения флуоресценции использовали осветитель Leica EL6000 с ртутной лампой высокого давления HBO 103 W/2. Уровень $[Ca^{2+}]_i$ оценивали с помощью двухволнового зонда Fura-2 (Molecular Probes, США), в соответствии с известной методикой [40,41]. Для прокраски клеток гиппокампа использовали эфир Fura-2AM в конечной концентрации 4 мкМ в растворе Хенкса, содержащем (в мМ): NaCl – 156, KCl – 3, $MgSO_4$ – 1, KH_2PO_4 – 1,25, $CaCl_2$ – 2, глюкоза – 10, HEPES – 10, pH 7,4. На каждое стекло с культурой клеток добавляли 200 мкл свежеприготовленного раствора красителя и инкубировали в термостате 40 мин при 37°C. После этого культуру промывали раствором Хенкса с добавлением 0,2 мМ L-аргинина и инкубировали 10–15 мин для завершения дэтерификации красителя.

Для рутинных измерений $[Ca^{2+}]_i$ использовали систему анализа изображений на базе инвертированного моторизованного микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия), оснащенного высокоскоростной монохромной CCD-камерой Hamamatsu ORCA-Flash 2.8. В качестве источника возбуждения флуоресценции использовали осветитель Lambda DG-4 Plus (Sutter Instruments, США). Для возбуждения и регистрации флуоресценции Fura-2 использовали набор светофильтров Filter set 21HE (Carl Zeiss, Германия) с фильтрами возбуждения BP340/30 и BP387/15, светоделителем FT409 и фильтром эмиссии BP510/90.

Для измерения флуоресценции круглое покровное стекло с культурой клеток монтировали в специальную измерительную камеру. Объем среды в камере составлял 0,5 мл. Добавление реагентов и отмывку проводили путем замены среды в десятикратном объеме с помо-

стью системы, обеспечивающей перфузию со скоростью 15 мл/мин. Серии изображений получали с интервалом в 1–2 с. Время получения одного двухканального кадра не превышало 400 мс. Нейроны в эксперименте выявляли по ССА и по быстрому ответу на деполяризацию, вызванную кратковременной (20 с) аппликацией 35 мМ КСl.

Полученные двухканальные (при возбуждении Fura-2 на 340 и 380 нм) временные серии изображений обрабатывали в программе ImageJ с плагином «Time series analyzer». При этом измеряли амплитуду кальциевых ответов одиночных клеток, выраженную как отношение сигналов флуоресценции Fura-2 при возбуждении на 340 и 380 нм. Для построения графиков и статистической обработки использовали программу Origin 9.1. Результаты представлены в виде среднего сигнала N клеток в поле зрения \pm стандартное отклонение ($N \pm SD$), в виде типичного Ca^{2+} -ответа большинства клеток или в виде ответа индивидуального нейрона. Данные сравнивали статистически с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и теста значимых различий Стьюдента–Ньюмана–Кейлса, или использовали парный критерий Стьюдента, считая достоверными различия при $p \leq 0,05$. Все данные получены как минимум с трех различных покровных стекол и двух–трех независимых выделений клеток.

Материалы. N-метил-D-аспартат, бикикуллин, домоевая кислота, L-аргинин были приобретены у компании Tocris Bioscience (Великобритания); сбалансированный солевой раствор Хенкса, нейробазальная среда, В-27, фетальная бычья сыворотка – производства Gibco (США), гентамицин – «Дальхимфарм» (Россия); 0,1% полиэтиленимин, L-глутамин, L-глутамат – Sigma-Aldrich (США); КСl – Химмед (Россия); Fura-2AM – Invitrogen (США). Все исследования на животных были проведены в соответствии с требованиями законодательства и были одобрены Комитетами по этике работы с животными ИТЭБ РАН и ИБК РАН.

Работа выполнена на смешанной культуре нейронов и астроцитов гиппокампа различных сроков культивирования (указаны на рисунках). Оценку жизнеспособности клеток проводили с помощью двойного окрашивания зондами Propidium Iodide и Hoechst 33342.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Переход к генерации пачечной активности при деполяризации. Изменяя изменения $[Ca^{2+}]_i$ с помощью флуоресцентного зонда Fura-2 и

изменения мембранного потенциала методом «пэтч-кламп» в конфигурации «whole-cell», мы исследовали переход от тонической активности к пачечной в нейронах культуры гиппокампа крысы при снятии торможения ингибитором рецепторов гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК(А)) бикикуллином. При этом мы отмечали закономерные изменения частоты и амплитуды ПД при генерации импульса медленной деполяризации.

На рис. 1 показано, что после добавления ингибитора ГАМК(А)-рецепторов бикикуллина, деполяризующего нейроны за счет закрытия Cl^- -каналов, возникает режим ССА, при котором тонические ПД с частотой 2–3 Гц (верхняя кривая) генерируются какое-то время нейроном без изменения $[Ca^{2+}]_i$ (рис. 1а, нижняя кривая). В этот период деполяризация во время ПД не открывает ПЗКК, по-видимому, по причине нахождения последних в инактивированном состоянии. Предполагается, что потенциала постгиперполяризации, развиваемого при ПД, в присутствии бикикуллина, недостаточно для реактивации Ca^{2+} -каналов. Последовательность тонических ПД прерывается периодически пачками ПД, во время которых нейрон генерирует медленный импульс деполяризации и соответствующий Ca^{2+} -сигнал. Частота колебаний $[Ca^{2+}]_i \approx 0,01$ Гц. Генерация пачки ПД на рис. 1а,б,г начинается с открытия низкопороговых ПЗКК, которое происходит за счет их реактивации на фоне импульса медленной деполяризации [42]. Механизм активации этих каналов до конца не ясен.

Изменение амплитуды и частоты ПД на фоне импульса медленной деполяризации. Влияние концентрации кальция. На рис. 1в–д приведены фрагменты записи пачки ПД (из рис. 1б), длительностью несколько секунд (рис. 1в), отражающие изменения переднего (рис. 1г) и заднего фронта пачки (рис. 1д). На фоне переднего фронта медленного импульса деполяризации (рис. 1г) наблюдается всплеск высокочастотной активности ПД. При этом предполагается следующая последовательность событий: первый ПД всегда имеет максимальную амплитуду, поскольку Na^+ -каналы полностью реактивированы к этому времени (рис. 1в,г); из-за большой скорости нарастания медленной деполяризации частота ПД на этом участке сильно увеличивается и стремится к теоретически максимальной (в данном случае – 150 Гц, рис. 1г); амплитуда каждого последующего ПД на фоне роста деполяризации уменьшается (рис. 1г), что говорит о потенциал-зависимой инактивации Na^+ -канала; затем амплитуда медленной деполяризации достигает значения, при котором все

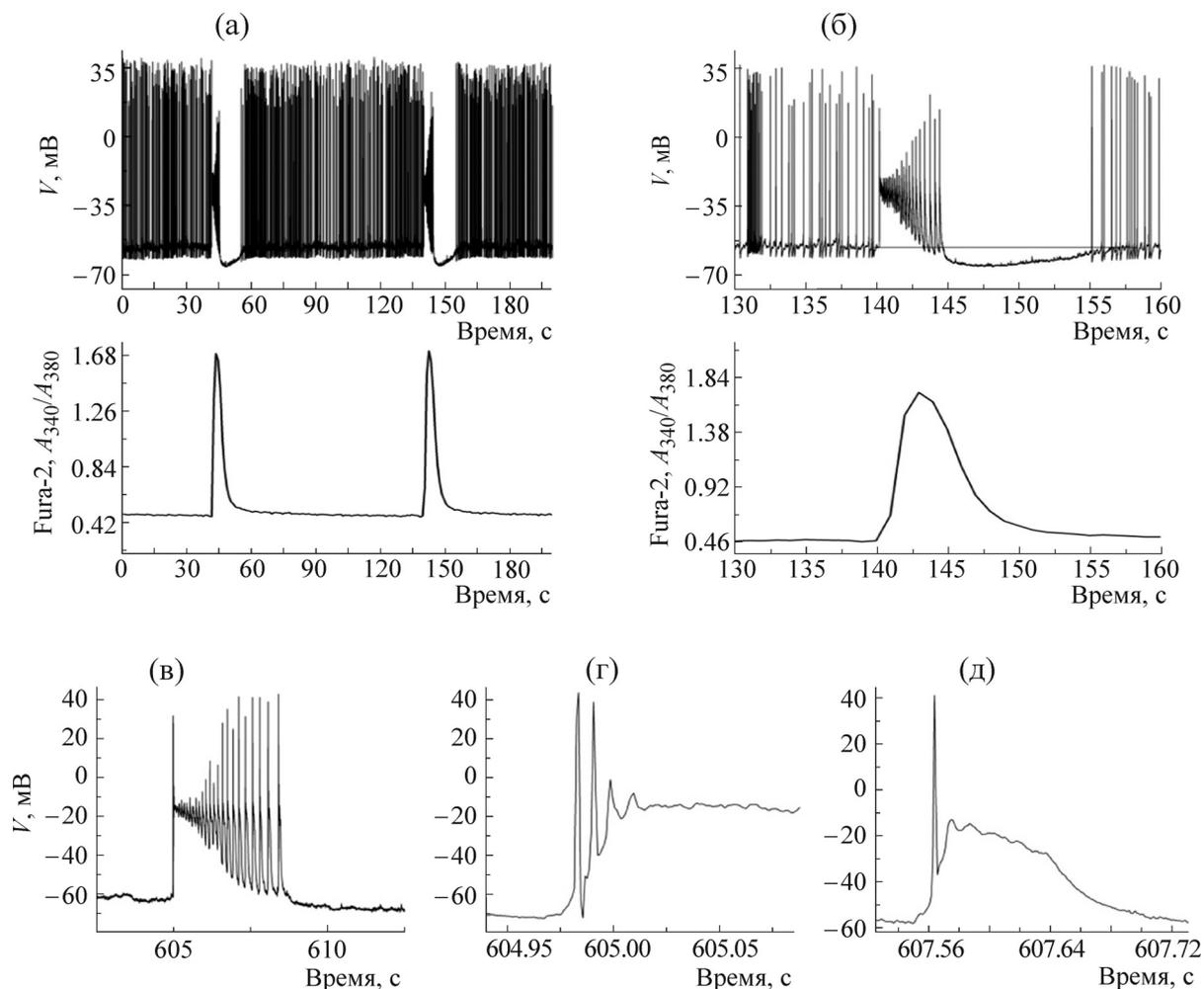


Рис. 1. (а) – Спонтанная тоническая активность ПД при ССА периодически прерывается спонтанной пачечной активностью, сопровождаемой Ca^{2+} -импульсом и импульсом медленной деполяризации. Изменение электрической активности (сверху) и $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (снизу) нейрона при ССА. Электрическая активность нейрона сопровождается генерацией Ca^{2+} -импульса только во время пачечной активности ПД. (б) – Генерация ПД заканчивается медленной гиперполяризацией (на ~ 10 мВ ниже критического потенциала возбуждения), во время которой импульсная активность нейрона прекращается. Затем следует фаза медленной деполяризации, и при достижении критического потенциала возбуждения снова начинается генерация ПД. В среде присутствует бикукуллин (10 мкМ). (в) – Пачка ПД из рис. 1б во время Ca^{2+} -импульса. Медленное уменьшение деполяризации сопровождается ростом амплитуды ПД, что говорит о реактивации Na^+ -канала. Частота ПД на заднем фронте деполяризации непрерывно уменьшается от 10 до 3 Гц за счет уменьшения деполяризующего входящего тока. (г) – Начало пачки ПД из рис. 1в. На переднем фронте медленной деполяризации генерируются затухающие по амплитуде (за счет инактивации Na^+ -каналов), высокочастотные ПД (частота ~ 140 Гц). (д) – Микропачка, состоящая из одного ПД на заднем фронте импульса медленной деполяризации из рис. 1в. ПД генерируется на переднем фронте более быстрого импульса «медленной деполяризации». Амплитуда деполяризации в микропачке постоянна и совпадает с амплитудой первоначальной деполяризации (на рис. 1в, г). Длительность микропачки составляет ~ 10 мс.

Na^+ -каналы инактивированы и генерации ПД не происходит, поскольку для реактивации Na^+ -канала нужна определенная степень гиперполяризации [40]. Далее развиваются несколько процессов регуляции активности каналов медленной фазы реполяризации: на фоне увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Ca^{2+} -потенциал уменьшается, Ca^{2+} -каналы закрываются, а Ca^{2+} -зависимые калиевые каналы активируются и медленно гипер-

поляризуют мембрану, что приводит к постепенной реактивации Na^+ -каналов и восстановлению генерации ПД. Пачечная активность продолжается до тех пор, пока кальциевые каналы не инактивируются параллельно с активацией кальций-зависимых калиевых каналов, которые реполяризуют мембрану ниже порога активации кальциевых каналов [43]. На фоне заднего фронта уменьшения деполяризации ам-

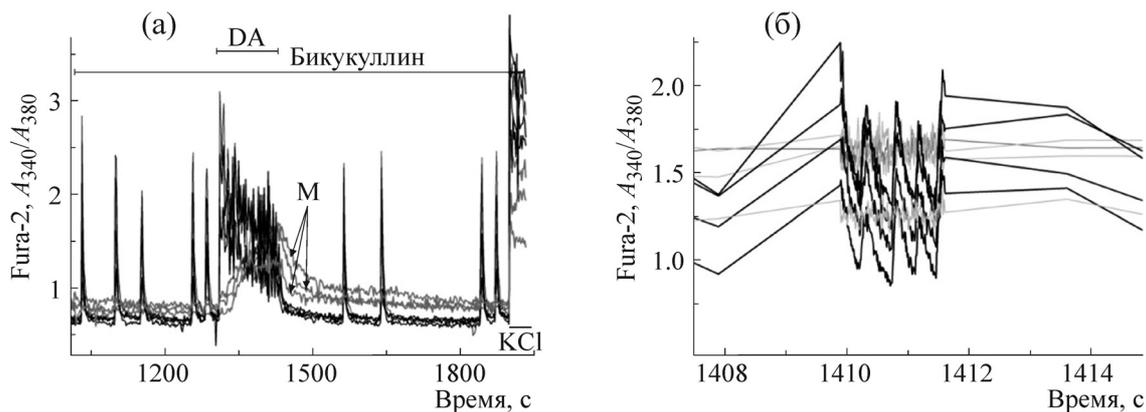


Рис. 2. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ в семи нейронах в синхронно пульсирующей культуре гиппокампа на 14-е сутки культивирования. (а) – Синхронные пульсации Ca^{2+} в нейронах, регистрируемые при снятии торможения ингибитором ГАМК(А)-рецепторов бикукулином (10 мкМ), и Ca^{2+} -ответы на активатор каинатных рецепторов домоевую кислоту (100 нМ). В конце для стандартной деполяризации клеток добавлен КСІ (35 мМ). При добавлении домоевой кислоты основная частота ССА увеличивалась до 0,25 Гц. Исходная частота пульсаций менялась в пределах 0,01–0,0025 Гц. Медленно-отвечающие клетки (М) не пульсируют и используются в качестве контроля (серые кривые). Быстрые записи сделаны во время спонтанного импульса, во время второй добавки домоевой кислоты и во время ответа на КСІ. (б) – Во время действия домоевой кислоты на две секунды включена быстрая регистрация (100 кадров в сек) кальций-зависимой флуоресценции нейронов (фрагмент рис. 2а). В отдельных популяциях клеток регистрируются высокочастотные синхронные колебания кальция (с частотой $\approx 2,5$ Гц). В медленно отвечающих на домоевую кислоту клетках колебаний нет (серые кривые). Основную запись проводили со скоростью 1 кадр за 2 с.

плитуда каждого последующего ПД увеличивается за счет реактивации все большего числа Na^+ -каналов (рис. 1д). В виду того что уровень деполяризации превышает критический потенциал генерации ПД, то время нахождения канала в инактивированном состоянии определяет частоту генерации ПД.

Однако во время каждого импульса ПД на заднем фронте медленной деполяризации наблюдается более быстрый импульс деполяризации длительностью (0,15 с), амплитуда которого постоянна и равна амплитуде импульса медленной деполяризации (рис. 1в,д), что косвенно указывает на участие одного и того же канала в быстрой и медленной деполяризации. Периодическая активация Ca^{2+} -канала указывает на отсутствие потенциал-зависимой инактивации канала в этот период. По-видимому, по этой причине во время каждого импульса ПД наблюдается активация медленного Ca^{2+} -канала и инактивация Na^+ -канала (рис. 1д). Ввиду генерации таких периодических импульсов деполяризации частота ПД на заднем фронте медленного импульса деполяризации сильно уменьшается и совпадает с частотой активации Ca^{2+} -канала (3–4 Гц).

Применяя методику быстрой регистрации изменений $[Ca^{2+}]_i$ [44], мы попытались обнаружить быстрые изменения концентрации Ca^{2+} , соответствующие флуктуациям активности Ca^{2+} -каналов в микропачках (рис. 1в,д), и на-

шли похожие осцилляции при активации домоевой кислотой каинатных рецепторов в отдельных популяциях нейронов (рис. 2). На рисунке показано, что аппликация домоевой кислоты вызывает повышение базального уровня $[Ca^{2+}]_i$, повышение частоты ССА и генерацию высокочастотных кальциевых колебаний в отдельных популяциях нейронов культуры с исходно синхронной спонтанной активностью (рис. 2б). Частота быстрых колебаний в данном эксперименте составляла 2,5 Гц, что соответствует частотам колебаний Ca^{2+} -потенциала на рис. 1в,д. Таким образом, быстрые флуктуации деполяризации на рис 1в–д могут быть следствием колебаний активности Ca^{2+} -каналов в микропачках и причиной быстрых изменений концентрации Ca^{2+} , зарегистрированных на рис. 2б.

Терминация пачки ПД происходит, по-видимому, как за счет гиперполяризации, обусловленной открытием Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов, так и за счет закрытия и инактивации ПЗКК. На рис. 1б показано, что потенциал покоя в это время восстанавливается; мембрана еще больше гиперполяризуется (на 10 мВ) за счет активности Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов, поскольку $[Ca^{2+}]_i$ еще высока (рис. 1б). Считается, что эта гиперполяризация необходима для реактивации Ca^{2+} и HCN-каналов. В это время Ca^{2+} откачивается из клетки (рис. 1б). Na^+ -каналы реактивированы, но отрицательный потенциал выше критического, и генерации ПД

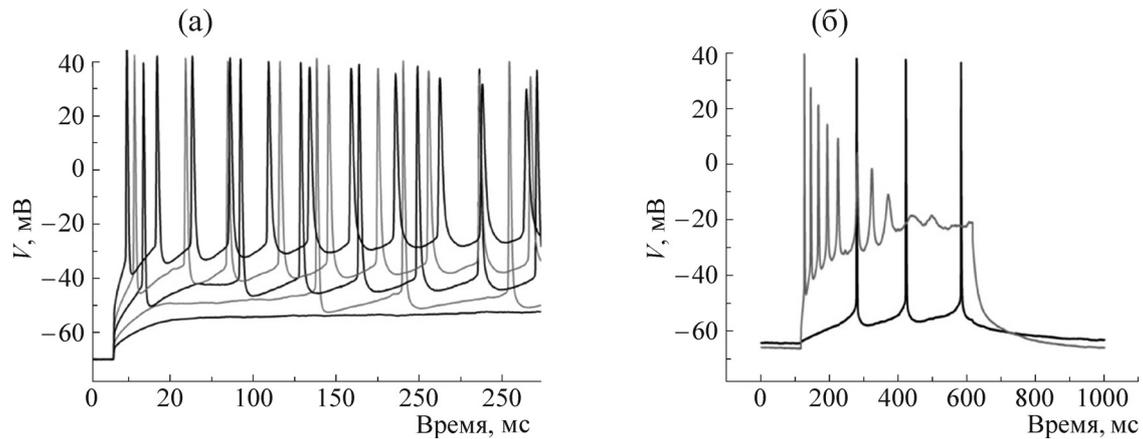


Рис. 3. Изменение частоты и амплитуды вызванных ПД при увеличении деполяризующего тока. (а) – Увеличение частоты вызванных ПД при увеличении амплитуды деполяризации за счет увеличения входящего тока. Приведены кривые через 40 рА. (б) – Кинетика деполяризации определяет частоту и амплитуду ПД. При малой деполяризации амплитуда ПД постоянная (черная кривая). При больших значениях деполяризации ПД затухают на переднем фронте деполяризации за счет инактивации N^+ -каналов (серая кривая). Приведены кривые стимуляции током 50 и 450 рА.

нет. Активность HCN-подобных каналов возрастает, мембрана медленно деполяризуется и достигает критического потенциала возбуждения, начинается генерация ПД, но Ca^{2+} -каналы открываются позже. Механизмы активации Ca^{2+} -каналов медленной деполяризации остаются дискуссионными и будут обсуждаться ниже.

Таким образом, Ca^{2+} -каналы, определяющие импульс медленной деполяризации, формируют пачечную активность двух типов: макро- и микропачки ПД, которые сопровождаются импульсами Ca^{2+} малой и большой частоты соответственно. На переднем фронте увеличения деполяризации частота ПД сильно возрастает (в 100 раз), а амплитуда падает за счет инактивации Na^+ -каналов. При поддержании деполяризационного потенциала выше потенциала реактивации Na^+ -канала генерация ПД прекращается.

При реполяризации за счет повышения $[Ca^{2+}]_i$ и активации Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов происходит постепенная реактивация Na^+ -каналов, генерация ПД возобновляется, частота ПД уменьшается, а амплитуда увеличивается. Увеличение $[Ca^{2+}]_i$ во время Ca^{2+} -деполяризации терминирует пачку ПД, вызывая гиперполяризацию и прекращение генерации ПД. Таким образом, импульсы медленной деполяризации, генерируемые Ca^{2+} -каналами, регулируют частоту и амплитуду ПД, контролируя состояния инактивации/реактивации Na^+ -каналов.

Такая зависимость частоты и амплитуды ПД от деполяризации моделируется в экспериментах с вызванными потенциалами в режиме

фиксации тока (рис. 3). Изменяя величину входящего тока, можно получить ряд зависимостей параметров пачечной активности от амплитуды деполяризующего потенциала. На рис. 3а показано, что деполяризационный сдвиг выше критического потенциала вызывает генерацию пачки ПД, частота которых увеличивается с ростом деполяризации за счет увеличения входящего тока (аналога тока HCN-канала). При постоянном потенциале деполяризации, меньшем потенциала инактивации Na^+ -канала, амплитуда ПД в пачке не изменяется (рис. 3а), поскольку не изменяется число инактивированных Na^+ -каналов. При больших значениях входящего тока, когда максимальная амплитуда деполяризации превышает потенциал инактивации Na^+ -канала, на переднем фронте роста деполяризации возникают высокочастотные ПД, амплитуда которых уменьшается по мере роста деполяризации, и ПД затухают вследствие инактивации Na^+ -каналов (рис. 3б). Таким образом, эксперименты с потенциалами, вызванными деполяризующими ступеньками постоянного тока, демонстрируют механизмы регуляции частоты и амплитуды ПД величиной деполяризации, описанные выше для пачечной ССА.

Изменение амплитуды медленной деполяризации ГАМК(А)- и глутаматными рецепторами. Как было показано выше, ССА сопровождается импульсами повышения Ca^{2+} в нейронах, что вызывает секрецию таких нейротрансмиттеров, как глутамат и ГАМК. Изменение активности соответствующих рецепторов может менять амплитуду медленной деполяризации при ССА. На рис. 4 показано, что манипуляции с актив-

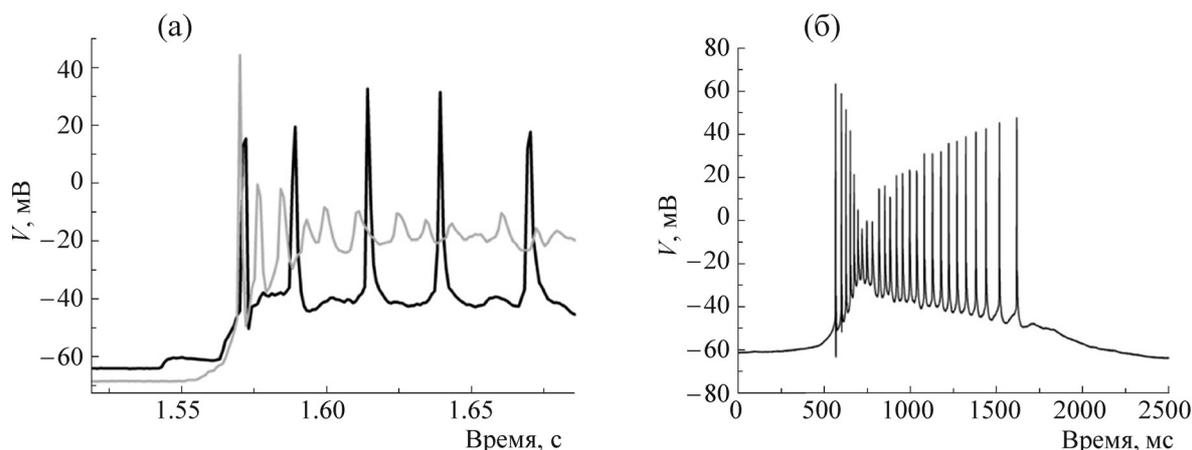


Рис. 4. Изменение мембранного потенциала нейрона при ССА. (а) – Начальный участок пачки ПД в контроле (черная кривая) и в присутствии 10 мкМ бикукуллина (серая кривая). Уменьшение активности гиперполяризующих Cl⁻-каналов увеличивает амплитуду медленной деполяризации (с -42 мВ до -18 мВ) выше потенциала инактивации Na⁺-канала, что приводит к затуханию амплитуды ПД на переднем фронте импульса. (б) – Ингибирование активности AMPA-каналов в присутствии 500 нМ NBQX уменьшает амплитуду медленной деполяризации до -25 мВ. При этом Na⁺-каналы инактивируются не полностью. Средние частоты генерации ПД на переднем и заднем фронте импульса деполяризации изменяются при уменьшении скоростей возрастания деполяризации (сравни с рис. 1в).

ностью потенциал-регулирующих каналов (рецепторов ГАМК(A) и альфа-аминометилглутаматпропионовой кислоты (AMPA)) изменяют частоту и амплитуду ПД в пачке. На рис. 4а приведены начальные фрагменты пачки ПД в контроле и в присутствии бикукуллина, ингибитора ГАМК(A)-рецепторов. Ингибирование ГАМК(A)-рецептора увеличивает амплитуду медленной деполяризации за счет уменьшения входящего Cl⁻-тока. Увеличение амплитуды деполяризации в присутствии бикукуллина выше потенциала инактивации Na⁺-канала приводит к временному затуханию ПД в пачке.

На рис. 4б показано, что ингибитор AMPA-рецепторов квиноксалиндион (2,3-дигидрокси-6-нитро-7-сульфамойл-бензо[f]хиноксалин, NBQX) в небольших концентрациях уменьшает амплитуду деполяризации ниже потенциала инактивации Na⁺-канала. При этом полной инактивации Na⁺-канала в максимуме медленной деполяризации не происходит и при замедлении переднего и заднего фронта деполяризации наблюдается увеличение числа ПД в пачке, уменьшение средних частот и увеличение длительности пачки ПД. Таким образом, при изменении параметров импульса медленной деполяризации непрерывно меняется частота и амплитуда ПД.

Ингибитор Ca²⁺-каналов Т-типа уменьшает длительность Ca²⁺-импульса при ССА. Поскольку блокаторы Т-типа Ca²⁺-каналов вызывают гиперполяризацию и снижение концентрации Ca²⁺ в клетке, они прогнозируемо должны обладать нейропротекторным действием при ги-

первозбуждении, вызванном их активацией. Защитное действие ингибиторов ПЗКК может быть обусловлено как последующей гиперполяризацией, так и ингибированием токсичных Ca²⁺-зависимых процессов. Взаимозависимость потенциала и концентрации Ca²⁺ ярко проявляется в пейсмекерных нейронах, для которых показано, что длительность Ca²⁺ импульса (определяемая длительностью пачки ПД) при пейсмекерной активности является критической для накопления ионов Ca²⁺ во внутриклеточных структурах в токсических концентрациях [45]. Как правило, эти нейроны характеризуются более интенсивным и длительным кальциевым сигналом из-за отсутствия десенситизации, кальцийсвязывающих белков в буферных концентрациях и ГАМК-зависимого торможения [46,47]. Вследствие этого уменьшение длительности Ca²⁺-сигнала (длительность пачки ПД) может быть эффективным механизмом уменьшения токсического действия Ca²⁺, особенно при высоких частотах ССА. На рис. 5 показано, что блокатор Т-каналов ML218 в концентрации 500 нМ постепенно снижает амплитуду деполяризации нейронов и уменьшает длительность пачек ПД при ССА. Медленная кинетика действия ML218 объясняется низкой скоростью проникновения в клетки. Чтобы показать все фазы подавления пачечной активности, в одном эксперименте были выбраны клетки с исходно высоким мембранным потенциалом покоя. В этих нейронах тоническая активность ПД между пачками отсутствует. Присутствие ML218 в концентрации 1 мкМ вызывает

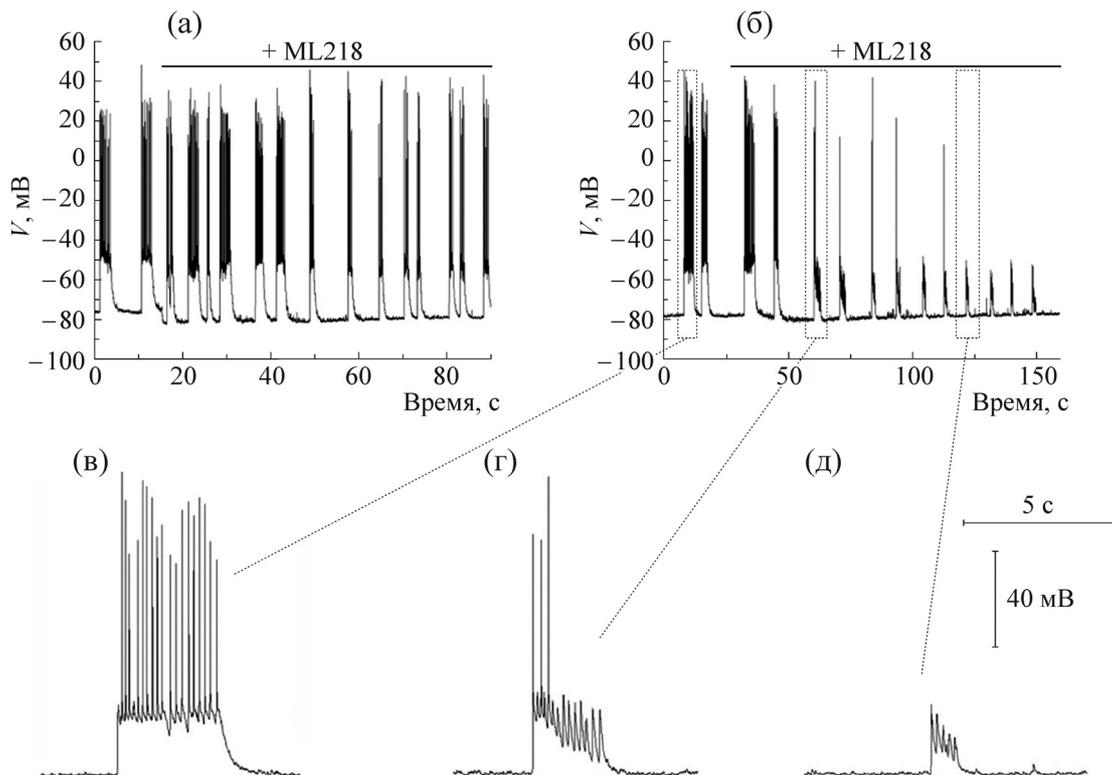


Рис. 5. Изменения потенциала нейрона при ССА. (а) – Культура гиппокампа на 16-е сутки культивирования. Блокатор Т-каналов ML218 в концентрации 500 нМ снижает амплитуду деполяризации нейронов и уменьшает длительность пачки ПД. (б) – Блокатор Т-каналов ML218 в концентрации 1 мкМ уменьшает длительность пачки, подавляет генерацию ПД, гиперполяризует клетку, уменьшает амплитуду медленной деполяризации. (в)–(д) – ML218 в концентрации 1 мкМ уменьшает длительность пачки, подавляет генерацию ПД и уменьшает амплитуду деполяризации. Пунктиром показано расположение пачек ПД, приведенных на рисунках (в)–(д), во время ССА до и после действия ML218.

постепенное снижение амплитуды медленной деполяризации, которое сопровождается вначале уменьшением длительности пачки до одного ПД за счет ускорения реполяризации. Затем амплитуда медленной деполяризации падает до значений ниже потенциала возбуждения и генерация ПД прекращаются. Но медленные колебания импульсов деполяризации без генерации ПД продолжают еще некоторое время. Таким образом, Т-тип Ca^{2+} -каналов принимает участие в инициации колебаний пачечной активности при ССА, периодически деполяризуя нейроны. Ca^{2+} -каналы Т-типа модулируют частоту и амплитуду ПД. Увеличение деполяризующего тока увеличивает частоту ПД, а деполяризация инактивирует Na^+ -каналы и уменьшает амплитуду ПД. Ингибиторы активности Ca^{2+} -каналов Т-типа уменьшают длительность импульса Ca^{2+} , что может объяснить их нейропротекторный эффект при ишемии и гипервозбуждении [5]. Вопрос о механизме периодической реактивации этих каналов остается открытым.

ОБСУЖДЕНИЕ

Спонтанная синхронная активность наблюдается во многих отделах мозга и играет ключевую роль в обработке нейрональной информации, развитии мозга, нейрональной пластичности и синаптогенезе [32,33]. Во время ССА тоническая активность ПД периодически прерывается пачечной активностью ПД. За каждой пачкой ПД следует период покоя, во время которого гиперполяризация препятствует генерации ПД. Пачечная активность является очень общим явлением и наблюдается во многих условиях и во многих нейронных системах [48]. Этот процесс в первую очередь регулируется кальциевыми каналами, которые деполяризуют нейрон и увеличивают вход ионов кальция в клетки. В 1993 г. было показано, что восходящая фаза каждого кальциевого импульса совпадает с пачкой потенциалов действия и что каждая пачка ПД накладывается на импульс непрерывной деполяризации мембраны [49]. Стало очевидным, что ПЗКК должны участвовать в ССА. Известно, что ионы Ca^{2+} являются

важными регуляторами электрической активности нейронов. С одной стороны, каналы Ca^{2+} деполяризуют клетку и, таким образом, способствуют ее возбуждению, регулируя состояние инактивации Na^+ -каналов. С другой стороны, увеличение концентрации Ca^{2+} регулирует активность других каналов, формирующих ПД. Ca^{2+} -импульс, генерируемый ПЗКК, через процесс секреции включает участие нейромедиаторов – ГАМК и глутамата, которые через каналы ГАМК(A), N-метил-D-аспартата и AMPA регулируют степень деполяризации. Синхронные изменения мембранного потенциала и концентрации Ca^{2+} в больших популяциях нейронов, происходящие при периодическом изменении активности Ca^{2+} -каналов T-типа, активируют синаптическую передачу и экспрессию генов, необходимых для развития нейронной сети без каких-либо гормонов и других внешних стимулов.

Для генерации ССА мы использовался сдвиг деполяризации, возникающий после уменьшения торможения в нейронной сети ингибитором ГАМК-рецепторов бикикуллином [50]. Снятие торможения нейронов бикикуллином индуцировало режим спонтанной активности нейронов, при котором тонические высокочастотные ПД, генерируемые нейроном без изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, прерываются генерацией пачки ПД, сопровождаемой импульсом медленной деполяризации и импульсом повышения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нейронах в сети. Изменения параметров ПД обусловлены тем, что активация Ca^{2+} -каналов происходит достаточно медленно, обеспечивая, с одной стороны, генерацию нескольких ПД на переднем фронте деполяризации, но в то же время достаточно интенсивно для обеспечения высокой частоты генерации ПД. Известно, что механизм частотной регуляции ПД состоит из разнесенных по времени потенциал-зависимых состояний (открытия/закрытия и инактивации/реактивации) ионных каналов. Тонкая регуляция деполяризующего потенциала обеспечивает либо тоническую, либо пачечную активность нейронов. Амплитуда медленной деполяризации определяет не только частоту генерации ПД, но и амплитуду ПД за счет потенциал-зависимой инактивации Na^+ -каналов. Как показано на рис. 1 и 4, скорость нарастания и спада амплитуды деполяризации (деполяризующий ток) является основным регулятором изменения частоты ПД внутри пачки.

Ранее было показано, что, несмотря на синхронность ССА, Ca^{2+} -импульсы, генерируемые отдельными нейронами, имеют разную форму и амплитуду [3]. Это означает, что синхронно-пульсирующие нейроны генерируют пачки ПД

разной частоты и амплитуды и, таким образом, передают различные сигналы. Механизмы формирования пачечной активности и изменения частоты и амплитуды ПД за счет потенциал-зависимой инактивации и реактивации Na^+ - и Ca^{2+} -каналов можно рассматривать как механизм кодирования электрического сигнала, передаваемого нейронами.

Медленная деполяризация, обусловленная открытием ПЗКК, не только изменяет частоту ПД в широких пределах, но также, формируя пачечную активность, по сути преобразует аналоговый сигнал (потенциал) в цифровой (частоту ПД), который автоматически модулируется по амплитуде. Считается, что механизм преобразования одиночного кратковременного импульса ПД в длительную пачку ПД различной частоты и амплитуды может быть механизмом фокусирования внимания на новом стимуле и механизмом активации определенных путей переработки этой информации [51,52]. Кодирование ПД по частоте и амплитуде импульсами медленной деполяризации может представлять способ размещения гораздо большего объема информации в конкретной единичной пачке, что приводит к более надежной передаче сигнала. Из-за сложности системы Ca^{2+} -сигналикации в нейронах процесс начала генерации длительных пачек ПД во время ССА остается под вопросом и детальные механизмы реактивации Ca^{2+} -канала во многом не ясны.

Нейропротекторные свойства T-типа Ca^{2+} -каналов. Как показано на рис. 5, T-тип кальциевых каналов не только определяет структуру ПД в пачке, но и регулирует длительность Ca^{2+} -импульса. Известно, что, несмотря на квазисинхронность колебаний Ca^{2+} в нейронах во время ССА, длительность Ca^{2+} -импульса в отдельных нейронах различается [3]. Длительность Ca^{2+} -импульса определяется несколькими причинами – недостатком Ca^{2+} -связывающих белков в буферных концентрациях, десенситизацией Ca^{2+} -каналов, недостатком ГАМК(A)-рецепторов, активностью кальциевых каналов T-типа. В ряде работ показано, что длительность Ca^{2+} -импульса является критическим параметром при высоких частотах ССА [54] и при пейсмекерной активности нейронов [36]. Нейроны, гибнущие в первую очередь при гипервозбуждении, характеризуются более длительным импульсом Ca^{2+} , быстрым подъемом концентрации Ca^{2+} во время импульса, отсутствием десенситизации, медленной откачкой Ca^{2+} из цитозоля и отсутствием Ca^{2+} -связывающих белков в буферных концентрациях [53,54]. На рис. 4 показано, что нейропротекторный эффект ингибиторов кальциевых каналов T-типа

па может быть обусловлен уменьшением длительности Ca^{2+} -импульса, что может быть критическим моментом как для пейсмекерных нейронов, так и для нейронов, содержащих Ca^{2+} -проницаемые каинатные и АМРА-рецепторы и реагирующих на глутамат импульсом Ca^{2+} без десенситизации [54].

Формирование пачечной активности ПД с участием ПЗКК открывает широкие возможности в преобразовании/кодировании электрического сигнала, передаваемого нейроном. При этом большую роль в этом преобразовании могут играть Ca^{2+} -транспортирующие системы и Ca^{2+} -связывающие белки, определяющие различную форму Ca^{2+} -импульса.

Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета науки МОН Республики Казахстан (грант № AP05133528).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. M. Lu, W. Guido, and S. M. Sherman, *J. Neurosci.* **68** (6), 2185 (1992).
2. S. Anava, A. Greenbaum, E. Ben Jacob, et al., *Biophys. J.* **96** (4), 1661 (2009).
3. A. V. Kononov, N. V. Ball, and V. P. Zinchenko, *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology* **5** (2), 162 (2011).
4. D. A. McCormick and D. Contreras, *Annu. Rev. Physiol.* **63**, 815 (2001).
5. I. Nikonenko, M. Bancila, A. Bloc, et al., *Mol. Pharmacol.* **68** (1), 84 (2005).
6. B. J. Kopecky, R. Liang, and J. Bao, *Pflugers Arch.* **466** (4), 757 (2014).
7. B. Nilius, K. Tala, and A. Verkhatsky, *Cell Calcium* **40** (2), 81 (2006).
8. D. Kim, I. Song, S. Keum, et al., *Neuron* **31** (1), 35 (2001).
9. I. Song, D. Kim, S. Choi, et al., *J. Neurosci.* **24** (22), 5249 (2004).
10. S. Huc, A. Monteil, I. Bidaud, et al., *Biochim. Biophys. Acta* **1793** (6), 947 (2009).
11. E. Perez-Reyes, L. L. Cribbs, A. Daud, et al., *Cell Mol Life Sci.* **56** (7–8), 660 (1999).
12. M. Chevalier, P. Lory, C. Mironneau, et al., *Eur. J. Neurosci.* **23** (9), 2321 (2006).
13. J. Proft and N. G. Weiss, *Mol. Pharmacol.* **87** (6), 890 (2015).
14. E. Perez-Reyes, *Mol. Pharmacol.* **77** (2), 136 (2010).
15. J. L. Sánchez-Alonso, J. V. Halliwell, and A. Colino, *Neurosci. Lett.* **439** (3), 275 (2008).
16. R. Iyer, M. A. Ungless, and A. A. Faisa, *Sci. Rep.* **7** (1), 5248 (2017).
17. R. Rehak, T. M. Bartoletti, J. D. T. Engbers, et al., *PloS One* **8**, e61844 (2013). doi:10.1371/journal.pone.0061844.
18. J. Wolfart and J. J. Roeper, *Neuroscience* **22** (9), 3404 (2002).
19. J. Xu and C. E. Clancy, *PloS One* **3** (4), e2056 (2008). doi:10.1371/journal.pone.0002056.
20. J. T. Wolfe, H. Wang, E. Perez-Reyes, and P. Q. Barrett, *J. Physiol.* **538** (2), 343 (2002).
21. J. Chemin, A. Mezghrani, I. Bidaud, et al., *J. Biol. Chem.* **282** (45), 32710 (2007).
22. J. Chemin, A. Monteil, E. Perez-Reyes, et al., *EMBO J.* **20** (24), 7033 (2001).
23. J. Chemin, J. Nargeot, and P. Lory, *J. Biol. Chem.* **282** (4), 2314 (2007).
24. K. Talavera, M. Staes, A. Janssens, et al., *J. Gen. Physiol.* **124** (3), 225 (2004).
25. Y. Zhang, L. L. Cribbs, and J. Satin, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **278** (1), H184 (2000).
26. J. T. Wolfe, H. Wang, J. Howard, et al., *Nature* **424** (6945), 209 (2003).
27. J. Tao, M. E. Hildebrand, P. Liao, et al., *Mol. Pharmacol.* **73** (6), 1596 (2008).
28. M. E. Hildebrand, L. S. David, J. Hamid, et al., *J. Biol. Chem.* **282** (29), 21043 (2007).
29. M. T. Nelson, S. M. Todorovic, and E. Perez-Reyes, *Curr. Pharmaceut. Design* **12** (18), 2189 (2006).
30. S. M. Todorovic and V. Jevtovic-Todorovic, *Pflugers Arch.* **466** (4), 701 (2014).
31. B. J. Kopecky, R. Liang, and J. Bao, *Eur. J. Physiol.* **466** (4), 757 (2014).
32. P. Orestes, D. Bojadzic, R. M. Chow, S. M. Todorovic, *Mol. Pharmacol.* **75** (3), 542 (2009).
33. N. C. Spitzer and E. X. Olson, *J. Neurobiol.* **26** (3), 316 (1995).
34. H. P. Robinson, M. Kawahara, et al., *J. Neurophysiol.* **70** (4), 1606 (1993).
35. J. N. Guzman, J. Sánchez-Padilla, C. S. Chan, D. J. Surmeier, *J. Neurosci.* **29** (35), 11011 (2009).
36. D. J. Surmeier and P. T. Schumacker, *J. Biol. Chem.* **288** (15), 10736 (2013).
37. O. J. Lieberman, S. J. Choi, E. Kanter, et al., *eNeuro.* **4** (6), 0167 (2017).
38. D. J. Surmeier, J. A. Obeso, and G. M. Halliday, *Nat. Rev. Neurosci.* **18** (2), 101 (2017)..
39. C. S. Chan, J.N. Guzman, E. Ilijic, et al., *Nature* **447** (7148), 1081 (2007).
40. G. Grynkiewicz, M. Poenie, and R. Y. Tsien, *J. Biol. Chem.* **260** (6), 3440 (1985).
41. H. Hayashi, H. Miyata, H. Terada, et al., *Jpn. Heart J.* **35** (5), 673 (1994).
42. L. Cozzi, P. D'Angelo, and V. Sanguineti, *Biol. Cybern.* **94** (5), 335 (2006).
43. S. M. Cain and T. P. Snutch, *Biochim. Biophys. Acta* **1828** (7), 1572 (2013).
44. M. V. Turovskaya, E. A. Turovsky, V. P. Zinchenko, et al., *Neurosci. Lett.* **516** (1), 151 (2012).
45. E. A. Turovsky, M. V. Turovskaya, S. G. Gaidin, and V. P. Zinchenko *Arch. Biochem. Biophys.* **615**, 35 (2017).

46. E. A. Turovsky, V. P. Zinchenko, S. G. Gaidin, and M. V. Turovskaya, *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology* **12**, 74 (2018).
47. V. P. Zinchenko, M. V. Turovskaya, I. Yu. Teplov, et al., *Biophysics* **61** (1) (2016).
48. E. M. Izhikevich, *Int. J. Bifurcation and Chaos* **10** (6), 1171 (2000).
49. H. P. Robinson, K. Torimitsu, Y. Jimbo, et al., *PLoS One*. **10** (7), e0134145 (2015). doi: 10.1371/journal.pone.0134145.
51. D. Cooper, *Neurochem. Int.* **41** (5), 333 (2002).
52. H. A. Swadlow, A. G. Gusev, and T. Bezdudnaya, *J. Neurosci.* **22** (17), 7766 (2002).
53. V. P. Zinchenko, E. A. Turovsky, M. V. Turovskaya, et al., *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology* **10** (2), 118 (2016).
54. V. P. Zinchenko, S. G. Gaidin, I. Y. Teplov, and A. M. Kosenkov, *Biochemistry (Moscow). Suppl. Ser. A: Membrane and Cell Biology* **11** (4), 261 (2017).

Regulation of the Frequency and Amplitude of Action Potentials by T-type Ca^{2+} Channels during Spontaneous Synchronous Activity in Hippocampal Neurons

I.Yu. Teplov*, S.T. Tuleukhanov**, and V.P. Zinchenko*

**Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

***Al-Farabi Kazakh National University, pr. 71 al-Farabi, Almaty, 050040, Republic of Kazakhstan*

In this paper, the changes in the frequency and amplitude of action potentials were investigated depending on depolarization caused by the activity of Ca^{2+} channels during spontaneous synchronous activity of hippocampal neurons in the culture. It is known that the pacemaker neuronal electrical activity can be both tonic and bursting. Using the image analysis for measurement of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and patch-clamp technique for control of membrane potential, we have shown that depolarization caused by the inhibitor of the GABA(A) receptor in the neural network results in a mode of spontaneous activity in which tonic high-frequency (2–3 Hz) action potentials are generated by a neuron without any changes in the cytoplasmic Ca^{2+} concentration, ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). The tonic mode is interrupted to burst activity, which is accompanied by a pulse of the slow depolarization and generation of calcium pulses. T-type calcium channel blocker, ML218, suppresses this process. At the same time, the frequency and amplitude of action potentials in the burst are regulated by slow depolarization pulses as follows: on the depolarization front, the frequency of action potentials increases and the amplitude decreases as a result of Na^+ channel inactivation. More rapid depolarization rate increases the frequency of action potentials. When the amplitude of slow depolarization is higher than the potential of Na^+ channel reactivation, the neural impulse activity is stopped. As the cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) increases and Ca^{2+} -dependent K^+ channels are activated, depolarization amplitude decreases slowly, and reactivation of Na^+ -channels can be seen as a gradual increase in the amplitude of action potentials and a decrease in the rate of depolarization. The frequency of action potentials on the backside of depolarization pulse slows down to 3–4 Hz due to the occurrence of the faster Ca^{2+} -potential oscillations (microbursts of action potentials). Under these conditions, only one action potential can be generated due to rapid depolarization at the leading edge. After that, generation of action potentials is suppressed because of Na^+ channel inactivation. The frequency of action potentials in this case coincides with the Ca^{2+} -channel activation frequency (3–4 Hz). Termination of burst firing is due to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase and Ca^{2+} -dependent K^+ channels activation, and the closure and inactivation of voltage-gated Ca^{2+} channels. As a result, the membrane is hyperpolarized even more (10 mV lower than the critical one), leading to a suppression of action potential generation, activation of HCN channels and reactivation of Na^+ and voltage-gated Ca^{2+} channels. The activity of HCN-like channels increases, the membrane slowly depolarizes and the membrane potential becomes more positive, in which the generation of tonic firing patterns begins, and then Ca^{2+} channels open, and Ca^{2+} potential and Ca^{2+} signal are generated again. Thus, the channels, which determine the pulse of slow depolarization, control the frequency and amplitude of action potentials during spontaneous synchronous activity, regulating the activation and inactivation conditions of Na^+ channels. The suppression of the activity of T-type Ca^{2+} channels reduces the duration of burst firing and Ca^{2+} impulse during spontaneous, synchronous activity of neurons, that contributes to survival of neurons during hyperexcitation and ischemia. Thus, a reduction of the Ca^{2+} pulse duration caused by the blockers of T-type Ca^{2+} -channels, may be one of the reasons in understanding why these compounds have demonstrated the neuroprotective effect.

Keywords: spontaneous synchronous activity of neurons, calcium impulse, T-type Ca^{2+} -channels, voltage-gated calcium channels, action potential, genesis of bursting activity, bursts of action potential, depolarization shift, critical potential