

## РОЛЬ ПАРВАЛЬБУМИН-СОДЕРЖАЩИХ ИНТЕРНЕЙРОНОВ В РЕГУЛЯЦИИ СПОНТАННОЙ СИНХРОННОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ МОЗГА В КУЛЬТУРЕ

© 2016 г. В.П. Зинченко, М.В. Туровская, И.Ю. Теплов,  
А.В. Бережнов, Е.А. Туровский

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

*E-mail: vpz@mail.ru*

Поступила в редакцию 02.11.15 г.

Подтипы тормозных ГАМК-ергических нейронов, содержащих  $Ca^{2+}$ -связывающие белки играют ведущую роль в регуляции синхронных спонтанных пульсаций  $Ca^{2+}$  в нейрональной сети. В работе показано, что: 1) интернейроны, содержащие  $Ca^{2+}$ -связывающие белки в буферных концентрациях, могут быть идентифицированы по форме  $Ca^{2+}$ -сигнала в ответ на деполяризацию или активацию ионотропных глутаматных рецепторов; 2)  $Ca^{2+}$ -связывающие белки участвуют в рассинхронизации спонтанных пульсаций  $Ca^{2+}$ . При малых частотах синхронных спонтанных пульсаций (менее 0,2 Гц) нейроны пульсируют квазисинхронно. При более высоких частотах происходит синхронизация спонтанных пульсаций во всех нейронах; 3) обнаружено, что в сети существуют одновременно несколько разночастотных синхронных колебаний, различающихся и по амплитуде синхронного импульса, что может являться механизмом селективного направления информации в отдельные нейроны с использованием одной и той же сети; 4) в одной из популяций интернейронов при высоких частотах синхронных спонтанных пульсаций наблюдается инверсия градиента ионов Cl. Ингибирование ГАМКА-рецепторов в этом случае оказывает тормозное действие на эту популяцию и возбуждающее на остальные нейроны в сети. Таким образом, в настоящей работе показаны несколько механизмов регуляции синхронной активности нейронов в культуре клеток гиппокампа крысы ГАМК-ергическими нейронами, содержащими  $Ca^{2+}$ -связывающие белки.

*Ключевые слова: интернейроны,  $Ca^{2+}$ -связывающие белки, парвальбумин, синхронная активность нейронов, концентрация  $Ca^{2+}$ .*

Особый статус ГАМК-ергических (ГАМК – гамма-аминомасляная кислота) нейронов в регуляции активности отдельных популяций нейронов мозга показан во многих экспериментах. Повреждение тормозных механизмов ГАМК-ергической передачи вызывает гиперактивацию и гиперсинхронизацию нейронов в сети [1]. На физиологическом уровне нарушение работы данных типов нейронов приводит к развитию нейродегенеративных заболеваний, таких как синдром Туретта и болезнь Паркинсона [2], шизофрения, эпилепсия и аутизм [2–5]. В отдельных работах показано, что при этом повреждаются и гибнут только определенные популяции интернейронов [6]. Однако подтип повреждаемых ГАМК-ергических нейронов почти нигде не установлен.

Сокращения: ГАМК – гамма-аминомасляная кислота, PV – парвальбумин, ССП – спонтанные синхронные пульсации. NMDA – N-метил-D-аспаратат, DA – домоевая кислота.

Популяция ГАМК-ергических нейронов неоднородна и состоит из нескольких подтипов, имеющих различное функциональное назначение и различные молекулярные механизмы регуляции. Отдельные подтипы ГАМК-ергических нейронов содержат  $Ca^{2+}$ -связывающие белки в буферных концентрациях [7]. Парвальбумин (PV), кальбиндин и калретинин являются главными буферами кальция в нейронах гиппокампа [7–10].  $Ca^{2+}$ -связывающие белки, в силу своих свойств, модулируют динамику внутриклеточного кальция в нейронах и влияют на процессы возбуждения [11] и синхронную импульсную активность нейронов в различных отделах мозга [12].  $Ca^{2+}$ -связывающие белки различаются по скорости связывания с  $Ca^{2+}$  и по-разному влияют на  $Ca^{2+}$ -сигнал. Быстрые буферы, такие как калретинин и кальбиндин, замедляют кинетику изменения концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле клеток ( $[Ca^{2+}]_i$ ), уменьшают амплитуду и пролонгируют задний фронт  $[Ca^{2+}]_i$ -импульса [13].  $Ca^{2+}$ -связывающие белки с медленной скоростью связывания, такие как

парвальбумин, незначительно уменьшают амплитуду импульса  $[Ca^{2+}]_i$ , но сильно увеличивают скорость затухания сигнала [13,14].  $Ca^{2+}$ -связывающие белки влияют на кинетику  $[Ca^{2+}]_i$ -импульсов как непосредственно, так и через модуляцию электрической активности нейронов [15]. Электрофизиологически показано, что парвальбумин ускоряет затухание пачек потенциалов действия, вызывающих  $Ca^{2+}$ -сигнал, и приводит к появлению медленной фазы развития пачки потенциалов действия [14]. Активность основных ионных каналов, регулирующих параметры пачечной активности потенциалов действия, также зависит от  $Ca^{2+}$ -связывающих белков. Так, в ГАМК-ергических нейронах эти белки вызывают активацию  $K^+$ -каналов BK- и SK-типа. При этом быстро связывающие  $Ca^{2+}$ -белки активируют BK-каналы [12,16], а медленно связывающие – SK-каналы [17,18]. Активация этих каналов приводит к замедлению процесса деполяризации, задержке генерации потенциалов действия и повторных разрядов спайков.

PV+ ГАМК-ергические нейроны являются быстрыми (fast spiking) нейронами, отличающимися коротким потенциалом действия [19,20]. Изменение активности SK-каналов регулирует частоту спайков в нейронах [21]. Наличие такой кальций-зависимой регуляции параметров потенциалов действия с участием PV может контролировать параметры (форму) разрядных пачек интернейронов, а значит, и форму  $[Ca^{2+}]_i$ -импульса. Активируемые гиперполяризацией катионные неселективные каналы (HCN-каналы), задающие ритм активности популяций нейронов головного мозга, также экспрессированы в субпопуляции ГАМК-ергических нейронов, которая частично перекрывается с популяцией PV+ нейронов.

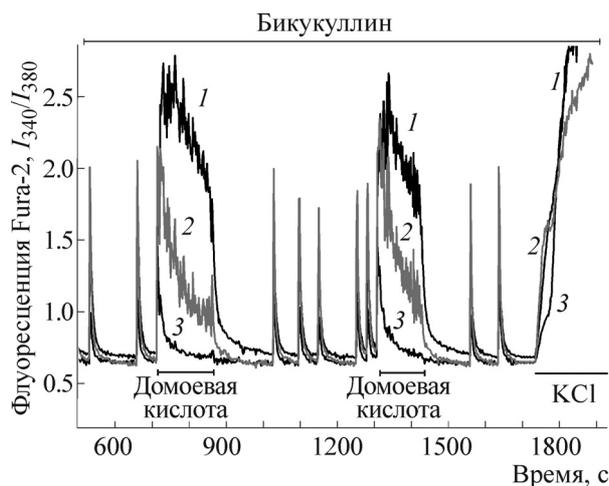
Несмотря на очевидную важность ГАМК-ергических нейронов, содержащих  $Ca^{2+}$ -связывающие белки, в регуляции потоков информации в мозге, физиологическая роль  $Ca^{2+}$ -связывающих белков в интернейронах остается под вопросом, а экспериментальные методики для селективной манипуляции с подтипами ГАМК-ергических нейронов ограничены. Попытка классифицировать нейроны по форме  $Ca^{2+}$ -импульса в спонтанных синхронных пульсациях (ССП), используя такие параметры, как скорость подъема и спада сигнала, и связать их с определенным фенотипом сделана в работе [22]. Там же была введена терминология, характеризующая форму  $Ca^{2+}$ -импульса. В настоящей работе приводятся доказательства, что нейроны, идентифицированные по форме  $Ca^{2+}$ -сигнала как импульсные, составляют популя-

цию PV+ интернейронов, которая участвует в регуляции синхронности СПП и подавлении гиперактивности сети.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Культура клеток.** Смешанную нейроглиальную культуру клеток гиппокампа выделяли из новорожденных (один-три дня) линейных крыс породы Sprague Dawley по методике, представленной в работе [23]. Культуру выращивали в  $CO_2$ -инкубаторе при  $37^\circ C$  и 100% влажности на среде Neurobasal A medium, с добавлением 2% Supplement B27, 0,5 мМ глутамин и 15 мкг/мл гентамицина. Эксперименты выполнены на культурах (13–17 суток *in vitro*), находящихся в режиме спонтанных синхронных пульсаций.

**Измерения уровня цитозольного кальция методом флуоресцентной микроскопии.** Изменения  $[Ca^{2+}]_i$  в нейронах регистрировали по интенсивности флуоресценции двухволнового  $Ca^{2+}$ -чувствительного зонда Fura-2 [24]. Для измерения  $[Ca^{2+}]_i$  использовали систему анализа изображений на базе инвертированного моторизованного микроскопа Leica DM16000 B, оснащенного высокоскоростной монохромной CCD-камерой Hamamatsu C9100, системой высокоскоростной смены возбуждающих светофильтров Leica's Ultra-Fast Filter Wheels (время переключения 10–30 мс). Для работы использовали объектив Leica HC PL APO 20x/0.7 IMM. В качестве источника возбуждения флуоресценции использовали осветитель Leica EL6000 с ртутной лампой высокого давления HBO 103 W/2. Для измерения флуоресценции круглое покровное стекло с культурой клеток, окрашенным зондом Fura-2AM, монтировали в специальную измерительную камеру. Объем среды в камере составлял 0,5 мл. Добавки реагентов и отмывку проводили сменой среды в десятикратном объеме с помощью системы, обеспечивающей перфузию со скоростью 15 мл/мин. Полученные на двух различных каналах временные серии изображений обрабатывали в программе ImageJ с использованием плагинов Time Series Analyzer и RatioPlus. При обработке серий изображений измеряли амплитуду кальциевых ответов одиночных клеток, выраженную как отношение сигналов флуоресценции Fura-2 при возбуждении 340 и 380 нм. Для выявления ГАМК-ергических нейронов и нейронов, содержащих  $Ca^{2+}$ -связывающие белки, использовали иммуноцитохимический метод [23]. Форму  $[Ca^{2+}]_i$ -ответов сопоставляли с содержанием  $Ca^{2+}$ -связывающих белков в клетках и их принадлежностью к подтипу ГАМК-ерги-



**Рис. 1.** Усредненные по пяти типичным клеткам  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы в ответ на повторные аппликации ДА (100 нМ) и КСI в синхронно пульсирующей культуре. В поле зрения микроскопа наблюдали 14 клеток, отвечающих на ДА быстрым импульсом (3), 6 клеток, отвечающих быстро и без десенситизации (1) и большинство клеток с умеренной десенситизацией сигнала (60 из 80 клеток) (2). Деполаризацию клеток вызывали добавлением 35 мМ КСI.

ческих нейронов при анализе препаратов, окрашенных флуоресцирующими антителами на GAD65/67, парвальбумин, кальбиндин и калретинин.

**Материалы.** В работе использованы: N-метил-D-аспартат (NMDA), домоевая кислота (ДА), бикикуллин, (Tocris Bioscience, Англия); раствор пенициллина-стрептомицина, среда Хенкса, 2,5% раствор трипсина, 0,1% поли-L-лизин, L-глутамин, (Sigma, США); КСI (Химмед, Россия); эмбриональная сыворотка телят (MP Biomedicals, США); 4% гентамицин (ОАО «Дальхимфарм», Россия); нейробазальная среда, заменитель сыворотки Supplement B-27, фетальная сыворотка быков, Fura-2AM (Invitrogen, США); первичные кроличьи антитела против глутаматдекарбоксилазы 65/67 (Abcam, Великобритания), вторичные антитела осы против кролика, конъюгированные с Atto 565 (НПФ «Биотехнологии», Россия) или вторичные антитела козы против кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 405 (Invitrogen, UK); первичные мышьиные моноклональные антитела против парвальбумина (Abcam, UK); вторичные антитела козы против мыши, конъюгированные с Alexa Fluor 633 (Invitrogen, США); первичные мышьиные моноклональные антитела против кальбиндина (Abcam, UK); первичные мышьиные антитела против калретинина (Abnova, США).

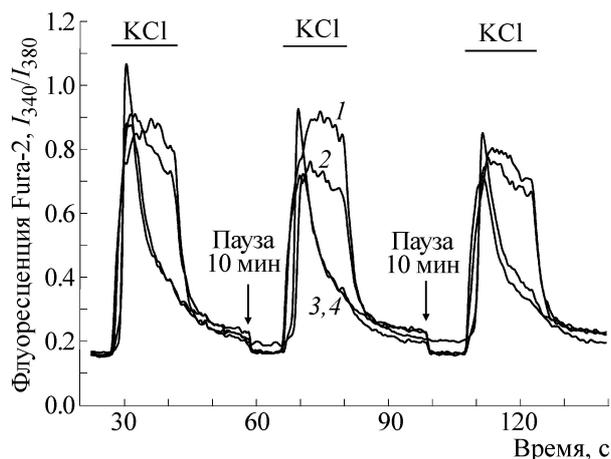
Статистический анализ и получение графиков были проведены с использованием программы Origin 8.5 (Microcal Software Inc., Northampton, США). Результаты были выражены как среднее – стандартное отклонение (*SD*) или представляли репрезентативные  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы отдельных клеток.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

**Параметры  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов, характеризующие нейроны, содержащие  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки.** Для визуализации подтипов ГАМК-ергических нейронов, содержащих  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки, необходимо было установить корреляцию между формой  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -импульса (в ССП и в ответах на деполаризацию и агонисты глутаматных рецепторов), эргичностью и содержанием  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков. Для этого были выбраны характерные параметры  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала, сохраняющиеся при повторной активации клеток.

Ранее нами показано, что  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ответы нейронов на деполаризацию и на активацию ионотропных глутаматных рецепторов отличаются по форме, скорости и амплитуде и характерны для каждого нейрона [25,26]. Одной из причин наблюдаемых различий в форме  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов является наличие  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков в буферных концентрациях [11]. На рис. 1 приведены усредненные по пяти типичным клеткам  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы в ответ на повторные аппликации агониста каинатных глутаматных рецепторов домоевую кислоту в синхронно-пульсирующей культуре. Показано, что по типу  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ответа на активатор каинатных рецепторов можно выделить несколько популяций нейронов. В поле зрения микроскопа наблюдали шесть клеток, отвечающих быстро и без десенситизации (кривая 1). 14 клеток отвечали на ДА быстрым импульсом небольшой амплитуды (кривая 3). Большинство нейронов (60 из 80 клеток в данном эксперименте) отвечало на ДА быстрым увеличением  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , который затем медленно уменьшался во время действия агониста (кривая 2).

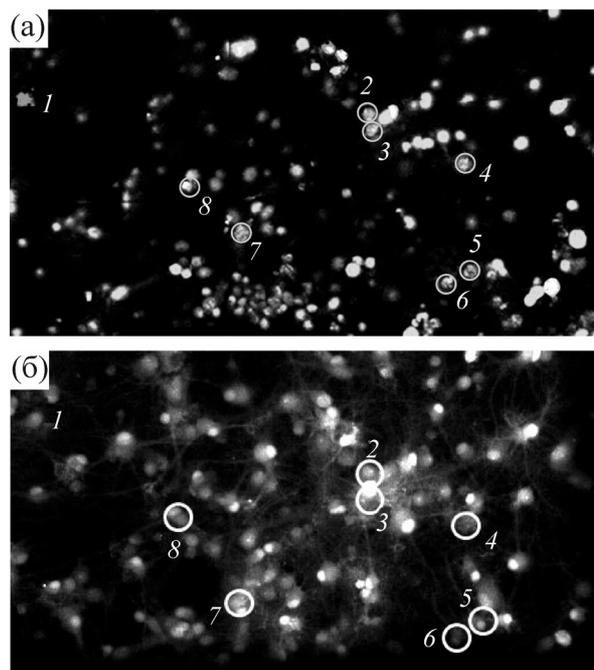
$\text{Ca}^{2+}$ -сигналы индивидуальных нейронов в ответ на кратковременную деполаризацию также отличаются по амплитуде, скорости нарастания сигнала и степени «десенситизации» (скорость падения сигнала во время действия активатора). На рис. 2 приведены характерные  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы четырех нейронов из двух популяций клеток в ответ на повторные аппликации 35 мМ КСI. Видно, что каждая клетка сохраняет свой индивидуальный ответ при повторной стимуляции. Большинство нейронов (до 90%) (про-



**Рис. 2.** Характерные  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналы двух популяций клеток в ответ на повторные аппликации 35 мМ KCl.

центное соотношение между подтипами нейронов отличается на разных сроках культивирования) отвечали на деполяризацию быстрым увеличением  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , которая затем медленно уменьшалась в присутствии KCl (кривые 1 и 2 на рис. 2). Нейроны одной из минорных популяций отвечали на деполяризацию импульсным ответом с небольшой задержкой сигнала, крутым передним фронтом и большой скоростью его затухания (кривые 3 и 4 на рис. 2).

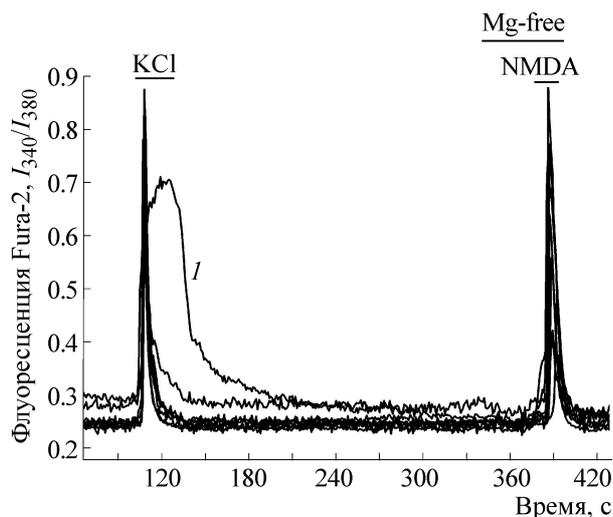
**Особенности  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов ГАМК-ергических нейронов, содержащих парвальбумин.** Из литературных данных известно, что крутой передний фронт и быстрый спад  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала характерны для нейронов, содержащих PV [13,14]. Мы предположили, что наблюдаемые нами задержка и быстрая десенситизация  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -импульсов отдельных клеток обусловлена присутствием  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков типа парвальбумина в буферных концентрациях в цитозоле этих клеток. Для идентификации ГАМК-ергических нейронов, содержащих  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки, мы обрабатывали клетки флуоресцирующими антителами на GAD65/67 и парвальбумин после измерения  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов. Затем  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнал каждой клетки сопоставляли с содержанием в ней  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков и принадлежностью к типу ГАМК-ергических нейронов. На рис. 3а показано изображение фиксированного препарата клеток, окрашенного флуоресцирующими антителами на парвальбумин и GAD65/67. После окраски производили съемку в трех каналах – красном, зеленом и проходящем. На рисунке кружками обведены нейроны, в которых колокализованы обе метки, т.е. PV+ ГАМК-ергические нейроны (номера 2–8).



**Рис. 3.** (а) – Двойное окрашивание клеток гиппокампа в культуре антителами на парвальбумин и ГАМК. Кружками обведены ГАМК-ергические нейроны, в которых отмечена колокализация антител на PV и GAD65/67 (номера 2–8). Для сравнения отмечена клетка 1 – ГАМК-ергический нейрон, не содержащий парвальбумина. (б) – Изображение клеток гиппокампа в культуре, окрашенных Fura-2 (возбуждение 380 нм), соответствующее конфокальному изображению (а). Цифрами 2–8 обозначены ГАМК-ергические нейроны, содержащие парвальбумин. Клетка 1 не содержит PV.

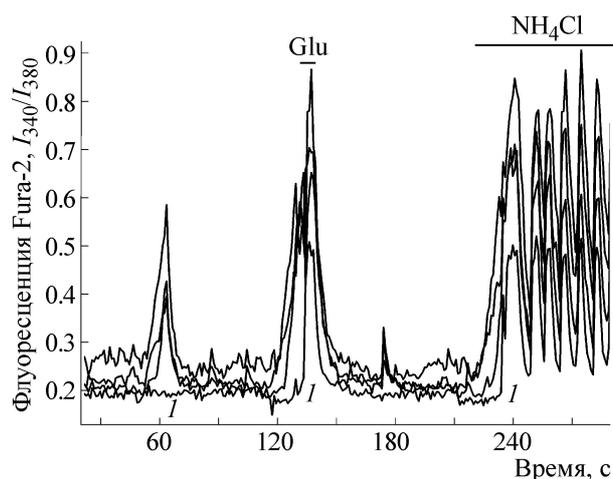
На рис. 3б приведено изображение той же культуры клеток гиппокампа, окрашенных Fura-2. Клетки последовательно активировали кратковременными добавками KCl, средой без добавления  $\text{Mg}^{2+}$ , NMDA и DA. Соответствующие  $\text{Ca}^{2+}$ -ответы каждой клетки в поле зрения регистрировали системой анализа изображения. На рис. 4 приведены кальциевые сигналы семи PV+ ГАМК-ергических нейронов, которые соответствуют клеткам со смешанной флуоресценцией на рис. 3б. Анализ изображения и  $\text{Ca}^{2+}$ -сигналов ГАМК-ергических PV+ нейронов (рис. 4) показал, что они отличаются: импульсным ответом на KCl, небольшой задержкой сигнала и крутым передним фронтом, сильной десенситизацией ответа на KCl, по сравнению с другими нейронами. Для сравнения на рисунке показан ответ одного из ГАМК- PV-нейронов. Все ГАМК+ PV+ нейроны этой популяции имеют импульсную форму  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа и на NMDA.

**Популяция сетевых нейронов, не принимающая участия в ССП малой частоты.** Наличие небольшой задержки  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала в ответах на



**Рис. 4.** Изменение  $[Ca^{2+}]_i$  в ГАМК-ергических нейронах, содержащих PV, в ответ на деполяризацию (35 mM KCl) и активацию глутаматных рецепторов NMDA в безмагневой среде (кривые соответствуют клеткам на рис. 3а, для которых была показана колокализация антител к PV и GAD 65/67). Нейроны характеризуются импульсным ответом – небольшой задержкой сигнала и быстрой десенситизацией. Для сравнения приведена запись ответа ГАМК-ергического нейрона, не содержащего парвальбумин (кривая I).

деполяризацию, если она связана с демпфированием  $Ca^{2+}$ -ответа  $Ca^{2+}$ -связывающими белками, предполагает, что данные клетки могут не отвечать на кратковременную активацию  $Ca^{2+}$ -каналов или отвечать незначительным увеличением  $[Ca^{2+}]_i$ . Действительно, такие случаи часто наблюдаются в эксперименте. На рис. 5 приведена запись ССП  $Ca^{2+}$  в четырех нейронах, представляющих различные популяции. В максимуме второго синхронного импульса добавлен глутамат (400 нМ), а на 215 с добавлен  $NH_4Cl$  (8 mM). Ранее на нейрональных культурах с использованием методов флуоресцентной микроскопии было показано, что  $NH_4^+$  вызывает гипервозбуждение нейронных сетей [27,28]. На рисунке показано, что одна из популяций нейронов с задержкой ответов на глутамат (аналогичные эксперименты сделаны и с NMDA) и  $NH_4Cl$  изначально не участвует в ССП. Можно было думать, что эти нейроны не являются сетевыми или это вовсе не нейроны. Однако, как показано на рисунке, эти клетки отвечают на глутамат (NMDA) и KCl  $Ca^{2+}$ -импульсом с небольшой задержкой и начинают пульсировать синхронно со всеми нейронами в культуре при высокой частоте после активации клеток  $NH_4Cl$ . При этом и в остальных популяциях пропадают задержки, наблюдаемые при низкой частоте ССП и в начальной реакции



**Рис. 5.** ССП  $Ca^{2+}$  в четырех нейронах, представляющих различные популяции. В максимуме второго импульса добавлен глутамат (400 нМ). На 215-й секунде добавлен  $NH_4Cl$  (8 mM). Клетки с задержкой  $Ca^{2+}$ -импульса в ССП и клетки, не пульсирующие при малой частоте ССП, начинают синхронно (без задержек) пульсировать при высокой частоте. Начальная частота 0,015 Гц увеличивается до 0,15 после добавления  $NH_4Cl$ .

на  $NH_4Cl$ . Таким образом, замедляя/демпируя изменения  $Ca^{2+}$  при ССП,  $Ca^{2+}$ -связывающие белки могут быть причиной рассинхронизации импульсов в ССП. По-видимому, при высокой частоте колебаний, сопровождаемой некоторым ростом базального уровня  $Ca^{2+}$ , происходит заполнение внутриклеточного буфера  $Ca^{2+}$  и клетки, содержащие  $Ca^{2+}$ -связывающие белки, начинают пульсировать синхронно с клетками без буфера. Наличие  $Ca^{2+}$ -буферов может выводить эти популяции нейронов из под регулирующего влияния одиночных  $Ca^{2+}$ -импульсов и импульсов малой частоты.

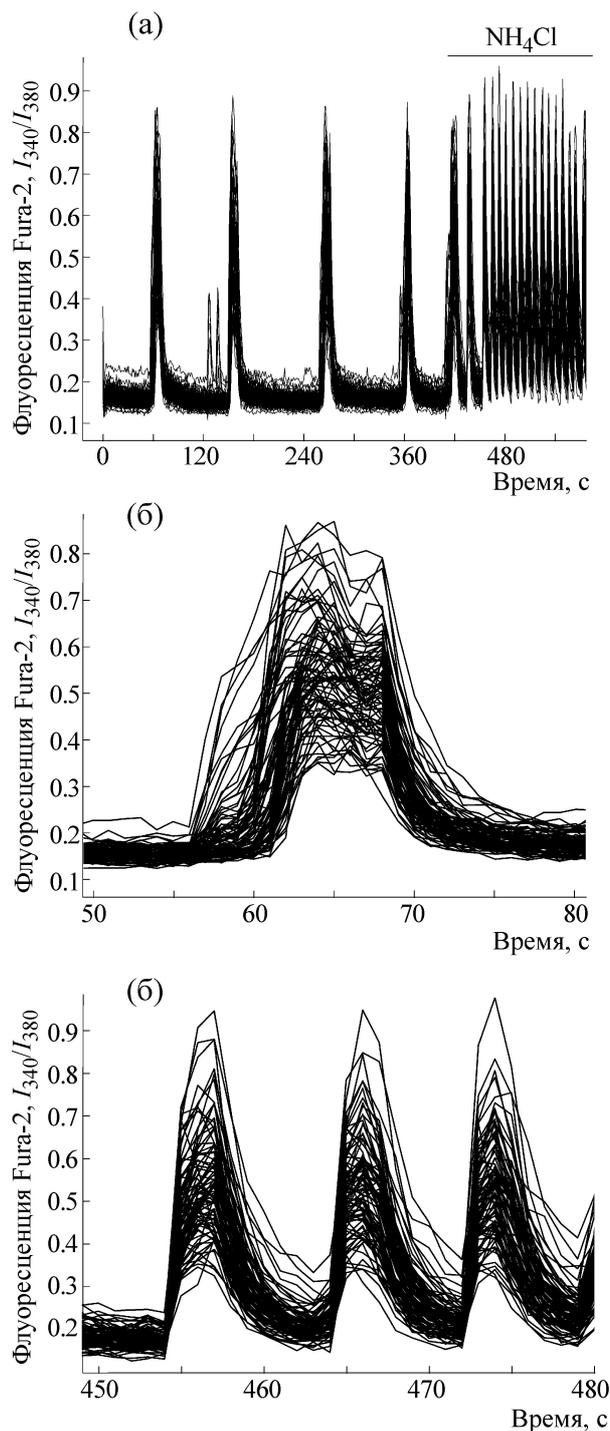
**$Ca^{2+}$ -связывающие белки и синхронность ССП.** Роль синхронизации нейронов в сети при эпилепсии и в усилении связи между областями мозга широко обсуждается в литературе [29,30]. Поэтому выявление новых механизмов синхронизации активности нейронов является важной задачей. Исследование процесса рассинхронизации  $Ca^{2+}$ -импульсов в ССП показало, что существует несколько причин этого явления. На рис. 6 приведена запись ССП ионов  $Ca^{2+}$  в цитозоле нейронов в культуре клеток гиппокампа на 14-е сутки культивирования. В начале эксперимента нейроны синхронно пульсируют с малой частотой 0,01 Гц, которая увеличивается в 10 раз при действии  $NH_4Cl$ . Видно, что в сети существует небольшая популяция клеток, которая может пульсировать синхронно между собой с другой, более высокой частотой (0,1 Гц), однако амплитуда пульсаций  $Ca^{2+}$  в

этой популяции клеток в этом случае гораздо ниже. На рис. 6б приведен развернутый во времени первый импульс в ССП. Видно, что спонтанные  $\text{Ca}^{2+}$ -импульсы во время ССП на самом деле квазисинхронны при малых частотах колебаний. По времени возникновения импульса можно различить несколько популяций нейронов (быстро отвечающие нейроны и нейроны с разной степенью задержки). Наблюдаемые задержки сохраняются для каждой клетки в каждом из последующих четырех импульсов. Интересно, что популяция быстро отвечающих нейронов на рис. 6б соответствует популяции нейронов синхронно пульсирующих с малой амплитудой на рис. 6а. На рис. 6в приведен в таком же масштабе развернутый во времени участок записи пульсаций после добавления  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Видно, что увеличение частоты сопровождается синхронизацией пульсаций, причем во многих клетках  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  не успевает возвращаться к исходному уровню за время между импульсами. Самые медленно понижающие  $\text{Ca}^{2+}$  клетки опять же входят в популяцию быстро отвечающих нейронов.

Из приведенного эксперимента следует, что ССП квазисинхронны при малой частоте и строго синхронны при высокой частоте ССП. Рассинхронизация обусловлена не только наличием быстро отвечающих легковозбудимых клеток, реакция которых предшествует реакции всех остальных нейронов, но и наличием механизма задержек генерации  $\text{Ca}^{2+}$ -импульса, которое может быть обусловлено присутствием  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков.

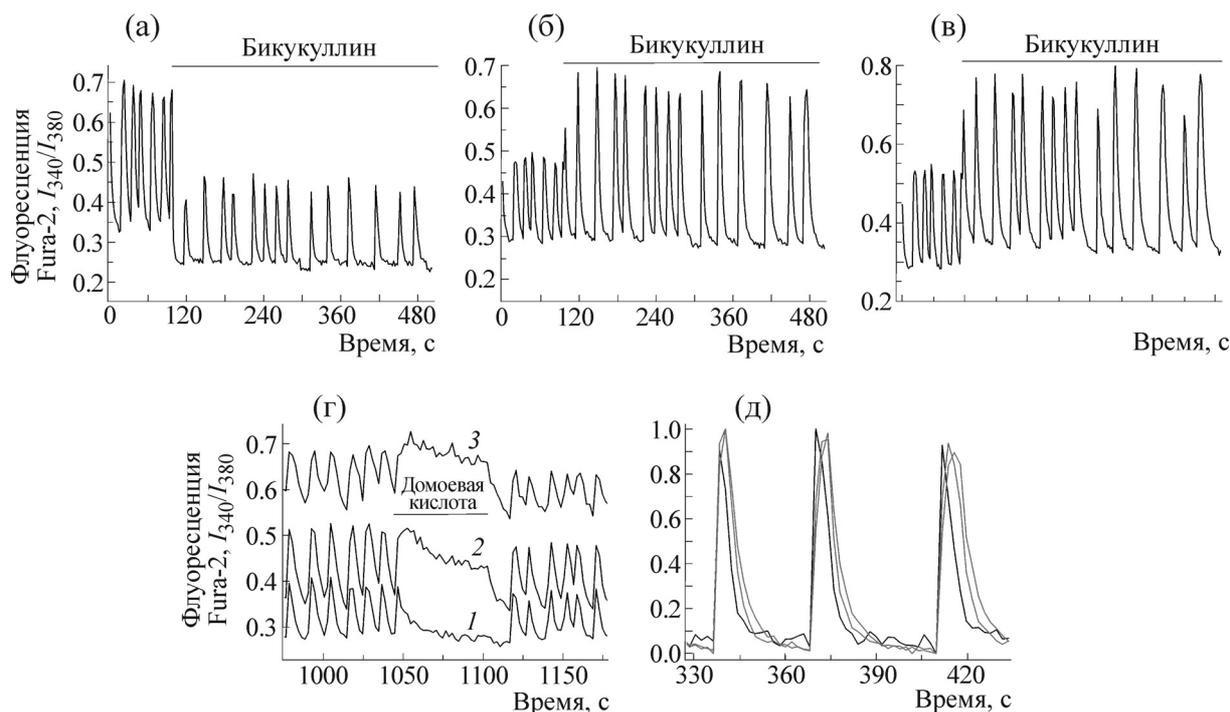
По-видимому, при высокой частоте колебаний, сопровождаемой некоторым ростом базального уровня  $\text{Ca}^{2+}$ , происходит заполнение внутриклеточного буфера  $\text{Ca}^{2+}$  и клетки начинают пульсировать, как и клетки без буфера. Таким образом, наличие  $\text{Ca}^{2+}$ -буферов может обеспечить пониженную возбудимость нейронов и может выводить эти популяции нейронов из-под регулирующего влияния коротких одиночных  $\text{Ca}^{2+}$ -импульсов и импульсов малой частоты и амплитуды.

**Инверсия градиента  $\text{Cl}^-$  в популяции PV+ ГАМК-ергических нейронов при высокой частоте пульсаций.** Известно, что при повышенной активности в нейронах может инвертироваться градиент ионов  $\text{Cl}^-$  [31,32]. В этих условиях тормозной нейротрансмиттер ГАМК превращается в возбуждающий для этих клеток. На рис. 5 и 6 показано, что при высокой частоте пульсаций в сети происходит повышение базального уровня  $\text{Ca}^{2+}$ , что может привести к заполнению  $\text{Ca}^{2+}$ -буферов и повышению энергетических затрат на поддержание физиологических значений



**Рис. 6.** (а) – ССП  $\text{Ca}^{2+}$  в нейронах на 14-е сутки культивирования. На 400-й секунде добавлен  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (8 мМ). (б) – Первый импульс в ССП. Показано, что клетки квазисинхронны. (в) – После добавления  $\text{NH}_4\text{Cl}$  наблюдается увеличение частоты и синхронизация пульсаций  $\text{Ca}^{2+}$ .

концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле. Таким образом, создаются условия, в которых в клетках может инвертироваться градиент ионов  $\text{Cl}^-$  на плазматической мембране. Для выявления нейронов



**Рис. 7.** Изменение режима колебаний  $[Ca^{2+}]_i$  в различных популяциях нейронов спонтанно синхронно-активной сети при действии ингибитора ГАМКА-рецепторов бикукуллина (1 мкМ). В первой популяции бикукуллин оказывает тормозное действие – уменьшает амплитуду пульсаций и базовый уровень  $Ca^{2+}$  (а), в основной (б) и во второй минорной (в) популяциях нейронов бикукуллин оказывает возбуждающее действие, увеличивая амплитуду пульсаций. (Приведен усредненный ответ пяти клеток из каждой популяции). (г) – Реакция нейронов тех же популяций на агонист каинатных рецепторов домоевую кислоту (100 нМ). В первой популяции нейронов регистрируется быстрозатухающий импульс. (д) – ССП  $Ca^{2+}$  в нейронах трех популяций. Импульсы нормализованы по амплитуде. В присутствии бикукуллина у клеток первой популяции наблюдается более быстрая десенситизация сигнала.

с инвертированным градиентом ионов  $Cl^-$  мы использовали ингибитор ГАМКА-рецепторов бикукуллин. По реакции на ингибитор нейроны разделились на три группы (рис. 7а–в), из которых две минорные по 5% (по-видимому, ГАМК-ергические нейроны). В данном случае в культуре нейронов (13 суток *in vitro*) исходно наблюдалась довольно высокая частота ССП. Видно, что отдельные клетки пульсируют с различной амплитудой и имеют различный базальный уровень  $Ca^{2+}$ . При такой частоте пульсаций в первой популяции нейронов  $Ca^{2+}$  не успевает откачиваться из цитозоля за время между импульсами, что приводит к повышению базального уровня  $[Ca^{2+}]_i$  (рис. 7а). Эти клетки также исходно отличались заметно большей амплитудой  $Ca^{2+}$ -импульсов (0,7).

Бикукуллин, добавленный в максимуме шестого  $Ca^{2+}$ -импульса, вызывает уменьшение амплитуды пульсаций с 0,35 до 0,15 в первой популяции нейронов (что означает снятие деполяризующего действия ГАМК). Базальный уровень  $Ca^{2+}$  в этой популяции уменьшается до уровня  $Ca^{2+}$  в покоящихся клетках (с 0,4

до 0,25), что тоже указывает на уменьшение возбуждения. Во всех остальных нейронах бикукуллин вызывает увеличение амплитуды сигнала (что объясняется снятием гиперполяризующего действия ГАМК). Добавление домоевой кислоты вызывает импульсный ответ только в первой популяции клеток и подъем  $Ca^{2+}$  со слабым затуханием в остальных нейронах (рис. 7г). Сопоставление формы  $Ca^{2+}$ -импульсов разных популяций нейронов в ССП показало, что  $Ca^{2+}$ -сигнал, генерируемый клетками первой популяции, опережает сигнал других клеток по положению максимума и более быстро затухает (рис. 7д), что, как показано выше, может быть обусловлено присутствием буферных концентраций парвальбумина.

Таким образом, при высокой частоте ССП в культуре клеток гиппокампа обнаруживается популяция нейронов, в которой ингибирование ГАМКА рецептора вызывает гиперполяризацию и торможение активности нейронов, что может быть только в случае инвертирования градиента  $Cl^-$  в этих клетках. По-видимому, высокая частота колебаний вызывает заполне-

ние  $\text{Ca}^{2+}$ -буферов клетки, включая и митохондриальный, что приводит к падению АТР и к инвертированию градиента  $\text{Cl}^-$  [7]. Эндогенная ГАМК в этом случае вместо торможения оказывает дополнительное возбуждающее действие на эти нейроны, что видно по повышению базального уровня  $\text{Ca}^{2+}$  и увеличенной амплитуде пульсаций. Нейроны этой популяции являются ГАМК-ергическими, поскольку их торможение биккуллином сопровождается активацией всех остальных нейронов в сети. Полученные данные предполагают, что эта популяция ГАМК-ергических нейронов выполняет функцию экстренного торможения гиперактивности других подконтрольных ГАМК-ергических и пирамидальных нейронов при высокой частоте ССП, используя для своей гиперактивации инвертирование  $\text{Cl}^-$ -градиента.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее было показано, что все нейроны в культуре отличаются по амплитуде и форме  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа на агонисты глутаматных рецепторов и по таким параметрам  $\text{Ca}^{2+}$ -ответа, как скорость ответа, крутизна переднего и заднего фронта, могут быть сгруппированы в отдельные популяции [33]. В настоящей работе продемонстрировано, что нейроны, содержащие  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки в буферных концентрациях, могут быть идентифицированы по форме  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала в ответ на деполяризацию или активацию ионотропных глутаматных рецепторов. Обнаруженное явление может быть положено в основу метода визуализации подтипов ГАМК-ергических нейронов, содержащих  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки. Визуализация отдельных подтипов ГАМК-ергических нейронов позволит исследовать их индивидуальные особенности с целью поиска селективной фармакологии, направленной на управление их активностью или повышение жизнеспособности.

На рис. 5 показано, что некоторые нейроны могут не принимать участия в ССП при малой частоте. По-видимому, это относится ко всем нейронам, содержащим различные  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки, но в большей степени к быстросвязывающим  $\text{Ca}^{2+}$ -белкам типа кальбиндина и кальретицина. В этом случае  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки выполняют роль селективного фильтра  $\text{Ca}^{2+}$ -импульсов, демпфируя низкоамплитудные кратковременные импульсы повышения  $\text{Ca}^{2+}$  в популяции нейронов этого подтипа.  $\text{Ca}^{2+}$ -буфер также может защищать нейроны от влияния одиночных или низкочастотных сетевых импульсов (с частотой порядка 0,03 Гц).

При исследовании влияния  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков на синхронизацию ССП показано, что наблюдаемая рассинхронизация импульсов  $\text{Ca}^{2+}$  в ССП при низких частотах пульсаций исчезает при высоких частотах. По-видимому, при повышении частоты пульсаций, когда  $\text{Ca}^{2+}$  не успевает откачиваться из цитозоля полностью за период между импульсами, происходит повышение базального уровня  $\text{Ca}^{2+}$ , что создает условия для заполнения  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера, приводит к исчезновению задержек в генерации  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала и ускорению переднего фронта (в разы). В этих условиях нейроны, содержащие  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающие белки, начинают пульсировать синхронно с остальными нейронами в сети. Проблема синхронизации кальциевой импульсной активности в нейрональной сети многогранна. Известно, что синхронность возрастает при ингибировании активности ГАМКА-рецепторов [27]. В настоящей работе показано, что синхронность  $\text{Ca}^{2+}$ -импульсов зависит от возбудимости нейронов и наличия  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков. При этом синхронность  $\text{Ca}^{2+}$ -импульса зависит не только от прямого влияния  $\text{Ca}^{2+}$ -буфера на кинетику  $\text{Ca}^{2+}$ -импульса, но и от влияния  $\text{Ca}^{2+}$ -связывающих белков на активность каналов, формирующих потенциалы действия. По крайней мере, для парвальбумина и кальбендина известно, что они являются активаторами кальций-зависимых калиевых каналов SK- и BK-типа соответственно [15].

Обнаружено, что в семействе синхронно-пульсирующих нейронов существует популяция более легковозбудимых нейронов. Начало генерации  $\text{Ca}^{2+}$ -импульса в этих нейронах опережает возбуждение нейронов других популяций на одну-две секунды. Нейроны этой популяции также отличались более медленным понижением  $\text{Ca}^{2+}$  в период между импульсами, что может быть следствием недостаточности (по разным причинам)  $\text{Ca}^{2+}$ -откачивающей системы. Клетки данной группы обладают свойством синхронно пульсировать с меньшей амплитудой деполяризующего и  $\text{Ca}^{2+}$ -импульсов, недостаточных для возбуждения  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала в остальных нейронах в сети. По-видимому, в сети генерируются высокочастотные низкоамплитудные импульсы деполяризации, которые генерируют  $\text{Ca}^{2+}$ -импульсы только в популяции легковозбудимых нейронов и недостаточны для возникновения  $\text{Ca}^{2+}$ -сигнала в остальных нейронах в сети. Таким образом, в сети существуют одновременно несколько разночастотных синхронных электрических колебаний, различающихся по амплитуде деполяризующего импульса, что, по-видимому, является механизмом селективного направления информации в отдельные нейроны

с использованием одной и той же сети. Только в нейронах этой популяции через 30–40 мин повышенной активности происходит глобальное повышение  $Ca^{2+}$ , и в дальнейшем наблюдается гибель этих клеток (не показано). Причиной гибели может быть ослабление биоэнергетических механизмов, на что указывает медленная скорость откачки  $Ca^{2+}$  из цитозоля в период между импульсами. Вторичной причиной селективной гибели этих клеток может быть инверсия градиента ионов  $Cl^-$ . В этом случае тормозной нейротрансмиттер ГАМК становится для этих клеток возбуждающим, что приводит к их гиперактивации и последующей гибели при увеличении частоты импульсной активности.

Обнаружено, что при повышении частоты ССП более 0,2 Гц в PV+ интернейронах наблюдается инвертирование  $Cl^-$  градиента, что приводит к дополнительной активации этих нейронов и, по-видимому, к усилению секреции ГАМК и развитию защитного торможения в нейронах-мишенях. Полученные данные предполагают, что PV+ популяция ГАМК-ергических нейронов выполняет функцию экстренного торможения гиперактивности других ГАМК-ергических и пирамидальных нейронов при высокой частоте ССП, используя для своей гиперактивации инвертирование градиента  $Cl^-$ .

### ВЫВОДЫ

1. Интернейроны, содержащие парвальбумин ( $Ca^{2+}$ -связывающий белок), могут быть идентифицированы по форме  $Ca^{2+}$ -сигнала/ответа/импульса, характеризующегося секундной задержкой, крутым передним фронтом и сильной десенситизацией.

2. Нейроны, содержащие  $Ca^{2+}$ -связывающие белки, могут не принимать участия в ССП малой частоты.

3. Наличие  $Ca^{2+}$ -связывающих белков является причиной рассинхронизации ССП в сети. Предполагается, что заполнение  $Ca^{2+}$ -буфера приводит к синхронизации ССП.

4. В семействе синхронно-пульсирующих сетевых нейронов присутствует популяция легко-возбудимых нейронов (по-видимому, однотипных, поскольку все нейроны этой популяции отличаются медленной скоростью понижения  $Ca^{2+}$  между импульсами), которые пульсируют с более высокой частотой под действием более слабой деполяризации.

5. При высокой частоте пульсаций, сопровождаемой увеличением метаболической нагрузки и повышением базального уровня  $Ca^{2+}$ , в минорной популяции ГАМК-ергических ней-

ронов инвертируется градиент  $Cl^-$ . При этом тормозной нейротрансмиттер ГАМК превращается в возбуждающий для этих интернейронов. Дополнительное возбуждение (деполяризация) приводит к развитию торможения в остальных подконтрольных нейронах в сети. По параметрам  $Ca^{2+}$ -сигналов данную популяцию нейронов можно отнести к PV+ ГАМК-ергическим нейронам. Усиливая секрецию ГАМК, эта популяция нейронов может выполнять функцию экстренного торможения гиперактивности других нейронов при высокой частоте ССП, используя для своей гиперактивации инвертирование  $Cl^-$ -градиента.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-14-00989) и стипендии Президента РФ СП-1057.2015.4 (для Е.А. Туровского).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. S. R. Cobb, E. H. Buhl, K. Halasy, et al. *Nature*. **378** (6552), 75 (1995).
2. Y. Aponte, J. Bischofberger, and P. Jonas, *J. Physiol.* **586** (8), 2061 (2008).
3. G. Maccaferri, J. D. Roberts, P. Szucs, et al., *J. Physiol.* **524** 91, (2000).
4. D. Orduz, P. Bishop, B. Schwaller, et al., *J. Physiol.* **591** (Pt 13), 3215 (2013).
5. R. Franconville, G. Revet, G. Astorga, et al., *Neurophysiol.* **106**, 1793 (2011).
6. C. Bernard, R. Cossart, J. C. Hirsch, et al., *Epilepsia* **41** (6), S90 (2000).
7. K. Baimbridge, M. Celio, and J. Rogers, *Trends Neurosci.* **15**, 303 (1992).
8. R. B. Kay and P. C. Brunjes, *Front. Cell Neurosci.* **8**, 111 (2014).
9. M. R. Celio, *Science* **231** 995. (1986).
10. E. Eggermann and P. Jonas, *Nat. Neurosci.* **15**, 20 (2012).
11. D. P. Bishop, D. Orduz, L. Lambot, et al., *Front. Mol. Neurosci.* **5**, 78 (2012).
12. G. Cheron, D. Gall, L. Servais, et al., *J. Neurosci.* **24** (2), 434 (2004).
13. M. Muler, F. Felmy, B. Schwaller, et al., *J. Neurosci.* **27**, 2261 (2007).
14. T. Collin, M. Chat, M. G. Lucas, et al., *Neurosci.* **25** (1), 96 (2005).
15. D. Gall, C. Roussel, T. Nieuws, et al., *Prog. Brain Res.* **148**, 321 (2005).
16. D. Gall, C. Roussel, I. Susa, et al., *J. Neurosci.* **23** (28), 9320 (2003).
17. B. Hirschberg, J. Maylie, J. P. Adelman, and N. V. Marrion, *J. Gen. Physiol.* **111**, 565 (1998).
18. X. M. Xia, B. Fakler, A. Rivard, et al., *Nature* **395**, 503 (1998).

19. B. Cauli, E. Audinat, B. Lambollez, et al., *J. Neurosci.* **17**, 3894 (1997).
20. Y. Kawaguchi and Y. Kubota, *Cereb. Cortex* **7**, 476 (1997).
21. F. Maingret, B. Coste, J. Hao, et al., *Neuron* **59** (3), 439 (2008).
22. T. P. Patela, K. Mana, B. L. Firestein, and D. F. Meaneva, *J. Neurosci. Meth.* **243** 26, (2015).
23. М. В. Туровская, Е. А. Туровский, А. В. Кононов и В. П. Зинченко, *Биол. мембраны* **30** (5–6), 479 (2013).
24. O. L. Barreto-Chang and R. E. Dolmetsch, *J. Vis. Exp.* **23**, 1067 (2009).
25. А. В. Кононов, Н. В. Баль и В. П. Зинченко, *Биологические мембраны* **28** (2), 127 (2011).
26. А. В. Кононов, С. В. Иванов и В. П. Зинченко, *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова* **99** (1), 63 (2013).
27. V. V. Dynnik, A. V. Kononov, A. V. Sergeev, et al., *Plos One* **10** (7), e0134145. doi: 10.1371/journal.pone.0134145 (2015).
28. C. Schwarz, S. Ferrea, K. Quasthoff, et al., *Exp. Neur.* **235**, 368 (2012).
29. H. Schmidt, G. Petkov, M. P. Richardson, and J. R. Terry, *PLoS Comput. Biol.* **10** (11), e1003947 (2014).
30. J. F. Hipp, A. K. Engel, and M. Siegel, *Neuron* **69**, 387 (2011).
31. A. Fukuda, K. Muramatsu, et al., *J. Neurophysiol.* **79** (1), 439 (1998).
32. K. Ganguly, A. F. Schinder, et al., *Cell* **105** (4), 521 (2001).
33. А. В. Кононов, Н. В. Баль и В. П. Зинченко, *Биол. мембраны* **29** (1), 133 (2012).

## A Role of Parvalbumin-Containing Interneurons in Regulation of Spontaneous Synchronous Activity of the Brain Neurons in Culture

V.P. Zinchenko, M.V. Turovskaya, I.Yu. Teplov, A.V. Berezhnov, and E.A. Turovsky

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

Subtypes of GABAergic neurons containing  $Ca^{2+}$ -binding proteins play a pivotal role in the regulation of spontaneous synchronous  $[Ca^{2+}]_i$  transients in a neuronal network. In this study it is shown that: (i) the interneurons containing  $Ca^{2+}$ -binding proteins in buffer concentration can be identified by the shape of  $Ca^{2+}$ -signal in response to depolarization or activation of the ionotropic glutamate receptors; (ii)  $Ca^{2+}$ -binding proteins participate in desynchronization of spontaneous  $Ca^{2+}$  transients. At low frequencies of spontaneous synchronous  $[Ca^{2+}]_i$  transients (less than 0.2 Hz) neurons pulse quasi-synchronously. At higher frequencies synchronization of spontaneous synchronous  $[Ca^{2+}]_i$  transients occurs in all neurons; (iii) it is revealed that several synchronous oscillations with different frequencies coexist in a network and the amplitude of their depolarizing impulse also varies. This phenomenon, apparently, is the mechanism to selectively direct information in separate neurons using the same network; (iiii) in minor populations of interneurons at high frequencies of spontaneous synchronous  $[Ca^{2+}]_i$  transients the inversion of  $Cl^-$ -concentration gradient is observed. In this case the inhibition of GABA receptors suppresses the activity of neurons in this population and excites other neurons in a network. Thus, the GABAergic neurons containing  $Ca^{2+}$ -binding proteins show different mechanisms to regulate the synchronous neuronal activity in cultured rat hippocampal cells.

*Key words: interneurons,  $Ca^{2+}$ -binding proteins, parvalbumin, synchronous activity of neurons,  $Ca^{2+}$ -concentration*