

РЕГУЛЯЦИЯ ЧАСТОТЫ И АМПЛИТУДЫ ПОТЕНЦИАЛОВ ДЕЙСТВИЯ Ca^{2+} -КАНАЛАМИ Т-ТИПА В НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА.

Теплов И.Ю.¹, Долгачева Л.П.¹, Тулеуханов С.Т.², Зинченко В.П.¹

¹ ФГБУН Институт биофизики клетки Российской академии наук

ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290, РФ; e-mail: vprz@mail.ru

² Казахский национальный университет имени аль-Фараби

г. Алматы, Казахстан

Поступила в редакцию: 18.07.2018.

Аннотация. В настоящей работе исследованы закономерности изменения частоты и амплитуды потенциалов действия (ПД) на фоне деполяризации, вызванной активностью Ca^{2+} -каналов во время спонтанной синхронной активности (ССА) нейронов гиппокампа в культуре. Используя систему анализа изображения для измерения $[Ca^{2+}]_i$ и метод пэтч-кламп для регистрации мембранного потенциала мы показали, что при снятии торможения ингибитором ГАМК(А) рецепторов, в нейрональной сети возникает режим ССА, при котором тонические высокочастотные (2 - 3 Гц) ПД, генерируемые нейроном без изменения концентрации цитоплазматического Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$), сменяются пачечной активностью, которая сопровождается импульсом медленной деполяризации (МД) и генерацией кальциевых импульсов. Ингибитор Т-типа кальциевых каналов ML218 подавляет этот процесс. Частота и амплитуда ПД в пачке регулируется импульсами МД следующим образом: на переднем фронте деполяризации частота ПД увеличивается, а амплитуда падает за счет инактивации Na^+ -каналов. Чем выше скорость нарастания деполяризации, тем выше частота генерации ПД. Если амплитуда МД превышает потенциал реактивации Na^+ -каналов, импульсная активность нейронов прекращается. По мере повышения $[Ca^{2+}]_i$ и активации Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов, амплитуда деполяризации медленно уменьшается, а Na^+ -каналы реактивируются, что приводит к постепенному росту амплитуды ПД на фоне уменьшения деполяризации. Терминация пачки ПД происходит за счет роста $[Ca^{2+}]_i$ и активации Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов, закрытия потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов и их инактивации. В результате, мембрана еще больше гиперполяризуется, что приводит к подавлению генерации ПД, открытию активируемых гиперполяризацией 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 ПД, а затем открываются Ca^{2+} -каналы и вновь генерируется кальциевый потенциал и Ca^{2+} сигнал. Таким образом, кальциевые каналы, определяющие импульс МД, управляют частотой и амплитудой ПД во время ССА, регулируя условия активации и инактивации Na^+ -каналов.

Ключевые слова: ССА – 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.

ВВЕДЕНИЕ

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. Ранее было показано, что различные типы нейронов во время ССА генерируют различные по форме Ca^{2+} импульсы [3]. Различия в форме кальциевых сигналов подразумевают различия в импульсе МД. В настоящее время не ясно, насколько эти различия определяют форму пачечной активности, и каковы механизмы влияния импульсов МД 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.

Т-тип Ca^{2+} -каналов играет важную роль в генезисе пачечной активности. Длительной истории открытия и изучения Т-типа Ca^{2+} -каналов посвящено множество публикаций [см. обзор 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^+ -каналов [10]. Низкопороговые каналы активируются при слабой деполяризации (при потенциалах, более положительных, чем -70 мВ), затем быстро и потенциал-зависимо инактивируются [8, 11] с $t \approx 20$ -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 потенциалах на мембране свыше 10 мВ, характеризуются более высокой проводимостью (25 пСм) и очень медленной кинетикой инактивации ($t \approx 500$ -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 Т-типа Ca^{2+} -каналов необходима гиперполяризация до -70 – -85 мВ [15]. Эта гиперполяризация 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 CAMKII [20], PKC и PKA [21]. Эндоканабиноиды [22, 23] и арахидоновая кислота ингибируют 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 $\text{Gaq}/11$ также селективно ингибирует $\text{Ca}_v3.3$ [28].

Т-каналы участвуют в регуляции ритмов при эпилепсии [29], боли [30], болезни Паркинсона [31], и ишемии [5]. Блокаторы каналов применяются при лечении этих заболеваний [31]. Нейропротекторное действие ингибиторов 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 ССА пачек ПД и Ca^{2+} -импульсов (Bursting). Нарушение ССА наблюдается при многих нервных расстройствах и нейродегенеративных заболеваниях [33]. Основной причиной нарушений является деполяризация (поскольку многие каналы, определяющие возбудимость, потенциал-зависимы). Если окологороговая 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 кальциевого импульса в данном случае определяется электрофизиологическими свойствами субъединиц $\text{Ca}_v1.3$ L-типа Ca^{2+} -каналов. Однако общей теории генеза пачек ПД и механизмов управления ритмами пока нет. В настоящей работе исследована зависимость частоты и амплитуды ПД от МД, создаваемой Ca^{2+} -каналами, и от $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в клетке. Кроме того, показаны способы кодирования информации, передаваемой ПД, импульсами МД.

МЕТОДЫ

Измерение мембранного потенциала. Для анализа изменений мембранного потенциала и активности ионных каналов в работе применяется электрофизиологический метод (пэтч-кламп) в конфигурации whole cell. При этом система электрофизиологических измерений (Molecular Devices) встроена во флуоресцентную станцию Axio Imager Z1 (Carl Zeiss, Germany), оснащенную высокоскоростной камерой Hamamatsu ORCA-Flas, что позволило исследовать одновременно с оптическими характеристиками и электрофизиологические характеристики живых клеток. Для регистрации токов использовался усилитель Axopatch 200B (Molecular Devices), АЦП Digidata 1440A и программное обеспечение pClamp10.2 (Molecular Devices). Изменения потенциала мембраны регистрировали в режиме фиксации тока. Данные электрофизиологии анализировались с помощью программы Clampfit 10.2.

Измерения уровня цитозольного кальция. Уровень $[\text{Ca}^{2+}]_i$ оценивали с помощью двухволнового зонда Fura-2 (Invitrogen, USA), 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): 156 NaCl, 3 KCl, 1 MgSO₄, 1.25 KH₂PO₄, 2 CaCl₂, 10 глюкозы и 10 HEPES, pH 7.4. На каждое стекло с культурой клеток добавляли 200 мкл свежеприготовленного раствора красителя и инкубировали в термостате 40 мин при 37 °С.

После этого культуру промывали раствором Хенкса с добавлением 0.2 мМ L-аргинина и инкубировали 10-15 мин для завершения деэстерификации красителя.

Для регистрации $[Ca^{2+}]_i$ 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). 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 помощью системы, обеспечивающей перфузию со скоростью 15 мл/мин. Серии изображений получали с интервалом в 0,5-1 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 KCl.

Полученные двухканальные (при возбуждении Fura-2 в 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 340 и 380 нм. Для построения графиков и статистической обработки использовали Origin 9.1. Результаты представлены в виде среднего сигнала N клеток в поле зрения \pm стандартное отклонение ($N \pm SD$), или в виде типичного Ca^{2+} ответа большинства клеток, или в виде ответа индивидуального нейрона. Данные сравнивались статистически с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA, и теста значимых различий Student-Newman-Keuls, или использовали парный критерий Стьюдента, считая достоверными различия при $p \leq 0.05$. Все данные получены, как минимум, из 3 различных покровных стекол и 2-3 независимых выделений клеток.

Материалы. N-метил-D-аспартат (NMDA), бикикуллин, домоевая кислота, L-аргинин были приобретены у компании Tocris Bioscience (Великобритания); сбалансированный солевой раствор Хенкса, Нейробазальная среда, суплемент В-27, фетальная бычья сыворотка производства Gibco, гентамицин – Дальхимфарм (Россия); 0.1 % полиэтиленимин; L-глутамин, L-глутамат, (Sigma-Aldrich, США); KCl (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).

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 ГАМК(A) рецепторов, бикикуллином. При этом мы отмечали закономерные изменения частоты и амплитуды ПД при генерации импульса МД.

На рисунке 1 показано, что после добавления ингибитора ГАМК(A) рецепторов, бикикуллина, деполяризующего нейроны за счет закрытия Cl^- -каналов, возникает режим *спонтанной синхронной активности* (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, не достаточно для реактивации Ca^{2+} -каналов. Последовательность тонических ПД прерывается периодически пачками ПД, во время которых нейрон генерирует медленный импульс деполяризации и соответствующий Ca^{2+} -импульс. Частота колебаний $[Ca^{2+}]_i \approx 0.01$ Гц. Генерация пачки ПД на рисунках 1А, Б, Г начинается, с открытия низкопороговых ПЗКК, которое происходит за счет их реактивации на фоне импульса МД [42]. Механизм активации этих каналов до конца не ясен.

Изменение амплитуды и частоты ПД на фоне импульса МД. Влияние концентрации кальция. На рисунках 1В-Д приведены фрагменты записи пачки ПД (из рис. 1Б), длительностью несколько сек (рис. 1В), отражающие изменения ПД на переднем (рис. 1Г) и заднем фронте пачки (рис. 1Д). На фоне переднего фронта импульса МД (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 МД частота ПД на этом участке сильно увеличивается, и стремиться к теоретически максимальной (150 Гц в данном случае, рис. 1Г); амплитуда каждого последующего ПД на фоне роста деполяризации уменьшается (рис. 1Г), что говорит о потенциал-зависимой инактивации Na^+ -канала; затем амплитуда МД достигает значения, при котором все Na^+ -каналы инактивированы и генерации ПД не происходит, поскольку для реактивации Na^+ -канала нужна определенная степень гиперполяризации [40]. Далее развиваются несколько процессов регуляции активности

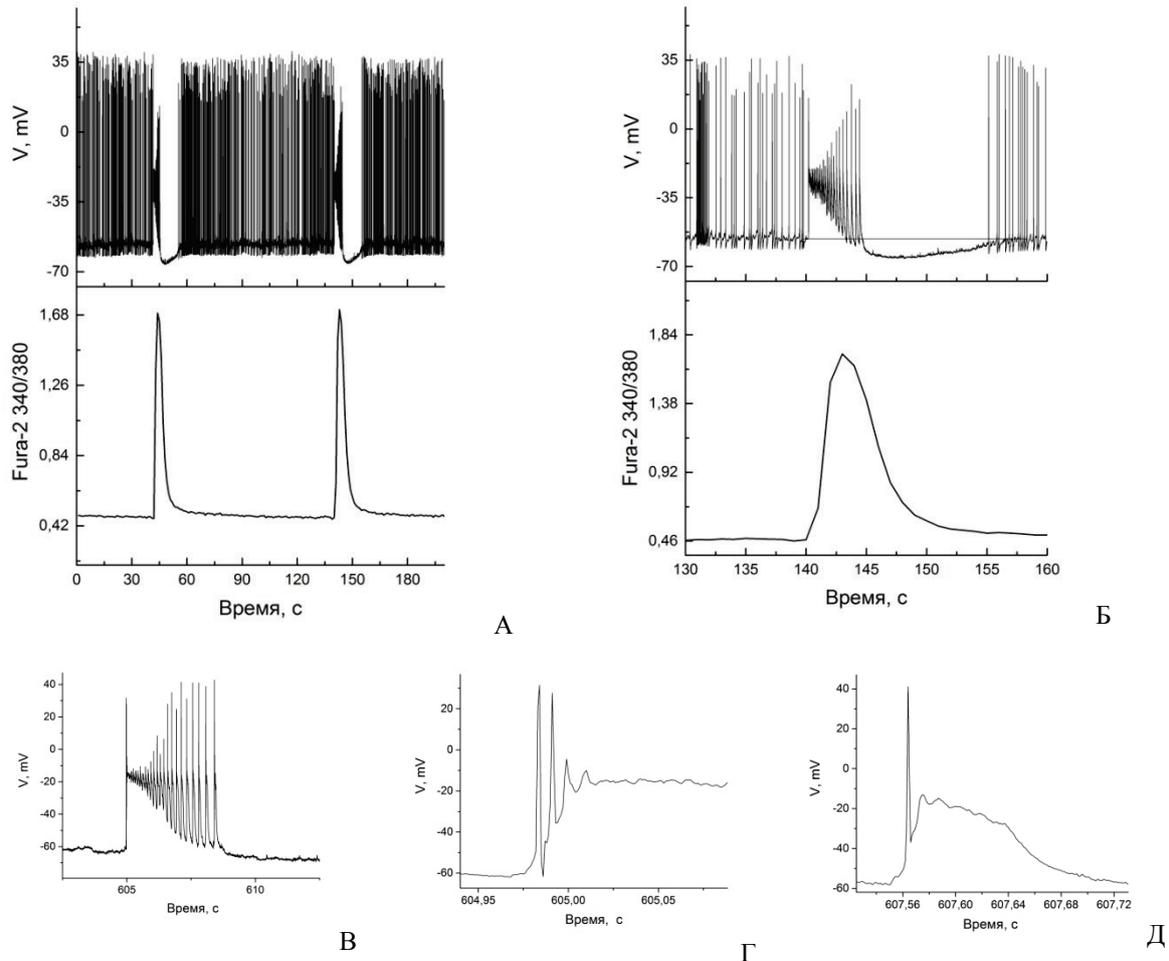


Рисунок 1. Спонтанная тоническая активность ПД при ССА периодически прерывается спонтанной пачечной активностью, сопровождаемой Ca^{2+} импульсом и импульсом МД. Изменение электрической активности (сверху) и $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (снизу) нейрона при ССА. Электрическая активность нейрона сопровождается генерацией Ca^{2+} -импульса только во время пачечной активности ПД. Генерация ПД исчезает в максимуме деполаризации и постепенно восстанавливается при реполяризации (Б). Пачка ПД заканчивается медленной сильной гиперполяризацией (на ~ 10 мВ ниже критического потенциала возбуждения), во время которой импульсная активность нейрона прекращается (Б). Затем следует фаза МД, и при достижении критического потенциала возбуждения снова начинается генерация ПД. В среде присутствует биккуллин (10 мкМ). Культура гиппокампа на 15 DIV (days *in vitro*).

(В) Пачка ПД из рис. 1Б во время Ca^{2+} -импульса. Медленное уменьшение деполаризации сопровождается ростом амплитуды ПД, что говорит о реактивации Na^+ -канала. Частота ПД на заднем фронте деполаризации непрерывно уменьшается от 10 до 3 Гц за счет уменьшения деполаризирующего входящего тока.

(Г)- Начало пачки ПД из рис. 1В. На переднем фронте МД генерируются затухающие по амплитуде (за счет инактивации Na^+ -каналов), высокочастотные ПД (частота ~ 140 Гц),

(Д) Микропачка, состоящая из одного ПД на заднем фронте импульса МД из рис. 1В. ПД генерируется на переднем фронте более быстрого импульса МД. Амплитуда деполаризации в микропачке постоянна и совпадает с амплитудой первоначальной деполаризации (на рис.1 В, Г). Длительность микропачки составляет ~ 10 мс.

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

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 рисунке 1Б показано, что потенциал

покоя в это время восстанавливается, и мембрана еще больше гиперполяризуется (на 10 мВ) за счет активности Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов, поскольку $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 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 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 МД остаются дискуссионными и будут обсуждаться ниже.

Таким образом, Ca^{2+} -каналы, определяющие импульс МД, формируют пачечную активность, которая сопровождается импульсами Ca^{2+} малой частоты. 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 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ и активации Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов, происходит постепенная реактивация Na^+ -каналов, генерация ПД возобновляется, частота ПД уменьшается, а амплитуда увеличивается (рис. 1Б). Увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ во время Ca^{2+} деполяризации терминирует пачку ПД, вызывая гиперполяризацию и прекращение генерации ПД. Таким образом, импульсы МД, 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. 2). Изменяя величину входящего тока можно получить ряд зависимостей параметров пачечной активности от амплитуды деполяризующего потенциала. На рисунке 2А 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 поддержании потенциала деполяризации на постоянном уровне, меньшем величины потенциала инактивации Na^+ -канала, амплитуда ПД в пачке не изменяется (рис. 2А), 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 медленной деполяризации, и ПД затухают вследствие инактивации Na^+ -каналов (рис. 2Б). 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 МД 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 МД при ССА. На рисунке 3 показано, что манипуляции с активностью потенциал-регулирующих каналов (ГАМК(А) и AMPA рецепторов) изменяют частоту и амплитуду ПД в пачке. На рисунке 3А приведены начальные фрагменты пачки ПД в контроле и в присутствии ингибитора ГАМК(А) рецепторов биккуллина. Ингибирование ГАМК(А) рецептора увеличивает амплитуду МД за счет уменьшения входящего Cl^- -тока. Увеличение амплитуды деполяризации в присутствии биккуллина выше потенциала инактивации Na^+ -канала приводит к временному затуханию ПД в пачке.

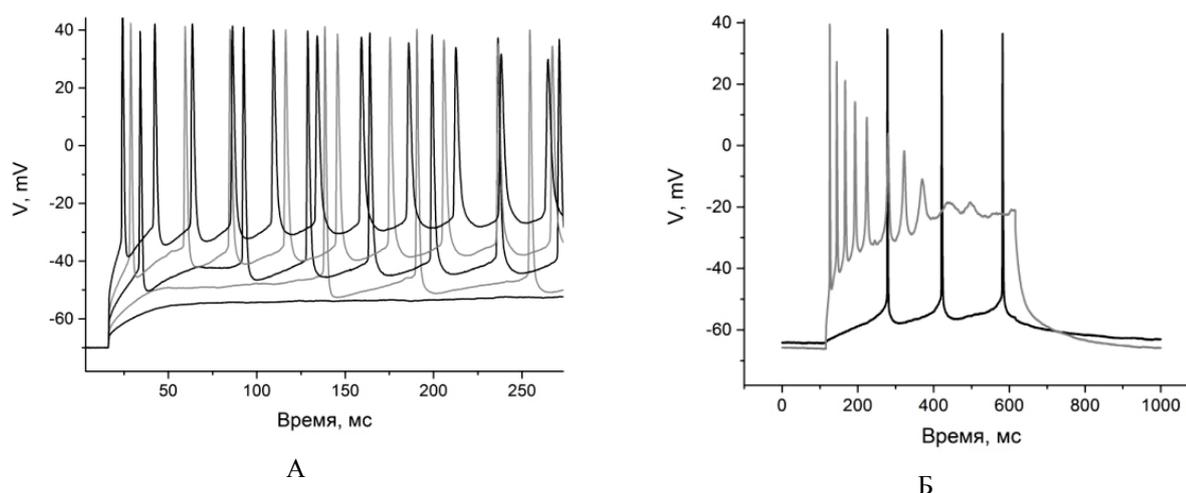


Рисунок 2. (А) Увеличение частоты вызванных ПД при увеличении амплитуды деполяризации за счет увеличения входящего тока. Приведены кривые через 40 pA. (Б) Кинетика деполяризации определяет частоту и амплитуду ПД. При малой деполяризации амплитуда ПД постоянная (черная кривая). При больших значениях деполяризации ПД затухают на переднем фронте деполяризации за счет инактивации Na^+ -каналов (серая кривая). Приведены кривые стимуляции током 50 и 450 pA

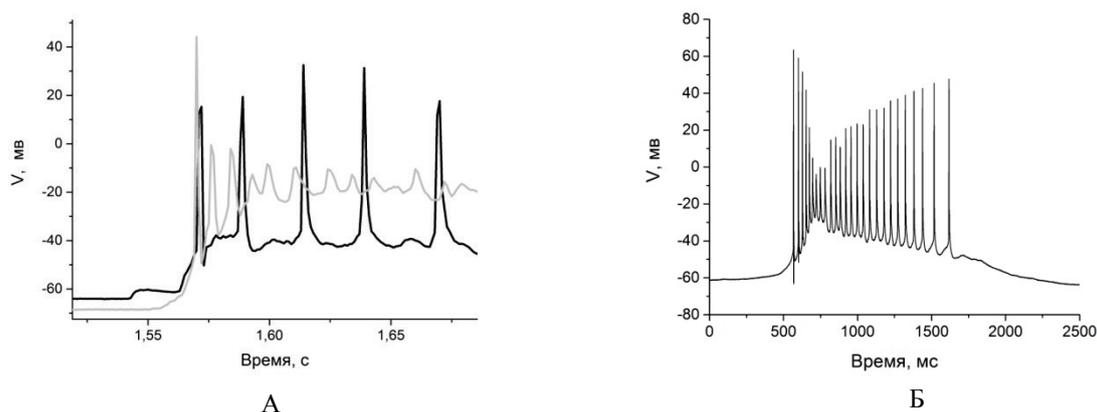


Рисунок 3. Изменение мембранного потенциала нейрона при ССА при действии ингибиторов ГАМК(А) и АМРА рецепторов. (А) - Начальный участок пачки ПД в контроле (черная кривая) и в присутствии 10 мкМ бикукуллина (серая кривая). Уменьшение активности гиперполяризующих Cl⁻-каналов увеличивает амплитуду МД (с -42 мВ до -18 мВ) выше потенциала инактивации Na⁺-канала, что приводит к затуханию амплитуды ПД на переднем фронте импульса. (Б) – Ингибирование активности АМРА-каналов в присутствии 500 нМ NBQX уменьшает амплитуду МД до -25 мВ. При этом Na⁺-каналы инактивируются не полностью. Средние частоты генерации ПД на переднем и заднем фронте импульса деполаризации изменяются в соответствии с уменьшением скоростей изменения деполаризации (сравни с рис. 1В).

На рисунке 3Б показано, что ингибитор АМРА рецепторов, NBQX, в небольших концентрациях уменьшает амплитуду деполаризации ниже потенциала инактивации Na⁺-канала. При этом полной инактивации Na⁺-канала в максимуме МД не происходит и при замедлении переднего и заднего фронта деполаризации наблюдается увеличение числа ПД в пачке, уменьшение средних частот и увеличение длительности пачки ПД. Таким образом, при изменении параметров импульса МД непрерывно меняется частота и амплитуда ПД.

Иггибитор Т-типа Ca²⁺-каналов уменьшает длительность Ca²⁺ импульса при ССА. Поскольку блокаторы Т-типа Ca²⁺-каналов вызывают гиперполяризацию и снижение концентрации Ca²⁺ в клетке, то они прогнозируемо должны обладать нейропротекторным действием при гипервозбуждении, 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 [44]. Как правило, эти нейроны характеризуются более интенсивным и длительным кальциевым сигналом из-за отсутствия десенситизации канала, отсутствия кальций-связывающих белков в буферных концентрациях и отсутствия ГАМК-зависимого торможения [45, 46]. Вследствие этого, уменьшение длительности Ca²⁺ сигнала (длительности пачки ПД), может быть эффективным механизмом уменьшения токсического действия Ca²⁺, особенно при высоких частотах ССА.

На рисунке 4 показано, что блокатор Т-каналов ML218 в концентрации 500 нМ постепенно снижает амплитуду деполаризации 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. Аппликация ML218 в концентрации 1 мкМ вызывает постепенное снижение амплитуды МД, которое сопровождается вначале уменьшением длительности пачки до 1 ПД за счет ускорения реполяризации. Затем амплитуда МД падает до значений ниже потенциала возбуждения и генерация ПД прекращается. Но медленные колебания импульсов деполаризации без генерации ПД продолжают еще некоторое время. Таким образом, Т-тип Ca²⁺-каналов принимает участие в инициации колебаний пачечной активности при ССА, периодически деполаризуя нейроны. Ca²⁺-каналы Т-типа модулируют частоту и амплитуду ПД. Увеличение деполаризирующего тока увеличивает частоту ПД, а деполаризация инактивирует Na⁺-каналы и уменьшает амплитуду ПД. Ингибиторы активности Ca²⁺-каналов Т-типа уменьшают длительность импульса Ca²⁺, что может объяснить их нейропротекторный эффект при ишемии и гипервозбуждении [5]. Вопрос о механизмах 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

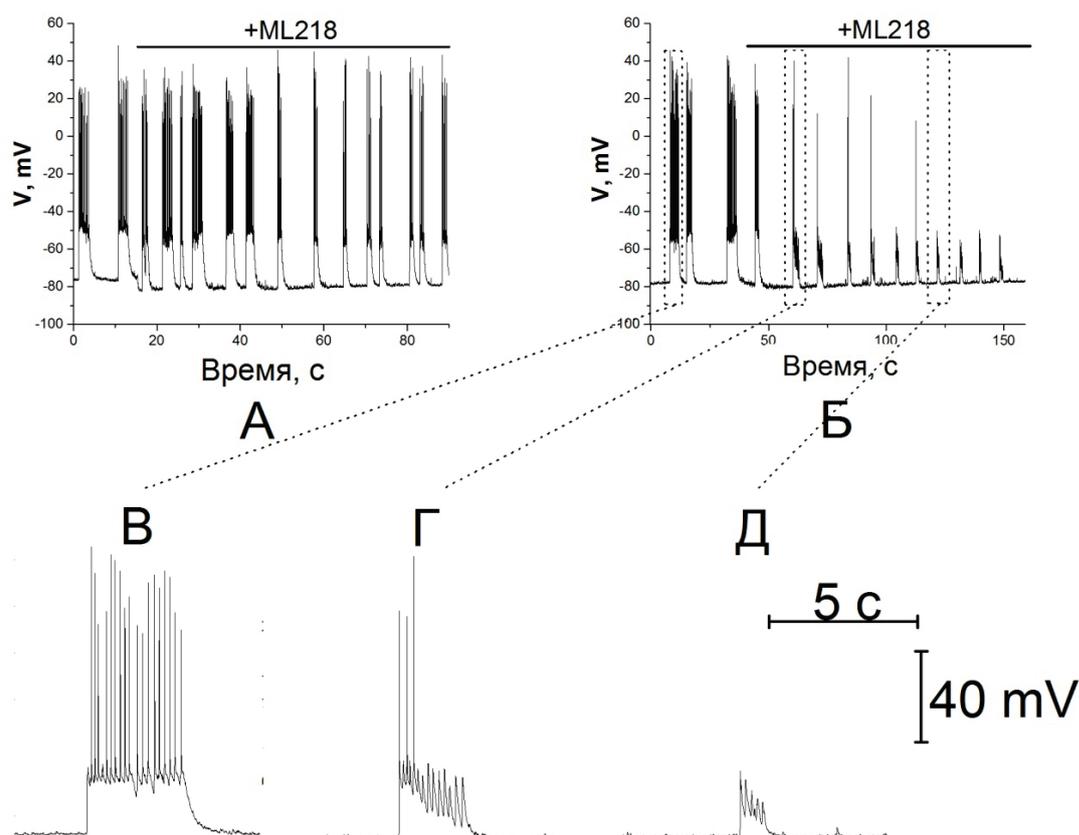


Рисунок 4. (А) – Изменения потенциала нейрона при ССА. Культура гиппокампа на 16 DIV. Блокатор Т-каналов ML218 в концентрации 500 нМ снижает амплитуду деполяризации нейронов и уменьшает длительность пачки ПД (рис. 4А). (Б) – Блокатор Т-каналов ML218 в концентрации 1 мкМ уменьшает длительность пачки, подавляет генерацию ПД, гиперполяризует клетку, уменьшает амплитуду МД. (В), (Г), (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, Г, Д, во время ССА до, и после действия ML218

активность является очень общим явлением и наблюдается во многих условиях и во многих нейронных системах [47]. 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 [48]. 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 ГАМК(A), NMDA and AMPA-каналы регулируют степень деполяризации нейрона. Синхронные изменения мембранного потенциала и концентрации Ca^{2+} в больших популяциях нейронов, происходящие при периодическом изменении активности Ca^{2+} -каналов Т-типа активируют синаптическую передачу и экспрессию генов, необходимых для развития нейронной сети без каких-либо гормонов и других внешних стимулов.

Для генерации ССА мы использовали сдвиг деполяризации, возникающий после уменьшения торможения в нейронной сети ингибитором ГАМК(A)-рецепторов бикуккулином [49]. Снятие торможения нейронов бикуккулином индуцировало режим спонтанной активности нейронов, при котором тонические высокочастотные ПД, генерируемые нейроном без изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$, прерываются генерацией пачки ПД, сопровождаемой импульсом МД и импульсом повышения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нейронах. Изменения параметров ПД обусловлены тем, что активация Ca^{2+} -каналов происходит достаточно медленно, обеспечивая, с одной стороны, генерацию нескольких ПД на переднем фронте деполяризации, и 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 МД определяет не только частоту генерации ПД, но и амплитуду ПД

за счет потенциал-зависимой инактивации Na^+ -каналов. Как показано на рисунках 1 и 3, 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 в отдельных нейронах, 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 за счет инактивации Na^+ -каналов. 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 [50, 51]. Кодирование ПД по частоте и амплитуде импульсами ПД 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+} сигнализации в нейронах процесс начала генерации длительных пачек ПД во время ССА остается под вопросом и детали механизмы реактивации Ca^{2+} -канала во многом не ясны.

Нейропротекторные свойства Ca^{2+} -каналов Т-типа. Как показано на рисунке 4, Т-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(А)-рецепторов, активностью кальциевых каналов Т-типа. В ряде работ показано, что длительность Ca^{2+} импульса является критическим параметром при высоких частотах ССА [53] и при пейсмекерной активности нейронов [36]. Нейроны, гибнущие в первую очередь при гипервозбуждении, также характеризуются более длительным импульсом Ca^{2+} , быстрым подъемом Ca^{2+} концентрации во время импульса, отсутствием десенситизации, медленной откачкой Ca^{2+} из цитозоля и отсутствием Ca^{2+} -связывающих белков в буферных концентрациях [52, 53]. На рисунке 3 показано, что нейропротекторный эффект ингибиторов кальциевых каналов Т-типа 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 КА- и АМРА- рецепторы, реагирующие на глутамат импульсом Ca^{2+} без десенситизации [53].

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 РК по гранту AP05133528.

Список литературы / References:

1. Lu S.M., Guido W., Sherman S.M. *Journal of Neuroscience*, 1992, vol. 68 (6), pp. 2185-98.
2. Anava S., Greenbaum A., Ben Jacob E., Hanein Y., Ayali A. *Biophys. J.*, 2009, vol. 96 (4), pp. 1661-1670.
3. Kononov A.V., Ball N.V., Zinchenko V.P. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2011, vol. 5 (2), pp. 162-170.
4. McCormick D.A., Contreras D. *On Annu. Rev. Physiol.*, 2001, vol. 63, pp. 815-46.
5. Nikonenko I., Bancila M., Bloc A., Muller D., Bijlenga P. *Mol Pharmacol.*, 2005, vol. 68 (1), pp. 84-9.
6. Kopecky B.J., Liang R., Bao J. *Pflugers Arch.*, 2014, vol. 466 (4), pp. 757-765.
7. Nilius B., Tala K., Verkhratsky A. *Cell Calcium.*, 2006, vol. 40 (2), pp. 81-88.
8. Kim D., Song I., Keum S., Lee T., Jeong M-J, Kim S-S, et al. *Neuron.*, 2001, vol. 31 (1), pp. 35-45.
9. Song I., Kim D., Choi S., Sun M., Kim Y., Shin H.S. *J. Neurosci.*, 2004, vol. 24 (22), pp. 5249-5257.
10. Huc S., Monteil A., Bidaud I., Barbara G., Chemin J., Lory P. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 2009, vol. 1793 (6), pp. 947-952.
11. Perez-Reyes [et al.] *Cell. Mol. Life Sci.*, 1999, vol. 56 (7-8), pp. 660-9.
12. Chevalier M., Lory P., Mironneau C., Macrez N., Quignard J.F. *Eur. J. Neurosci.*, 2006, vol. 23 (9), pp. 2321-9.
13. Proft J., Weiss N.G. *Molecular Pharmacology*, June 2015, vol. 87 (6), pp. 890-906.
14. Perez-Reyes E. *Mol. Pharmacol.*, 2010, vol. 77 (2), pp. 136-8.
15. Sánchez-Alonso J.L., Halliwell J.V., Colino A. *Neurosci. Lett.*, 2008, vol. 439 (3), pp. 275-80.
16. Iyer R., Ungless M.A., Faisa A.A. *Sci. Rep.*, 2017, vol. 7 (1), pp. 5248.
17. Rehak R., Bartoletti T.M., Engbers J.D.T., Berecki G., Turner R.W., Zamponi G.W. *Plos One*, 2013, vol. 8, e61844, DOI: 10.1371/journal.pone.0061844.
18. Wolfart J., Roeper J. *J. Neurosci.*, 2002, vol. 22 (9), pp. 3404-3413.

19. Xu J., Clancy C.E. *Plos One*, 2008, vol. 3 (4), p. e2056, DOI: 10.1371/journal.pone.0002056.
20. Wolfe J.T., Wang H., Perez-Reyes E., Barrett P.Q. *J. Physiol.*, 2002, vol. 538 (2), pp. 343-355.
21. Chemin J., Mezghrani A., Bidaud I., Dupasquier S., Marger F., Barrère C. [et al.] *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282 (45), pp. 32710-32718.
22. Chemin J., Monteil A., Perez-Reyes E., Nargeot J., Lory P. *EMBO J.*, 2001, vol. 20 (24), pp. 7033-7040.
23. Chemin J., Nargeot J., Lory P. *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282 (4), pp. 2314-2323.
24. Talavera K., Staes M., Janssens A., Droogmans G., Nilius B. *J. Gen. Physiol.*, 2004, vol. 124 (3), pp. 225-238.
25. Zhang Y., Cribbs L.L., Satin J. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2000, vol. 278 (1), pp. H184-H193.
26. Wolfe J.T., Wang H., Howard J., Garrison J.C., Barrett P.Q. *Nature.*, 2003, vol. 424 (6945), pp. 209-213.
27. Tao J., Hildebrand M.E., Liao P., Liang M.C., Tan G., Li S. [et al.] *Mol. Pharmacol.*, 2008, vol. 73 (6), pp. 1596-1609.
28. Hildebrand M.E., David L.S., Hamid J., Mulatz K., Garcia E., Zamponi G.W., Snutch T.P. *J. Biol. Chem.*, 2007, vol. 282 (29), pp. 21043-55.
29. Nelson M.T., Todorovic S.M., Perez-Reyes E. *Current Pharmaceutical Design.*, 2006, vol. 12 (18), pp. 2189-97.
30. Todorovic S.M., Jevtovic-Todorovic V. *Pflügers Archiv.*, 2014, vol. 466 (4), pp. 701-6.
31. Kopecky B.J., Liang R., Bao J. *European journal of physiology*, 2014, vol. 466 (4), pp. 757-765.
32. Orestes P., Bojadzic D., Chow R.M., Todorovic S.M. *Molecular pharmacology*, 2009, vol. 75 (3), pp. 542-554.
33. Spitzer N.C., Olson E.X. *J. Neurobiol.*, 1995, vol. 26 (3), pp. 316-324.
34. Robinson H.P., Kawahara M. [et al.] *J. Neurophysiol.*, 1993, vol. 70 (4), pp. 1606-1616.
35. Guzman J.N., Sánchez-Padilla J., Chan C.S., Surmeier D.J. *J. Neurosci.*, 2009, vol. 29 (35), pp. 11011-9.
36. Surmeier D.J., Schumacker P.T. *J. Biol. Chem.*, 2013, vol. 288 (15), pp. 10736-10741.
37. Lieberman O.J., Choi S.J., Kanter E., Saverchenko A., Frier M.D., Fiore G.M., Wu M., Kondapalli J., Zampese E., Surmeier D.J., Sulzer D., Mosharov E.V. *eNeuro*, 2017, vol. 4 (6), pp. 0167-17.
38. Surmeier D.J., Obeso J.A., Halliday G.M. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2017, vol. 18 (2), pp. 101-113.
39. Chan C.S., Guzman J.N., Ilijic E., Mercer J.N., Rick C., Tkatch T., Meredith G.E., Surmeier D.J. *Nature*, 2007, vol. 447 (7148), pp. 1081-6.
40. Grynkiwicz G., Poenie M., Tsien R.Y. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260 (6), pp. 3440-50.
41. Hayashi H., Miyata H., Terada H., Satoh H., Katoh H., Nakamura T., Kobayashi A. *Jpn. Heart J.*, 1994, vol. 35 (5), pp. 673-82.
42. Cozzi L., D'Angelo P., Sanguineti V. *Biol. Cybern.*, 2006, vol. 94 (5), pp. 335-349
43. Cain S.M., Snutch T.P. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, vol. 1828 (7), pp. 1572.
44. Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Gaidin S.G., Zinchenko V.P. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2017, vol. 615, pp. 35-43.
45. Turovsky E.A., Zinchenko V.P., Gaidin S.G., Turovskaya M.V. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2018, vol. 12, pp. 74-84.
46. Zinchenko V.P., Turovskaya M.V., Teplov I.Yu., Berezhnov A.V., Turovsky E.A. *Biophysics*, 2016, vol. 61 (1), pp. 85-93
47. Izhikevich E.M. *International Journal of Bifurcation and Chaos*, 2000, vol. 10 (6), pp. 1171-1266.
48. Robinson H.P., Torimitsu K., Jimbo Y., Kuroda Y., Kawana A. *Jpn. J. Physiol.*, 1993, vol. 43 (1), pp. 25-30.
49. Dymnik V.V., Kononov A.V., Sergeev A.V., Teplov I.Yu., Zinchenko V.P. *Plos One*, 2015, vol. 10 (7), p. e0134145, DOI: 10.1371/journal.pone.0134145.
50. Cooper D. *Neurochemistry international*, 2002, vol. 41 (5), pp. 333-340.
51. Swadlow H.A., Gusev A.G., Bezdudnaya T. *Journal of Neuroscience*, 2002, vol. 22 (17), pp. 7766-7773.
52. Zinchenko V.P., Turovsky E.A., Turovskaya M.V., Berezhnov A.V., Sergeev A.I., Dymnik V.V. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2016, vol. 10 (2), pp. 118-125.
53. Zinchenko V.P., Gaidin S.G., Teplov I.Y., Kosenkov A.M. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2017, vol. 11 (4), pp. 261-274.

REGULATION OF ACTION POTENTIAL FREQUENCY AND AMPLITUDE BY T-TYPE Ca^{2+} CHANNEL DURING SPONTANEOUS SYNCHRONOUS ACTIVITY IN HIPPOCAMPAL NEURONS**Теплов И.Ю.¹, Долгачева Л.П.¹, Түлеуқанов С.Т.², Зинченко В.П.¹**¹Institute of cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences
*Institutskaya, 3, Pushchino, 142290, Russia; e_mail: vpz@mail.ru*²Al-Farabi Kazakh national University
Almaty, Kazakhstan

Abstract. In this paper, the changes in the frequency and amplitude of action potentials (PD) were investigated depending on the depolarization caused by the Ca^{2+} channels activity during the spontaneous synchronous activity (SSA) of hippocampal neurons in culture. Using the image analysis and patch-clamp we have shown that depolarization caused by the inhibitor of the GABA(A) receptor results in a mode of the spontaneous activity in which tonic high-frequency (2-3 Hz) APs are generated by a neuron without any changes in cytosolic free Ca^{2+} concentration, ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). The tonic mode is interrupted burst activity, which is accompanied by a pulse of the slow depolarization and generation of calcium pulses. Inhibitor of T-type calcium channels ML218 inhibits this process. At the same time, the frequency and the amplitude of AP are regulated by slow depolarization pulses as follows: on the depolarization front, the APs frequency increases. At the same time, the amplitude decreases due to Na^+ channels inactivation. The higher is the depolarization rate, the higher is the APs generation frequency. If slow depolarization amplitude exceeds Na^+ channels reactivation potential, the neuronal impulse activity stops. As the cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) increases and Ca^{2+} -activated K^+ channels are activated, depolarization amplitude decreases slowly, and Na^+ -channels are reactivated, which leads to a gradual increase in the amplitude of APs against the background of depolarization decrease. Termination of burst firing is due to $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increase and to Ca^{2+} -dependent K^+ channels activation, and voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCC) inactivation. As a result, the membrane is hyperpolarized even more, that suppress AP generation, activate HCN channels and reactivate Na^+ and VGCC. The activity of HCN-like channels increases, the membrane slowly depolarizes and the potential reaches critical, generation of tonic APs begins, with further opening of the Ca^{2+} channels, and Ca^{2+} potential and Ca^{2+} signal are generated again. Thus, the channels, determining the pulse of slow depolarization, control the frequency and the amplitude of APs of PD during SSA, regulating the activation and inactivation conditions of Na^+ channels.

Key words: SSA – spontaneous synchronous activity, calcium impulse, T-type Ca^{2+} - channels, voltage-gated calcium channels, action potential, genesis of bursting activity, bursting of action potential, depolarization shift, critical potential.