

Метод витальной идентификации нейронов, содержащих кальций-проницаемые AMPA-рецепторы

Кайрат Б.К.¹, Гайдин С.Г.², Зинченко В.П.², Майоров С.А.², Ларюшкин Д.П.², Косенков А.М.²

1. Казахский национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан

2. Институт биофизики клетки РАН, г. Пущино, Московская область, Россия, 142290

Кальций-проницаемые AMPA-рецепторы (CP-AMPA-Rs) играют ключевую роль в функционировании головного мозга в норме и при патологии. Они вовлечены в регуляцию жизненно важных физиологических процессов, таких как синаптическая пластичность, синаптогенез и развитие нейронных сетей. CP-AMPA-Rs участвуют в модулировании высвобождения нейромедиаторов, тем самым поддерживая баланс возбуждения и торможения. В то же время функции нейронов, экспрессирующих CP-AMPA-Rs, и их роль в модуляции сетевой активности изучены недостаточно, поскольку отсутствуют надёжные и точные методы их визуализации. Целью данного исследования является разработка метода витальной идентификации и характеристика нейронов, содержащих CP-AMPA-рецепторы (CP-AMPA-R-нейроны).

В экспериментах использовались 13-14 дневные нейроглиальные культуры гиппокампа, выделенные из мозга новорождённых крыс линии Sprague-Dawley. Изменения внутриклеточной концентрации $[Ca^{2+}]_i$ оценивали в большинстве экспериментов с использованием флуоресцентного Ca^{2+} -чувствительного зонда Fura-2 AM. В случае одновременной регистрации изменения $[Na^+]_i$ и $[Ca^{2+}]_i$ использовались флуоресцентные зонды SBFI AM и Fluo-3 AM. Изменения $[Ca^{2+}]_i$ и $[Na^+]_i$ в клетках выражали как соотношение 340/387 для Fura-2 и SBFI или как $\Delta F/F_0$ для Fluo-3. Визуализацию нейронов, содержащих CP-AMPA-Rs, производили путём регистрации кальциевого сигнала в ответ на аппликацию селективного агониста AMPARs, фторвиллардина (FW), в присутствии антагониста GluK1-содержащих каинатных рецепторов (KARs), UBP 310, антагониста NMDARs, D-AP5, и блокатора потенциал-зависимых кальциевых каналов, верапамила. Для определения подтипа нейронов (глутаматергические или ГАМКергические) был использован метод иммуноцитохимического окрашивания с использованием антител к ГАМК и глутаматдекарбоксилазе 65/67 (маркер ГАМКергических нейронов).

В результате было обнаружено, что подавляющее большинство CP-AMPA-R-нейронов являются ГАМКергическими. Эти нейроны отличаются более высокими амплитудами кальциевых ответов на аппликацию агонистов по сравнению с нейронами, содержащими Ca^{2+} -непроницаемые AMPAR-рецепторы (CI-AMPA-R-нейроны). Кроме того, около 30 % CP-AMPA-R-нейронов демонстрируют присутствие также и GluK1-содержащих KARs. Несмотря на значительную разницу в притоке Ca^{2+} между нейронами, содержащими CP-AMPA-Rs и CI-AMPA-R-нейронами, AMPAR-опосредованный приток Na^+ в этих двух группах нейронов оказался одинаков. Помимо этого было обнаружено, что CP-AMPA-R-нейроны демонстрируют слабое ГАМК(A)-рецептор-опосредованное торможение из-за малого

количества ГАМКергических синапсов на some этих клеток. Однако полученные данные показывают, что слабое ГАМК(А)-рецептор-опосредованное ингибирование присуще всем ГАМКергическим нейронам в культуре и не может рассматриваться как уникальная особенность нейронов, содержащих CP-AMPARs.

Применение предложенного нами метода витальной идентификации будет способствовать расширению знаний о роли CP-AMPA-рецепторов и экспрессирующих их нейронов в функционировании мозга.

A method of vital identification of neurons containing calcium-permeable AMPA receptors

Kairat Bakhytzhhan Kairatuly¹, Gaidin S.G.², Zinchenko V.P.², Mayorov S.A.², Laryushkin D.P.²,
Kosenkov A.M.²

1. Al-Farabi Kazakh National University, Almaty, Kazakhstan

2. Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow region, Russia,
142290

Calcium-permeable AMPA receptors (CP-AMPARs) play a key role in brain functioning in health and disease. They are involved in the regulation of synaptic plasticity, synaptogenesis, and the development of neuronal networks. CP-AMPARs modulate the release of neurotransmitters, thereby maintaining a balance of excitation and inhibition. At the same time, the functions of neurons expressing CP-AMPARs and their role in the modulation of network activity have not been fully studied since there are no reliable and accurate methods of their visualization. This study aimed to develop an approach to the vital identification and characterization of neurons containing CP-AMPA receptors (CP-AMPA neurons).

The neuroglial hippocampal cultures (13-14 days in vitro) prepared from the brains of newborn Sprague-Dawley rats were used in the experiments. Changes in the intracellular concentration of Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) were evaluated in most experiments using a fluorescent Ca^{2+} -sensitive probe Fura-2 AM. In the case of simultaneous registration of changes in $[Na^+]_i$ and $[Ca^{2+}]_i$, SBFI AM and Fluo-3 AM fluorescent probes were used. Changes in $[Ca^{2+}]_i$ and $[Na^+]_i$ in cells were expressed as 340/387 ratio for Fura-2 and SBFI or as $\Delta F/F_0$ for Fluo-3. Neurons were distinguished from glial cells by short-term application of KCl before or after experiments. The visualization of neurons containing CP-AMPARs was performed by applying a selective agonist of AMPARs, fluorowillardiine (FW), in the presence of an antagonist of GluK1-containing KARs, UBP 310, an antagonist of NMDARs, D-AP5, and a blocker of voltage-dependent calcium channels, verapamil. Immunostaining with antibodies against GABA and glutamatedecarboxylase 65/67 (a marker of GABAergic neurons) was used to identify GABAergic and glutamatergic neurons.

It was found that the vast majority of CP-AMPA neurons are GABAergic and they differ in higher amplitudes of calcium responses to the application of agonists compared to neurons containing Ca^{2+} -impermeable AMPAR receptors (CI-AMPA neurons). In addition, about 30% of CP-AMPA neurons

demonstrate the presence of GluK1-containing KARs. Also, neurons containing CP-AMPA receptors are characterized by a more significant influx of Ca^{2+} than CI-AMPA neurons, while the AMPAR-mediated influx of Na^+ in these two groups of neurons is similar. In addition, it was found that CP-AMPA neurons exhibit weak GABA(A)-receptor-mediated inhibition due to the small number of GABAergic synapses on the soma of these cells. However, the data obtained show that weak GABA(A)-receptor-mediated inhibition is observed in all GABAergic neurons in culture and cannot be considered a unique feature of neurons containing CP-AMPA receptors.

The proposed method of vital identification will contribute to expanding knowledge about the role of CP-AMPA receptors and neurons expressing them in brain functioning.