

М.С. Шипшина, М. С. Веселовський

Особливості сенсорної нейротрансмісії в ко-культурі нейронів спінальних гангліїв і дорсальних рогів спинного мозку щурів

Досліджували властивості хімічної нейропередачі на рівні первинних аферентних входів у спинний мозок на розробленій нами простій і зручній in vitro моделі суміжно-культивованих дисоційованих нейронів спінальних гангліїв (СГ) і нейронів дорсальних рогів спинного мозку (ДРСМ) новонароджених щурів. Результати наших досліджень показали наявність збуджувальних і гальмівних синапсів нейронів СГ на клітинах ДРСМ. Збуджувальна нейротрансмісія в таких синапсах була опосередкована пресинаптичним викидом глутамату та подальшою активацією рецепторів NMDA- і не-NMDA-субкласів. При цьому активація не-NMDA-рецепторів робить основний внесок у реалізацію збуджувальних постсинаптичних ефектів. У передачу гальмівних сигналів були залучені як гліцин-, так і ГАМК-ергічні нейрони СГ. Однак в більшості досліджених пар нейронів гальмівна синаптична трансмісія була опосередкована пресинаптичним вивільненням гліцину. Запропонована нами in vitro модель ко-культури нейронів СГ/ДРСМ, на відміну від раніше розроблених подібних методів, дає змогу найбільш повно використовувати сучасні методичні підходи у вивченні особливостей трансмісії соматосенсорної інформації з периферії в ЦНС, а також глибоко досліджувати специфічні властивості синапсів аферентних нейронів.

Ключові слова: спінальні ганглії, дорсальні роги спинного мозку, ко-культура, синаптична передача, NMDA-рецептори, не-NMDA-рецептори, γ -аміномасляна кислота, гліцин, викликані постсинаптичні струми.

ВСТУП

Первинні аферентні нейрони та нейрони дорсальних рогів спинного мозку (ДРСМ) відіграють фундаментальну роль у трансмісії та модуляції різних видів соматичної та вісцеральної сигналізації [1, 17]. На рівні ДРСМ відбувається первинна інтеграція сенсорних сигналів і реалізується первинний контроль роstralних центрів над аферентною інформацією за допомогою спадних провідних шляхів. Сенсорна інформація про стимули різних модальностей сприймається периферичними рецепторами і передається клітинам ДРСМ волокнами нейронів спінальних гангліїв (СГ), що проходять у складі задніх корінців спинного

мозку (СМ). Мієлінізовані та немієлінізовані волокна нейронів СГ закінчуються в різних пластинах (за Рекседом) дорсального рогу. Так, тонкі С-волокна мають закінчення переважно в пластинах I і II [3]; терміналі ноцицепторів A_{δ} знаходяться переважно в пластинах I і V та частково – в пластині X; аферентні волокна від внутрішніх органів закінчуються в основному на клітинах пластин I та V, а крупні мієлінізовані A_{β} -волокна – на дендритах нейронів III і IV пластин [1]. У ДРСМ містяться клітини трьох класів: 1) проєкційні нейрони, що передають інформацію роstralним центрам [6], більшою частиною формують пластини I, II і V; 2) збуджувальні проміжні нейрони, що передають сигнал у межах

© М.С. Шипшина, М. С. Веселовський

відповідних сегментів СМ; 3) гальмівні інтернейрони, що модулюють сенсорну трансмісію. Загалом, ДРСМ являють собою складну чітко організовану частину ЦНС з різноманітним виконуваним нею функцій.

Більшість досліджень особливостей трансмісії на рівні аферентних синаптичних входів в СМ проводилися *in vivo* [2] або *in vitro* на зрізах СМ із збереженням дорсальних корінців [24, 25, 26]. При цьому постсинаптичні відповіді викликалися стимуляцією цілого корінця, а вибір постсинаптичної клітини відбувався «наосліп». Однак необхідність у більш точних дослідженнях нейротрансмісії на цьому рівні стала передумовою для розробки більш зручних об'єктів. У зв'язку з широким використанням первинних нейрональних культур для вивчення функціональних властивостей синапсів і синаптичних ефектів фармакологічних агентів, протеїнів тощо, деякими авторами була запропонована низка засобів сумісного культивування нейронів СГ і клітин СМ чи ДРСМ [10, 13, 17, 19, 22]. Використання таких змішаних і розділених культур дає змогу полегшити рішення деяких експериментальних задач, однак відтворення більшості з таких об'єктів є достатньо складним у методичному плані.

Як модель для вивчення синаптичної передачі в первинних аферентних синапсах нами був розроблений більш простий метод суміжного культивування дисоційованих нейронів СГ і ДРСМ. Це модифікований і спрощений варіант мульти-компаратментної техніки [4], що не був описаний раніше. В нашій моделі клітини двох різних популяцій були просторово роз'єднані, будучи розміщеними в суміжних компартментах. При цьому аксони нейронів СГ утворювали синапси на клітинах-мішенях ДРСМ, вільно долаючи межу розподілу культур двох популяцій нейронів. У такій системі значно полегшується ідентифікація клітин СГ чи ДРСМ, оскільки їх розміщення задане

умовами посадки культур. Крім того, при відповідному збільшенні стає можливим візуально простежити проєкції аферентних нейронів на клітини ДРСМ, що додає зручності при виборі пари синаптично зв'язаних клітин. Запропонована нами тут модель ко-культури нейронів СГ/ДРСМ дає змогу культивувати клітини протягом декількох тижнів та є зручною для вивчення властивостей синаптичної передачі на рівні первинних аферентних входів у спинний мозок. У цій роботі ми спробували охарактеризувати типи такої хімічної нейропередачі та з'ясувати роль субпопуляцій постсинаптичних рецепторів в їх реалізації.

МЕТОДИКА

Виготовлення камер для суміжного культивування нейронів СГ/ДРСМ. Для наших експериментів в пластикові чашки для культивування діаметром 35 мм були поміщені покриті полі-L-орнітином (Poly-L-ornitine, «Sigma», США) круглі покривні скельця. Камери для суміжного культивування нейронів СГ/ДРСМ являють собою окремі секції прямокутних силіконових камер flexiPERM slide («greiner bio-one», Німеччина), посередині котрих, перпендикулярно контактній площині камери із покривним склом, покритим полі-L-орнітином, були вмонтовані прямокутні покривні скельця. Лінійні розміри останніх коректувалися відповідно до внутрішніх розмірів силіконових камер. Готові камери при розміщенні на скельцях формували щільні контакти в місцях стикання їх з підкладкою. Таким чином, формувалися два компартменти, в кожному з яких висівалися нейрони відповідного типу. В таких умовах виключалося змішування суспензій клітин на межі розподілу двох відсіків, що дало можливість отримати суміжні культури клітин СГ і ДРСМ.

Суміжне ко-культивування дисоційованих нейронів СГ і ДРСМ. Для приго-

тування ко-культур дисоційованих СГ/ДРСМ нейронів використовували новонароджених шурів лінії Вістар. Люмбальний відділ спинного мозку і пов'язані з ним СГ брали від тієї самої тварин та занурювали в охолоджений розчин мінімального середовища Ігла (MEM, «Sigma», США), що містив NERES – 20 ммоль/л, натрієву сіль бензилпеніциліну 25 – од/мл, сульфат стрептоміцину – 25 мкг/мл. Після видалення спинномозкових оболонок від ділянки СМ відокремлювали ДРСМ, для чого СМ за допомогою скальпеля по дорсальній комісурі був розділений на дві половини та зони, що відповідають дорсальним третинам, висікалися з кожної половини. Ділянки тканини СМ, що містили ДРСМ, попередньо розрізані скальпелем на сегменти, інкубували в 0,2%-му розчині трипсину (тип XI, «Sigma», США) протягом 8 хв при 37°C. СГ очищували від передніх, задніх корінців і спинномозкового нерва, після чого інкубували в 0,2%-му розчині пронази (Pronase E, «Serva», Німеччина) протягом 7–8 хв при 37°C. Після ферментації тканину сегментів ДРСМ і СГ декілька разів промивали в розчині MEM, що містив 10% кінської сироватки (Horse serum, «Gibco», США), для інактивації протеолітичних ферментів. Механічну дисоціацію клітин ДРСМ і СГ проводили за допомогою оплавлених пастерівських піпеток, діаметри кінчиків яких поступово зменшуються в розчині для культивування, що містив MEM, 10 % кінської сироватки, 2,2 г/л NaHCO_3 , 6 мкг/мл інсуліну (Insulin, «Sigma», США), 25 од/мл натрієвої солі бензилпеніциліну, 25 мкг/мл сульфату стрептоміцину. Отримані суспензії клітин розбавлялися розчином для культивування таким чином, щоб кінцева щільність їх при підрахунку в гемоцитометрі становила приблизно 50 000 клітин/см². Далі клітини двох популяцій висівали у відповідні компартменти камер для культивування на скельця, попередньо вкриті полі-L-орні-

тином, та інкубували при 37°C, концентрації CO_2 5 % та абсолютній вологості протягом 1 год. За цей час нейрони ДРСМ і СГ добре осідали та прикріплялися до скла у проєкціях займаних відсіків. Потім камери акуратно знімали, даючи можливість нейронам СГ вільно формувати аксони в напрямку до клітин-мішеней ДРСМ. У чашки з ко-культурою додавали по 2 мл розчину для культивування та інкубували при вищезазначених умовах протягом декількох тижнів. На 2-гу – 3-тю добу культивування в середовище до ко-культури додавали 5 мкмоль/л цитозин-А-D-арабінофуранозиду («Sigma», США) для пригнічення проліферації гліальних клітин, а через 36–48 год після цього розчин міняли на свіжий. В таких умовах нейрони добре росли та морфологічно диференціювалися, після 14-ї доби культивування культуру брали в експеримент.

Електрофізіологічні методи. Реєстрація іонних струмів в парах «нейрон СГ – нейрон ДРСМ» відбувалася за допомогою методу фіксації потенціалів у конфігураціях «ціла клітина» одночасно на пре- та постсинаптичній клітинах. Аналізували постсинаптичні струми (вПСС) на мембранах нейронів ДРСМ, викликані внутрішньоклітинною стимуляцією клітин СГ у кожній парі. Стимуляцію СГ нейронів здійснювали прикладанням деполяризувальних імпульсів амплітудою 60–120 пА та тривалістю 0,5–1 мс з інтервалом 1–2 с. Експериментальна установка була зібрана на базі інвертованого мікроскопа Axiovert S100 («Carl Zeiss», Німеччина). Використання фазово-контрастного об'єктива (Plan-Neofluar 100Ч NA 1.30) з масляною імерсією дозволяло отримати в системі 1000-кратне оптичне збільшення, щоб візуально ідентифікувати потенціально зв'язані пари нейронів. Сигнали, відповідні вПСС, реєстрували та фільтрували з частотою 5 кГц за допомогою двох підсилювачів ЕРС-8 («НЕКА», Німеччина), оцифровували та

записували з застосуванням аналого-цифрового перетворювача DigiData 1322A та програмного пакета WinWCP V3.9.6. (University of Strathclyde, Шотландія); частота оцифровки становила 10 кГц. Усі експерименти проводили при 20°C. На мембранах нейронів ДРСМ потенціал підтримували на рівні -70 мВ. Значення мембранного потенціалу клітин були відкоректовані з урахуванням рідинного контактного потенціалу (16 мВ), розрахованого за допомогою калькулятора контактних потенціалів програмного пакета PClamp 9.0 («Axon Instruments», США).

Patch-піпетки із внутрішнім діаметром кінчика 1–1,5 мкм були витягнуті з боросилікатних скляних капілярів («World Precision Instruments», США). Внутрішньоклітинний розчин у петч-піпетках в усіх випадках містив (ммоль/л): калію глюконату – 155; натрію глюконату – 10; EGTA – 10; MgCl₂ – 1; HEPES – 20 (рН доводили до 7,4 додаванням КОН). Заповнені таким розчином піпетки мали опір 5–7 МОм. Базовий зовнішньоклітинний розчин містив (ммоль/л): NaCl – 140; KCl – 3; CaCl₂ – 2; MgCl₂ – 2; глюкози – 30; HEPES – 20 (рН доводили до 7,4 додаванням NaOH). При дослідженні властивостей збуджувальних вПСС використовували зовнішньоклітинний розчин, що номінально не мав у складі Mg²⁺. У наших експериментах градієнт для Cl⁻ створювався таким чином, що під час реєстрації вПСС мали вихідний напрям, а вЗПСС – вхідний. Це давало змогу візуально розрізнити два типи постсинаптичних відповідей під час реєстрації.

Аплікація та зміна розчинів, що містили блокатори збуджувальної (DNQX, D_L-AP5) та гальмівної (бікукулін, стрихнін) нейропередачі відбувалася безупинно (швидкість зміни розчинів 1мл/30 с). Всі реактиви для електрофізіологічних експериментів були отримані від фірми «Sigma» (США).

Аналіз кінетичних показників вПСС (амплітуда, час наростання, постійна часу

спаду) виконували за допомогою програмного пакета Clampfit 9.0 («Axon Instruments», США) та Excel2002 («Microsoft Corporation», США), побудова графіків – за допомогою програми OriginPro 8 («OriginLab Corporation», США).

РЕЗУЛЬТАТИ

Морфологічні характеристики нейронів СГ та ДРСМ у ко-культурі. В умовах суміжного культивування нейрони СГ і ДРСМ розвивалися відповідно до своїх фенотипічних властивостей та вільно формували синаптичні контакти як з клітинами власної популяції, так і з нейронами іншої генерації. При цьому нейрони СГ і ДРСМ добре розрізнялися морфологічно (рис. 1). Нейрони СГ у ко-культурі були представлені псевдоуніполярними та біполярними клітинами еліпсоїдної або круглої форми, що відрізнялися фазово-яскравими сомами різного розміру (від 20 до 50 мкм). Нейрони ДРСМ були більш фазово-темними і нараховували бі- або мультиполярні клітини, що характеризувалися дуже вираженою арборизацією нейритів. Клітинні тіла останніх відрізнялися розмаїттям форм і розмірів, що, напевно, пов'язано із належністю їх до окремих функціональних типів нейронів ДРСМ.

Нами були протестовані 25 пар синаптично зв'язаних пар клітин СГ/ДРСМ. Серед них в 12 парах внутрішньоклітинна стимуляція нейрона СГ викликала збуджувальні вПСС (вЗПСС), а в 13 парах – гальмівні вПСС у клітинах ДРСМ. Невелика та постійна синаптична затримка 5,14 мс ± 0,31 мс (n = 18) і відсутність пропусків синаптичних відповідей в обох випадках дають змогу визначити зареєстровані ПСТ як моносинаптичні [9].

Властивості вЗПСС на мембранах клітин ДРСМ, викликаних стимуляцією СГ нейронів у парі. Моносинаптичні вЗПСС, зареєстровані на нейронах ДРСМ при

підтримуваному потенціалі -70 мВ і фізіологічній позаклітинній концентрації Mg^{2+} (2 ммоль/л), характеризувалися швидкою активаційною та інактиваційною кінетикою. Час до піку вЗПСС, розрахований за висхідною частиною кривої струму від 10 до 90% пікової амплітуди, становило $2,82$ мс $\pm 0,37$ мс ($n = 5$). Спад вЗПСС у найкращий спосіб апроксимувався однією експонентою із середньою постійною часу $\tau = 3,91$ мс $\pm 0,31$ мс ($n = 5$). При цьому часовий хід вЗПСС практично не змінювався при різних значеннях підтримуваного потенціалу (рис. 2, в). Значення амплітуд вЗПСС практично лінійно залежали від підтримуваних потенціалів на мембранах

ДРСМ клітин, і потенціал реверсії постсинаптичних струмів становив $-1,43$ мВ $\pm 2,46$ мВ ($n = 5$; рис. 2, а, б). Таким чином, кінетичні властивості вЗПСС відповідали таким, раніше описаним для глутаматергічних ПСС, що були досліджені на інших препаратах [8, 16, 18]. Аплікація селективного блокатора NMDA-рецепторів D_L -AP5 у концентрації 10 мкмоль/л не викликала зниження амплітуд вЗПСС і не впливала на кінетику їхнього спаду. Тоді як прикладання блокатора не-NMDA-рецепторів DNQX у концентрації 10 мкмоль/л призводила до повного блокування вЗПСС (рис. 3, а). Такий ефект у наших експериментах міг бути пов'язаний з блокадою

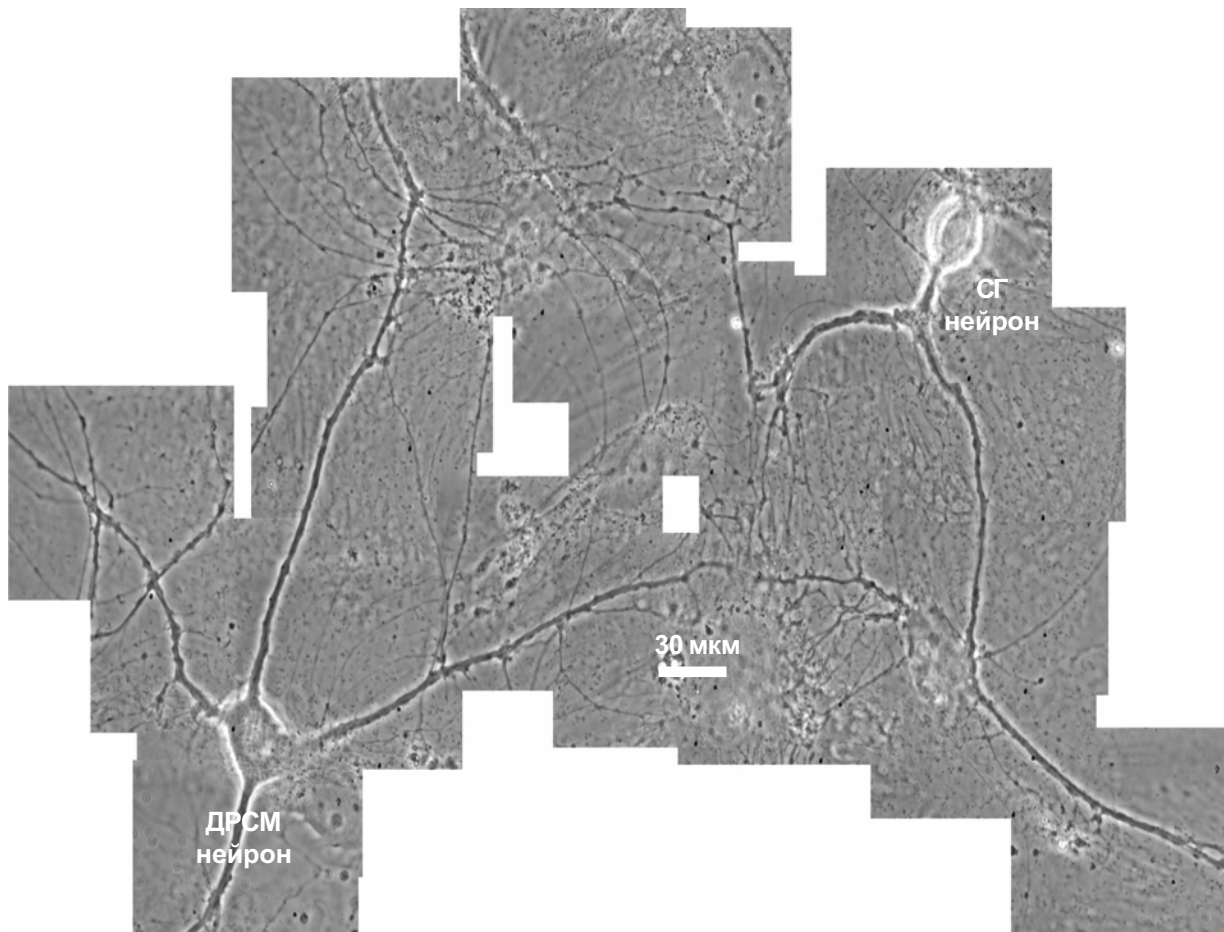


Рис. 1. Реконструйоване мікрофотографічне зображення нейронів спінальних гангліїв та клітин дорсальних рогів спинного мозку в умовах суміжного ко-культивування на 14-ту добу *in vitro* (об'єктив Plun-Neofluar 100г, NA 1.3, масляна імерсія, «Zeiss»)

NMDA-рецепторів Mg^{2+} [12], коли їх позаклітинна концентрація була 2 ммоль/л.

В експериментах з використанням зовнішньоклітинного розчину, що не містить Mg^{2+} , часовий хід моносинаптичних вЗПСС, реєстрованих при підтримуваному потенціалі -70 мВ, характеризувався більш повільним двох експоненціальним спадом ($\tau_1 = 2,68 \pm 0,31$ мс, $\tau_2 = 58,85 \pm 10,32$ мс ($n = 7$)), а час до піку становив $3,05$ мс $\pm 0,58$ мс ($n = 7$). Активаци́йна та інактиваци́йна кінетика таких вЗПСС також не виявляла суттєвих змін залежно від підтримуваних потенціалів.

Прикладання DNQX у концентрації 10 мкмоль/л дало змогу виділити NMDA-компонент вЗПСС, зареєстрованих при підтримуваному потенціалі -70 мВ у безмагнієвому позаклітинному розчині. Цей залишковий струм повністю блокувався апликацією D_L -AP5 у концентрації 10 мкмоль/л (див. рис. 3, б). Амплітуда ізольованого NMDA-компонента становила в середньому $18,06\% \pm 2,19\%$ від інтегра-

льного вЗПСС. При цьому в порівнянні з інтегральними струми, опосередковані активацією NMDA-рецепторів, відрізнялися повільнішою кінетикою. Час до піку таких струмів був $6,29$ мс $\pm 1,21$ мс ($n = 6$), а спад добре описувався однією експонентою з $\tau = 45,01$ мс $\pm 10,40$ мс ($n = 6$).

В більшості досліджених клітинних пар у безмагнієвому середовищі вЗПСС містили як NMDA-, так і не- NMDA-компоненти. Однак в 2 парах нейронів СГ/ДРСМ за тих самих умов реалізація вЗПСС була опосередкована внеском тільки не- NMDA-компонента. Такі струми повністю блокувалися DNQX (10 мкмоль/л) при підтримуваному потенціалі -70 мВ (не зображено).

Характеристики вГПСС на мембранах клітин ДРСМ, викликаних стимуляцією СГ нейронів у парі. У 13 з 25 пар клітин стимуляцію первинних аферентних нейронів викликала ГПСС у нейронах ДРСМ. Амплітуди усереднених вГПСС мали лінійну залежність від підтримуваного потенціалу

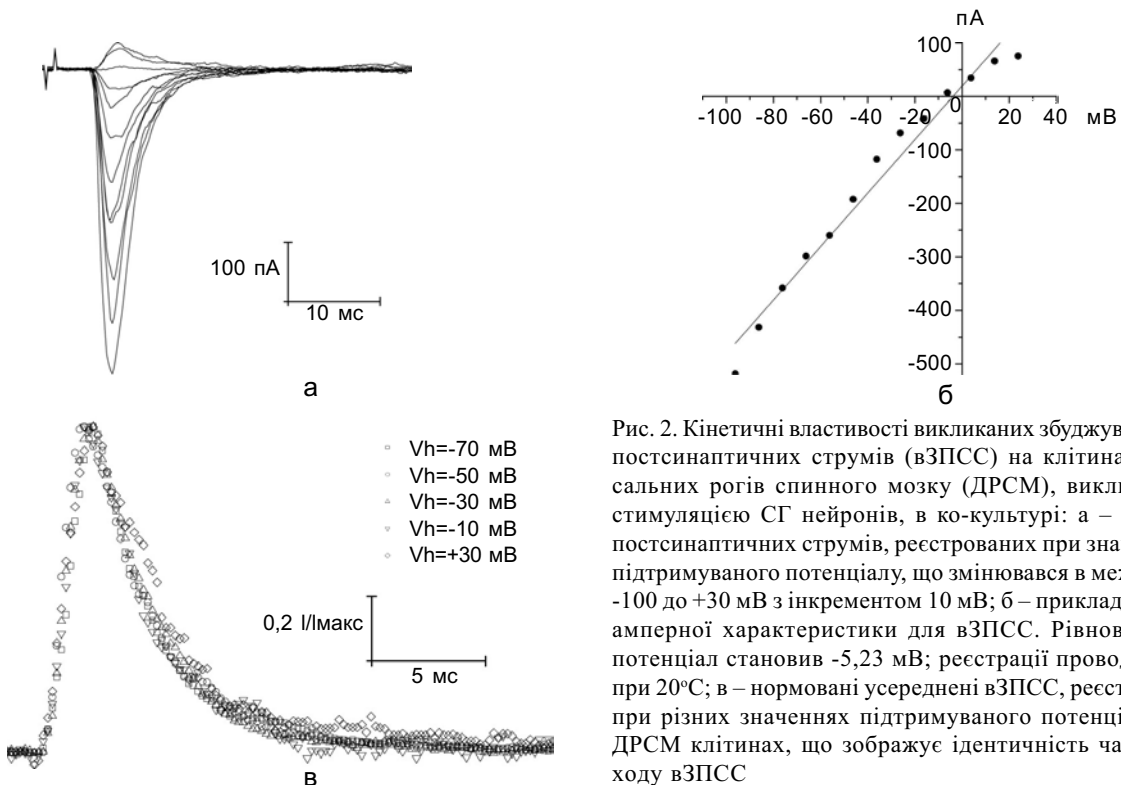


Рис. 2. Кінетичні властивості викликаних збуджувальних постсинаптичних струмів (вЗПСС) на клітинах дорсальних рогів спинного мозку (ДРСМ), викликаних стимуляцією СГ нейронів, в ко-культури: а – записи постсинаптичних струмів, реєстрованих при значеннях підтримуваного потенціалу, що змінювався в межах від -100 до +30 мВ з інкриментом 10 мВ; б – приклад вольтамперної характеристики для вЗПСС. Рівноважний потенціал становив -5,23 мВ; реєстрації проводилися при 20°C; в – нормовані усереднені вЗПСС, реєстровані при різних значеннях підтримуваного потенціалу на ДРСМ клітинах, що зображує ідентичність часового ходу вЗПСС

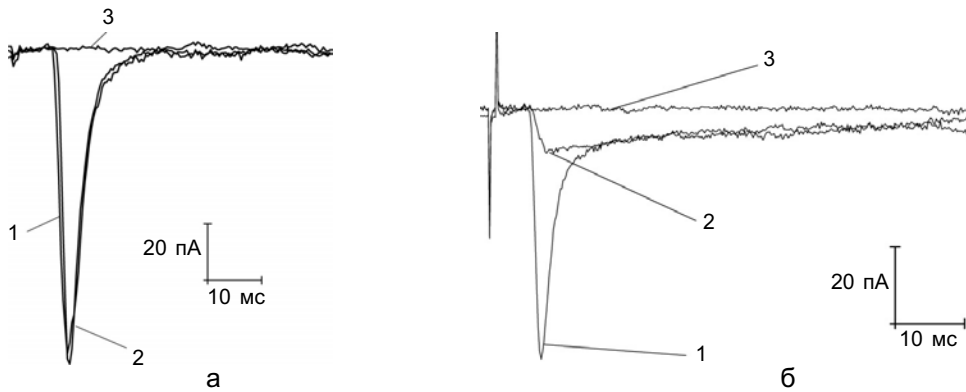


Рис. 3. Фармакологічні властивості викликаних збуджувальних постсинаптичних струмів (вЗПСС). а – дія блокувальних глутаматергічної нейротрансмісії на вЗПСС, реєстровані при зовнішньоклітинній концентрації Mg^{2+} 2 ммоль/л: 1 – вЗПСС у контролі; 2 – при аплікації D_L -AP5 (10 мкмоль/л); 3 – при аплікації DNQX (10 мкмоль/л). б – дія блокувальних НМДА- та не-НМДА-рецепторів на вЗПСС, реєстровані в безмагнієвому зовнішньоклітинному розчині: 1 – вЗПСС в умовах контролю; 2 – після аплікації DNQX (10 мкмоль/л); 3 – при аплікації D_L -AP5 (10 мкмоль/л)

на мембранах постсинаптичних клітин. Розрахований за вольт-амперними характеристиками потенціал реверсії для цих струмів становив $-101 \pm 2,68$ мВ ($n = 6$) і відповідав рівноважному потенціалу для Cl^- , розрахованому за рівнянням Нернста для використовуваних розчинів (-109 мВ; рис. 4). Часовий хід більшості моносинаптичних вГПСС, зареєстрованих при підтримуваному потенціалі -70 мВ, характеризувався достатньо швидким зростанням та повільним спадом. Час до піку для вГПСС різних амплітуд був однаковим і становив $2,62$ мс $\pm 0,37$ мс ($n = 7$). Спад

добре апроксимувався однією експонентою з $\tau = 19,58$ мс $\pm 4,50$ мс ($n = 7$).

Викликані ГПСС в 8 з 13 пар були обстежені на чутливість до блокувальних гальмівної нейротрансмісії. Для 7 пар нейронів СГ/ДРСМ незалежно від позаклітинної концентрації Mg^{2+} аплікація специфічного блокувальника ГАМК_A-рецепторів бікукуліну метіодиду в концентрації 10 мкмоль/л не викликала суттєвих змін амплітуд і кінетичних показників вГПСС. Тоді як подальше прикладання стрихніну в концентрації 0,5–1 мкмоль/л призводило до повного блокування залишкового вГПСС

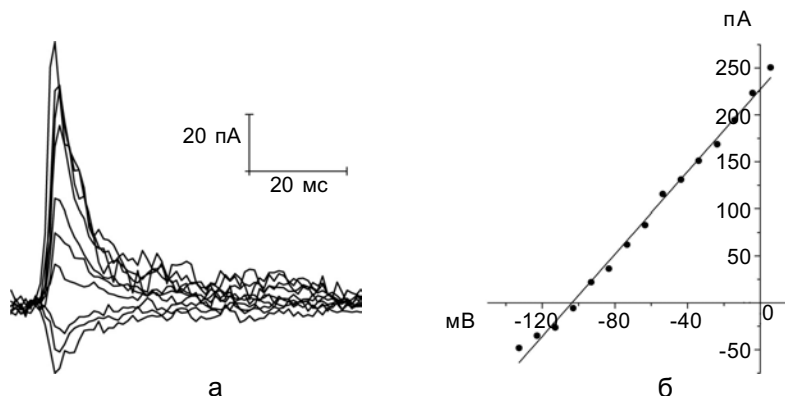


Рис. 4. Кінетичні характеристики викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС), відведених від клітин дорсальних рогів спинного мозку (ДРСМ) при стимуляції нейронів спінальних гангліїв (СГ) у парах: а – записи постсинаптичних струмів, реєстрованих при значеннях підтримуваного потенціалу, що змінювався від -130 до $+10$ мВ з інкрементом 10 мВ; б – вольт-амперна характеристика вГПСС, зареєстрованих при $20^\circ C$; рівноважний потенціал становив $-106,52$ мВ

(рис. 5, а). Такі фармакологічні ефекти та вищеописані кінетичні властивості дають підставу визначати зареєстровані нами вГПСС як гліциніндуковані Cl^- струми [9, 14, 26].

Однак у 1 парі нейронів СГ/ДРСМ вГПСС виявилися чутливими до блокатора ГАМК_A-рецепторів (див. рис. 5, б). У цьому разі аплікація бікукуліну метіодиду повністю пригнічувала вГПСС. Крім того, інактиваційна кінетика цих струмів була повільнішою за таку гліцинактивованих (τ спаду, усереднене за 40 записами, становило $44,43 \text{ мс} \pm 0,49 \text{ мс}$), що дало змогу ідентифікувати їх як ГАМК-індуковані Cl^- струми [11, 14, 26].

ОБГОВОРЕННЯ

Ми досліджували властивості хімічної нейротрансмісії на рівні первинних аферентних входів у спинний мозок на розробленій нами *in vitro* моделі суміжно-культивованих дисоційованих нейронів СГ і ДРСМ щура. У такій системі добре ідентифіковані морфологічні відмінності двох популяцій клітин і можливість візуально відстежити проєкції аферентних нейронів на клітини ДРСМ забезпечували зручність проведення та достатньо високу продук-

тивність запланованих електрофізіологічних досліджень з визначення постсинаптичних ефектів.

Отримані нами експериментальні результати узгоджуються з даними попередніх електрофізіологічних та імунохімічних досліджень про наявність і вивільнення низки медіаторів у терміналях волокон первинних аферентів, що закінчуються на різних структурах ДРСМ [24]. У деяких попередніх працях були описані збуджувальні та гальмівні синаптичні відповіді в спинномозкових клітинах, викликані активацією нейронів СГ [25]. При цьому відзначалося, що збуджувальні постсинаптичні сигнали можуть бути опосередковані глутаматом чи спорідненими амінокислотами, що взаємодіють переважно з рецепторами не- NMDA субкласу [7, 24, 26]. Також як медіатор була описана функція субстанції Р у передачі ноцицептивної інформації нейронам ДРСМ, експресуючим NK1-рецептори [15]. Наші результати свідчать про вивільнення глутамату як збуджувального нейромедіатора в синаптичних терміналях нейронів СГ і про участь NMDA- и не-NMDA-рецепторів у реалізації вГПСС у нейронах ДРСМ. Однак при нормальній фізіологічній концентрації Mg^{2+} 2 ммоль/л

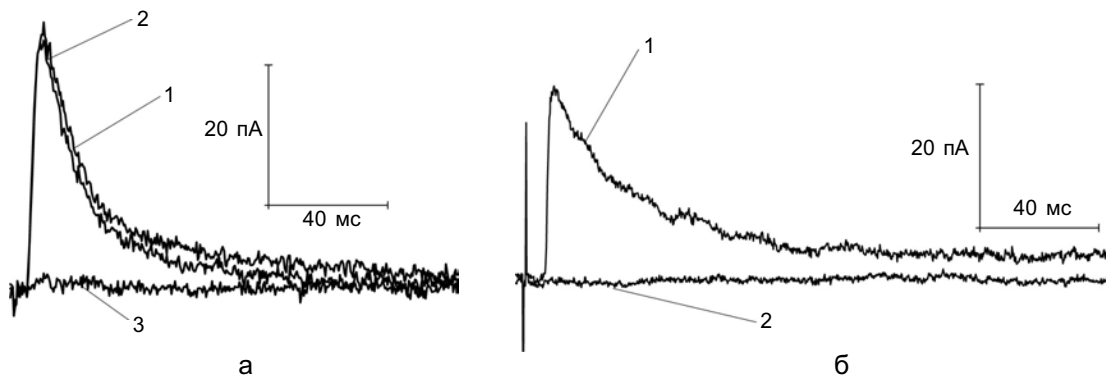


Рис 5. Ефекти блокаторів гальмівної синаптичної передачі на викликані гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС) нейронів дорсальних рогів спинного мозку (ДРСМ), реєстрованих в ко-культурі: а – фармакологічні властивості вГПСС зі швидкою інактивацією: 1 – вГПСС в контролі; 2 – при аплікації метіодиду бікукуліну (10 мкмоль/л); 3 – після аплікації стрихніну в концентрації 0,5 мкмоль/л. б – блокувальна дія метіодиду бікукуліну (10 мкмоль/л) на вГПСС клітин ДРСМ, зареєстровані в одній з пар СГ/ДРСМ нейронів: 1 – вГПСС у контролі; 2 – після аплікації метіодиду бікукуліну (10 мкмоль/л)

виділити NMDA-компонент вЗПСС виявилося неможливим, що могло бути пов'язано з потенціалзалежним блокуванням Mg^{2+} вхідного струму через NMDA-рецептор-керовані канали при підтримуваному потенціалі -70 мВ [12]. Хоча в наших умовах зміна підтримуваного потенціала на мембранах ДРСМ нейронів у бік деполаризувальних значень не виявляла суттєвих змін у лінійності ходу вольт-амперних характеристик та кінетичних властивостях вЗПСС. Напевно внесок NMDA-рецепторів у реалізацію інтегрального вЗПСС виявився незначним, бо скасування Mg^{2+} -блоку деполаризацією не вплинуло на постсинаптичну відповідь та її часові характеристики. Можливість оцінити NMDA-компонент вЗПСС стала доступною тільки при виключенні позаклітинного Mg^{2+} . При цьому розмір NMDA-опосередкованого струму становив $18,06 \pm 2,19$ % від інтегрального вЗПСС (див. рис. 3, б). Таким чином, можна припустити, що в дослідженій нами групі клітин ДРСМ на постсинаптичних мембранах у синапсах нейронів СГ щільність NMDA-рецепторів є нижчою порівняно з не-NMDA-рецепторами. Це підтверджує домінуючий внесок останніх у реалізацію вЗПСС.

Питання про ідентифікацію медіаторів, які опосередковують гальмівну трансмісію в синапсах нейронів СГ на клітини ДРСМ, нині залишається відкритим. Деякими дослідниками було висловлено припущення, що ГАМК і гліцин як медіатори, ймовірно, відіграють важну роль у модуляції ноцицептивної трансмісії в ДРСМ [25, 26]. Імунногістохімічні дослідження з використанням методів імунного забарвлення також показали наявність нейронів і терміналей, що містять гліцин і ГАМК у високій концентрації, в ділянках ДРСМ, що приймають первинні аферентні входи [5, 20, 21, 23]. Проте роль цих медіаторів у гальмуванні сенсорного сигналу не є загально-визнаною, як і взагалі існування гальмівних

проекцій первинних аферентів на нейрони ДРСМ [7]. В наших експериментах у більшості досліджених клітин ДРСМ вГПСС, що були викликані стимуляцією нейронів СГ, виявилися чутливими до блокатора гліцинових рецепторів (рис. 5, а), що дає змогу пов'язати ресстрацію таких струмів з пресинаптичним вивільненням гліцину в терміналях клітин СГ. Крім того, кінетичні властивості цих вГПСС також узгоджуються з такими, раніш описаними для гліцинергічних ПСС [9, 14, 25, 26]. Однак нами були також виявлені вГПСС, кінетичні характеристики котрих, а також ефект антагоністу ГАМК_A-рецепторів, є показником того, що вони зумовлені викидом ГАМК у пресинаптичних терміналях первинних аферентів (див. рис. 5, б). Таким чином, результати наших експериментів показали, що як гліцин-, так і ГАМК-ергічні нейрони СГ можуть брати участь у передачі гальмівних сигналів клітинам ДРСМ.

Попередні дослідження в ідентифікації властивостей гальмівної та збуджувальної нейропередачі на рівні первинних аферентних входів спиралися на вивчення синаптичних контактів, що формуються визначеними типами аферентних волокон і пов'язані з передачею сигналів певних модальностей. У нашій роботі ми не ставили завдання з'ясувати належність аксонів пресинаптичних СГ нейронів до A_{α} , A_{β} чи С-типу волокон. Тому ми не можемо екстраполювати наші результати на особливості хімічної передачі больових або інших конкретних видів сенсорних сигналів. Однак представлена нами *in vitro* модель суміжно-культивованих дисоційованих нейронів СГ/ДРСМ дає можливість вивчення модулювальних ефектів на синаптичну передачу, а також детального дослідження особливостей функціонування специфічних синаптичних контактів, що формуються в парі клітин СГ і ДРСМ, та відображають перший рівень обробки соматосенсорних сигналів.

М.С. Шипшина, М.С. Веселовский

**ОСОБЕННОСТИ СЕНСОРНОЙ НЕЙРО-
ТРАНСМИССИИ В КО-КУЛЬТУРЕ
НЕЙРОНОВ СПИНАЛЬНЫХ ГАНГЛИЕВ И
ДОРСАЛЬНЫХ РОГОВ СПИННОГО МОЗГУ
КРЫС**

В данной работе мы исследовали свойства химической нейротрансдачи на уровне первичных афферентных входов в спинной мозг на разработанной нами простой и удобной *in vitro* модели смежно-культивируемых диссоциированных нейронов спинальных ганглиев (СГ) и нейронов дорсальных рогов спинного мозга (ДРСМ) новорожденных крыс. Результаты наших исследований показали наличие возбуждающих и тормозных синапсов нейронов СГ на клетках ДРСМ. Возбуждающая нейротрансмиссия в таких синапсах была опосредована пресинаптическим высвобождением глутамата и последующей активацией рецепторов NMDA- и не- NMDA-субклассов. При этом активация не-NMDA-рецепторов делает основной вклад в реализацию возбуждающих постсинаптических эффектов. В передачу тормозных сигналов были вовлечены как глицин-, так и ГАМК-эргические нейроны СГ. Однако в большинстве исследованных пар нейронов тормозная синаптическая трансмиссия была опосредована пресинаптическим высвобождением глицина. Предложенная нами *in vitro* модель ко-культуры нейронов СГ/ДРСМ, в отличие от ранее разработанных подобных методов, позволяет наиболее полно использовать современные методические подходы в изучении особенностей трансмиссии соматосенсорной информации с периферии в ЦНС, а также дает возможность глубокого исследования специфических свойств синапсов афферентных нейронов.

Ключевые слова: спинальные ганглии, дорсальные рога спинного мозга, ко-культура, синаптическая передача, NMDA-рецепторы, не-NMDA-рецепторы, γ -аминонасыщенная кислота, глицин, вызванные постсинаптические токи.

M. S. Shipshina, N. S. Veselovsky

**CHARACTERISTICS OF SENSORY
NEUROTRANSMISSION IN CO-CULTURE OF
BOTH THE RAT DORSAL ROOT GANGLION
AND THE RAT DORSAL HORN SPINAL CORD
NEURONS**

We examined properties of chemical neurotransmission at the level of primary afferent inputs into spinal cord with the new easy-to-use *in vitro* model of contiguously-cultivated dissociated both the dorsal root ganglion neurons (DRG) and the dorsal horn spinal cord neurons (DHSC) from newborn rats. The results of our studies showed the presence of excitatory and inhibitory DRG neurons synapses on the cells of DHSC. The excitatory afferent signaling in such synapses was mediated by presynaptic release of glutamate and a following activation of both NMDA- and non-NMDA-receptor subclasses.

In these cases the activation of non-NMDA-receptors makes a main contribution to realization of excitatory postsynaptic effects. Either glycine- or GABA-ergic DRG neurons were involved in transmission of inhibitory signals to the DHSC neurons. However, in vast majority of examined neuronal pairs the inhibitory synaptic transmission was mediated by presynaptic release of glycine. As distinct from the previous similar methods, an *in vitro* model of co-culture of both the DRG and the DHSC neurons proposed here allows to use comprehensively modern technical approaches for examination of the transmission of somatosensory information from the periphery to the CNS. The described model could be acceptable for detailed investigation of specific properties of primary afferent synapses.

Key words: dorsal root ganglion, dorsal horn spinal cord, co-culture, synaptic transmission, NMDA- receptors, non-NMDA-receptors, GABA, glycine, evoked postsynaptic currents.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Шеперд Г. Нейробиология. – М.: Мир, 1987. – 454 с.
2. Экклс Дж. Физиология нервных клеток. – М.: Изд-во иностр. лит-ры, 1959. – 298 с.
3. Brown A. G. The dorsal horn of the spinal cord // Q. J. Exp. Physiol. – 1982. – **67**. – P. 193–212.
4. Campeton R. Local control of neurite development by nerve growth factor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1977. – **74**. – P. 4516–4519.
5. Cronin J.N., Bradbury E.J., Lidierth M. Laminar distribution of GABAA- and glycine-receptor mediated tonic inhibition in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord: effects of picrotoxin and strychnine on expression of Fos-like immunoreactivity // Pain. – 2004. – **112**. – P. 156–163.
6. Giesler G.J., Menetrey D., Basbaum A.I. Differential origins of spinothalamic tract projections to medial and lateral thalamus in the rat // J. Compar. Neurol. – 1979. – **184**. – P. 107–126.
7. Gruner W., Silva L.R. w-Conotoxin Sensitivity and Presynaptic Inhibition of Glutamatergic Sensory Neurotransmission *in vitro* // J. Neurosci. – 1994. – **14**, №5. – P. 2800–2808.
8. Hestrin S., Nicoll R.A., Perkel D.J., Sah P. Analysis of excitatory synaptic action in pyramidal cells using whole-cell recording from rat hippocampal slices // J. Physiol. – 1990. – **422**. – P. 203–225.
9. Jonas P., Bischofberger J., Sandkühler J. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse // Science. – 1998. – **281**, № 5375. – P. 419–424.
10. Lee C.J., Labrakakis C., Joseph D.J., Macdermott A.B. Functional similarities and differences of AMPA and Kainate receptors expressed by cultured rat sensory neurons // Neuroscience. – 2004. – **129**. – P. 35–48.
11. Maximov A., Pang Z.P., Tervo D.G., Sudhof T.C.

- Monitoring synaptic transmission in primary neuronal cultures using local extracellular stimulation // *J. Neurosci. Methods.* – 2007. – **161**. – P. 75–87.
12. Mayer M.L., Westbrook G.L., Guthrie P.B. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurons // *Nature.* – 1984. – **309**. – P. 261–263.
 13. Medvedeva Y.V., Veselovsky N.S., Fedulova S.A., Kostyuk P.G. Postsynaptic currents in dorsal root ganglion neurons co-cultured with spinal cord neurons // *Neurophysiology.* – 2001. – **33**. – P. 1–4.
 14. Mitchell E.A., Gentet L.J., Dempster J, Belelli D. GABAA and glycine receptor-mediated transmission in rat lamina II neurones: relevance to the analgesic actions of neuroactive steroids // *J. Physiol.* – 2007. – **583**. – P. 1021–1040.
 15. Morris R., Cheung O., Stewart A., Maxwell D. Spinal dorsal horn neurone targets for nociceptive primary afferents: do single neurone morphological characteristics suggest how nociceptive information is processed at the spinal level // *Brain Res. Rev.* – 2004. – **174**, № 46. – P. 173–190.
 16. Nelson P.G., Pun R.Y., Westbrook G.L. Synaptic excitation in cultures of mouse spinal cord neurones: receptor pharmacology and behavior of synaptic currents // *J. Physiol.* – 1986. – **372**. – P. 169–190.
 17. Ohshiro H., Ogawa S., Shinjo K. Visualizing sensory transmission between dorsal root ganglion and dorsal horn neurons in co-culture with calcium imaging // *J. Neurosci. Methods.* – 2007. – **165**. – P. 49–54.
 18. Sah P., Hestrin S., Nicoll R.A. Properties of excitatory postsynaptic currents recorded in vitro from rat hippocampal interneurons // *J. Physiol.* – 1990. – **430**. – P. 605–616.
 19. Sikand P., Premkumar L.S. Potentiation of glutamatergic synaptic transmission by protein kinase C-mediated sensitization of TRPV1 at the first sensory synapse // *Ibid.* – 2007. – **581**, № 2. – P. 631–647.
 20. Todd A.J., Spike R.C. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn // *Prog. Neurobiol.* – 1993. – **41**. – P. 609–645.
 21. Todd A. J., Watt C, Spike R.C., Sieghart W. Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord // *J. Neurosci.* – 1996. – **76**, № 3. – P. 974–982.
 22. Vikman K.S., Backström E., Kristensson K., Hill R.H. A two-compartment in vitro model for studies of modulation of nociceptive transmission // *J. Neurosci. Methods.* – 2001. – **105**. – P. 175–184.
 23. Watson N. Synaptic interactions between the terminals of slow-adapting type II mechanoreceptor afferents and neurones expressing -aminobutyric acid- and glycine-like immunoreactivity in the rat spinal cord // *J. Comp. Neurol.* – 2004. – **471**. – P. 168–179.
 24. Yoshimura M., Jessell T.M. Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord // *J. Physiol.* – 1990. – **430**. – P. 315–335.
 25. Yoshimura M., Nishi S. Blind patch-clamp recordings from substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices: Pharmacological properties of synaptic currents // *Neuroscience.* – 1993. – **53**. – P. 519–526.
 26. Yoshimura M., Nishi S. Primary afferent-evoked glycine- and GABA-mediated IPSPs in substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord in vitro // *J. Physiol.* – 1995. – **482**. – P. 29–38.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: shipshina@ya.ru

Матеріал надійшов до редакції 12.01.2010