

# Особливості перерозподілу НМДА- та АМПА-рецепторів у синасах між гангліозними клітинами сітківки та нейронами *superficial superior colliculus*

Г.В. Думанська, О.В. Рихальський, М.С. Веселовський

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: Dootannya@gmail.com

*Ми досліджували розподіл НМДА- і АМПА-рецепторів та їх функціональних особливостей у реалізації збудливої нейропередачі між гангліозними клітинами сітківки (ГКС) та нейронами *superficial superior colliculus* (SSC) в *in vitro* моделі зорового тракту. Модель являє собою первісну кокультуру дисоційованих клітин сітківки та нейронів SSC. Викликані постсинаптичні струми (вПСС) були зареєстровані на нейронах SSC у відповідь на локальну електричну позаклітинну стимуляцію аферентних аксонів ГКС. Проаналізували зміни кінетичних характеристик наростання та спаду вПСС у парах ГКС-нейрон SSC у відповідь на деполаризацію постсинаптичного нейрона залежно від тривалості культивування. Результати наших досліджень показали, що на етапі формування синаптичних контактів між ГКС та нейронами SSC НМДА-рецептори на постсинаптичних мембранах відіграють провідну роль. У разі ж сформованого синаптичного зв'язку передача сенсорного сигналу опосередковується переважно АМПА-рецепторами. Таким чином, існує перерозподіл специфічних функцій глутаматних постсинаптичних НМДА- та АМПА-рецепторів у процесі формування та розвитку синаптичних контактів між ГКС та нейронами SSC.*

*Ключові слова: гангліозні клітини сітківки; нейрони *superficial superior colliculus* кокультура; викликані постсинаптичні струми; НМДА-рецептори; АМПА-рецептори.*

## ВСТУП

Зоровий тракт формується аксонами гангліозних клітин сітківки (ГКС), які забезпечують передачу аферентного сигналу в підкіркові центри головного мозку. *Superficial superior colliculus* (SSC) є зоровим рефлекторним центром, котрий забезпечує інтеграцію і передачу інформації у вищі відділи головного мозку. Проекції ГКС у SSC відображають перший рівень передачі, обробки сенсорних сигналів і зазнають значного структурного та функціонального вдосконалення незадовго до народження і до кінця третього постнатального тижня [1].

Більшість збудливих синапсів у центральній нервовій системі є глутаматергічними. Глутаматні НМДА-рецептори виявляються на ранніх етапах розвитку [2]. У багатьох відділах головного мозку їх активність пригнічу-

ється з розвитком синаптичних структур та зі зниженням здатності синаптичних контактів до структурної модифікації [3]. Нещодавно було показано, що робота НМДА-рецепторів може змінювати структуру постсинаптичної щільності включенням та усуненням АМПА-рецепторів і, таким чином, модулювати силу та стабільність синаптичних контактів у процесі розвитку [4]. Включення АМПА-рецепторів у постсинаптичну мембрану та їх усунення за допомогою інтерналізації є важливим процесом регуляції синаптичної сили, що лежить в основі механізму пам'яті та навчання. Водночас експерименти *in vivo* виявили, що хронічне блокування НМДА-рецепторів не впливає на розвиток та роботу АМПА-рецепторів [5]. Отже, зниження активності НМДА-рецепторів у процесі розвитку збігається в часі з завершенням формування ретинотопічних проєкцій сітківки в SSC та з втратою здатно-

сті синаптичних контактів до реорганізації. Однак досі всі складові процесу формування проекції сітківки в SSC не відомі.

Мета нашої роботи – дослідження розподілу функціональних ролей НМДА- та АМПА-рецепторів у реалізації збудливої нейропередачі між ГКС та нейронів SSC в умовах кокультування.

## МЕТОДИКА

Культувували дисоційовані клітини сітківки та нейрони SSC згідно з розробленою нами методикою, яка була описана раніше [6, 7]. Всі маніпуляції з лабораторними тваринами були проведені з дотриманням положень Конвенції з біоетики Ради Європи (1997), Хельсінкської декларації Всесвітньої Медичної Асоціації (1996), Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), загальних етичних принципів наукових досліджень, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 р.), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2006), інших міжнародних угод та національного законодавства у цій галузі. Коротко, тканини сітківки та SSC новонароджених щурів дисоціювали за допомогою ферментативної та механічної дезагрегації. Отримані суспензії клітин, щільністю близько  $10^4$  клітин/см<sup>2</sup>, переносили в окремі компартменти камер для кокультування. Самі камери розміщали на покривних скельцях у чашках Петрі. Після адгезії клітин до основи, камери знімали і надалі кокультура перебувала в умовах інкубатора в атмосфері повітряно-газової суміші з підвищеним вмістом двоокису вуглецю ( $5 \pm 0,5\%$  CO<sub>2</sub>), при  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  та вологості не менше ніж 80%. В експеримент відбирали пари синаптично зв'язаних нейронів, візуально простежуючи проекції аксонів пресинаптичних ГКС на нейрони SSC. Покривне скельце з кокультуваними нейрона-

ми розміщали в робочій камері, заповненій стандартним зовнішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl<sub>2</sub> – 2, MgCl<sub>2</sub> – 2, HEPES – 20, глюкоза – 10; pH 7,4. Усі реактиви фірми “Sigma” (США). В експериментах з реєстрації НМДА-опосередкованих викликаних постсинаптичних струмів (ВПСС) використовували безмагнієвий зовнішньоклітинний розчин, оскільки наявність іонів магнію не давала можливості зареєструвати ці струми при підтримуваному потенціалі  $-70$  мВ. Селективні блокатори НМДА- та АМПА-рецепторів – D<sub>L</sub>-APV та DNQX відповідно, аплікували у концентрації 20 мкмоль/л.

ВПСС, що виникали у відповідь на локальну електричну позаклітинну стимуляцію аферентних аксонів ГКС, реєстрували у нейронах SSC, використовуючи метод patch-clamp в конфігурації “ціла клітина” в режимі фіксації напруги. Для локальної електричної позаклітинної стимуляції скляну піпетку перпендикулярно підводили до пресинаптичного аксона на відстань від 2 до 3 мкм. Заповненні відповідним зовнішньоклітинним розчином стимулюючі піпетки мали опір 8–10 МОм. Саму стимуляцію здійснювали прикладанням деполяризуючих імпульсів амплітудою 4–5 В та тривалістю 2–3 мс з частотою 0,5 с<sup>-1</sup>.

Patch-піпетки з внутрішнім діаметром кінчика 1–1,5 мкм були виготовлені з боросилікатних скляних капілярів (“World Precision Instruments”, США). Внутрішньоклітинний розчин був такого складу (ммоль/л): калій глюконат – 155, EGTA – 0,5, MgCl<sub>2</sub> – 1, HEPES – 20; pH 7,4. Всі реактиви фірми “Sigma” (США). Заповнені цим розчином patch-піпетки мали опір 5–7 МОм. Якість фіксації потенціалу протягом експерименту контролювали за допомогою моніторингу варіацій значень амплітуди струму витоку ( $I_{\text{вит}}$ ) та сталої часу емнісного струму ( $\tau_{\text{емн}}$ ) у відповідь на короткий (10 мс) прямокутний стимул невеликої амплітуди ( $-10$  мВ). Отримані результати аналізували лише в тому разі, якщо варіації значень  $\tau_{\text{емн}}$  та  $I_{\text{вит}}$

не перевищували 20%.

Отримані вПСС мали синаптичну затримку в діапазоні 1,2–3,7 мс. Відносно коротка та стала затримка за умов вибраного температурного режиму протягом експерименту (20–25 °С) дала змогу визначити такі вПСС, як моносинаптичні. Аналізували кінетичні параметри вПСС – час наростання та сталу часу спаду. Час наростання вПСС розраховували за висхідною частиною кривої струму від 10 до 90% пікової амплітуди. Сталу часу спаду струму визначали апроксимацією низхідної частини струму однією або двома експонентами. Відсотковий внесок НМДА-/АМПА-опосередкованого струму з інтегрального розраховували як відсоткове відношення амплітуд відповідних струмів.

Обробку та візуалізацію результатів виконували за допомогою програмного пакету Clamfit 9.0 (“Axon Instruments”, США) та Origin 8.5 (“OriginLab Corporation”, США).

## РЕЗУЛЬТАТИ

Нами було досліджено 64 синаптичнозв’язані пари ГКС-нейрон SSC (рис. 1) у період від 10 до 47 діб культивування. При реєстрації

в стандартному зовнішньоклітинному розчині при підтримуваному потенціалі –70 мВ вПСС характеризувалися часом наростання  $2,95 \pm 0,61$  мс ( $n = 28$ ), а спад струмів апроксимувався однією експонентою з середньою постійною часу  $3,92 \pm 0,59$  ( $n = 28$ ).

Ми проаналізували зміни кінетичних характеристик наростання та спаду вПСС у відповідь на деполяризацію постсинаптичного нейрона SSC залежно від тривалості культивування. Час наростання та кінетика спаду вПСС, зареєстрованих від пар ГКС-нейрон SSC, взятих в експеримент протягом перших 3 тиж кокультивування ( $n = 17$ ), достовірно змінювалися, починаючи зі значення підтримуваного потенціалу –30 мВ (рис. 2, а, в). Тоді як кінетичні характеристики вПСС, зареєстрованих від пар ГКС-нейрон SSC після 3 тиж кокультивування ( $n = 11$ ), не виявили достовірних змін (рис. 2, б, г). У таких випадках аплікація  $D_L$ -APV при підтримуваному потенціалі –70 мВ не викликала суттєвого зменшення амплітуд вПСС і не впливала на кінетику спаду. Аплікація DNQX повністю блокувала вПСС (рис. 3, а).

Ми також провели серію експериментів в безмагнієвому зовнішньоклітинному розчині

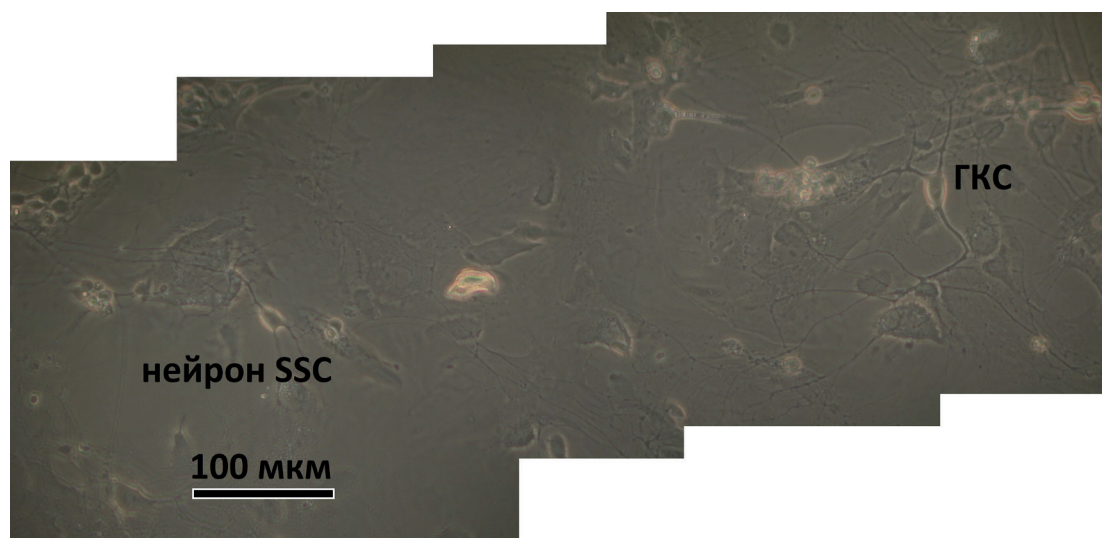


Рис. 1. Реконструйоване мікрофотографічне зображення синаптичнозв’язаної пари гангліозної клітини сітківки (ГКС) та нейрона superficial superior colliculus (SSC) на 24-ту добу культивування

при підтримуваному потенціалі  $-70$  мВ. За таких умов вПСС, що були зареєстровані від пар ГКС-нейрон SSC, взятих в експеримент протягом 3 перших тижнів кокультування поділялися на дві групи. Спад струмів першої групи апроксимувався однією експонентою зі сталою часу  $51,24 \pm 6,25$  мс ( $n = 11$ ). Середній час наростання вПСС становив  $4,92 \pm 1,02$  мс ( $n = 11$ ). Такі струми були опосередковані виключно НМДА-компонентою [8] і повністю блокувалися аплікацією  $D_L$ -APV (див. рис. 3, в). Спад струмів другої групи апроксимувався двома експонентами зі сталими часу  $2,87 \pm 0,73$ ,  $45,24 \pm 5,36$  мс ( $n = 13$ ). Середній час наростання таких вПСС становив  $4,58 \pm 1,96$  мс ( $n = 13$ ). Струми другої групи були опосередковані активацією постсинаптичних НМДА- і АМ-

ПА-рецепторів. Аплікація DNQX дала змогу виділити НМДА-компонент таких вПСС з середньою амплітудою  $-54,12 \pm 3,12$  пА.

У синаптично зв'язаних парах ГКС-нейрон SSC, взятих в експеримент після 3 тиж кокультування, зареєстровані моносинаптичні вПСС характеризувалися більш повільним двоекспоненційним спадом  $2,56 \pm 0,56$ ,  $41,24 \pm 8,4$  мс ( $n = 12$ ), а середній час наростання становив  $4,65 \pm 1,48$  мс. Кінетика наростання та спаду таких вПСС достовірно не змінювалася при різних значеннях підтримуваного потенціалу. Аплікація DNQX дала змогу виділити НМДА-компонент вПСС з середньою амплітудою  $-20,56 \pm 2,14$  пА та часом наростання  $5,64 \pm 1,12$  мс ( $n = 12$ ). Спад апроксимувався однією експонентою зі сталою часу  $48,24 \pm 7,54$  мс ( $n = 12$ ). На-

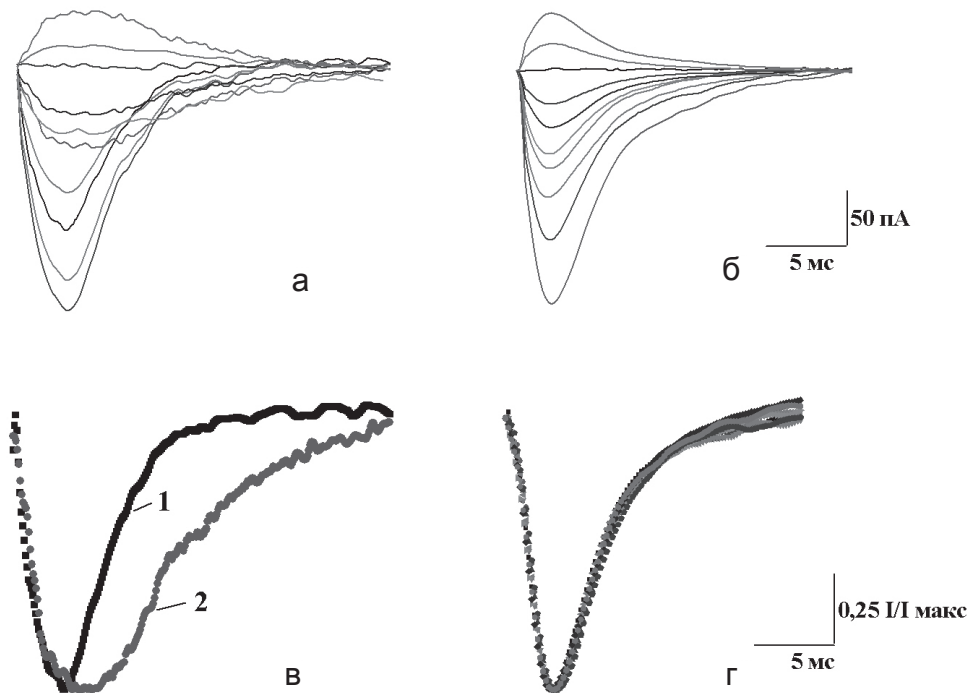


Рис. 2. Кінетичні характеристики викликаних постсинаптичних струмів (вПСС) відведених від нейронів superficial superior colliculus (SSC) у відповідь на локальну електричну позаклітинну стимуляцію аферентних аксонів гангліозних клітин сітківки (ГКС). а – записи вПСС пар ГКС-нейрон SSC, взятих в експеримент протягом перших 3 тиж кокультування, при значенні підтримуваного потенціалу, що змінювався від  $-70$  до  $+20$  мВ з інкретментом  $10$  мВ. б – нормовані вПСС пар ГКС-нейрон SSC зображені на а; 1, 2 – при значенні підтримуваного потенціалу  $-70$  мВ та  $-30$  мВ відповідно. в – записи вПСС пар ГКС-нейрон SSC, взятих в експеримент після 3 тиж кокультування, при значенні підтримуваного потенціалу, що змінювався від  $-70$  до  $+20$  мВ з інкретментом  $10$  мВ. г – нормовані вПСС пар ГКС-нейрон SSC зображені на в

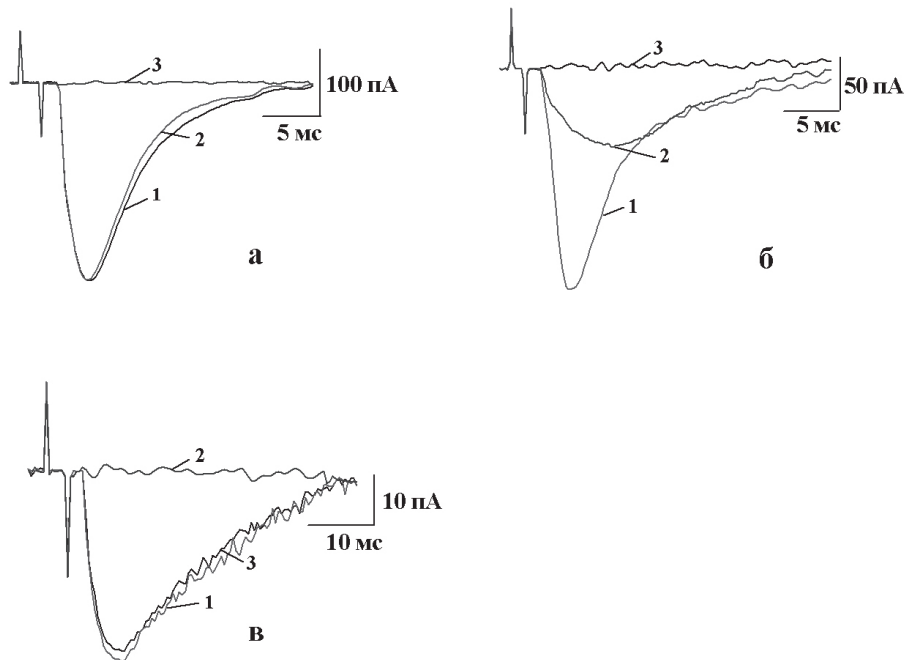


Рис. 3. Фармакологічні властивості викликаних постсинаптичних струмів (вПСС) зареєстрованих на нейронах SSC у відповідь на локальну електричну позаклітинну стимуляцію аксонів гангліозних клітин сітківки (ГКС). а – дія блокаторів глутаматергічної синаптичної передачі на вПСС реєстрованих в парах ГКС-нейрон SSC при зовнішньоклітинній концентрації  $Mg^{+2}$  2 ммоль/л: 1 – вПСС в контролі, 2 – при аплікації 20 мкмоль/л  $D_L$ -APV, 3 – при аплікації 20 мкмоль/л DNQX. б – дія блокаторів глутаматергічної синаптичної передачі на вПСС реєстрованих в парах ГКС-нейрон SSC в безмагнієвому зовнішньоклітинному розчині: 1 – вПСС в контролі, 2 – при аплікації 20 мкмоль DNQX, 3 – при аплікації 20 мкмоль  $D_L$ -APV. в – дія блокатора НМДА-рецепторів на вПСС зареєстрованих в безмагнієвому зовнішньоклітинному розчині: 1 – вПСС в контролі, 2 – при аплікації 20 мкмоль/л  $D_L$ -APV, 3 – після відмиву блокатора

явність  $D_L$ -APV повністю блокувала цей компонент вПСС (див. рис. 3, б). Тобто описані струми опосередковувалися НМДА- та АМПА-компонентами.

## ОБГОВОРЕННЯ

Нами були досліджені особливості перерозподілу функціональних ролей НМДА- та АМПА-рецепторів у реалізації збуджувальної нейропередачі між ГКС та нейронами SSC в *in vitro* моделі зорового тракту за допомогою аналізу змін кінетичних характеристик вПСС. Ми також провели ідентифікацію компонентів інтегрального струму за допомогою аплікації блокаторів НМДА- та АМПА-рецепторів. Отримані результати свідчать про

вивільнення глутамату як збуджувального нейромедіатора в терміналях аферентних волокон зорового тракту, які входять в SSC. ВПСС у парах ГКС-нейрон SSC опосередковувалися активацією постсинаптичних як виключно НМДА-рецепторних комплексів на ранніх етапах кокультування, так і НМДА- і АМПА-рецептор-каналних комплексів, що узгоджується з даними інших авторів [9, 10]. В експериментах з використанням стандартного зовнішньоклітинного розчину з концентрацією 2 ммоль  $Mg^{+2}$ , виявилось неможливим виділити НМДА-компоненту зВПСС при підтримуваному потенціалі  $-70$  мВ. Цей ефект пояснюється потенціалзалежним блокуванням НМДА-рецепторкерowanego каналу іонами магнію [11]. Зняття  $Mg^{+2}$ -блоку



деполяризацією змінювало кінетику спаду та часовий хід вПСС у парах ГКС-нейрон SSC, взятих в експеримент протягом перших 3 тиж кокультування, при зміні підтримуваного потенціалу до  $-30$  мВ. Водночас ці показники вПСС у парах ГКС-нейрон SSC, взятих в експеримент після 3 тиж кокультування залишалися незмінними. Таким чином, внесок НМДА-компоненти в інтегральний вПСС на етапі формування синаптичних контактів між ГКС та нейронами SSC *in vitro* є суттєвим, бо скасування  $Mg^{+2}$ -блоку вплинуло на час наростання та кінетику спаду струмів.

Використання безмагнієвого зовнішньоклітинного розчину дало змогу виявити вПСС, які опосередковані активацією виключно НМДА-рецепторів (100%,  $n = 11$ ), а також виділити НМДА-компоненту з інтегрального вПСС. Відсотковий внесок НМДА-опосередкованого струму в парах ГКС-нейрон SSC, взятих в експеримент протягом перших 3 тиж кокультування, становив  $48,33 \pm 3,56$  % інтегрального вПСС ( $n = 13$ ). Водночас, починаючи з 3-го тижня культивування сягав  $15,53 \pm 2,14$ % інтегрального вПСС ( $n = 12$ ). Оцінені нами зміни відсоткового внеску НМДА-компоненти в інтегральному струмі залежно від тривалості кокультування відображають перерозподіл типів глутаматних рецепторів у синапсах між ГКС та нейронами SSC протягом кокультування. Час наростання та повільні і швидкі сталі спаду струмів обох груп за різних тривалостей культивування достовірно не відрізнялися при  $P = 0,05$  і відповідали даним, описаним раніше при дослідженні глутаматергічної НМДА- та АМПА-опосередкованої синаптичної передачі [12].

Ми виявили, що на етапі формування синаптичних контактів між ГКС та нейронами SSC НМДА-рецептори на постсинаптичних мембранах відіграють провідну роль. У разі ж сформованого синаптичного зв'язку передача сенсорного сигналу опосередковується переважно АМПА-рецепторами. Таким чином, існують певні специфічні зміни функціональ-

ного значення типів глутаматних постсинаптичних рецепторів у процесах синаптогенезу та активність залежного вдосконалення синаптичних контактів між ГКС та нейронами SSC в *in vitro* моделі зорового тракту.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.*

**А.В. Думанская, О.В. Рихальский,  
Н.С. Веселовский**

#### **ОСОБЕННОСТИ ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЯ НМДА- И АМПА-РЕЦЕПТОРОВ В СИНАП- САХ МЕЖДУ ГАНГЛИОЗНЫМИ КЛЕТКАМИ СЕТЧАТКИ И НЕЙРОНАМИ SUPERFICIAL SUPERIOR COLLICULUS**

Исследовали распределение НМДА- И АМПА-рецепторов и их функциональных особенностей в реализации возбуждающей нейротрансмиттерной передачи между ганглиозными клетками сетчатки (ГКС) и нейронами superficial superior colliculus (SSC) в *in vitro* модели зрительного пути. Модель – первичная культура диссоциированных клеток сетчатки и нейронов SSC. Вызванные постсинаптические токи (вПСТ) были зарегистрированы на нейронах SSC в ответ на локальную электрическую внеклеточную стимуляцию афферентных аксонов ГКС. Мы проанализировали изменения кинетических характеристик нарастания и спада вПСТ в парах ГКС-нейрон SSC в ответ на деполяризацию постсинаптического нейрона в зависимости от длительности культивирования. Результаты наших исследований показали, что основную роль в процессе формирования контактов между ГКС и нейронами SSC играют НМДА-рецепторные комплексы. На этапе же сформированного синаптического контакта передача сенсорного сигнала опосредуется в основном АМПА-рецепторами. Таким образом, существует перераспределение специфических функций глутаматных постсинаптических НМДА- и АМПА-рецепторов в процессе формирования и развития синаптических контактов между ГКС и нейронами SSC. Ключевые слова: ганглиозные клетки сетчатки; нейроны superficial superior colliculus; культура; вызванные постсинаптические токи; НМДА-рецепторы; АМПА-рецепторы.

H.V. Dumanska, O.V. Rikchalsky, N.S. Veselovsky

## THE CHANGES IN DISTRIBUTION OF NMDA- AND AMPA-RECEPTORS IN RETINOCOLLICULAR SYNAPSES

*O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv;  
e-mail: Doomannya@gmail.com*

We investigated the changes in distribution of the NMDA- and AMPA-receptors in the synapses in the *in vitro* model of the retinocollicular pathway. The model was a primary coculture of the retinal cells and superficial superior colliculus (SSC) neurons. Evoked postsynaptic currents (ePSCs) were recorded in SSC neurons in response to local electrical extracellular stimulation of the afferent retinal ganglion cells' (RGC) axons. We analyzed the changes in the kinetic characteristics of ePSCs at different holding potentials during cocultivation. The results obtained reflect that NMDA receptors play an essential role in the formation of the retinocollicular synapses. After the formation of retinocollicular connections, the main role in the sensory signal transmission belongs to AMPA receptors. Thus, the data obtained indicate the specific dynamic changes of the functional roles of NMDA- and AMPA-receptors in the formation and development of the retinocollicular synaptic contacts. Key words: retinal ganglion cells; superficial superior colliculus neurons; coculture; NMDA-receptors; AMPA-receptors.

### REFERENCES

1. Mrcic-Flogel TD, Hofer SB, Creutzfeldt C, Cloëz-Tayarani I, Changeux JP, Bonhoeffer T, Hübener M. Altered map of visual space in the superior colliculus of mice lacking early retinal waves. *J Neurosci.* 2005 Jul 20;25(29):6921-8.
2. Simon DK, Prusky GT, O'Leary DD, Constantine-Paton M. N-methyl-D-aspartate receptor antagonists disrupt the

- formation of a mammalian neural map. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992 Nov 15;89(22):10593-7.
3. Carmignoto G, Vicini S. Activity-dependent decrease in NMDA receptor responses during development of the visual cortex. *Science.* 1992 Nov 6;258(5084):1007-11.
  4. Shi SH, Hayashi Y, Petralia RS, Zaman SH, Wenthold RJ, Svoboda K, Malinow R. Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science.* 1999 Jun 11;284(5421):1811-6.
  5. Colonnese MT, Shi J, Constantine-Paton M. Chronic NMDA receptor blockade from birth delays the maturation of NMDA currents, but does not affect AMPA/kainate currents. *J Neurophysiol.* 2003 Jan;89(1):57-68.
  6. Dumanska H, Veselovsky N. Short-term hypoxia induces bidirectional pathological long-term plasticity of neurotransmission in visual retinocollicular pathway. *Exp Eye Res.* 2019 Feb;179:25-31.
  7. Dumanska GV, Rykhalsky OV, Veselovsky MS. Characteristics of quantal release of glutamate and GABA in synapses between retinal ganglion cells and superior colliculus neurons in coculture. *Fiziol Zh.* 2014;60(1):3-10. [Ukrainian].
  8. Voigt T, Opitz T, de Lima AD. Activation of early silent synapses by spontaneous synchronous network activity limits the range of neocortical connections. *J Neurosci.* 2005 May 4;25(18):4605-15.
  9. Shah RD, Crair MC. Retinocollicular synapse maturation and plasticity are regulated by correlated retinal waves. *J Neurosci.* 2008 Jan 2;28(1):292-303.
  10. Furman M, Crair MC. Synapse maturation is enhanced in the binocular region of the retinocollicular map prior to eye opening. *J Neurophysiol.* 2012 Jun;107(11):3200-16.
  11. Mayer ML, Westbrook GL, and Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature.* 1984;309:261-263.
  12. Sah P, Hestrin S, Nicoll RA. Properties of excitatory postsynaptic currents recorded *in vitro* from rat hippocampal interneurons. *J Physiol.* 1990 Nov;430:605-16.

*Матеріал надійшов  
до редакції 30.04.2021*