

Переваги використання кокультур дисоційованих пре- та постсинаптичних нейронів для досліджень синаптичної передачі

Г.В. Думанська, М.С. Веселовський

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАНУ, doomanu@biph.kiev.ua

У цій статті представлено переваги використання кокультури первинних дисоційованих пре- та постсинаптичних нейронів як експериментальної моделі для вивчення механізмів нейропередачі в сенсорних трактах у нормі та за патологічних умов. Як приклад, розглянуто модель зорового тракту – кокультуру дисоційованих клітин сітківки та нейронів superficial superior colliculus (SSC). В даній моделі кожна синаптично зв'язана пара гангліозна клітина сітківки (ГКС) – нейрон SSC відображає окреме волокно зорового тракту, що дає змогу досліджувати моносинаптичну передачу сигналу на чітко ідентифікованих клітинах. Крім того, модель забезпечує можливість поєднання методики парного «patch-clamp» із швидкою локальною суперфузією для безперервного моніторингу моносинаптичної нейропередачі між ГКС та нейронами SSC під впливом фармакологічних агентів або патологічних чинників із високою часовою роздільною здатністю.

Ключові слова: кокультура пре- та постсинаптичних нейронів, синаптична передача, сенсорний тракт, метод парного «patch-clamp», швидка локальна суперфузія, гіпоксія.

ВСТУП

Дослідження функціонування сенсорних систем у нормі та патології є актуальним питанням сьогодення, оскільки відкриває можливості для розробки нових методів профілактики та лікування відповідних порушень. Вибір адекватного та зручного експериментального об'єкта є ключовим для відтворення специфічних міжнейронних взаємодій і отримання достовірних результатів. Попередні дослідження синаптичної передачі у сенсорних системах, зокрема міжгангліозними клітинами сітківки (ГКС) та нейронами верхнього пласту одного з підкоркових зорових центрів – superficial superior colliculus (SSC), проводили або *in vivo* [1, 13, 15, 17], або *in vitro* на парасагітальних гострих (переживаючих) зрізах SSC [4, 11, 16, 20]. Реєстрація нейропередачі у таких випадках проводилась у нейронах SSC у відповідь на електричну стимуляцію “наосліп” stratum

opticum – пласту Superior colliculus, що містить велику кількість різних аферентних проєкцій, включно з проєкціями від сітківки. Основним обмеженням вищеописаних підходів є відсутність можливості візуалізації та ідентифікації конкретного пресинаптичного волокна, а також контролю генерацію в ньому потенціалу дії. Крім того, зазвичай подібна стимуляція “наосліп” викликає полісинаптичні відповіді, що загалом ускладнює інтерпретацію отриманих результатів. Це підкреслило необхідність створення більш адекватної моделі для дослідження сенсорної нейропередачі.

В нейрофізіологічних дослідженнях використання клітинних культур надає можливість відтворення складних процесів функціонування та взаємодії нейронних мереж у контрольованому середовищі. Культури первинних дисоційованих нейронів, що утворюються шляхом ферментативної та механічної

дисоціації тканини, зберігають генетично зумовлені властивості клітин *in vivo*, включаючи здатність формувати функціонально специфічні синаптичні контакти [8]. Кокультура первинних дисоційованих пре- та постсинаптичних нейронів дозволяє відтворити основні структурно-функціональні особливості сенсорних шляхів. З метою відтворення просторово та функціонально специфічних зв'язків нами створена оригінальна камера для кокультування нейронів різних відділів головного та спинного мозку [21]. Основна ідея створення кокультури полягала в просторовому розмежуванні суспензій пре- та постсинаптичних нейронів на початковому етапі їхньої адгезії до основи з подальшим кокультуванням. Таким чином надається можливість пресинаптичним клітинам регенерувати свої відростки та формувати генетично-детерміновані контакти з постсинаптичними нейронами–мішенями. Подібна модель дозволяє відтворити основні структурно-функціональні особливості відповідного сенсорного сигнального шляху. Це створює унікальні умови для використання сучасних методів електрофізіологічної реєстрації, аналізу синаптичної передачі, механізмів пластичності та дослідження ранніх проявів впливу різних патологічних факторів [6]. Крім того, модель кокультури є зручною платформою для тестування фармакологічних агентів, адже поєднує високу відтворюваність *in vitro* з функціональною наближеністю до фізіологічних умов.

В даній статті ми представимо модель зорового тракту – кокультуру первинних дисоційованих клітин сітківки та нейронів SSC. Опишемо переваги досліджень синаптичної передачі в даній моделі, а також можливості комбінації сучасних методів електрофізіологічної реєстрації з методикою швидкої локальної суперфузії.

МЕТОДИКА

Електрофізіологічні дослідження синаптичної передачі між ГКС та нейронами

SSC проводили в моделі зорового тракту – кокультури дисоційованих клітин сітківки та нейронів SSC. В експериментах використовували білих новонароджених щурів лінії Wistar, обох статей. Тварин декапітували у відповідності до Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, 18 березня 1986 р.), та Рекомендацій Першого Національного конгресу з питань біоетики (Київ, Україна, 20 вересня 2001 р.) в стерильних умовах. План та процедури експериментів були схвалені Комісією з біоетики Інституту фізіології ім. Богомольця НАНУ (протокол № 5/25 від 25.06.2025 р.).

Камера для кокультування опорно-залежних клітин. Нами розроблено пристрій для кокультування опорнозалежних клітин – камеру для кокультування [21], схема якої представлена на рис. 1А. Пристрій складається з силіконового кільця (2) з гладенькою основою, що забезпечує герметичне закріплення на покривному склі (1), та скляної перегородки (5) завтовшки 0,13–0,17 мм, розташованої перпендикулярно до основи і розділяючи камеру на два компартменти (3 і 4). Перед встановленням камери покривне скло попередньо обробляли поліорнітином (“Sigma”, США) для покращення адгезії клітин. Зібрану камеру для кокультування розміщували у чашці Петрі до моменту використання.

Приготування суспензій первинних дисоційованих клітин сітківки та нейронів *superficial superior colliculus*. Очне яблуко та Superior colliculus виділяли з однієї тварини та занурювали в мінімальне середовище Ігла з буфером Hepes, до якого додавали 25 од/мл бензилпеніциліну та 25 мг/мл стрептоміцину сульфату (“Sigma”, США). Superior colliculus очищали від судинної плівки та відділяли поверхневий шар (Superficial Superior colliculus, SSC). Тканину SSC розрізали скальпелем на фрагменти та переносили у розчин з ферментом (Trypsin type XI “Sigma”, 10 хв

за температури 37 °C). З очного яблука видаляли рогівку, кристалик та склоподібне тіло. Сітківку відокремлювали від хоріоїдеї та розділяли на фрагменти. Ферментативна обробка сітківки трипсином (Trypsin type XI “Sigma”) тривала 8 хв за температури 37 °C. Після ферментації тканини сітківки та SSC промивали середовищем для культивування: мінімальне середовище Ігла з додаванням 26 мМ натрію бікарбонату NaHCO_3 , 1,25 % розчину інсуліну, 25 од/мл бензилпеніциліну, 25 мг/мл стрептоміцину сульфату (реактиви фірми “Sigma”) та 10 % кінської сироватки (“Gibco”). Механічну дезагрегацію тканин проводили шляхом багаторазового пропускання через пастерівські піпетки різного, щораз меншого діаметру (600 мкм, 400 мкм та 250 мкм). Після розведення кінцеві щільності суспензій клітин сітківки і SSC складали порядку 10^4 клітин/см².

Кокультивування первинних дисоційованих клітин сітківки та нейронів *Superficial Superior Colliculus*. Отримані суспензії розміщали в окремих компартментах підготовлених камер для кокультивування та інкубували в атмосфері повітряно-газової суміші з підвищеним вмістом двоокису вуглецю (5 % CO_2), за температури 37 °C та вологості не менше 80 % протягом 1 години, щоб клітини обох популяцій прикріпились до основи (рис. 1, Б). Після цього камери знімали, обережно відокремлюючи силіконове кільце від покривного скельця, і додавали по 2 мл середовища для культивування в кожену чашку Петрі. На третю добу культивування додавали цитозин- β -D-арабіно-фуранозид (ARAC; “Sigma”, США) в концентрації $8 \div 10$ мкМ для блокування проліферації гліальних клітин та утворення моношару. Наступної доби проводили повну заміну культурального середовища, надалі – часткову заміну кожні чотири доби. В процесі кокультивування ГКС регенерували свої відростки та формували генетично-детерміновані синаптичні контакти з нейронами SSC (рис. 1 В, Г). В отриманій ко-

культурі кожна синаптично зв’язана пара ГКС – нейрон SSC відображає окреме волокно зорового тракту, що дозволяє досліджувати моносинаптичну нейропередачу на чітко ідентифікованих клітинах.

Електрофізіологічна реєстрація. Покривне скельце з кокультивованими нейронами розміщали в робочій камері, заповненій стандартним зовнішньоклітинним розчином наступного складу (мМ): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl_2 – 2, MgCl_2 – 2, HEPES – 20, глюкоза – 10 (реактиви фірми “Sigma”, США); pH 7,4. Петч-піпетки з внутрішнім діаметром кінчика 1–1,5 мкм були виготовлені з боросилікатних скляних капілярів (“World Precision Instruments”, США). Внутрішньоклітинний розчин петч-піпетках мав наступний склад (в мілімолях на 1 л): калію-глюконат – 155, EGTA – 0,5, MgCl_2 – 1, HEPES – 20 (всі реактиви фірми “Sigma”, США); pH 7,4. Заповненні таким розчином петч-піпетки мали опір 6–8 МОм.

В кокультурі синаптично зв’язані пари визначали, візуально простежуючи проекції

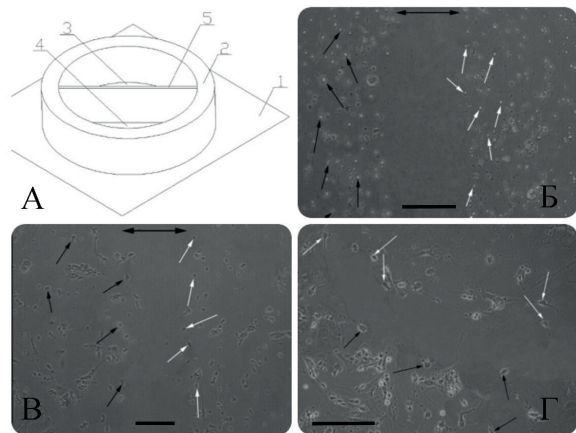


Рис. 1. Кокультивування дисоційованих клітин сітківки та нейронів SSC. А - камера для кокультивування опорнозалежних клітин: 1 - покривне скельце, 2 - силіконове кільце, 3 та 4 - компартменти культуральної камери, утворені посередництвом скляної перегородки - 5; Б, В та Г – дисоційовані клітини сітківки та нейрони SSC на 0, 3 та 9 добу кокультивування, відповідно. Чорними стрілками вказані ГКС, білими – нейрони SSC; двостороння стрілка вказує на межу розподілу клітин різних популяцій; масштаб відповідає 100 мкм.

аксонів ГКС на нейрони SSC. Підтверджували ідентифікацію нейронів за встановленими морфологічними та електрофізичними параметрами [5, 7, 9]. Діаметр соми нейрона визначали, як середнє арифметичне максимальних діаметрів соми за двома перпендикулярними осями. Необхідним та достатнім критерієм ідентифікації електрофізіологічної ідентифікації ГКС та нейронів SSC в кокультурі була наявність специфічної викликаної електричної активності у відповідь на тривалий деполяризуючий поштовх струму, характерної для цих клітин *in vivo* [5, 7, 9, 10, 18]. Мембранні потенціали ГКС та нейронів SSC варіювалися від -50 до -70 мВ.

Електрофізіологічні реєстрації проводили з використанням методу парного «patch-clamp» в конфігурації «ціла клітина» в режимах фіксації струму та потенціалу за температури $20-25^{\circ}\text{C}$. НМДА-рецептор опосередковані викликані постсинаптичні струми (вПСС) реєстрували за підтримуваного потенціалу -70 мВ в безмагнієвому зовнішньоклітинному розчині. Наявність іонів Mg^{2+} у стандартному зовнішньоклітинному розчині потенціал-залежно блокувала реєстрацію НМДА-опосередкованих відповідей [12, 14]. В усіх експериментах концентрації іонів хлору для зовнішньо- та внутрішньоклітинного розчинів становили $151-144$ та 2 ммоль/л відповідно. За цих концентрацій при підтримуваному потенціалі хлорні вПСС через канали GAMK_A -рецепторканалних комплексів мали вихідний напрямок та гіперполяризували мембрану нейронів, а струми через канали іонотропних глутаматних рецепторів – вхідний напрямок і деполяризували. Таким чином, під час реєстрації ставало можливим візуально розрізняти збуджувальні та гальмівні постсинаптичні струми, що значно полегшувало аналіз експериментальних результатів.

Контроль якості фіксації потенціалу протягом експерименту здійснювали за допомогою моніторингу варіацій значень амплітуди струму витоку ($I_{\text{вит}}$) та сталої часу емнісного струму ($\tau_{\text{емн}}$) у відповідь на корот-

кий (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% .

Імітували короточасні стани гострої гіпоксії протягом електрофізіологічної реєстрації шляхом аплікації відповідних гіпоксичних розчинів на синаптично зв'язані пари методом швидкої локальної суперфузії [19]. Гіпоксичні розчини ($0,19$ мг/л O_2) готували безпосередньо перед експериментом шляхом барботування відповідного зовнішньоклітинного розчину азотом протягом 20 хв.

Обробку та візуалізацію даних виконували за допомогою програмного пакету Clamfit 9.0 (“Axon Instruments”, США), Excel 2007 (“Microsoft Corporation”, США) та Origin 8 Pro (“OriginLab Corporation”, США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Морфологічна та електрофізіологічна ідентифікація нейронів в кокультурі. Електрофізіологічні експерименти на отриманій кокультурі проводили починаючи з 11-ї доби кокультивування. Проекції ГКС на нейрони SSC легко візуалізувались на фоні гліального моношару. Діаметри сом пресинаптичних ГКС були порядку $20-25$ мкм. Постсинаптичні нейрони SSC в кокультурі характеризувались меншим діаметром соми і були порядку 15 мкм. Ідентифікація потенційних пар підтверджувалась наявністю специфічної викликаної електричної активності. У ГКС характер активності в залежності від тривалості кокультивування можна було розділити на три групи: генерацією одиничного ПД, швидкою адаптивністю та високочастотною генерацією ПД протягом усього стимулу (рис. 2 А, Б та В).

Нейрони SSC рівномірно відповідали на тривалі деполяризуючі поштовхи струму або гамаритмічною активністю (рис. 3 А), або регулярною генерацією ПД (рис. 3. Б) протягом всього стимулу.

Реєстрація синаптичної передачі в кокультурі. Фармакологічно-ізолювані НМДА-, АМПА- та ГАМК_A-рецептор опосередковані вПСС реєстрували в постсинаптичних нейронах SSC у відповідь на генерацію потенціалів дії (ПД) у пресинаптичних ГКС рис.4. Пресинаптичну клітину – ГКС-утримували в режимі фіксації струму. ПД викликали деполяризуючими поштовхами струму тривалістю 3–5 мс, амплітудою 100–300 пА з частотою 0,5 Гц. Постсинаптичний нейрон SSC утримували в режимі фіксації потенціалу на рівні – 70 мВ та реєстрували вПСС у відповідь на кожний пресинаптичний ПД. Таким чином, метод парного «patch-clamp» дає змогу одночасно контролювати виникнення ПД на сомі пресинаптичної ГКС і реєструвати вПСС на сомі постсинаптичного нейрона SSC. Всі вПСС мали синаптичну затримку в діапазоні 3,1–3,7 мс. Коротка та стала затримка, за умов вибраного температурного режиму протягом експерименту, дозволяла визначити такі вПСС як моносинаптичні [2, 3].

Комбінація методів парного «*patch-clamp*» та швидкої локальної суперфузії в кокультурі. Розроблена *in vitro* модель зорового тракту, у поєднанні з унікальною комбінацією методів електрофізіологічної реєстрації та швидкої локальної суперфузії (рис. 5), забезпечила можливість дослідження

впливу патологічних факторів та фармакологічних агентів на синаптичну передачу між ГКС та нейронами SSC вже з перших секунд їхньої дії. Крім того, таке поєднання дає змогу безперервно відстежувати параметри синаптичної передачі та електрофізіологічні характеристики нейронів у контролі, під час дії експериментальних агентів чи факторів та після їхнього впливу, зберігаючи при цьому цілісність дослідження на рівні окремих пар клітин. Це дозволило нам вперше детально охарактеризувати гіпоксія-індуковані зміни синаптичної передачі між ГКС та нейронами SSC[6].

ВИСНОВКИ

Таким чином, використання кокультури первинних дисоційованих нейронів сітківки та SSC відкриває широкі перспективи для фармакологічних та електрофізіологічних досліджень. Вона дозволяє детально аналізувати механізми функціонування синаптичної передачі у контрольованих умовах та отримувати статистично надійні результати. Кокультура забезпечує роботу з чітко ідентифікованими парами нейронів, які зберігають свої функціональні характеристики, що робить її зручною експериментальною моделлю для вивчення як нормальної фізіології, так і механізмів

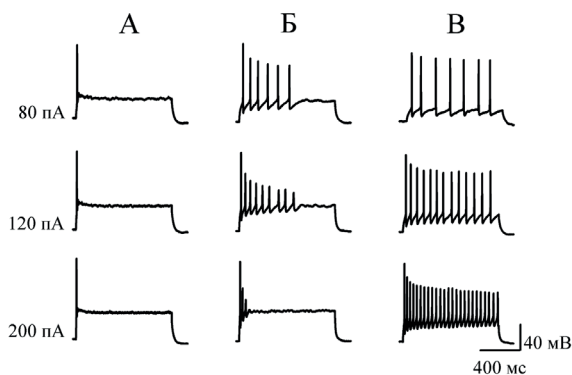


Рис. 2. Викликана електрична активність культивованих ГКС у відповідь на тривалий деполяризуючий поштовх струму. А – генерація одиничного потенціалу дії (ПД). Б – швидка адаптація. В – високочастотна генерація ПД.

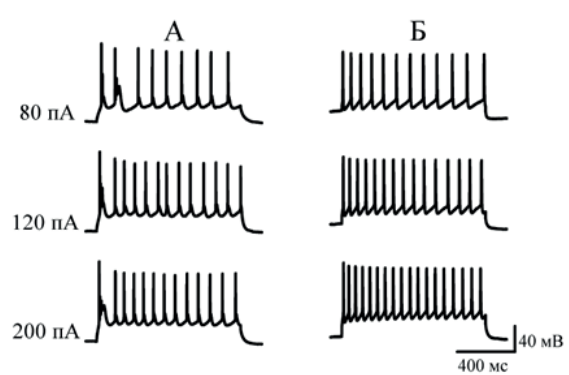


Рис. 3. Викликана електрична активність культивованих нейронів SSC у відповідь на тривалий деполяризуючий поштовх струму. А – гамма ритмічна активність. Б – регулярна генерація потенціалів дії

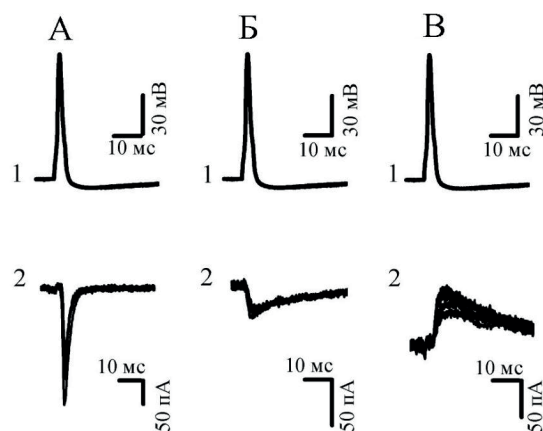


Рис. 4. Парна реєстрація в синаптично зв'язаних парах ГКС та нейронів SSC. А, Б, В - приклади типових АМПА-, НМДА- та ГАМК_A-рецепторопосередкованих постсинаптичних струмів (2) нейронів SSC у відповідь на генерацію потенціалу дії (1) в ГКС відповідно

патологічних змін у сенсорних трактах. Крім того, ця модель дозволяє ефективно комбінувати сучасні електрофізіологічні та фармакологічні підходи, включаючи швидку локальну суперфузію та парний patch-clamp, для високоточних досліджень синаптичної динаміки.

Наразі за підтримки гранту Національного фонду досліджень України № 2023.05/0023 ми досліджуємо роль протеїн кінази C у гіпоксія-індукованому дисбалансі збуджувальної та гальмівної нейротрансмісії між ГКС та нейронами SSC in vitro моделі зорового тракту.

H.V. Dumanska, M.S. Veselovsky

ADVANTAGES OF USING COCULTURES OF DISSOCIATED PRE- AND POSTSYNAPTIC NEURONS FOR STUDIES OF SYNAPTIC TRANSMISSION

*Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv;
e-mail: doomanya@biph.kiev.ua*

This study highlights the advantages of using a coculture of primary dissociated pre- and postsynaptic neurons as an experimental model for investigating the mechanisms of neurotransmission in sensory pathways under normal and pathological conditions. As an example, we present the model of the visual retinocollicular pathway — a coculture of rat retinal cells and neurons of the superficial layers of the superior col-

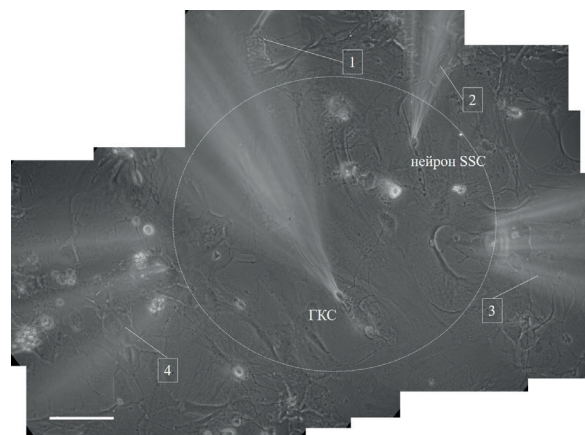


Рис.5. Реконструйована мікрофотографія синаптично зв'язаної пари ГКС та нейрону SSC у кокультурі під час реєстрації з використанням парного «patch-clamp» та швидкої локальної суперфузії на 21-й день кокультування; коло штрих пунктиром відображає область аплікації; масштаб відповідає 100 мкм. Де 1 та 2 - петч-піпетки, а 3 та 4 – подаюча та відсмоктуюча піпетки швидкої локальної суперфузії відповідно

liculus (SSC). In this model, each synaptically connected pair of a retinal ganglion cell (RGC) and SSC neuron represents a single fiber of the retinocollicular pathway, allowing study of monosynaptic neurotransmission between precisely identified cells. Moreover, this system enables the combination of paired patch-clamp recordings with fast local superfusion, providing continuous monitoring of monosynaptic retinocollicular neurotransmission under the influence of pharmacological agents or pathological factors with high temporal resolution. Keywords: coculture of pre- and postsynaptic neurons, synaptic transmission, sensory pathway, paired patch-clamp technique, fast local superfusion, hypoxia.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ:

1. Chandrasekaran HR, Plas DT, Gonzales E, Crair MC. Evidence for an instructive role of retinal activity in retinotopic map refinement in the colliculus superior of the mouse. *J Neurosci.* 2005;25:6929-6938.
2. Cline HT, Tsien RW. Glutamate-induced increases in intracellular Ca²⁺ in cultured frog tectal cells mediated by direct activation of NMDA receptor channels. *Neuron.* 1991;6:259-267.
3. Cline H T, Debski E, Constantine-Paton M. NMDA receptor antagonist desegregates eye-specific stripes. *Proc. Nat. Acad. Scie.* 1987;84:4342-4345.
4. Colonnese MT, Shi J, Constantine-Paton M. Chronic NMDA receptor blockade from birth delays the maturation NMDA currents, but does not affect AMPA/kainite currents. *J Neurophysiol.* 2003;89:57-68.
5. Dowling JE. *The Retina: an Approachable Part of the Brain.* Belknap Press Harvard Univ. Press, Cambridge;

1987. p. 20–50.
6. Dumanska H, Veselovsky N. Short-term hypoxia induces bidirectional pathological long-term plasticity of neurotransmission in visual retinocollicular pathway. *Exp Eye Res.* 2019;179:25-31. doi: 10.1016/j.exer.2018.10.014.
7. Guenther E, Schmid S, Grantyn R and Zrenner E. In vitro identification of retinal ganglion cells in culture without the need of dye labeling. *J. Neurosci. Methods.* 1993;51:177–181.
8. Li Y, Irwin N, Yin Y, Lanser M, Benowitz LI. Axon regeneration in goldfish and rat retinal ganglion cells: differential responsiveness to carbohydrates and cAMP. *J Neurosci.* 2003;(21):7830–7838.
9. Lilley S, Robbins J. The rat retinal ganglion cell in culture: An accessible CNS neurone. *J Pharm. Toxicol. Methods.* 2004;51:209–220.
10. Lo FS, Cork RJ, Mize RR. Physiological Properties of Neurons in the Optic Layer of the Rat's Colliculus superior. *J Neurophys.* 1998;80:331–343.
11. Lo FS, Mize RR. Synaptic regulation of L-type Ca^{2+} channel activity and long-term depression during refinement of the retinocollicular pathway in developing rodent colliculus superior. *J Neurosci.* 2000;20: RC58.
12. Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA responses in spinal cord neurons. *Nature.* 1984;309:261–263.
13. Mrsic-Flogel DT, Hofer SB, Creutzfeldt C, Cloëz-Tayarani I, Changeux JP, Bonhoeffer T, and Hübener M. Altered map of visual space in the colliculus superior of mice lacking early retinal waves. *J Neurosci.* 2005;25:6921–6928.
14. Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbert A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature.* 1984;307:462–465.
15. Razak KA, Huang L, Pallas SL. NMDA receptor blockade in the colliculus superior increases receptive field size without altering velocity and size tuning. *J Neurophysiol.* 2003;90:110-119.
16. Shah RD, Crair MC. Mechanisms of response homeostasis during retinocollicular map formation. *J Physiol.* 2008;586(18):4363-4369.
17. Simon DK, O'Leary DD. Development of topographic order in the mammalian retinocollicular projection. *J Neurosci.* 1992;12:1212–1232.
18. Tabata T, Kano M. Heterogeneous intrinsic firing properties of vertebrate retinal ganglion cells. *J Neurophysiol.* 2002;87:30–41.
19. Veselovsky NS, Engert F, Lux HD. Fast local superfusion technique. *Pflugers Arch.* 1996;432(2):351–4.
20. Xue L, Zhang F, Chen X, Lin J, Shi J. PZD protein mediated activity-dependent LTP/LTD developmental switch at rat retinocollicular synapse. *J Physiol. Cell Physiol.* 2010;298:1572–1582.
21. Думанська ГВ, Веселовський МС. Пристрій для спільного культивування нейронів різних відділів головного та спинного мозку. Патент України на корисну модель № 26863 Україна, МПК C12N 5/02. заявник і патентовласник НТУУ “КПІ” – заявл. 25.02.2007; опубл. 10.10.2007, Бюл. №16.