

О.П. Мізерна, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

Участь N-типу потенціалкерованих кальцієвих каналів у регуляції пластичності гальмівної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа

Відомо, що N-тип високопорогових кальцієвих каналів бере участь у регуляції синаптичної передачі в багатьох терміналах центральної нервової системи. Проте дотепер залишається невідомою їхня роль у регуляції короткочасної пластичності ГАМКергічної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа. У цій роботі ми досліджували чутливість ГАМКергічної депресії при парній стимуляції, яка є однією із форм короткочасної пластичності, до селективного блокатора N-типу високопорогових кальцієвих каналів ω – конотоксину (GVIA). Для вимірювання викликаних гальмівних постсинаптичних струмів були застосовані методики фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина» та позаклітинної локальної електричної парної стимуляції аксона пресинаптичного нейрона. При аплікації ω -конотоксину (200 нмоль/л та 1 мкмоль/л) спостерігалось дозозалежне незворотне зниження амплітуди парних струмів на 25–49 % і зменшення депресії на 11–22 % порівняно з контролем. Зроблено висновок, що N-тип кальцієвих каналів відіграє важливу роль у регуляції синаптичної передачі та короткочасної пластичності ГАМКергічної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа.

Ключові слова: N-тип кальцієвих каналів, ω -конотоксин – GVIA, ГАМКергічна синаптична передача, короткочасна синаптична пластичність, депресія при парній стимуляції.

ВСТУП

Синаптична пластичність, що зумовлена попередньою активністю синапсу, проявляється в зміні ефективності передачі при парній стимуляції. Депресія при парній стимуляції – це одна із форм короткочасної синаптичної пластичності, під час якої спостерігається зменшення ефективності передачі в результаті попередньої активності. Вважають, що короткочасна синаптична пластичність є результатом численних клітинних механізмів, що можуть включати як пресинаптичні (у нервовому закінченні), так і постсинаптичні (у клітині-мішені) події. Найбільш поширеним пресинаптичним механізмом вважають зменшення кількості вивільненого нейромедіа-

тора, що може відображати спустошення пулу готових до вивільнення везикул [9, 18, 19]. Крім того, зниження ефективності синаптичної передачі може бути наслідком зменшення вмісту іонів кальцію, що надходять у пресинаптичну терміналь, інактивації кальцієвих каналів [5] та активації метаболічних авторецепторів у терміналі [14]. Постсинаптичний механізм, який може впливати на ефективність передачі – це десенситизація лігандкерованих рецепторів постсинаптичного нейрона [12, 19]. Проте дослідження, що були проведені на культивованих нейронах гіпокампа показали, що при короткотривалій парній аплікації екзогенного ГАМК роль постсинаптичного механізму в явищі депресії є мінімальною і що депресія переважно не залежить від

© О.П. Мізерна, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

пресинаптичних метаботропних рецепторів [9, 17].

Відомо, що вивільнення нейромедіатора опосередковане входом Ca^{2+} в нервові закінчення через потенціалкервані кальцієві канали [10]. Швидка синаптична передача в центральній нервовій системі ссавців є результатом одночасної активації різних типів високопорогових кальцієвих каналів: L, N, P/Q і R [15]. Роль кожного з них у регуляції збудливої [7, 11] та гальмівної [7, 13] синаптичної передачі в гіпокампі була продемонстрована за допомогою використання селективних блокаторів цих каналів. Було досліджено, що L-тип кальцієвих каналів не регулює низькочастотне синхронне вивільнення нейромедіатора [8]. Існують дані, що R-тип кальцієвих каналів бере участь у регуляції швидкої збудливої синаптичної передачі між нейронами гіпокампа [6], проте в процесі швидкого вивільнення гальмівного медіатора він не задіяний на відміну від N- та P/Q-типів [3]. Хоча в гіпокампі швидка синаптична передача є результатом активації N- та P/Q-типів кальцієвих каналів, саме N-тип відіграє більш суттєву роль у гальмівній синаптичній передачі [13].

Мета нашої роботи – дослідити роль N-типу кальцієвих каналів у регуляції ГАМК-ергічної депресії при парній стимуляції.

МЕТОДИКА

Приготування культури дисоційованих нейронів гіпокампа. Для отримання культури використовували новонароджених щурів лінії Вістар. Тварин декапітували, головний мозок вміщували в мінімальне середовище Ігла («Sigma», США) з додаванням 20 ммоль/л буфера HEPES, 25 од/мл натрієвої солі бензилпеніциліну та 25 мкг/мл стрептоміцину сульфату. Гіпокамп відокремлювали за допомогою скальпеля та нарізали на поперечні смужки 1–2 мм завтовшки. Ферментативну обробку здійснювали 0,05%-м розчином трипсину (тип II, «Sig-

ma», США) при кімнатній температурі (23–25°C) протягом 7 хв. Потім тканину промивали два рази розчином для культивування такого складу: мінімальне середовище Ігла, кінська сироватка – 10 %, інсулін – 6 мкг/мл, бікарбонатний буфер NaHCO_3 – 2,3 мг/мл, натрієва сіль бензилпеніциліну – 25 од/мл і сульфат стрептоміцину – 25 мкг/мл. Суспензію клітин отримували за допомогою механічної дисоціації набором пастерівських піпеток з діаметрами кінчиків, які послідовно зменшувалися. Клітини висаджували в чашку Петрі, яка була попередньо оброблена полі-L-орнітином. У скляне кільце діаметром 6 мм, яке обмежувало площу посадки, наливали 200 мкл суспензії. Чашки Петрі з суспензією вміщували в інкубатор («Jouan», Франція) з контрольованими вмістом двоокису вуглецю (5 % CO_2) в повітряно-газовій суміші температурним режимом (37°C) та постійним пасивним зволоженням. На 3-тю добу культивування для пригнічення проліферації гліальних клітин у середовище додавали цитозин- β -D-арабіно-фуранозид (5 мкмоль/л). Режим обробки культури за допомогою останнього підбирали таким чином, щоб пригнітити проліферацію гліальних клітин на такій стадії, коли кількість астроцитів була достатньою для утворення гліального моношару. Повторну повну заміну розчину для культивування проводили через 24 год.

Електрофізіологічні методи. Для вимірювання викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС), які відводили від культивованих нейронів гіпокампа було застосовано метод фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина». Експериментальна установка для реєстрації іонних струмів була зібрана на базі інвертованого мікроскопа Axiovert 35 («Carl Zeiss», Німеччина).

У роботі використовували підсилювач електричних сигналів Axopatch-1D («Axon Instruments», США), який давав можливість вимірювати постсинаптичні струми та визначати природний потенціал спокою нейронів у режимі фіксації струму. Підтри-

муваний потенціал в експериментах становив -50 мВ. Потенціал спокою всіх клітин був у межах від -50 до -60 мВ.

Електричні сигнали, які відводилися від нервових клітин, піддавали фільтрації за допомогою апаратного високочастотного фільтра Бесселя з частотою зрізу 2 кГц. Оцифровку результатів під час експерименту здійснювали за допомогою аналогово-цифрового перетворювача TL-1 («Axon Instruments», США) з частотою дискретизації 10 кГц. Для подальшої обробки та аналізу викликаних гальмівних постсинаптичних струмів використовували програмний пакет pClamp 9.0 («Axon Instruments», США).

Локальну електричну стимуляцію проводили за допомогою приладу з ізольованим виходом ISO-Flex («AMPI», Ізраїль). Стимуляційну мікропіпетку з діаметром отвору близько 2 мкм, яку виготовляли за технологією аналогічно піпеткам для реєстрації струмів, заповнювали стандартним зовнішньоклітинним сольовим розчином і з'єднували з виходом стимулятора. Опір такої піпетки, заповненої розчином, становив $7-9$ МОм. Струми реєстрували при подразненні аксона прямокутними імпульсами напруги негативної полярності тривалістю $0,4$ мс. Частота стимуляції становила $0,5$ Гц, інтервал між імпульсами в парі – 150 мс.

У дослідах використовували зовнішньоклітинний розчин такого складу (ммоль/л): NaCl – 140 , KCl – 3 , CaCl₂ – 2 , MgCl₂ – 2 , глюкозу – 30 , HEPES – 20 ; pH $7,4$ (NaOH); до цього розчину додавали також блокатори збуджувальної нейротрансмісії D_L-2-аміно-5-фосфоновалеріанову кислоту (D_L-AP5) і 6,7-динітрохіноксалін-2,3-діон (DNQX) у концентрації 20 мкмоль/л. Розчин для заповнення відвідної скляної піпетки містив (ммоль/л): глюконат калію – 155 , MgCl₂ – 2 , EGTA – 10 , HEPES – 20 ; pH $7,4$ (KOH).

Для аплікації фармакологічних речовин було застосовано методику швидкої локальної суперфузії, розробленої спеціально для

роботи з моношаровою культурою клітин [16].

Результати в тексті представлені у вигляді «середнє значення» \pm «середньоквадратична похибка середнього (S.E.M.)». Статистичну обробку результатів проводили з використанням критерію t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ

Основним гальмівним нейромедіатором у головному мозку ссавців є γ -аміномасляна кислота (ГАМК), яка активує різні типи ГАМК-рецепторів [19]. Постсинаптичні струми були викликані зовнішньою локальною парною стимуляцією окремого пресинаптичного аксона прямокутними імпульсами струму тривалістю $0,4$ мс з міжімпульсним інтервалом 150 мс. Потенціал реверсії моносинаптичних ГАМКергічних ВГПСС відповідав рівноважному хлорному потенціалу E_{Cl} ($E_r = -90,36$ мВ ± 3 мВ; $n = 4$). Це вказує на те, що отримані ВГПСС опосередковані через ГАМК_A-рецептори, які розташовані на постсинаптичній мембрані (результати не представлено). Як кількісну міру синаптичної пластичності було обрано коефіцієнт парної стимуляції (КПС), який обчислювали як відношення амплітуди 2-го ВГПСС у парі до 1-го. Депресію при стимуляції парою імпульсів було визначено як явище, при якому КПС < 1 . Досліджені нейрони демонстрували тільки депресію при парній стимуляції.

Оскільки вхід Ca²⁺ в терміналь через високопорогові кальцієві канали відіграє визначальну роль у механізмі вивільнення нейромедіатора, ми вирішили дослідити дію їх блокаторів на синаптичну передачу та пластичність гальмівної синаптичної передачі в культурі нейронів гіпокампа щура. Відомо, що Cd²⁺ у досить великих концентраціях є неселективним блокатором потенціалкеруваних кальцієвих каналів, тоді як при концентраціях, менших ніж 20 мкмоль/л, його можна вважати блокатором лише ви-

сокопорогових кальцієвих каналів [1]. У цій роботі ми використовували Cd^{2+} у таких концентраціях: 1, 2 і 5 мкмоль/л. Аплікація кадмію достовірно дозозалежно зменшувала амплітуду парних струмів (рис. 1,а). Залежно від концентрації блокатора, частка Cd^{2+} -чутливих кальцієвих каналів, які брали участь у синаптичній передачі була 41–86 %. До того ж, під впливом кадмію спостері-

галося зменшення депресії порівняно з контролем на 14–42 % (див. рис. 1,в). Для того щоб відокремити роль саме N-типу від усіх високопорогових кальцієвих каналів у регуляції ефективності синаптичної передачі, ми використали селективний його блокатор ω -конотоксин – GVIA у концентраціях 200 нмоль/л і 1 мкмоль/л. Аплікація ω -конотоксину дозозалежно незворотно

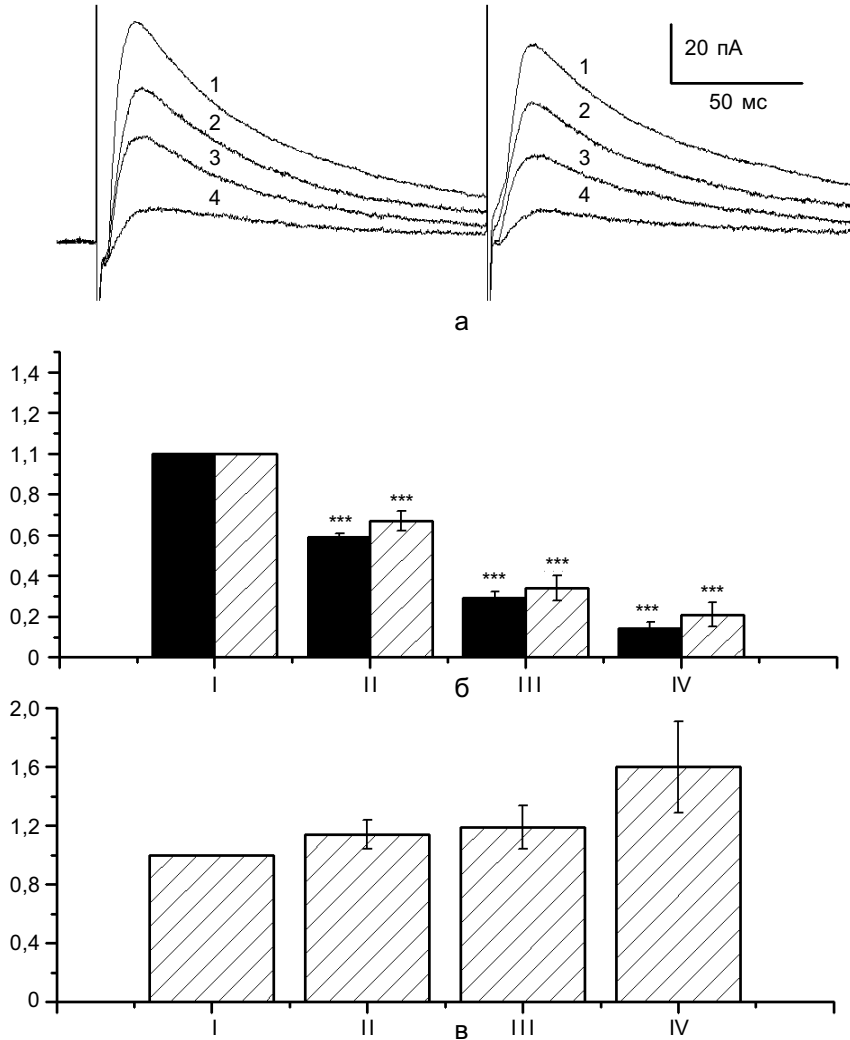


Рис. 1. Дія кадмію на викликанні гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС) у культивованих нейронах гіпокампа: а – приклад реєстрації усереднених вГПСС у контролі (1) та при почерговій аплікації Cd^{2+} (2–1 мкмоль/л; 3–2 мкмоль/л, 4–5 мкмоль/л). Усереднення проводили за 15 послідовними вГПСС (підтримуваний потенціал становив – 50 мВ); б – амплітудна гістограма нормованих значень амплітуди 1-го та 2-го вГПСС у парі, зареєстрованих у фізіологічному розчині та при аплікації Cd^{2+} (n = 6). За одиницю прийнято амплітуду вГПСС у контролі. 1 – 1-й вГПСС у парі, 2 – 2-й вГПСС у парі; в – гістограма, що показує збільшення нормованих значень коефіцієнта парної стимуляції при аплікації Cd^{2+} (n = 6). За одиницю прийнято значення коефіцієнта парної стимуляції у контролі. На б, в: I – контроль, II – 1 мкмоль/л, III – 2 мкмоль/л, IV – 5 мкмоль/л. ***P<0,001

зменшила амплітуду парних струмів на 25–49 % (рис. 2,а). Також під впливом блокатора спостерігалось зменшення депресії порівняно з контролем на 11–22 % (див. рис. 2,в). Амплітуди 2-го вГПСС були менш чутливими до обох блокаторів (33–81 і 18–38 % відповідно), ніж амплітуди 1-го вГПСС (див. рис. 1, 2,б). Відносні значення 1-го та 2-го вГПСС у парі, а також КПС

після аплікації Cd^{2+} та ω -конотоксину наведено в таблиці.

ОБГОВОРЕННЯ

Із досліджень, проведених на нейронах культури гіпокампа, було показано, що десенситизація не бере участі в регуляції короткочасної синаптичної пластичності [9],

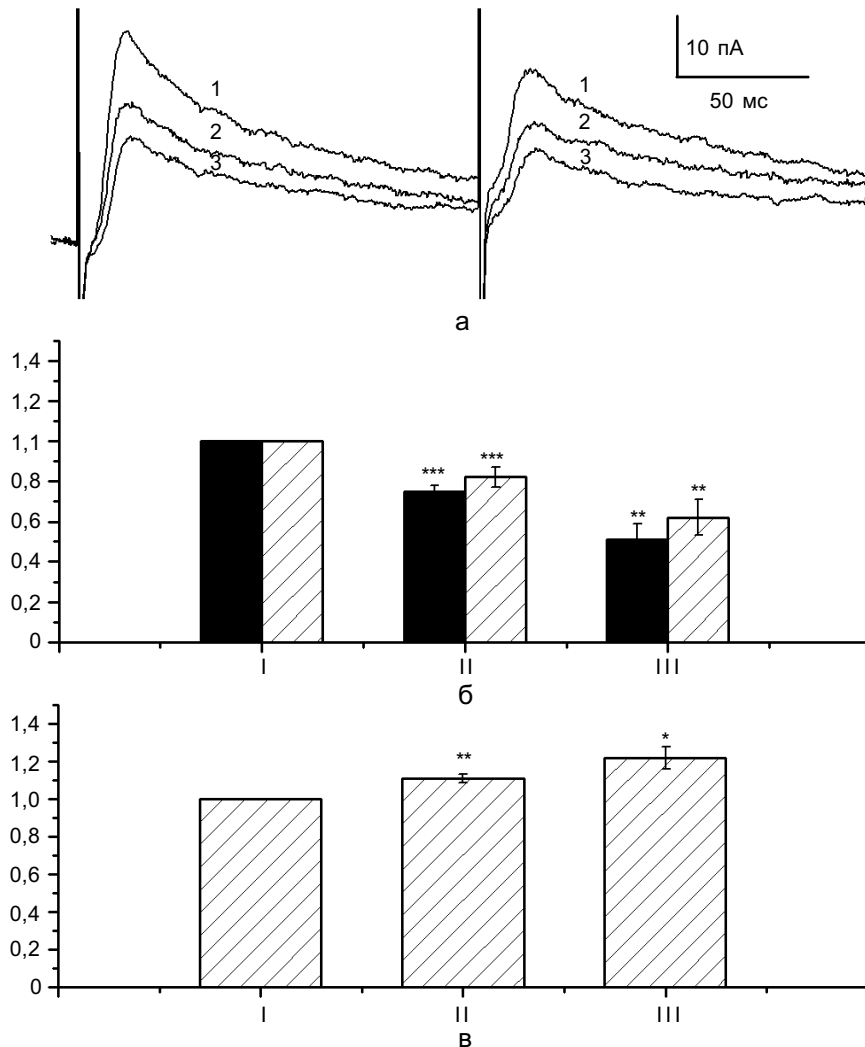


Рис. 2. Дія ω - конотоксину – GVIA на викликанні гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС) у культивованих нейронах гіпокампа: а – приклад реєстрації усереднених вГПСС у контролі (1) та при почерговій аплікації ω -конотоксину (2 – 200 нмоль/л; 3–1 мкмоль/л). Усереднення проводилось за 15 послідовними вГПСС (підтримуваний потенціал становив – 50 мВ); б – амплітудна гістограма нормованих значень амплітуди 1-го та 2-го вГПСС у парі, зареєстрованих в фізіологічному розчині та при аплікації ω - конотоксину (n = 6). За одиницю прийнято амплітуду вГПСС у контролі. I – 1-й вГПСС у парі, 2 – 2-й вГПСС у парі; в – гістограма, що показує збільшення нормованих значень коефіцієнта парної стимуляції при аплікації ω - конотоксину (n = 6). За одиницю прийнято значення коефіцієнта парної стимуляції у контролі. На б,в: I – контроль, II – 200 нмоль/л, III – 1 мкмоль/л. *P<0,05, **P<0,01, ***P<0,001

Порівняння усереднених характеристик парних викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) при дії Cd²⁺ і блокатора N-типу високопорогових кальцієвих каналів ω- конотоксину (S.E.M.; n = 6)

Показник	Cd ²⁺			ω- КОНОТОКСИН	
	1 мкмоль/л	2 мкмоль/л	5 мкмоль/л	200 нмоль/л	1 мкмоль/л
Відносна амплітуда					
1-го вГПСС	0,59±0,02***	0,29±0,03***	0,14±0,03***	0,75±0,03***	0,51±0,06**
2-го вГПСС	0,67±0,05***	0,34±0,06***	0,19±0,05***	0,82±0,05**	0,62±0,07**
Відносний коефіцієнт парної стимуляції	1,14±0,10	1,19±0,15	1,42±0,23	1,11±0,04**	1,22±0,04*

*P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 відносно контролю.

що депресія не залежить від активації ГАМК_B-рецепторів [9, 17], тому це явище може бути повністю регульоване іншими пресинаптичними механізмами, які пов'язані зі входом кальцію у терміналь [19]. Оскільки в механізмах вивільнення нейро-медіатора та формування синаптичної пластичності вхід Ca²⁺ у терміналь саме через потенціалкеровані кальцієві канали відіграє вирішальну роль, у цій роботі ми змінювали потік вхідного Ca²⁺, використовуючи блокатори високопорогових кальцієвих каналів, щоб дослідити внесок цих каналів у регуляцію явища депресії.

Насамперед ми з'ясували, що неселективний блокатор високопорогових кальцієвих каналів Cd²⁺ дозозалежно пригнічує ГАМКергічну синаптичну передачу та зменшує депресію, викликану парною стимуляцією. На відміну від наших результатів, у дослідах, проведених на аутопсах культури гіпокампа, Cd²⁺ не змінював рівень депресії [2]. При аплікації селективного блокатора N-типу високопорогових кальцієвих каналів ω-конотоксину – GVIA спостерігали достовірне незворотне зниження амплітуди парних струмів і зменшення рівня депресії порівняно із контролем. Наші результати узгоджуються із даними, отриманими на більшості синапсах ЦНС, які свідчать, що зменшення потоку Ca²⁺ в пресинаптичну терміналь знижує депресію, зменшуючи початкове вивільнення нейро-медіатора [19] та підтверджують, що N-тип потенціалкерованих кальцієвих каналів відіграє дуже важливу роль у регуляції

синаптичної передачі та безпосередньо бере участь у регуляції короточасної пластичності ГАМКергічної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа.

О.П. Мизерная, С.А. Федуллова, Н.С. Веселовский

УЧАСТИЕ N-ТИПА ПОТЕНЦИАЛЗАВИСИМЫХ Кальциевых КАНАЛОВ В РЕГУЛЯЦИИ ПЛАСТИЧНОСТИ ТОРМОЗНОЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ МЕЖДУ НЕЙРОНАМИ КУЛЬТУРЫ ГИППОКАМПА

Известно, что N-тип высокопороговых кальциевых каналов принимает участие в регуляции синаптической передачи во многих синапсах ЦНС. Однако до сих пор остается неизвестной роль N-типа этих каналов в регуляции кратковременной пластичности ГАМКергической синаптической передачи между нейронами культуры гиппокампа. В данной работе мы исследовали чувствительность ГАМКергической депрессии при парной стимуляции, которая является одной из форм кратковременной пластичности, к селективному блокатору N-типа высокопороговых кальциевых каналов ω – конотоксина – GVIA. Для измерения вызванных тормозных постсинаптических токов были использованы методики фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» и внеклеточной локальной электрической парной стимуляции аксона пресинаптического нейрона. При аплікации ω- конотоксина (200 нмоль/л и 1 мкмоль/л) наблюдалось дозозависимое необратимое уменьшение амплитуды парных токов на 25–49 % и снижение уровня депрессии на 11–22 % в сравнении с контролем. Таким образом, был сделан вывод, что N-тип кальциевых каналов играет очень важную роль в регуляции синаптической передачи и кратковременной пластичности ГАМКергической синаптической передачи между нейронами культуры гиппокампа. Ключевые слова: N-тип кальциевых каналов, ω-конотоксин – GVIA, ГАМКергическая синаптическая передача, кратковременная синаптическая пластичность, депрессия при парной стимуляции.

O.P. Mizerna, S.A. Fedulova, N.S. Veselovsky

THE ROLE OF N-TYPE HIGH-VOLTAGE-ACTIVATED Ca^{2+} CHANNELS TO GABAERGIC SHORT-TERM SYNAPTIC PLASTICITY IN CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS

Now it is clear that N-type Ca^{2+} channels contribute to synaptic transmission at many of CNS synapses. However, it is not known whether presynaptic N-type Ca^{2+} channels contribute to short-term synaptic plasticity (STP) mediated by GABA release at inhibitory synapses of cultured hippocampal neurons. We studied the sensitivity of GABAergic paired pulse depression (PPD) as a common form of STP to selective N-type high-voltage-activated Ca^{2+} channels blocker omega-conotoxin (CgTx). Evoked inhibitory postsynaptic currents (eIPSCs) were studied using patch-clamp technique in whole-cell configuration in postsynaptic neuron and local extracellular paired pulse stimulation of single presynaptic axon by rectangular pulse with 0.4 ms duration, the interpulse interval in pair was 150 ms. CgTx (200 nM; 1 μ M) in a dose-dependent manner irreversibly reduced the amplitude of paired eIPSCs by 25–49% and decreased PPD by 11–22% compared with control. These results confirm that N-type Ca^{2+} channels are highly involved in inhibitory synaptic transmission and short-term synaptic plasticity in cultured hippocampal neurons.

Key words: N-type calcium channels, ω -conotoxin GVIA, GABAergic synaptic transmission, paired pulse depression.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Веселовський Н.С., Федулова С.А., Костюк П.Г. Биофизика одиночного синапса. – К.: Наук. думка, 2004. – 118 с.
2. Brody D.L., Yue D.T. Release-independent short-term synaptic depression in cultured hippocampal neurons// *J. Neurosci.* – 2000. – **20**. – P. 2480–2494.
3. Dietrich D., Kirschstein T., Kukley M. et al. Functional specialization of presynaptic Cav2.3 Ca^{2+} channels// *Neuron.* – 2003. – **39**. – P. 483–496.
4. Fagg G.E., Foster A.C. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system// *Neuroscience.* – 1983. – **9**. – P. 701–719.
5. Forsythe I. D., Tsujimoto T., Barnes-Davies M. et al. Inactivation of presynaptic calcium current contributes to synaptic depression at a fast central synapse// *Neuron.* – 1998. – **20**. – P. 797–807.
6. Gasparini S., Kasyanov A.M., Pietrobon D. et al. Presynaptic R-type calcium channels contribute to fast excitatory synaptic transmission in the rat hippocampus// *J. Neurosci.* – 2001. – **21**. – P. 8715–8721.
7. Horne A.L., Kemp J.A. The effect of ω -conotoxin GVIA on synaptic transmission within the nucleus accumbens and hippocampus of the rat in vitro// *Brit. J. Pharmacol.* – 1991. – **103**. – P.1733–1739.
8. Jensen K., Jensen M.S., Lambert J.D. Role of presynaptic L-type Ca^{2+} channels in GABAergic synaptic transmission in cultured hippocampal neurons// *J. Neurophysiol.* – 1999. – **81**. – P. 1225–1230.
9. Jensen K., Lambert J.D., Jensen M.S. Activity-dependent depression of GABAergic IPSCs in cultured hippocampal neurons// *J. Neurophysiol.* – 1999. – **82**. – P. 42–49.
10. Katz B., Miledi R. The role of calcium in neuromuscular facilitation// *J. Physiol.* – 1968. – **195**. – P.481–492.
11. Luebke J.I., Dunlap K., Turner T.J. Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus// *Ibid.* –1993. – **11**. – P.895–902.
12. Neher E. Vesicle pools and Ca^{2+} microdomains: new tools for understanding their roles in neurotransmitter release// *Neuron.* – 1998. – **20**. – P. 389–399.
13. Ohno-Shosaku T., Hirata K., Sawada S., Yamamoto C. Contributions of multiple calcium channel types to GABAergic transmission in rat cultured hippocampal neurons// *Neurosci. Lett.* – 1994. – **181**. – P. 145–148.
14. Takahashi T., Forsythe I.D., Tsujimoto T. et al. Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor// *Science.* – 1996. – **274**. – P. 594–597.
15. Takahashi T., Momiyama A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission// *Nature.* –1993. – **366**. – P.156–158.
16. Veselovsky N.S., Engert F., Lux H.D. Fast local superfusion technique // *Pflug. Arch.* –1996. – **432**. – P. 351–354.
17. Wilcox K.S., Dichter M.A. Paired pulse depression in cultured hippocampal neurons is due to a presynaptic mechanism independent of GABA_B autoreceptor activation// *J. Neurosci.* – 1994. – **14**. – P. 1775–1788.
18. Wu L.G., Borst J.G. The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression // *Neuron.* – 1999. – **23**. – P. 821–832.
19. Zucker R.S., Regehr W.G. Short-term synaptic plasticity// *Annu. Rev. Physiol.* – 2002. – **64**. – P. 355–405.

Ин-т фізіології ім. О. О. Богомольця, НАН України, Київ
E-mail: mizerna_oksana@ukr.net

Матеріал надійшов до редакції 06.03.2009