

С.І. Мельник, М. Райт, Дж.А. Теннер, Т.Ш. Цінцадзе,
В.П. Цінцадзе, Е.Д. Міллер, Н.О. Лозова

Аналог діаденозинових поліфосфатів модулює передачу сигналу в зрізах гіпокампа

Модулирующее действие эндогенных диаденозиновых полифосфатов на синаптическую передачу в срезах гиппокампа крысы было проверено с негидролизуемым аналогом Ар₄ диаденозин-5',5'''-Р₁,Р₄-[β,γ-метилен]тетрафосфатом (АррСН₂ррА). Было обнаружено, что АррСН₂ррА в микромолярных концентрациях производит подавление ортодромно вызванных популяционных спайков СА3-СА1 синаптического контакта, при этом не действуя на антидромно вызванные популяционные спайки и возбуждающие постсинаптические токи зоны СА1. Такое исключительно селективное ингибирование может быть вовлечено в процесс дендритного электрогенеза пирамидальных нейронов и, таким образом, опосредовать нейронную активность гиппокампа.

ВСТУП

Діаденозинові поліфосфати (Ар_nА) – ендогенні речовини, виявлені в пресинаптичних терміналях нейронів головного мозку багатьох ссавців. Їхній внесок у загальний вміст синапсом доволі значний – від 7 до 12 % [1]. Роль діаденозинових поліфосфатів у ЦНС до цих пір невизначена, однак є праці, в яких показана висока їх спорідненість до рецепторів Р₂ (АТФ) [2]. Раніше в нашій лабораторії проводилися дослідження дії діаденозинових поліфосфатів Ар₄А і Ар₅А на синаптичну передачу в зрізах гіпокампа щура [3]. Було показано, що зовнішньоклітинне їх прикладання призводить до сильного пригнічення синаптичної передачі, яке повністю усувалося за наявності блокаторів аденозинових А₁-рецепторів. Однак внаслідок нестабільності ендогенних діаденозинових поліфосфатів і нині залишилося нез'ясованим, чи це пригнічення опосередковане дією самих поліфосфатів, чи дією їхніх метаболітів (таких, як АДФ, АМФ чи аденозин). Щоб виключити можливий вплив метаболітів діаденозинових поліфосфатів,

ми використали новий аналог останніх, що не гідролізується – діаденозин-5', 5'''-Р₁,Р₄-[β,γ-метилен]тетрафосфат (АррСН₂ррА) [4], синтезований у лабораторії професора Е. Міллера.

Мета нашого дослідження – вивчити вплив АррСН₂ррА на властивості збуджувальної синаптичної передачі в зрізах гіпокампа щурів.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на зрізах гіпокампа щурів лінії Вістар віком від 18 до 23 діб.

Після декапітації гіпокамп швидко вилучали і переносили в охолоджений до +5°C розчин з таким складом (ммоль/л): NaCl – 138, KCl – 2,7, CaCl₂ – 1,5, MgSO₄ – 1,5, NaH₂PO₄ – 0,4, NaHCO₃ – 26, глюкоза – 15. Розчин постійно насичували карбогеном – газовою сумішшю з вмістом 95 % O₂ і 5 % CO₂. Після охолодження гіпокампа за допомогою тонкого леза робили поперечні зрізи (згідно з напрямком ламінарних волокон) товщиною 300–500 мкм. У процесі приготування зрізів забезпечували постійне над-

ходження свіжого (насиченого карбогеном) розчину до гіпокампа. Після приготування зрізи витримували 120–200 хв при $+25^{\circ}\text{C}$ в інкубаційній камері. Експерименти проводили при кімнатній температурі ($20\text{--}25^{\circ}\text{C}$).

Для реєстрації популяційних спайків як стимулювальний електрод використовували пару склеєних між собою ніхромових дрітків товщиною 50 мкм. Електроди встановлювали на поверхню зрізу. Тривалість стимулювального імпульсу становила 200–500 мкс, і амплітуда його сягала 30 В. Використовували частоту стимуляції 0,1–0,3 Гц.

Реєстрацію збуджувальних постсинаптичних струмів виконували з застосуванням методики patch-clamp. Для отримання доступу до пірамідних нейронів поля CA1 зріз гіпокампа препарували під мікроскопом: струменем зовнішньоклітинного розчину прорізали зріз між stratum oriens і stratum pyramidale та видаляли невелику частину тканини з альвеолярного боку зрізу, забезпечуючи вільний доступ до сом нейронів.

Отримані результати обробляли математично методом варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми Origin 6.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Ми дослідили дію діаденозинових поліфосфатів на синаптичну передачу в таких шляхах: 1) колатералі Шаффера – пірамідні нейрони зони CA1; 2) перфорантний шлях – пірамідальні нейрони зони CA1; і 3) перфорантний шлях – гранулярні клітини зубчастої фасції.

Як показано на рис. 1, AppCH_2ppA у концентрації 8 мкмоль/л викликав зменшення амплітуди ортодромно викликаного популяційного спайку в усіх синаптичних шляхах гіпокампа. Подальші електрофізіологічні експерименти проводили на синаптичному контакті CA3/CA1 при стимуляції колатералей Шаффера.

Зовнішньоклітинне прикладання 8 мкмоль/л AppCH_2ppA призводило до швидкого пригнічення ортодромно викликаних популяційних спайків (на $88\% \pm 6\%$, $n=7$, $P<0,02$). При цьому амплітуда антидромно викликаних популяційних спайків залишалася практично незмінною ($1\% \pm 4\%$, $n=3$, $P<0,05$). На рис. 2,а,б представлено дію різних концентрацій AppCH_2ppA (від 2 до 8 мкмоль/л) на орто- та антидромно викликані популяційні спайки.

Надалі було проведено дослідження ана-

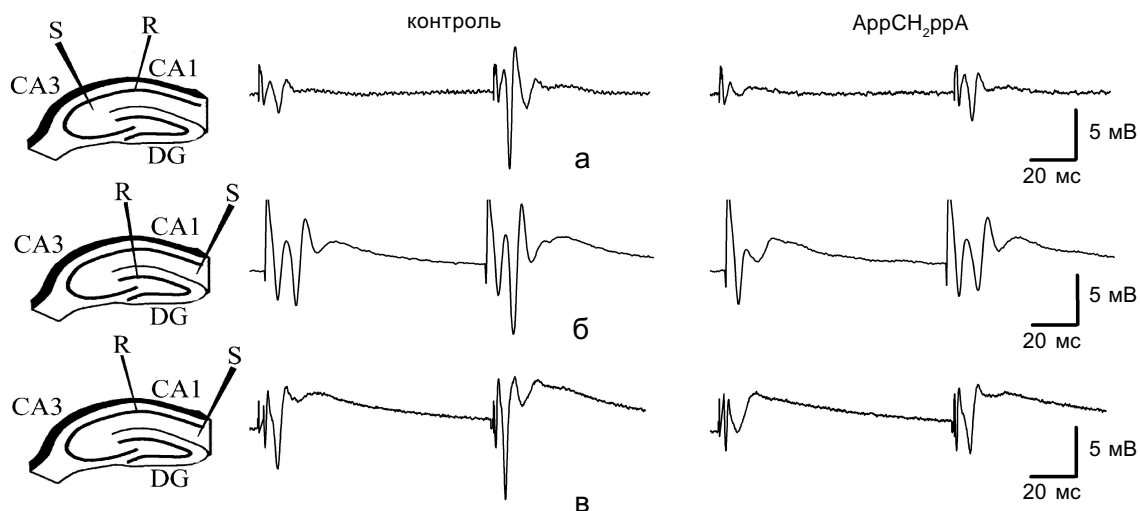


Рис. 1. Дія AppCH_2ppA на ортодромно викликані популяційні спайки у зрізах гіпокампа: а – колатералі Шаффера – пірамідальні нейрони зони CA1; б – перфорантний шлях – група гранулярних клітин зубчастої фасції; в – перфорантний шлях – пірамідальні нейрони зони CA1. У колонці ліворуч наведено схематичні зображення розташування стимулювальних (S) і реєструвальних (R) електродів

лога діаденозинових поліфосфатів, а також реєстрація збуджувальних постсинаптичних струмів у постсинаптичному нейроні зони СА1 гіпокампа при стимуляції колатералей Шаффера в режимі фіксації потенціалу з використанням методики patch-clamp (див. рис. 2,в). Експерименти проводили при потенціалі – 80 мВ. Слід зазначити, що за наявності 1,5 ммоль Mg^{2+} зареєстрований при даному потенціалі струм був опосередкований активацією насамперед рецепторів типу АМПА. Було виявлено, що $AppCH_2ppA$ (див. рис. 2,в) не мав значного впливу на амплітуду збуджувальних постсинаптичних струмів ($I_{AppCH_2ppA} / I_{контроль} \times 100 \%$ було $96 \% \pm 6 \%$, $n=6$).

Реєстрація (електрод R) популяційних спайків, відведених від сом пірамідних ней-

ронів зони СА1 при антидромній стимуляції (електрод S_A) зони alveus-oriens, дає можливість спостерігати дію $AppCH_2ppA$ локально на фокальні потенціали аксоносоматичної ділянки нейронів СА1 (рис. 3). Фіксування вимірювань потенціалів у тій самій ділянці при ортодромній стимуляції колатерально-комісурального шляху (електрод S_o) дозволяє відстежити зміни потенціалу, опосередковані або процесами в синаптичних контактах (зміна пресинаптичного викиду медіатора чи зміна чутливості рецепторів на постсинаптичній мембрані до нейромедіатора), або локальними змінами потенціалу в дендритах нейронів СА1. При збільшенні викиду медіатора з пресинаптичних терміналей в ділянці апікальних

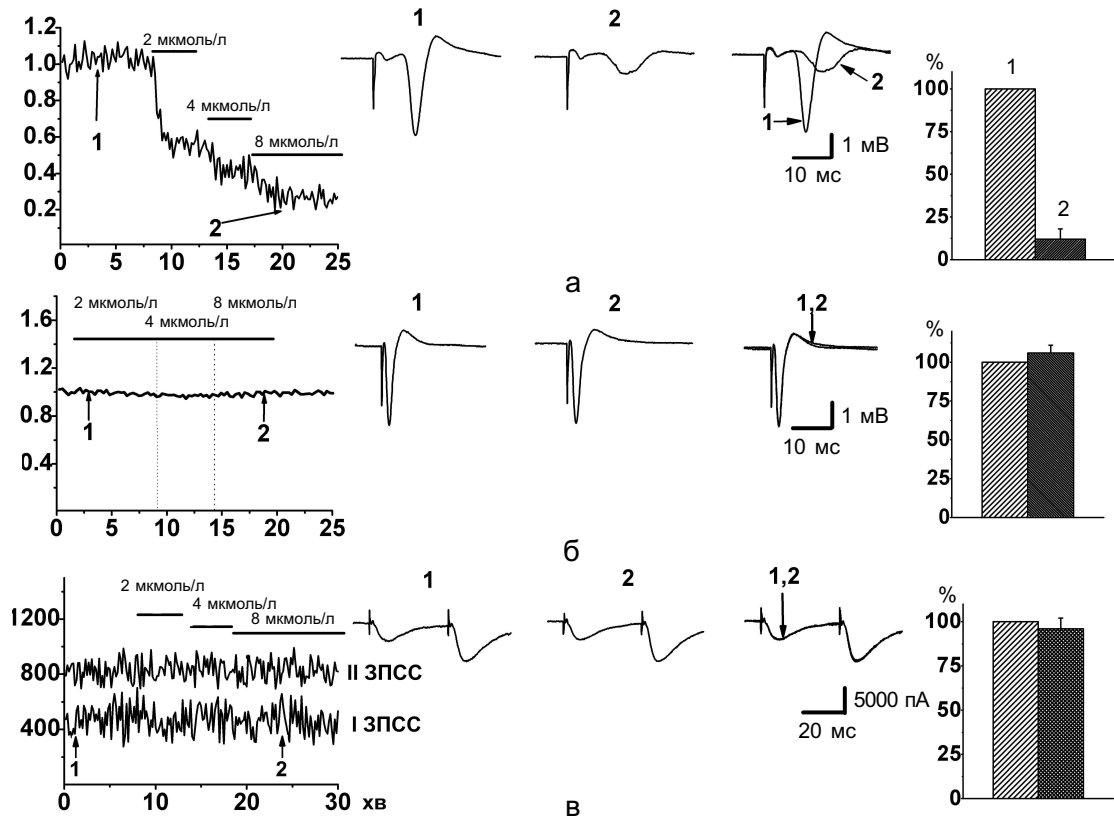


Рис. 2. Дія $AppCH_2ppA$ у концентрації 2–8 мкмоль/л на ортодромно (а), антидромно (б) викликані спайки та збуджувальні постсинаптичні струми. Ліворуч наведено часові залежності амплітуди популяційних спайків (а, б) (амплітуда віднормована відносно контролю) і струмів (в); в середній частині – реєстрації популяційних спайків (а, б) і струмів (в) до (1) та після (2) прикладання $AppCH_2ppA$, та суміщені реєстрації; праворуч – середні значення пікових амплітуд популяційних спайків (а, б) і струмів (в) до (1) та після прикладання $AppCH_2ppA$ (2), віднормовані відносно контролю (100 %)

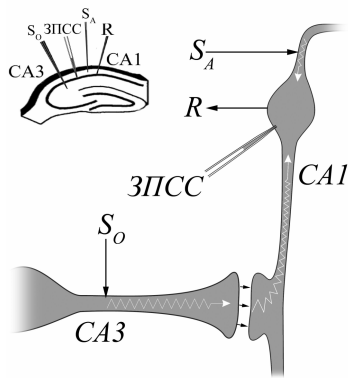


Рис. 3. Ілюстрація механізму виникнення ортодромно (S_o) та антидромно (S_a) викликаних спайків і збуджувальних постсинаптичних струмів (ЗПСС)

дендритів, як правило, спостерігається збільшення амплітуди ортодромних популяційних спайків, при цьому на амплітуду антидромних спайків зміна викиду нейромедіатора не впливає. Крім того, збільшення концентрації медіатора в збуджувальних синаптичних контактах призводить до активації постсинаптичних глутаматних рецепторів, що повинно відобразитися на амплітуді струмів.

Оскільки в наших експериментах збуджувальні постсинаптичні струми залишаються незмінними, а ортодромно викликані популяційні спайки пригнічуються, можна припустити, що зміна збудливості опосередкована локальною гіперполяризацією в ділянці дендритів, модулюючи таким чином передачу сигналу. Така локальна гіперполяризація здається достатньо вірогідною з огляду на працю Такігави та Альцгеймера [5], які продемонстрували суттєву різницю амплітуд активованих аденозином калієвих струмів вихідного випрямлення в сомі та в дендритах нейронів.

У нашій роботі за допомогою електрофізіологічних методик була досліджена дія AppCH_2ppA – аналога діаденозинових поліфосфатів, що не гідролізується, на синаптичну передачу в зрізах гіпокампа щура, і виявлена локалізація цієї дії. Слід зазначити, що цей поліфосфат викликає локальну гіперполяризацію дендритів постсинаптичних нейронів, не

змінюючи при цьому збудливість сом і аксонів даних нейронів. Така модуляція синаптичної передачі діаденозиновими поліфосфатами може бути включена в процес дендритного електрогенезу пірамідальних нейронів і, таким чином, опосередковувати нейрональну активність гіпокампа.

Sergei Melnik, Michael Wright, Julian A. Tanner, Vera Tsintsadze, Timur Tsintsadze, Andrew D. Miller and Natalia Lozovaya

NON-HYDROLYSABLE DIADENOSINE POLYPHOSPHATE ANALOGUE MODULATES SIGNAL TRANSDUCTION IN HIPPOCAMPAL SLICES

The modulatory effect of endogenous diadenosine polyphosphates on synaptic transmission in the rat hippocampal slices has been re-examined with a non-hydrolysable Ap_2A analogue diadenosine-5',5'»- P^1, P^4 -[β, γ -methylene]tetraphosphate (AppCH_2ppA). We have shown that AppCH_2ppA at low micromolar concentrations induce inhibition of orthodromically evoked population spikes, without affecting of excitatory postsynaptic currents and antidromic spikes recorded in the CA1 zone of hippocampus. Such a spatially selective neuronal inhibition may influence dendritic electrogenesis in pyramidal neurons and consequently mediate control of neuronal network activity in hippocampus.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Pintor J., Diaz-Hernandez M., Gualix J. et al. Diadenosine polyphosphate receptors from rat and guinea-pig brain to human nervous system // *Pharmacol. Ther.* – 2000. – **87**, №2–3. – P. 103–115.
2. Pintor J., Miras-Portugal M.T. Receptors for diadenosine polyphosphates P2D, P2Y ApnA , P4 and dinucleotide receptors: are there too many? // *Trends Pharmacol. Sci.* – 2000. – **21**, №4. – P. 135.
3. Klishin A., Lozovaya N., Pintor J. et al. Possible functional role of diadenosine polyphosphates: negative feedback for excitation in hippocampus // *Neuroscience.* – 1994. – **58**, №2. – P. 235–236.
4. Wright M., Tanner J.A., Miller A.D. Quantitative single-step purification of dinucleoside polyphosphates // *Anal. Biochem.* – 2003. – **316**, №1. – P. 135–138.
5. Takigawa T., Alzheimer C. G protein-activated inwardly rectifying K^+ (GIRK) currents in dendrites of rat neocortical pyramidal cells // *J. Physiol.* – 1999. – **517**, (Pt 2). – P. 385–390.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 03.05.2006