

## ЗАВИСИМАЯ ОТ АКТИВНОСТИ ПОТЕНЦИАЦИЯ АСИНХРОННОГО КОМПОНЕНТА ГАМК-ЭРГИЧЕСКИХ СИНАПТИЧЕСКИХ ТОКОВ В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ НЕЙРОНАХ ГИППОКАМПА

Поступила 20.05.13

После активации ГАМК-эргических синаптических соединений в культуре нейронов гиппокампа сериями деполяризующих стимулов ( $5\text{--}45\text{ с}^{-1}$ , пять–20 стимулов) в постсинаптическом нейроне развивается тормозный постсинаптический ток (ТПСТ), состоящий из фазного и асинхронного компонентов. В экспериментах с одновременным отведением от двух синаптически связанных нейронов мы обнаружили, что деполяризация пресинаптической клетки на 2 мин до положительных потенциалов также приводила к возникновению асинхронного компонента ТПСТ (аТПСТ), вызываемого одиночным потенциалом действия (ПД) пресинаптического нейрона. При этом время спада ТПСТ становилось в среднем втрое большим, чем в первом случае. Аналогичная потенциация аТПСТ наблюдалась в части синапсов после их длительного (в течение 15 мин) раздражения сериями деполяризующих стимулов ( $45\text{ с}^{-1}$ , 20 стимулов, интервал между сериями 23 с). Такая потенциация аТПСТ сохранялась продолжительное время (от 3 до 17 мин). В части синаптических соединений одновременно с потенциацией аТПСТ отмечалась потенциация платоподобного входящего тока через мембрану пресинаптического нейрона. При этом заряд, переносимый указанным током через мембрану упомянутой клетки, достоверно коррелировал с временем спада вызванного ТПСТ (средний коэффициент корреляции  $0.83 \pm 0.10$ ). Данный факт может свидетельствовать о том, что упомянутый входящий ток опосредует потенциацию ТПСТ. Полученные результаты позволяют предположить, что вышеописанная форма пластичности может регулировать эффективность ГАМК-эргической синаптической передачи в гиппокампе при физиологических режимах синаптической активности.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** ГАМК, гиппокамп, тормозный постсинаптический ток (ТПСТ), асинхронный синаптический ток, синаптическая пластичность.

### ВВЕДЕНИЕ

ГАМК-эргические тормозные постсинаптические токи (ТПСТ) в центральных синапсах, вызванные физиологически релевантной пресинаптической активностью, включают в себя, как правило, два компонента: фазный, связанный с синхронным выделением нейротрансмиттера из везикул пресинаптической терминали в течение нескольких миллисекунд после генерации потенциала действия (ПД) в аксоне пресинаптической клетки, и асинхронный, связанный с дрящимся на протяжении нескольких

сот миллисекунд после ПД процессом стохастического высвобождения ГАМК из везикул [1, 2]. Молекулярные механизмы асинхронного компонента ТПСТ (аТПСТ) существенно отличаются от таковых фазного синхронного компонента [3–5]; в частности, для обеих составляющих идентифицированы специфические механизмы модуляции и пластичности [6, 7]. Особый интерес представляют зависимость от активности формы пластичности аТПСТ и их молекулярная основа. В настоящей работе мы описываем новую форму пластичности вызванного ТПСТ (вТПСТ) – потенциацию аТПСТ после деполяризации пресинаптического нейрона или его стимуляции с умеренной частотой ( $20\text{--}45\text{ с}^{-1}$ ). Мы предполагаем, что данная форма пластичности может ощутимо влиять на эффективность ГАМК-эргической синаптической передачи при физиоло-

<sup>1</sup> Государственная ключевая лаборатория молекулярной и клеточной биологии, Киев (Украина).

<sup>2</sup> Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев (Украина).

Эл. почта: borisyuk@biph.kiev.ua (А. Л. Борисюк).

гических режимах синаптической активности.

## МЕТОДИКА

*Культивирование нейронов гиппокампа.* Эксперименты проводились на культуре нейронов гиппокампа. Суспензия клеток, полученная после выделения и 10-минутной ферментативной обработки гиппокампа новорожденных крыс 0.25 %-ным раствором трипсина при температуре 37 °С, равномерно (из расчета  $5 \cdot 10^3 - 50 \cdot 10^3$  клеток/см<sup>2</sup>) высевалась на сухие стерильные стекла, заранее покрытые смесью поли-L-лизина и ламинина. Культуральная среда, основанная на смеси MEM с GlutaMAX, дополнительно содержала в себе 25 мМ NEPES, гентамицин, 10 % лошадиной сыворотки и 1 % реактива N-2 Supplement. Культивирование производилось при 37 °С и наличии 5 % CO<sub>2</sub> в увлажненной воздушной атмосфере; клетки использовались для экспериментов на 14–21-й день культивирования. Реактивы были приобретены у фирмы «Life Technologies» (США).

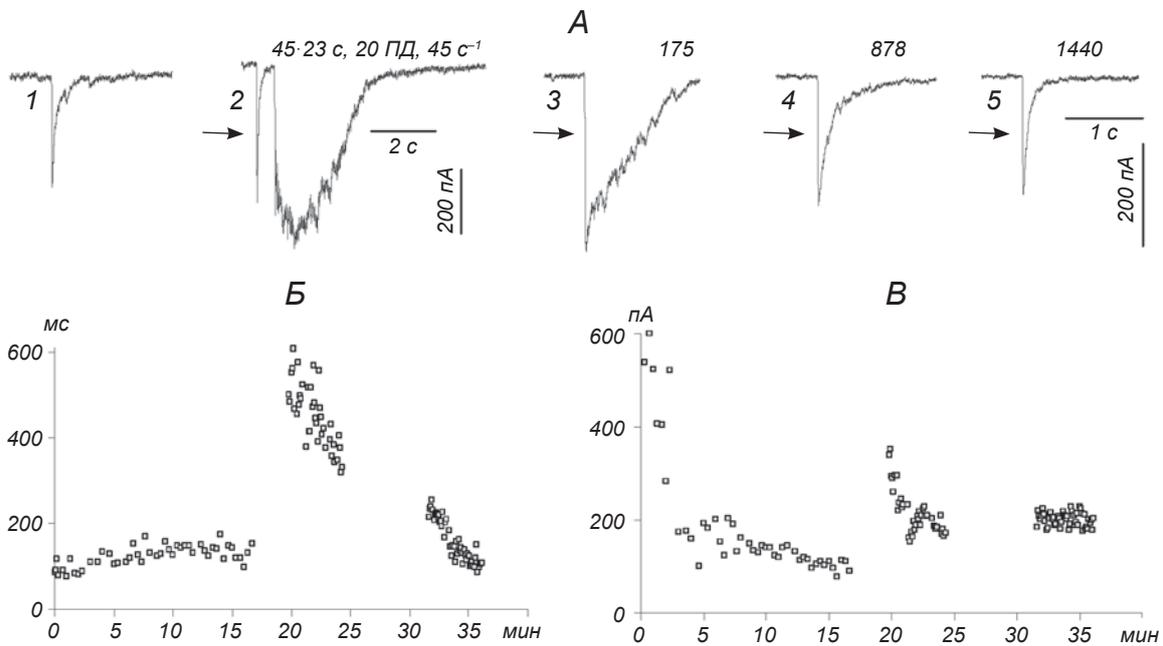
*Электрофизиологические эксперименты.* Одновременные отведения от пары культивируемых синаптически связанных клеток получали с помощью методики «двойной пэтч-клэмп» в конфигурации «целая клетка». Внеклеточный раствор содержал в себе (в миллимолях на 1 л): NaCl – 150, KCl – 1, NEPES – 10, MgCl<sub>2</sub> – 1, CaCl<sub>2</sub> – 2, глюкозу – 10 (pH 7.3). В этот раствор добавляли 40 мкМ APV и 20 мкМ CNQX для блокирования глутаматергической синаптической активности. Для отведения ТПСТ использовались стеклянные микропипетки (сопротивление 4–6 МОм), которые заполнялись следующим раствором (в миллимолях на 1 л): CsCl – 135, NEPES – 10, EGTA-КОН – 2, MgATP – 2, фосфокреатин – 5, CaCl<sub>2</sub> – 0.3, NaGTP – 0.5 (pH 7.3). ПД в пресинаптической клетке возникали в ответ на кратковременное (4.0 мс) изменение поддерживаемого на ее мембране потенциала (МП) до 0 мВ; исходный уровень МП составлял –60 ... –70 мВ и в обеих клетках, и пре-, и постсинаптической, был одинаков. Постсинаптические токи, вызванные генерацией ПД в пресинаптической клетке, идентифицировались как ГАМК<sub>A</sub>-эргические, так как они обратимо и полностью блокировались под воздействием 10 мкМ бикакуллина. Амплитуда одиночного вТПСТ вычислялась как среднее значение тока в пределах полумиллисекундного интервала на максимум этого тока; время спада оценива-

лось по площади под кривой тока, деленной на его амплитуду. Числовые данные приведены ниже как средние ± среднеквадратическое отклонение.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Потенциация асинхронного компонента одиночных вТПСТ после продолжительной деполяризации пресинаптической клетки.* В постсинаптическом нейроне вТПСТ развивались в ответ на поступление ПД, вызванного в пресинаптической клетке кратковременным (4 мс) одиночным изменением потенциала, который поддерживался на мембране, до 0 мВ. Они имели амплитуду 200–500 пА и среднее время спада  $150 \pm 30$  мс ( $n = 9$ ). В семи из девяти тестируемых синапсов после продолжительной (~2 мин) деполяризации мембраны пресинаптической клетки до положительных потенциалов кинетика вТПСТ существенно замедлялась. При этом на спаде вТПСТ наблюдался характерный шум, который связан с асинхронным выделением ГАМК из везикул и напоминает асинхронный компонент тока, развивающегося в тех же нейронах в ответ на предъявление коротких серий ПД. Время спада таких вТПСТ по сравнению с временем спада контрольных токов было большим в среднем в  $3.3 \pm 1.0$  раз. В условиях продолжительной низкочастотной ( $0.2 \text{ с}^{-1}$ ) стимуляции пресинаптической клетки форма вТПСТ постепенно, в среднем за 2–3 мин, возвращалась к форме исходных контрольных ответов. Тетаническая стимуляция пресинаптической клетки (одна пачка из 500 стимулов с частотой  $15 \text{ с}^{-1}$  или 1000 стимулов с частотой  $19 \text{ с}^{-1}$ ) также вызывала в пяти исследованных клетках аналогичную потенциацию аТПСТ. В этом случае время спада токов превышало контроль в среднем в  $3.1 \pm 0.7$  раза.

*Потенциация асинхронного компонента одиночных вТПСТ после продолжительной стимуляции пресинаптической клетки короткими пачками стимулов.* В некоторых ГАМК-эргических соединениях (три из девяти) длительная кондиционирующая стимуляция пресинаптической клетки короткими пачками стимулов (20 стимулов с частотой следования  $45 \text{ с}^{-1}$ , интервал между пачками 23 с, всего 45 пачек) приводила, подобно длительной деполяризации, упомянутой выше, к замедлению кинетики вТПСТ. После окончания кондиционирующей стимуляции пресинаптической клетки время спада вТПСТ становилось в среднем в  $5.2 \pm 0.1$  раза



**Рис. 1.** Потенциация асинхронного компонента тормозного постсинаптического тока (ТПСТ). *A* – замедление кинетики и потенциация асинхронного компонента ГАМК-эргического вызванного ТПСТ (вТПСТ) в постсинаптической клетке пары синаптически связанных культивируемых нейронов гиппокампа. 1 – вТПСТ в контроле; 2 – ТПСТ, развивавшийся в ответ на ритмическую стимуляцию пресинаптической клетки с частотой  $45\text{ с}^{-1}$  (20 стимулов); 3–5 – последовательные отведения вТПСТ в различные моменты времени после прекращения стимуляции (мин, указано над записями). *Б, В* – зависимость продолжительности спада вТПСТ (*Б*, мс) и его амплитуды (*В*, пА) от времени (мин).

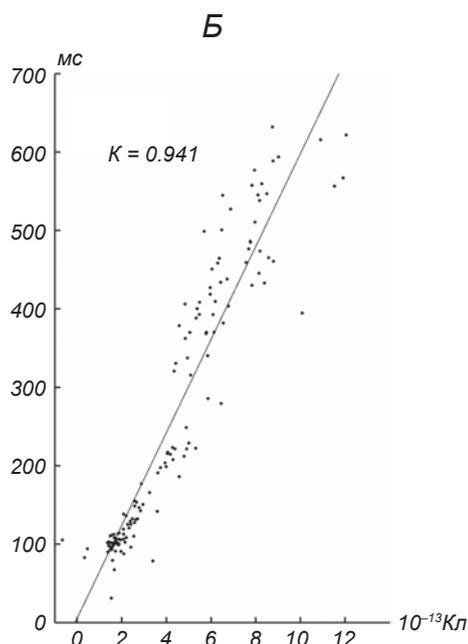
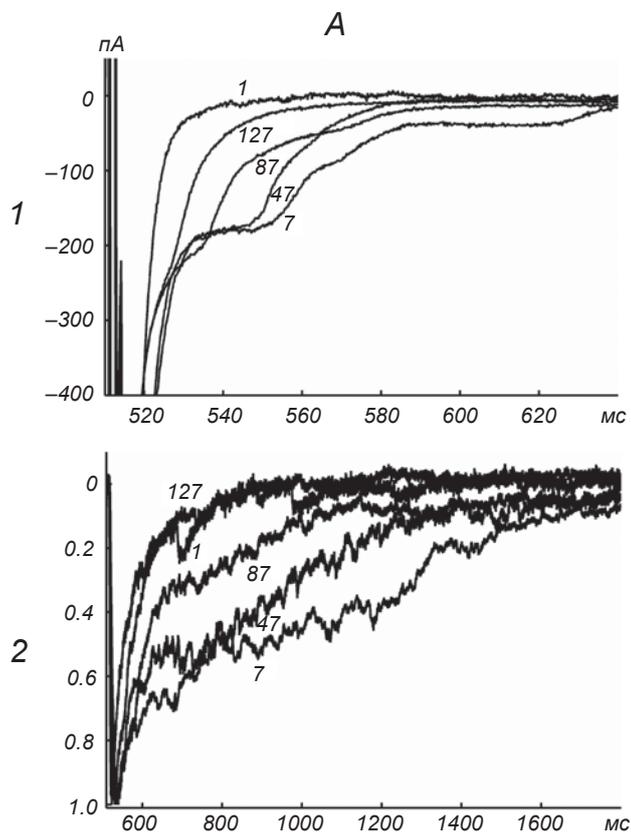
**Рис. 1.** Потенциация асинхронного компонента гальмивного постсинаптического струму.

больше по сравнению с таковым в контроле, ( $n = 3$ ). Так, в случае, показанном на рис. 1, *A*, время спада вТПСТ, зарегистрированного через 175 с после окончания стимуляции в указанном выше режиме, составляло 543 мс, т. е. становилось примерно в пять раз бóльшим по сравнению с временем спада контрольных вТПСТ, зарегистрированных до начала такой стимуляции ( $103 \pm 10$  мс). В этом конкретном случае существенное замедление спада вТПСТ длилось около 17 мин, пока данный параметр постепенно возвращался к начальному значению (*Б*). Следует отметить, что скорость восстановления времени спада вТПСТ до контрольных значений и восстановления формы последнего возрастала с увеличением частоты стимуляции для инициации вТПСТ.

Средняя амплитуда одиночных вТПСТ до начала кондиционирующей пачечной стимуляции равнялась  $510 \pm 30$  пА (рис. 1, *В*). В ходе такой стимуляции пресинаптической клетки амплитуды первых ТПСТ в пачке постепенно уменьшались (до  $150 \pm 15$  пА) по сравнению с амплитудой одиночных вТПСТ. Зависимость значений амплитуды от времени была двухфазной. После окончания кондиционирующей высокочастотной стимуляции ам-

плитуда одиночных вТПСТ, вызываемых с низкой частотой ( $0.2\text{ с}^{-1}$ ), снова увеличивалась, возвращаясь при этом почти к начальному значению (400 пА). Однако затем она быстро уменьшалась практически до уровня, характерного для первого ТПСТ после окончания длительной стимуляции ( $200 \pm 20$  пА). Следует отметить, что продолжительность увеличения амплитуды вТПСТ была значительно меньше, чем длительность потенциации аТПСТ (2–3 мин по сравнению с 17 мин). Такое различие в динамике этих двух процессов позволяет предполагать, что механизм наблюдавшейся нами потенциации аТПСТ отличен от механизма посттетанической потенциации.

*Корреляция времени спада постсинаптического ГАМК-эргического тока с зарядом, переносимым деполяризующим током, который наблюдался в пресинаптической клетке после кондиционирующей стимуляции.* В некоторых парах исследованных клеток потенциация аТПСТ сопровождалась потенциацией специфического деполяризующего тока, регистрируемого в пресинаптической клетке после ее короткой деполяризации, которая вызывала генерацию ПД в упомянутой клетке и ответный вТПСТ в постсинаптическом нейроне (рис. 2, *A*).



Этот ток характерной платоподобной формы имел амплитуду порядка 200 пА, потенциал реверсии около +20 мВ и длился несколько сот миллисекунд. Заряд, переносимый данным током через мембрану пресинаптического нейрона, уменьшался со временем синхронно с возвращением кинетики вТПСТ в постсинаптической клетке к контрольной. При этом наблюдалась значительная корреляция между перенесенным зарядом и временем спада вТПСТ (средний коэффициент корреляции  $0.83 \pm 0.10$ ,  $P < 0.0001$ ,  $n = 3$ ) (Б).

Следует отметить, что в некоторых клетках заметные вариации заряда, переносимого пресинаптическим током, отчетливо коррелировали с вариациями длительности вТПСТ в постсинаптической клетке. В случаях, когда развитию вТПСТ предшествовал спонтанный ТПСТ, время спада вызванного тока, как правило, было меньшим, чем в отсутствие указанного спонтанного тока. Аналогичная зависимость наблюдалась для времени спада деполаризующих пресинаптических токов (рис. 3). Это дополнительно подкрепляет гипотезу о том, что наблюдаемая корреляция (рис. 2, Б) не случайна. Очевидно, пресинаптический ток каким-то образом участвует в индукции аТПСТ, развивающегося в ответ на предъявления одиночных стимулов.

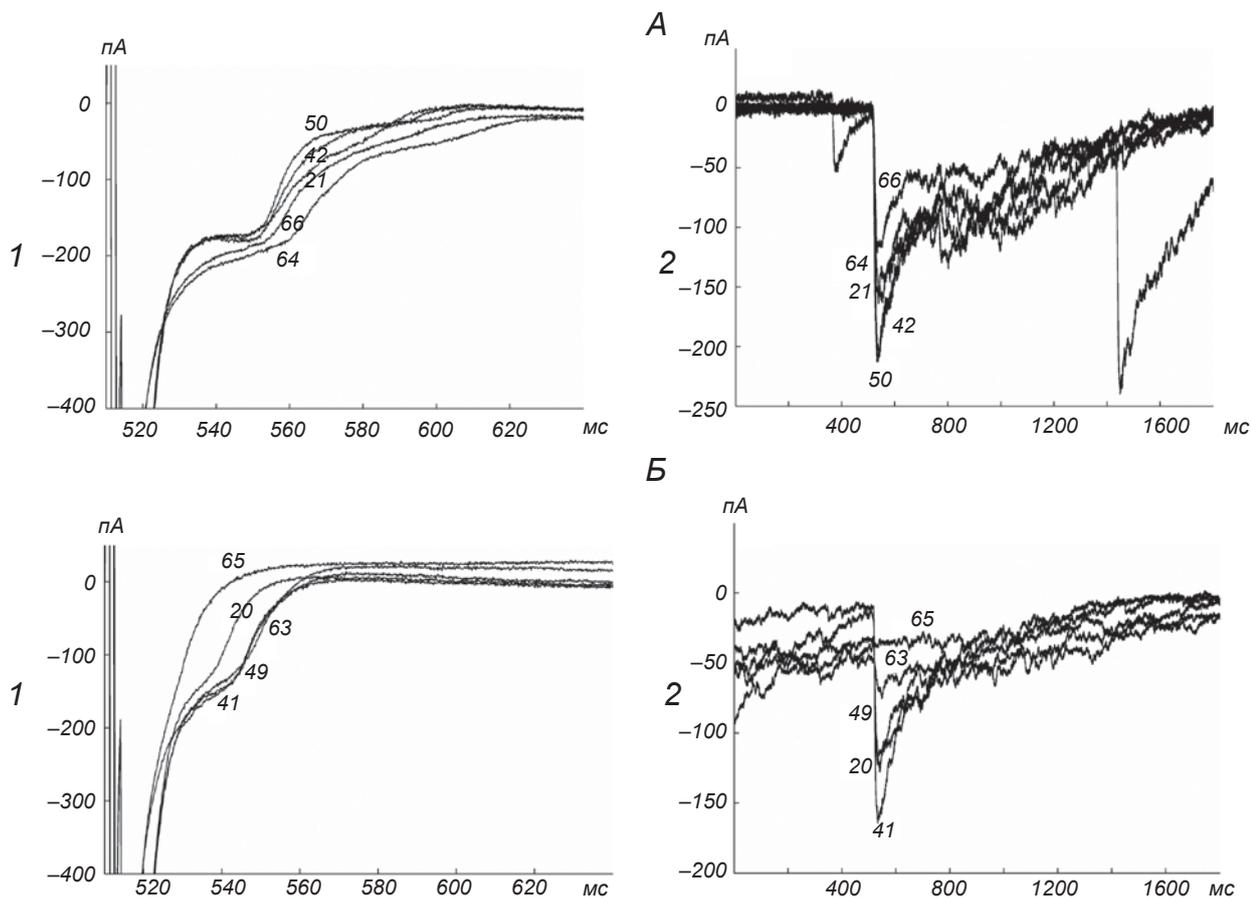
**Р и с. 2.** Корреляция потенциации асинхронного компонента вызванного тормозного постсинаптического тока (вТПСТ) с характеристиками специфического деполаризующего тока через мембрану пресинаптической клетки.

А – временное течение деполаризующего тока (пА) в пресинаптической клетке (1) и нормированных ТПСТ в постсинаптическом нейроне (2; за единицу принята максимальная амплитуда этих токов ТПСТ). Около кривых указаны порядковые номера реализаций в ходе стимуляции с частотой  $0.2 \text{ с}^{-1}$ . Б – корреляционное поле значений заряда, переносимого током в пресинаптической клетке в пределах временного интервала 25–150 мс после начала стимуляции ( $1 \cdot 10^{-13}$  Кл, ось абсцисс), и времени спада вТПСТ (мс, ось ординат). Вверху указано значение коэффициента корреляции  $K$ .

**Р и с. 2.** Кореляція потенціації асинхронного компонента викликаного гальмівного постсинаптичного струму з характеристиками специфічного деполаризуючого струму крізь мембрану пресинаптичної клітини.

Потенциация аТПСТ, подобная обнаруженной в нашей работе, была описана ранее для возбуждающих синапсов в культуре нейронов гиппокампа [8]. В этих экспериментах тетаническая стимуляция пресинаптического нейрона приводила к значительной потенциации асинхронного компонента возбуждающего постсинаптического тока, но при этом в тормозных синапсах подобной потенциации аТПСТ не наблюдалось.

Корреляция между потенциацией аТПСТ и появлением специфического платоподобного деполаризующего тока в пресинаптической клетке, насколько нам известно, ранее не описывалась. Природа данного тока и связь этого феномена с потенциацией аТПСТ пока не вполне понятны. Одна из воз-



**Р и с. 3.** Трансмембранные деполаризующие токи (пА) в пресинаптической клетке (1) и соответствующие им тормозные постсинаптические токи (ТПСТ) в постсинаптическом нейроне (2).

*А* – токи после длительного раздражения пресинаптической клетки пачками стимулов (по 20 стимулов, частота 45 с<sup>-1</sup>, интервал между пачками 23 с, всего 45 пачек). *Б* – аналогичные токи в тех же клетках при тех же условиях предварительной стимуляции, зарегистрированные в случаях, когда вызванным ТПСТ с интервалом менее 500 мс предшествовали спонтанные ТПСТ.

**Р и с. 3.** Трансмембранні деполаризуючі струми (пА) в пресинаптичній клітині (1) та відповідні їм гальмівні постсинаптичні струми в постсинаптичному нейроні (2).

возможностей состоит в том, что деполаризация, обусловленная указанным током в начальном сегменте аксона пресинаптической клетки, пассивно распространяется к синапсам, образуемым его терминалями, и вызывает кальциевый ток через потенциалзависимые кальциевые каналы (ПЗКК) и асинхронное выделение ГАМК из везикул упомянутых терсиналей. Нечто подобное было показано в работе Кристи и соавт. [7]. В указанных экспериментах подпороговая деполаризация в соме нейронов гиппокампа приводила к облегчению вТПСТ и развитию аТПСТ в постсинаптической клетке. Другая возможность состоит в том, что проводимость пресинаптической мембраны является кальцийзависимой и присутствует на всем протяжении аксона. Тогда вход кальция через ПЗКК может вызывать повышение данной проводимости и значительное

увеличение локальной концентрации кальция, входящего как через ПЗКК, так и через каналы, обеспечивающие саму эту проводимость. В результате волна повышения концентрации кальция сможет активно распространяться по аксону даже без участия натриевых каналов. Молекулярный механизм пресинаптического деполаризующего тока требует дальнейшего изучения. Возможным кандидатом на такую роль являются TRPC-каналы, поскольку идущие через них токи имеют характерную медленную платоподобную кинетику [9]. Потенциал реверсии некоторых из них (например, каналов TRPC5), будучи измеренным в паре растворов, использованных в данной работе, должен быть близок к +20 мВ [9]. Активация таких каналов зависит от кальция, и они имеются в мембране аксонов нейронов гиппокампа [10, 11]. Кроме того, для активации TRPC-токов

требуется повышенная концентрация диацилглицерола и пониженная – фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфата (PIP2) [9, 12]. Эти условия могут создаваться в течение нескольких минут после деполяризации вследствие повышения активности фосфолипазы, обусловленного ростом внутриклеточной концентрации кальция [13].

Таким образом, полученные данные позволяют предполагать, что зависимость от активности потенцияция асинхронного компонента ГАМК-эргических синаптических токов может в заметной степени регулировать эффективность синаптической передачи при физиологических режимах синаптической активности.

Культура нейронов гиппокампа была любезно предоставлена нам сотрудницей Института физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины Т. Н. Цугоркой.

Авторы настоящей статьи – А. Л. Борисюк, А. Р. Степанюк, А. В. Довгань и П. В. Білан – подтверждают, что у них отсутствует конфликт интересов.

А. Л. Борисюк<sup>1,2</sup>, А. Р. Степанюк<sup>1,2</sup>, А. В. Довгань<sup>1,2</sup>,  
П. В. Білан<sup>1,2</sup>

#### ЗАЛЕЖНА ВІД АКТИВНОСТІ ПОТЕНЦІАЦІЯ АСИНХРОННОГО КОМПОНЕНТА ГАМК-ЕРГІЧНИХ СИНАПТИЧНИХ СТРУМІВ У КУЛЬТИВОВАНИХ НЕЙРОНАХ ГІПОКАМПА

<sup>1</sup> Державна ключова лабораторія молекулярної та клітинної біології, Київ (Україна).

<sup>2</sup> Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

#### Резюме

Після активації ГАМК-ергічних синаптичних з'єднань у культурі нейронів гіпокампа серіями деполяризуючих стимулів (5–45 с<sup>-1</sup>, п'ять–20 стимулів) у постсинаптичному нейроні розвивається гальмівний постсинаптичний струм (ГПСС), що складається з фазного та асинхронного компонентів. У експериментах з одночасним відведенням від двох синаптично зв'язаних нейронів ми виявили, що деполяризація пресинаптичної клітини на 2 хв до позитивних потенціалів також призводила до виникнення асинхронного компонента ГПСС (аГПСС), викликаного поодиноким потенціалом дії (ПД) пресинаптичного нейрона. При цьому час спаду ГПСС збільшувався у середньому втричі, ніж у першому випадку. Аналогічна потенціяція аГПСС спостерігалася в частині синапсів після їх тривалого (протягом 15 хв) подразнення серіями деполяризуючих стимулів (45 с<sup>-1</sup>, 20 стимулів, інтервал між серіями 23 с). Така потенціяція аГПСС зберігалася протягом тривалого часу (від 3 до 17 хв). У частині синаптичних з'єднань одночасно з по-

тенціяцією аГПСС відмічалися потенціяція платоподібного вхідного струму крізь мембрану пресинаптичного нейрона. При цьому заряд, що переносився вказаним струмом крізь мембрану згаданої клітини, вірогідно корелював із часом спаду викликаного ГПСС (середній коефіцієнт кореляції 0.83 ± 0.10). даний факт може свідчити про те, згаданий вхідний струм опосередковує потенціяцію ГПСС. Отримані результати дозволяють припустити, що вищеописана форма пластичності може регулювати ефективність ГАМК-ергічної синаптичної передачі в гіпокампі при фізіологічних режимах синаптичної активності.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. P. Jonas, J. Bischofberger, D. Fricker, and R. Miles, "Interneuron diversity series: Fast in, fast out – temporal and spatial signal processing in hippocampal interneurons," *Trends Neurosci.*, **27**, 30-40 (2004).
2. M. I. Daw, L. Tricoire, F. Erdelyi, et al., "Asynchronous transmitter release from cholecystokinin-containing inhibitory interneurons is widespread and target cell-independent," *J. Neurosci.*, **29**, 11112-11122 (2009).
3. A. J. Groffen, S. Martens, A. R. Diez, et al., "Doc2b is a high-affinity Ca<sup>2+</sup> sensor for spontaneous neurotransmitter release," *Science*, **327**, 1614-1618 (2010).
4. J. Raingo, M. Khvotchev, P. Liu, et al., "VAMP4 directs synaptic vesicles to a pool that selectively maintains asynchronous neurotransmission," *Nat. Neurosci.*, **15**, 738-745 (2012).
5. J. J. Hablitz, S. S. Mathew, and L. Pozzo-Miller, "GABA vesicles at synapses: are there 2 distinct pools?" *Neuroscientist*, **15**, 218-224 (2009).
6. A. B. Ali and M. Todorova, "Asynchronous release of GABA via tonic cannabinoid receptor activation at identified interneuron synapses in rat CA1," *Eur. J. Neurosci.*, **31**, 1196-1207 (2010).
7. J. M. Christie, D. N. Chiu, and C. E. Jahr, "Ca<sup>2+</sup>-dependent enhancement of release by subthreshold somatic depolarization," *Nat. Neurosci.*, **14**, 62-68 (2011).
8. M. P. Kaplan, K. S. Wilcox, and M. A. Dichter, "Differences in multiple forms of short-term plasticity between excitatory and inhibitory hippocampal neurons in culture," *Synapse*, **50**, 41-52 (2003).
9. M. X. Zhu, *TRP Channels*, CRC Press, Boca Raton (FL) (2011).
10. R. A. Nichols, A. F. Dengler, E. M. Nakagawa, et al., "A constitutive, transient receptor potential-like Ca<sup>2+</sup> influx pathway in presynaptic nerve endings independent of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels and Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange," *J. Biol. Chem.*, **282**, 36102-36111 (2007).
11. D. K. Heo, W. Y. Chung, H. W. Park, et al., "Opposite regulatory effects of TRPC1 and TRPC5 on neurite outgrowth in PC12 cells," *Cell Signal.*, **24**, 899-906 (2012).
12. T. Rohacs, "Regulation of transient receptor potential channels by the phospholipase C pathway," *Adv. Biol. Regul.*, **53**, 341-355 (2013).
13. Y. Sugawara, R. Echigo, K. Kashima, et al., "Intracellular calcium level is an important factor influencing ion channel modulations by PLC-coupled metabotropic receptors in hippocampal neurons," *Brain Res.*, **1512**, 9-21 (2013).