

С.Ю. Иванова, П.Г. Костюк

## Збільшення ефективності ГАМКергічної синаптичної передачі після тривалої блокади ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів у культурі нейронів гіпокампа щура

*В последнее время предложена концепция согласно которой выделяют две основные формы пластичности в нейронных сетях. А именно пластичность, обусловленную предыдущей активностью синапса и гомеостатическую пластичность, которая обеспечивает стабильность работы центральной нервной системы. Хроническая блокада либо тормозной, либо возбуждающей синаптической передачи используются для изучения гомеостатической пластичности. Известно, что длительная блокада ионотропных глутаматных рецепторов активизирует ряд гомеостатических механизмов, включая увеличение эффективности глутаматэргической синаптической передачи. Мы исследовали, влияние длительной блокады ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов на свойства тормозной синаптической передачи опосредованной γ-аминомасляной кислотой (ГАМК). Используя метод фиксации потенциала в конфигурации "целая клетка" для регистрации тормозных постсинаптических токов (ТПСТ) в постсинаптической клетке и локальную внеклеточную стимуляцию пресинаптического нейрона мы исследовали некоторые свойства ГАМКэргической передачи в контрольных культурах нейронов гиппокампа и в культурах нейронов гиппокампа, выращенных при наличии блокатора ГАМК<sub>A</sub>-рецепторов – бичукуллина (20 мкмоль/л). Показано, что хроническая блокада ГАМКэргической синаптической передачи значительно (почти на 100%) увеличивает амплитуду ТПСТ, но не влияет на их потенциал реверсии, коэффициенты вариации и депрессию, вызванную парной стимуляцией. Можно сделать вывод, что в основе изменения эффективности ГАМКэргической синаптической передачи лежат, в основном, постсинаптические механизмы. Таким образом, гомеостатическая пластичность характерна для ГАМКэргической передачи, а не только для глутаматэргической передачи (что было известно ранее).*

### ВСТУП

Останнім часом було запропоновано розглянути пластичність у нейронних мережах у двох формах [13, 15]: дієзалежну, тобто зумовлену попередньою активністю нейронів, яка змінює властивості нейронних мереж, і гомеостатичну, котра може певним чином протидіяти змінам, пов'язаним з попередньою активністю. Тривалу блокаду збуджувальної чи гальмівної синаптичної передачі часто використовують як модель для дослідження гомеостатичної пластичності [3, 5, 6, 11, 14]. Така блокада призводить до змін збудливості нейронів, ефектив-

ності синаптичної передачі, властивостей і розподілу постсинаптичних рецепторів [13, 15]. Зокрема, тривала блокада глутаматних рецепторів збільшує ефективність передачі збудження через синапс і навіть призводить до появи епілептиформної активності в культурі нейронів гіпокампа після відмикки блокаторів [2], вказуючи на порушення рівноваги між процесами збудження та гальмування. Було припущено, що цей ефект опосередкований НМДА-рецепторами, оскільки він є чутливим до їх антагоністів [2]. Збільшення ефективності глутаматергічної передачі після тривалої блокади іонотропних

© С.Ю. Иванова, П.Г. Костюк

глутаматних рецепторів спостерігалось у культурах нейронів із різних ділянок мозку ссавців [5–8, 11, 14, 16]. Таким чином, ефект хронічної блокади глутаматергічних рецепторів на властивості глутаматергічної синаптичної передачі детально досліджено. Однак немає відомостей щодо гальмівної синаптичної передачі, тому в цій роботі ми досліджували чи впливає тривала блокада гальмівної (ГАМКергічної) синаптичної передачі на її функціонування, а саме ми порівняли амплітуди викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (ГПСС) на градієнті 25 мВ, їх потенціал реверсії, коефіцієнти варіації та депресію, зумовлену парною стимуляцією у нейронах контрольних культур і культур, вирощених при наявності бікукуліну.

## МЕТОДИКА

Клітини контрольних культур і культур вирощених при наявності бікукуліну (дослідні) культивували паралельно. Для отримання клітин у новонароджених шурів лінії Вістар виділяли гіпокамп, розрізали на п'ять частин кожний і переносили в сольовий розчин, що містив 0,05% пронази Е. Ферментативну обробку проводили протягом 18 хв при 32°C, після чого шматочки гіпокампа тричі відмивали розчином без ферменту і диспергували до окремих клітин за допомогою Пастерівських піпеток. Суспензію клітин щільністю 60 тис. клітин на 200 мкл живильного середовища наносили на покриті полі-L-орнітином покривні скельця розміром 18x18 мм. Через 2 год інкубування при 36°C в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> у кожен чашку Петрі додавали 2 мл середовища для культивування (живильне середовище), яке складалося з 90% мінімального середовища Ігла (МЕМ), 10% кінської сироватки, 10 мкг/мл інсуліну та антибіотиків. Живильне середовище міняли кожні чотири доби. Після 5–6 діб *in vitro* культури обробляли фторурацилом (1 мкмоль/л)

протягом 36 год для пригнічення проліферації гліальних клітин, після чого повністю заміняли живильне середовище. Для отримання культивованих нейронів, вирощених за умов довготривалої блокади ГАМКергічної синаптичної передачі (дослідні культури), через 10 діб *in vitro* до половини чашок Петрі додавали блокатор ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів – бікукулін (20 мкмоль/л).

Електрофізіологічні дослідження проводили на культурах віком 17–26 діб *in vitro*. Контрольні та дослідні культури брали до експерименту через добу для того, щоб зменшити можливі відмінності властивостей ГАМКергічної передачі, пов'язані з віком культури. Безпосередньо перед експериментом як контрольні, так і дослідні культури інкубували протягом однієї години у зовнішньоклітинному розчині без блокаторів. Після чого клітини переносили в реєстраційну камеру та додавали 50 мкмоль/л DL-2-аміно-5-фосфовалер'янової кислоти (APV) та 10 мкмоль/л 6-ціано-7-нітрохіноксалін-2,3-діону (CNQX), щоб заблокувати синаптичні струми, опосередковані іонотропними глутаматними рецепторами. Для експериментів обирали ділянки покривних скелець з відносно низькою щільністю клітин (2–5 нейронів у полі зору з діаметром 400 мкм). Для збудження пресинаптичної клітини використовували зовнішньоклітинний електрод, розташований поблизу соми або аксона цієї клітини. Такий підхід дозволяє стимулювати окремих пресинаптичних нейрон або навіть поодинокую синаптичну терміналь [1, 4]. Для реєстрації гальмівних постсинаптичних струмів використовували метод фіксації потенціалу в конфігурації “ціла клітина”. За наших експериментальних умов (цезій у patch-піпетці) ми реєстрували ГАМКергічні струми, зумовлені активацією ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів, тобто хлорні струми, які мали потенціал реверсії приблизно –35 мВ. Склад розчинів, що використовувався, був таким (ммоль/л): розчин для patch-піпетки:

$C_6H_{11}CsO_7$  (глюконат цезію) – 100, CsCl – 30,  $MgCl_2$  – 4,  $Na_2ATP$  – 4, EGTA – 10, NIPES – 10. Зовнішньоклітинний розчин: NaCl – 140, KCl – 4,  $CaCl_2$  – 2,  $MgCl_2$  – 1, NIPES – 10, глюкоза – 10; рН усіх розчинів був 7,4. Експерименти проводили при кімнатній температурі (20–22°C). Оцифровані струми аналізували за допомогою програми ANDATRA (Ярослав Бойчук, Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця). Результати представлені як середня величина  $\pm$  середньоквадратична похибка середнього. Для статистичних порівнянь використовували критерій t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для того, щоб з'ясувати, чи впливає тривала блокада ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів на влас-

тивості ГАМК-ергічної синаптичної передачі, ми порівняли амплітуди викликаних ГПСС на градієнті 25 мВ, їх потенціали реверсії, коефіцієнти варіації та депресію, зумовлену парною стимуляцією у нейронах контрольних і дослідних культур. На рис. 1 представлено викликані постсинаптичні струми при різних підтримуваних потенціалах на мембрані постсинаптичного нейрона і вольт-амперні характеристики для контрольної та для дослідної пар нейронів. У контрольних культурах середнє значення потенціалу реверсії викликаних ГПСС було  $-34,5 \pm 0,45$  мВ (n=15) та відповідно в дослідних культурах  $-35,6 \pm 0,45$  мВ (n=15). Потенціали реверсії викликаних постсинаптичних струмів у нейронах контрольних і дослідних культур статистично достовірно не відрізнялись (t=-1,67,

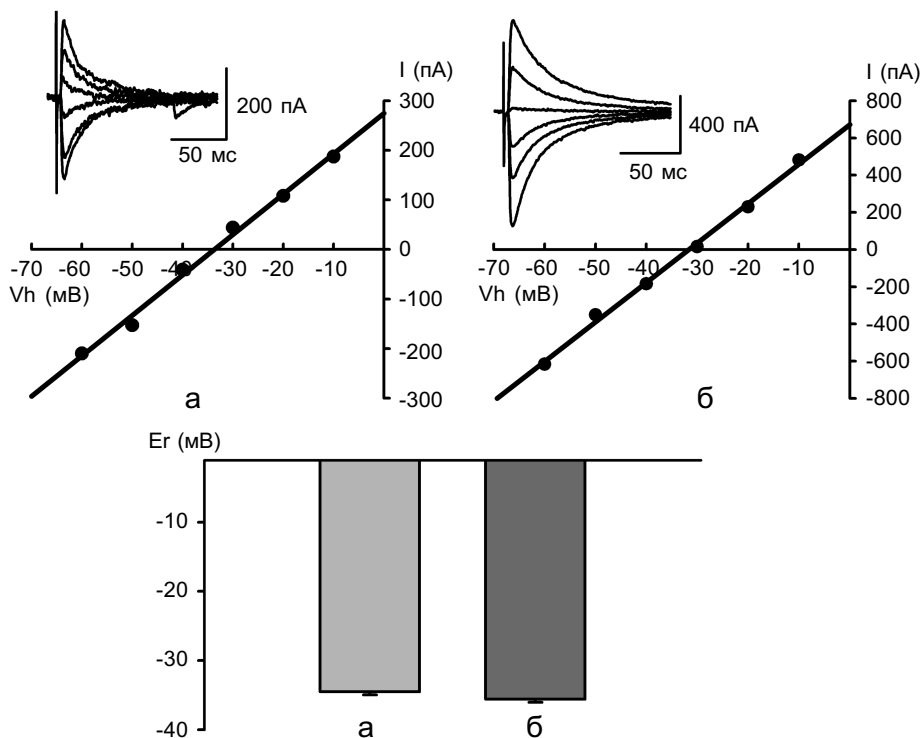


Рис. 1. Реєстрації викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (ГПСС) при різних підтримуваних потенціалах на мембрані постсинаптичного нейрона та вольт-амперні характеристики ГПСС у культурах нейронів гіпокампа, вирощених у контрольних умовах (а) і при наявності блокатора ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів – бікукуліну (б).

У нижній частині рисунка – середні значення потенціалів реверсії ГПСС для контрольних (а) і дослідних (б) пар нейронів

$P > 0,10$ ,  $df=28$ ). Значення потенціалу реверсії, отримане в експерименті, було близьким до теоретично розрахованого за допомогою рівняння Нернста для рівноважного хлорного потенціалу.

Проте ми виявили значне збільшення амплітуди викликаних ГПСС, опосередкованих ГАМК у дослідних культурах нейронів гіпокампа. На рис. 2 показано приклади реєстрацій викликаних ГПСС і діаграми, що демонструють середні значення амплітуд викликаних ГПСС у контрольних і дослідних культурах. Середнє значення амплітуди викликаних ГПСС на градієнті 25 мВ у контрольних і дослідних парах нейронів ( $n=15$ ) становило  $-277,56 \pm 52,5$  та  $-555,94 \text{ пА} \pm 99,53 \text{ пА}$  відповідно. Аналіз цих результатів показав статистично достовірну відмінність ( $t = -2,47$ ;  $P < 0,02$ ;  $df = 28$ ).

Використовуючи стимуляцію парою імпульсів кожні 2 с з інтервалом у парі 100 мс, ми оцінили депресію ГПСС, зумовлену такою парною стимуляцією. Обчислювали її як  $(\text{ГПСС}_1 - \text{ГПСС}_2) / \text{ГПСС}_1$ , де  $\text{ГПСС}_1$  – це амплітуда струму, викликаного першим

стимулом у парі, а  $\text{ГПСС}_2$  – амплітуда струму у відповідь на другий стимул у парі. Середнє значення депресії ГПСС, зумовленої парною стимуляцією, для контрольних пар становило  $0,15 \pm 0,04$  ( $n=15$ ) і  $0,16 \pm 0,03$  ( $n=14$ ) для дослідних пар (рис. 3,а). Отже, ми не виявили статистично достовірних відмінностей депресії ГПСС, зумовленої парною стимуляцією ( $t = -0,2$ ;  $P > 0,84$ ;  $df = 27$ ).

Також ми оцінили значення коефіцієнтів варіації (КВ) амплітуд викликаних ГПСС<sub>1</sub>, які ми розраховували як відношення середньоквадратичної похибки до середньої амплітуди. КВ для контрольних і дослідних пар становив  $-0,14 \pm 0,02$  ( $n=15$ ) і  $-0,11 \pm 0,01$  ( $n=14$ ) відповідно (див. рис. 3,б). Тобто нами не виявлено статистично достовірної різниці середніх значень коефіцієнтів варіації ГПСС<sub>1</sub> ( $t = -1,21$ ;  $P > 0,24$ ;  $df = 27$ ).

Однією з моделей для дослідження гомеостатичної пластичності є тривале збільшення або зменшення імпульсної активності нейронів за допомогою блокторів збуджувальної чи гальмівної синаптичної передачі. В наших експериментах ми

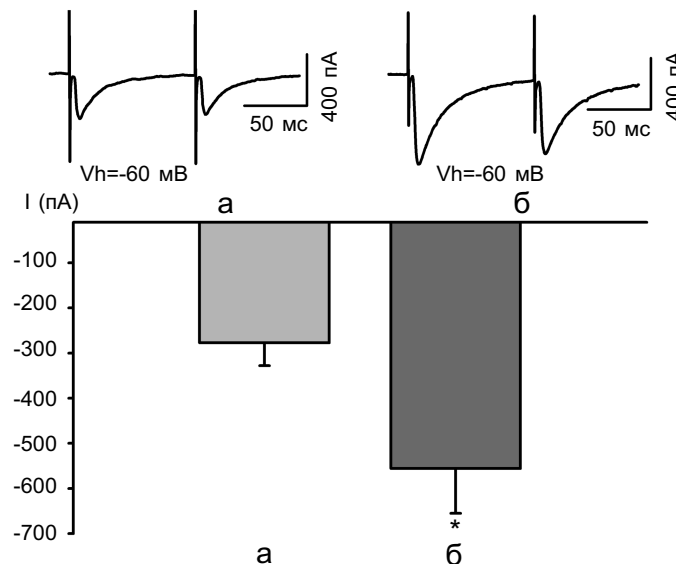


Рис. 2. Приклади гальмівних постсинаптичних струмів (ГПСС), викликаних парною стимуляцією пресинаптичного нейрона гіпокампа у контрольних (а) і дослідних (б), вирощених при наявності бікукуліну, парах нейронів. У нижній частині рисунка – середні значення амплітуд викликаних ГПСС у парах нейронів у контрольних (а) і дослідних (б) культурах

збільшували нейронну активність за допомогою блокади ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів і досліджували, чи впливає таке тривале збільшення імпульсної активності нейронів на властивості ГАМКергічної синаптичної передачі. Ми показали, що тривала блокада ГАМКергічної передачі дійсно призводить до підвищення амплітуди викликаних ГПСС, тобто до збільшення ефективності ГАМКергічної передачі. Таке збільшення ефективності ГАМКергічної передачі, в свою чергу, є одним із шляхів, спрямованих на зменшення нейронної активності, тобто є компенсаторним. Отже, наші результати свідчать про гомеостатичні зміни ГАМКергічної передачі в гіпокампі при збільшенні нейронної активності. Таке свідчення, наскільки нам відомо, отримано вперше. Зважаючи на те, що тривала інкубація нейронів кори мозочка з додаванням ГАМК або її агоністів призводить до зменшення кількості ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів [9, 10], можна припустити, що за наших умов при наявності блокаторів ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів спостерігається протилежний процес – збільшення кількості ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів. На користь саме такого, тобто постсинаптичного механізму змін ефективності ГАМКергічної синаптичної передачі свідчать наші результати про те, що збільшення амплітуд ГПСС не супроводжувалося змен-

шенням коефіцієнтів варіації ГПСС і змінами депресії, зумовленої парною стимуляцією.

Вважається, що ефективність гальмування в корі головного мозку може регулюватися за допомогою мозкового нейротрофічного фактора – BDNF (brain-derived neurotrophic factor) [12, 13]. Відомо також, що останній синтезується й вивільняється нейронами під час їх активності [12, 13]. Встановлено, що зменшення вмісту BDNF зменшує кількість ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів у постсинаптичній мембрані. Зважаючи на це, можна припустити, що за наших експериментальних умов (збільшення імпульсної активності) вміст BDNF збільшується і це призводить до збільшення кількості постсинаптичних ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів. Проте безпосередня відповідь на питання щодо участі BDNF у гомеостатичній пластичності ГАМКергічної синаптичної передачі потребує подальшого дослідження.

S.Y. Ivanova, P.G. Kostyuk

#### CHRONIC TREATMENT WITH GABA<sub>A</sub> RECEPTOR ANTAGONIST BICUCULLINE INCREASES EFFICACY OF GABAERGIC SYNAPTIC TRANSMISSION IN RAT HIPPOCAMPAL CELL CULTURES

It has been proposed to consider plasticity in neuronal network as occurring in two forms: use-dependent plasticity which

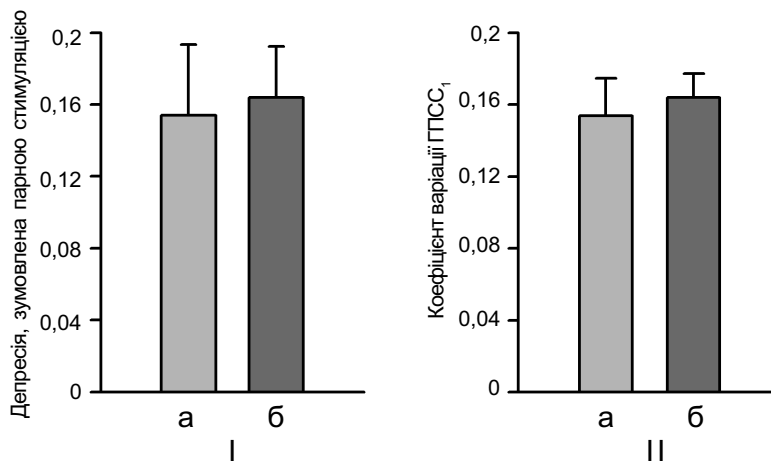


Рис. 3. Середні значення депресії, зумовленої парною стимуляцією (I) та коефіцієнтів варіації (II) гальмівних постсинаптичних струмів у контрольних (а) і дослідних (б) культурах

modifies the network properties, and homeostatic plasticity which may counteract use-dependent changes. Chronic block of some of transmitter receptors is often used as a model for studying homeostatic plasticity. We studied whether chronic block of GABA<sub>A</sub> receptors can affect GABAergic transmission. Using whole-cell voltage clamp recording and local extracellular stimulation we investigated evoked inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) in cultured rat hippocampal neurons grown in the presence of GABA<sub>A</sub> receptor antagonist – bicuculline (20mM) and in control conditions. Cell for both control and pretreated cultures were obtained from same dissection and were grown in parallel. We compared the amplitudes of the evoked IPSC, the reversal potentials of the responses IPSC coefficient of variation and depression evoked by paired stimulation. Chronic bicuculline treatment did not significantly affect the paired-pulse depression (PPD) and IPSC reversal potentials. In contrast we found that amplitude of evoked IPSCs was increased about two times in cultures treated with bicuculline. However, IPSC coefficients of variation were not significantly different. We conclude that chronic block of GABA<sub>A</sub> receptors enhances efficacy of GABAergic synaptic transmission in rat hippocampal cell cultures and this effect is likely to postsynaptic mechanism(s) because IPSC increase was not accompanied with changes of IPSC coefficient of variation. A possibility that the effect of chronic block of GABA<sub>A</sub> receptors on GABAergic transmission is mediated by neurotrophin BDNF is discussed.

*International Center of Molecular Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Fedulova S.A., Vasilyev D.V., Isaeva E.V. et al. Possibility of multiquantal transmission at single inhibitory synapse in cultured rat hippocampal neurons // *Neuroscience*. – 1999. – **92**. – P. 1217–1230.
2. Furshpan E.J., Potter D.D. Seizure-like activity and cellular damage in rat hippocampal neurons in cell culture // *Neuron*. – 1989. – **3**. – P. 199–207.
3. Galante M., Avossa D., Rosato-Siri M. et al. Homeostatic plasticity induced by chronic block of AMPA/kainate receptors modulates the generation of rhythmic bursting in rat spinal cord organotypic cultures // *Eur. J. Neurosci*. – 2001. – **14**. – P. 903–917.
4. Kirischuk S., Veselovsky N., Grantyn R. Relationship between presynaptic calcium transients and postsynaptic currents at single gamma-aminobutyric acid (GABA)ergic boutons // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1999. – **96**. – P. 7520–7525.
5. Liao D., Zhang X., O'Brien R. et al. Regulation of morphological postsynaptic silent synapses in developing hippocampal neurons // *Nat. Neurosci*. – 1999. – **2**. – P. 37–43.
6. Lissin D.V., Gomperts S.N., Carroll R.C. et al. Activity differentially regulates the surface expression of synaptic AMPA and NMDA glutamate receptors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 1998. – **95**. – P. 7097–7102.
7. Luthi A., Schwyzer L., Mateos J.M. et al. NMDA receptor activation limits the number of synaptic connections during hippocampal development // *Nat. Neurosci*. – 2001. – **4**. – P. 1102–1107.
8. McKinney R.A., Luthi A., Bandtlow C.E. et al. Selective glutamate receptor antagonists can induce or prevent axonal sprouting in rat hippocampal slice cultures // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 1999. – **96**. – P. 11631–11636.
9. Mhatre M.C., Ticku M.K. Chronic GABA treatment downregulates the GABA<sub>A</sub> receptor alpha 2 and alpha 3 subunit mRNAs as well as polypeptide expression in primary cultured cerebral cortical neurons // *Brain Res. Mol. Brain Res*. – 1994. – **24**. – P. 159–165.
10. Montpied P., Ginns E.I., Martin B.M. et al. gamma-Aminobutyric acid (GABA) induces a receptor-mediated reduction in GABA<sub>A</sub> receptor alpha subunit messenger RNAs in embryonic chick neurons in culture // *J. Biol. Chem*. – 1991. – **266**. – P. 6011–6014.
11. Rao A., Craig A.M. Activity regulates the synaptic localization of the NMDA receptor in hippocampal neurons // *Neuron*. – 1997. – **19**. – P. 801–812.
12. Rutherford L.C.F., DeWan A.F., Lauer H.M.F. et al. Brain-derived neurotrophic factor mediates the activity-dependent regulation of inhibition in neocortical cultures // *J. Neurosci*. – 1997. – **17**. – P. 4527–4535.
13. Turrigiano G.G. Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same // *Trends Neurosci*. – 1999. – **22**. – P. 221–227.
14. Turrigiano G.G., Leslie K.R., Desai, N.S. et al. Activity-dependent scaling of quantal amplitude in neocortical neurons // *Nature*. – 1998. – **391**. – P. 892–896.
15. Turrigiano G.G., Nelson S.B. Hebb and homeostasis in neuronal plasticity // *Curr. Opin. Neurobiol*. – 2000. – **10**. – P. 358–364.
16. Watt A.J.F., van Rossum M.C.F., MacLeod K.M.F. et al. Activity coregulates quantal AMPA and NMDA currents at neocortical synapses // *Neuron*. – 2000. – **26**. – P. 659–670.

*Міжнар. центр молек. фізіології НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до редакції 30.03.2004*