

С.Ю. Іванова, М.В. Сторожук, О.П. Костюк, П.Г. Костюк

Вплив блокади синаптичної передачі та гіпоглікемії на імпульсну нейронну активність у культурі нейронів гіпокампа щура

Спонтанная импульсная активность нейронов исследовалась в культуре нейронов гиппокампа крыс. Обнаружено, что нейроны нередко генерируют дуплеты и триплеты потенциалов действия (ПД) с межимпульсными интервалами 60 мс и менее, несмотря на относительно низкую среднюю частоту ПД (1–2 Гц). Гистограммы межимпульсных интервалов хорошо аппроксимировались функцией экспоненциального спада с двумя компонентами с постоянными времени $\tau_1 \sim 36$ мс и $\tau_2 \sim 1000$ мс соответственно. Частота спонтанной импульсной активности существенно изменялась при приложении блокаторов возбуждающей и тормозной синаптической передачи: уменьшалась при наличии блокатора АМРА-каинатных рецепторов CNQX (10 мкмоль/л); увеличивалась при добавлении блокатора ГАМК_A-рецепторов бикакуллина (10 мкмоль/л). Исследовался также эффект замены внеклеточной глюкозы на манитол на частоту спонтанной импульсной активности. Обнаружено, что удаление глюкозы из внеклеточного раствора приводит к уменьшению частоты спонтанной импульсной активности до ~25 % от контроля. Полученные результаты позволяют предполагать что эффект гипогликемии обусловлен изменениями синаптической передачи.

ВСТУП

Одним з ускладнень діабету є порушення пам'яті та процесів навчання. Як процеси навчання, так і експресія довготривалої потенціації у зоні СА1-гіпокампа змінюються у щурів із індукованою стрептозотоцином гіперглікемією [3, 4, 8, 9]. З іншого боку, гіпоглікемія також призводить до порушень пам'яті та процесів навчання [7, 19]. Зокрема, низький вміст глюкози спричинює пригнічення довготривалої потенціації опосередкованими механізмами, залежними від вивільнення NO [7]. Такі факти свідчать про те що нормальний вміст глюкози дуже важливий для функціонування мозку.

Гостра гіпоглікемія є одним із поширених негативних наслідків інсулінової терапії. Розуміння механізмів порушень функцій мозку, зумовлених зменшенням вмісту

глюкози, дуже важливе для розробки нових підходів нормалізації функцій нервової системи під час гіпоглікемії. Зважаючи на це, чимало експериментальних досліджень спрямовано на вивчення дії гіпоглікемії на центральну нервову систему та можливих механізмів такого впливу. Встановлено, що гіпоглікемія може призводити до уражень головного мозку, спричинених вивільненням збуджувальних амінокислот, що в свою чергу збільшує вхід іонів кальцію до нейронів і є причиною їх загибелі [2]. Такі та інші наслідки гіпоглікемії досить детально описані [2, 5, 7, 10]. Відомі також деякі клітинні механізми, що лежать в основі цих явищ. Водночас, менше є відомостей щодо впливу гіпоглікемії на імпульсну активність в нейронних мережах, зокрема в гіпокампі.

© С.Ю. Іванова, М.В. Сторожук, О.П. Костюк, П.Г. Костюк

Метою нашої роботи було вивчення впливу гострої гіпоглікемії на спонтанну імпульсну активність нейронів гіпокампа.

МЕТОДИКА

Для отримання клітин у новонароджених щурів лінії Вістар видаляли 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 (щільність 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% CO₂ у кожен чашку Петрі додавали 2 мл середовища для культивування, яке складало 90% мінімального середовища Ігла (МЕМ), 10% кінської сироватки, 10 мкг/мл інсуліну та антибіотики. 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 живильне середовище повністю заміняли.

Електрофізіологічні дослідження проводили *in vitro*, на культурах віком від 17 до 26 діб зі встановленими синаптичними зв'язками [6, 13]. Нейрони для експериментів вибирали на ділянках покривних скельць із відносно високою щільністю (8–10 нейронів у полі зору з діаметром 400 мкм). Для реєстрації імпульсної нейронної активності використовували метод patch-clamp у конфігурації щільного або нещільного контакту з інтактною клітиною. Потенціал на піпетці підтримували на рівні 0 мВ. Імпульсну нейронну активність (тобто нейронні ПД) реєстрували як “струми ПД”. Контрольний зовнішньоклітинний розчин містив (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4, CaCl₂ – 2,

MgCl₂ – 1, NEPES – 10, глюкоза – 10; pH 7,4. Для дослідження впливу гіпоглікемії використовували зовнішньоклітинний розчин, в якому глюкоза була еквімолярно заміщена на манітол. Patch-піпетку для реєстрації імпульсної активності заповняли контрольним зовнішньоклітинним розчином. 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 ± середньоквадратична похибка середнього. Для статистичних порівнянь використовували критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Спочатку ми досліджували імпульсну нейронну активність за контрольних умов, тобто без блокаторів синаптичної передачі та при наявності глюкози.

Для експериментів обирали великі нейрони пірамідної форми, ймовірно, глутаматергічні пірамідні нейрони. В середньому частота імпульсної активності в цих нейронах була досить невисокою (1–2 Гц), незважаючи на це, потенціали дії достатньо часто групувались у дуплети і триплети з міжімпульсними інтервалами ~20–60 мс. Приклади реєстрацій показано на рис. 1. У даному випадку середня частота імпульсної активності була 1,43 Гц, а гістограма міжімпульсних інтервалів добре апроксимувалася двома компонентами із постійними часу $\tau_1 = 42,7$ мс і $\tau_2 = 1235$ мс. Подібні результати (“кластеризація” ПД) спостерігалась і в інших нейронах. Постійні часи становили $\tau_1 = 36,3$ мс ± 3,5 мс (n=4) та $\tau_2 = 1000$ мс ± 387 мс.

Слід зазначити, що частота спонтанних ПД у культурі нейронів гіпокампа зі встановленими синаптичними зв'язками значною мірою залежала від активації АМРА-каїнатних і ГАМК_A-рецепторів. На рис. 2 показано приклади реєстрацій спонтанних

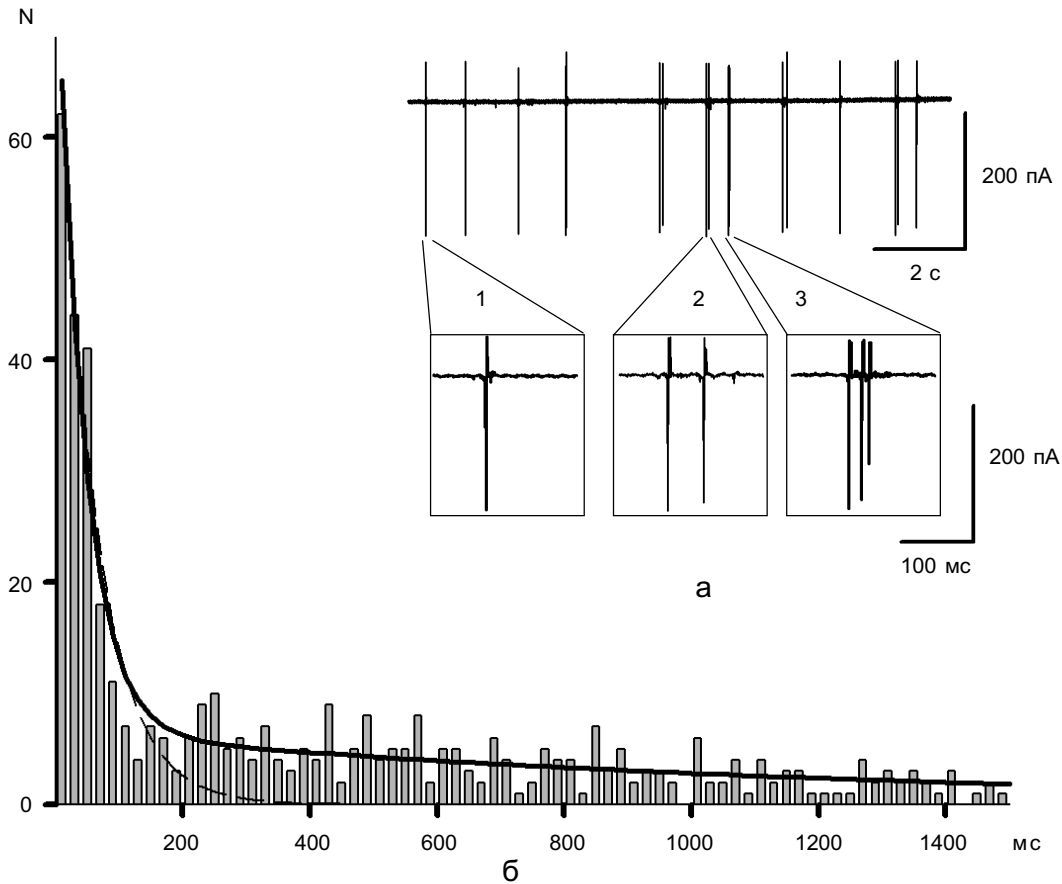


Рис. 1. Реєстрації спонтанної імпульсної активності нейрона (а) в культурі гіпокампа щура: 1 – поодинокий потенціал дії, 2 – дуплет, 3 – триплет. Гістограма розподілу міжімпульсних інтервалів спонтанної імпульсної активності нейрона в культурі гіпокампа щура (б). Апроксимація гістограми однією (суцільна лінія) та двома експонентами із постійними часу $\tau_1 = 42,7$ мс та $\tau_2 = 1235$ мс (пунктирна лінія)

ПД у контролі, при наявності антагоніста АМРА-каїнатних рецепторів CNQX (10 мкмоль/л) і після відмивки блокатора. Подібні результати спостерігались і в інших чотирьох експериментах. У середньому частота імпульсної активності при наяв-

ності CNQX зменшувалася до 10 % від контролю. Блокада ГАМК_A-рецепторів за допомогою бікукуліну призводила до протилежного ефекту – збільшенню частоти імпульсної активності (рис. 3).

У наступній серії експериментів ми

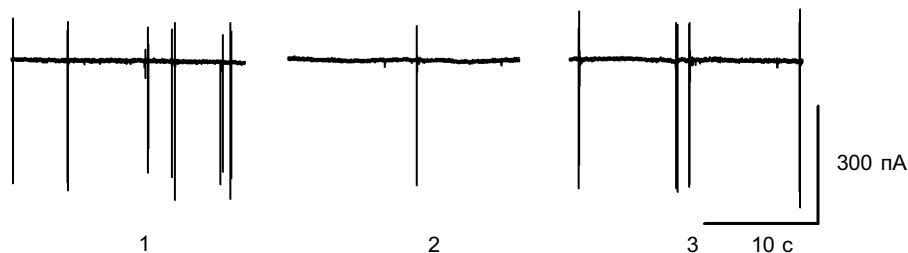


Рис. 2. Реєстрації спонтанної імпульсної активності нейрона в культурі гіпокампа щура в контролі (1), при наявності 10 мкмоль/л CNQX – блокатора АМРА-каїнатних глутаматних рецепторів (2) та після його відмивання (3)

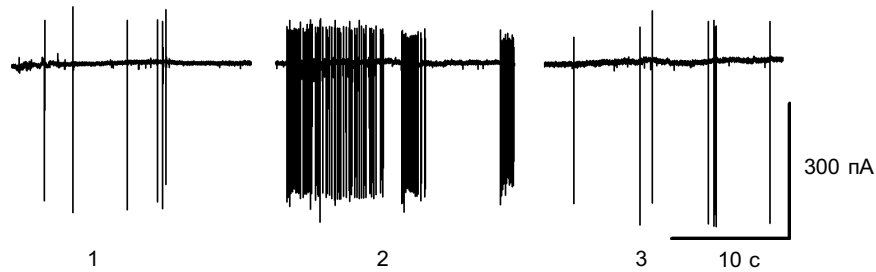


Рис. 3. Реєстрації спонтанної імпульсної активності нейрона в культурі гіпокампа щура в контролі (1), при наявності блокатора ГАМК_A-рецепторів – 10 мкмоль/л бікукуліна (2) та після його відмивання (3)

досліджували вплив гострої гіпоглікемії на спонтанну імпульсну активність нейронів гіпокампа. Спонтанну імпульсну активність реєстрували не менше ніж 3 хв у контрольних умовах (перфузія розчином із глюко-

зою), після цього починали перфузувати камеру розчином, в якому глюкоза була еквімолярно заміщена на манітол. Це призводило до значного зменшення частоти імпульсної активності (рис. 4). Слід зазна-

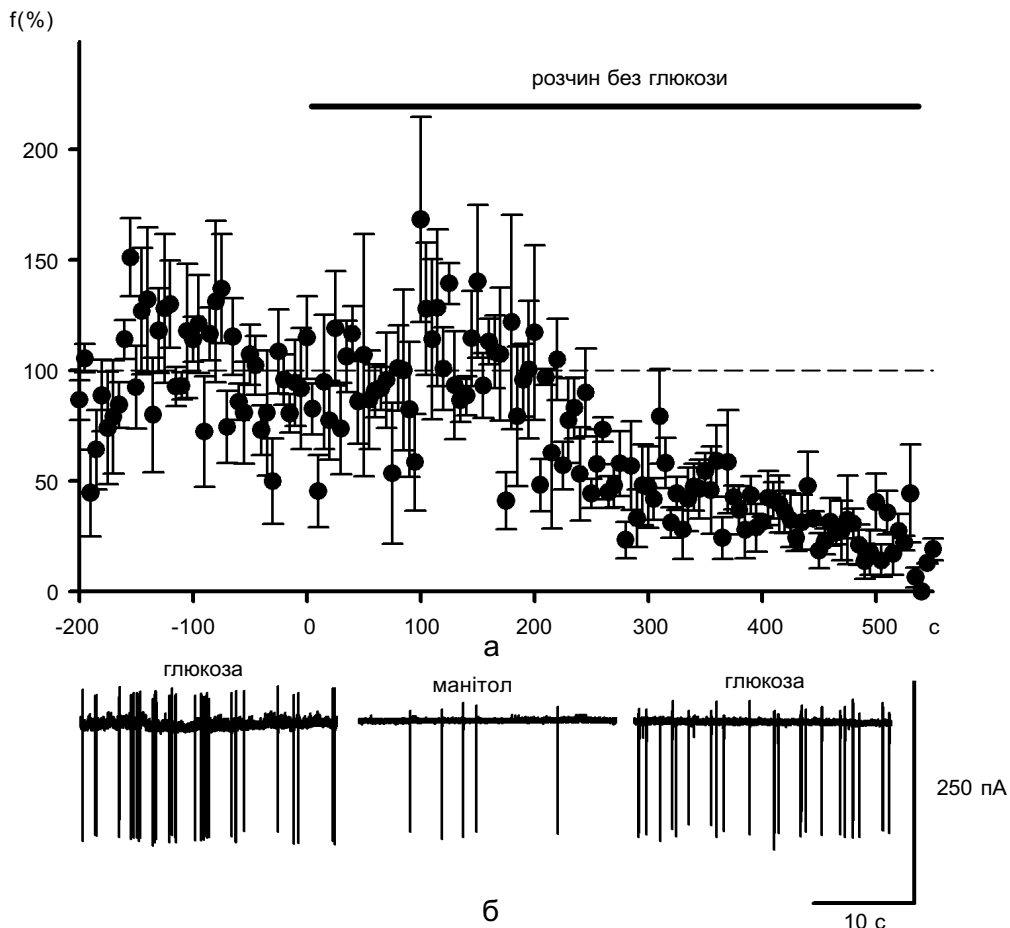


Рис. 4. Частота спонтанної імпульсної активності (% від контролю) нейронів у культурі гіпокампа щура за контрольних умов – розчин із глюкозою та за умов гіпоглікемії – розчин, в якому глюкоза еквімолярно заміщена манітолом (а) та реєстрації спонтанної імпульсної активності нейрона в культурі гіпокампа щура за контрольних умов – розчин з глюкозою, без глюкози та після повернення до контрольного розчину (б)

чити, що це зменшення розпочиналося приблизно через 4 хв після початку перфузії камери розчином без глюкози і сягало максимуму приблизно через 8–9 хв. У середньому частота імпульсної нейронної активності на 9-й хвилині перфузії розчином без глюкози зменшувалася до $23,5\% \pm 3,6\%$ від контролю ($n = 4$; $P < 0,05$). В одному із зазначених експериментів досліджувалася також зворотність ефекту гіпоглікемії. Після реєстрації імпульсної активності за умов контролю та гіпоглікемії знову починали перфузію розчином із глюкозою. Значне відновлення частоти імпульсної активності спостерігалось через 10 хв після початку реперфузії розчином із глюкозою (рис. 4, б).

Наші результати щодо впливу гіпоглікемії на імпульсну нейронну активність у культурі нейронів гіпокампа добре узгоджуються з даними, отриманими при дослідженні впливу гіпоглікемії на активність нейронів дорсолатерального септального ядра [1]. Схожі результати також спостерігались при вивченні зрізів гіпокампа [20]. Це дає змогу припустити універсальність ефекту гіпоглікемії на нейронну активність у головному мозку. Важливим питанням залишається механізм(и) впливу гіпоглікемії на нейронну активність. Наші результати стосовно ролі блокаторів збуджувальних (AMPA-каїнатних) і гальмівних (ГАМК_A-рецепторів) у регуляції спонтанної нейронної активності у культурі нейронів гіпокампа із встановленими синаптичним зв'язками (див. рис. 2, 3), дозволяють припускати, що ефект гіпоглікемії опосередкований збільшенням ефективності ГАМКергічної передачі або, навпаки, зменшенням ефективності збуджувальної синаптичної передачі. Останнє здається більш імовірним зважаючи на те, що у дорсолатеральному септальному ядрі гіпоглікемія зменшувала і збуджувальну, і гальмівну синаптичні передачі [1, 11, 12, 14, 15], проте це питання потребує подальшого дослідження. Цікаво також зазначити, що незалежно від механізму впливу гіпоглікемії на нейронну

активність, тривалі зміни нейронної активності незалежно від їх механізму можуть активувати гомеостатичні зміни як збудливості нейронів, так і ефективності синаптичної передачі. Зокрема, тривале зменшення нейронної активності призводить до компенсаторного збільшення збудливості нейронів, збільшення ефективності збуджувальної (глутаматергічної) та зменшення ефективності гальмівної (ГАМКергічної передачі) [16–18]. Не виключено, що подібні компенсаторні зміни відбуваються при тривалій гіпоглікемії і є одним із механізмів порушень пам'яті та процесів навчання.

Таким чином, частота спонтанної імпульсної активності нейронів у культурі гіпокампа щура залежить від балансу гальмівної та збуджувальної синаптичної передачі, а також від концентрації глюкози в позаклітинному середовищі.

**S.Y. Ivanova, M.V. Storozhuk, E.P. Kostyuk,
P.G. Kostyuk**

SPONTANEOUS NEURONAL ACTIVITY IN RAT HIPPOCAMPAL CELL CULTURES: EFFECT OF GLUCOSE DEPRIVATION

Spontaneous neuronal activity was studied in rat hippocampal cell cultures using patch clamp technique in cell-attached or loose-patch configuration. It was found that in spite of relatively low average frequency (1–2 Hz) of neuronal activity in the cell cultures, neurons often fire doublets or triplets of action potentials with interspike interval of 60 ms and less. Interspike interval histograms were substantially better fitted by double exponential decay functions than by single exponential ones. On average, estimated decay time constant for the fits were $\tau_1 \sim 36$, ms and $\tau_2 \sim 1000$ ms respectively. Spontaneous neuronal firing to a large extent depended on glutamatergic excitation and GABA_A ergic inhibition: a blocker of AMPA/kainate receptor CNQX (10 μ M) either substantially decreased or completely blocked spontaneous action potentials; a blocker of GABA_A receptors bicuculine (10 μ M) increased neuronal firing. Effect of glucose deprivation on action potential frequency was also studied. It was found that glucose deprivation reduces AP frequency to 25% of control. Taken together, these results support an idea that hypoglycaemia alters synaptic transmission in hippocampus.

*International Center of Molecular Physiology,
A.A. Bogomoletz Institute, National Academy of Sciences of
Ukraine, Kiev*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Akasu T., Tsurusaki M., Shoji S. Depletion of glucose causes presynaptic inhibition of neuronal transmission in the rat dorsolateral septal nucleus // *Synapse*. – 1996. – **24**, № 2. – P. 125–134.
2. Auer R. N. F., Anderson L. G. Hypoglycaemic brain damage: effect of a dihydropyridine calcium channel antagonist in rats // *Diabetologia*. – 1996. – **39**, № 2. – P. 129–134.
3. Biessels G. J. F., Kamal A., Ramakers G. M. F. et al. Place learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-induced diabetic rats // *Diabetes*. – 1996. – **45**, № 9. – P. 1259–1266.
4. Biessels G. J. F., Kamal A., Urban I. J. F. et al. Water maze learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment // *Brain Res.* – 1998. – **800**, №1. – P. 125–135.
5. Brown A. M. F., Ransom B. R. Neuroprotective effects of increased extracellular Ca²⁺ during aglycemia in white matter // *J. Neurophysiol.* – 2002. – **88**, №3. – P. 1302–1307.
6. 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**, № 4. – P. 1217–1230.
7. Izumi Y. FAU, Zorumski C. F. Involvement of nitric oxide in low glucose-mediated inhibition of hippocampal long-term potentiation // *Synapse*. – 1997. – **25**, №3. – P. 258–262.
8. Kamal A. FAU, Biessels G. J. F., Duis S. E. F. et al. Learning and hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: interaction of diabetes and ageing // *Diabetologia*. – 2000. – **43**, №4. – P. 500–506.
9. Kamal A. FAU, Biessels G. J. F., Urban I. J. F. et al. Hippocampal synaptic plasticity in streptozotocin-diabetic rats: impairment of long-term potentiation and facilitation of long-term depression // *Neuroscience*. – 1999. – **90**, №3. – P. 737–745.
10. Mobbs C. V. F., Kow L. M. F., Yang X. J. Brain glucose-sensing mechanisms: ubiquitous silencing by aglycemia vs. hypothalamic neuroendocrine responses // *Amer. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* – 2001. – **281**, №4. – P. E649–654.
11. Shoji S. Glucose regulation of synaptic transmission in the dorsolateral septal nucleus of the rat // *Synapse*. – 1992. – **12**, № 4. – P. 322–332.
12. Shoji S. FAU, Akasu T., Hasuo H. et al. Glucose-depletion suppresses synaptic transmissions in rat dorsolateral septal nucleus // *Jap. J. Physiol.* – 1991. – **41**, №5. – P. 809–815.
13. Storozhuk M. V., Melnick I. V., Kostyuk P. G. et al. Postsynaptic mechanism may contribute to inhibitory acetylcholine effect on GABAergic synaptic transmission in hippocampal cell cultures // *Synapse*. – 2001. – **41**, № 1. – P. 65–70.
14. Tsurusaki M., Akasu T. Effects of corticosteroids on synaptic transmission in rat dorsolateral septal nucleus // *Jap. J. Physiol.* – 2000. – **50**, №2. – P. 267–272.
15. Tsurusaki M., Akasu T., Shoji S. Patch-clamp analysis of hypoglycemia-induced inhibition of synaptic transmission in the rat dorsolateral septal nucleus // *Kurume Med. J.* – 1994. – **41**, № 2. – P. 65–72.
16. Turrigiano G., Abbott L. F., Marder E. Activity-dependent changes in the intrinsic properties of cultured neurons // *Science*. – 1994. – **264**, № 5161. – P. 974–977.
17. Turrigiano G. G. Homeostatic plasticity in neuronal networks: the more things change, the more they stay the same // *Trends Neurosci.* – 1999. – **22**, № 5. – P. 221–227.
18. Turrigiano G. G., Nelson S. B. Hebb and homeostasis in neuronal plasticity // *Curr. Opin. Neurobiol.* – 2000. – **10**, № 3. – P. 358–364.
19. Yamada K. A. F., Rensing N., Izumi Y. et al. Repetitive hypoglycemia in young rats impairs hippocampal long-term potentiation // *Pediatr. Res.* – 2004. – **55**, № 3. – P. 372–379.
20. Zhu P. J. F., Krnjevic K. Adenosine release is a major cause of failure of synaptic transmission during hypoglycaemia in rat hippocampal slices // *Neurosci. Lett.* – 1993. – **155**, № 2. – P. 128–131.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України;
Міжн. центр молек. фізіології НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов
до редакції 24.05.04*