

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

Кальційзалежна регуляція депресії гальмівної синаптичної передачі блокатором N-типу кальцієвих каналів у культурі нейронів гіпокампа

Різні типи високопорогових кальцієвих каналів запускають механізм вивільнення нейромедіатора в центральних синапсах ссавців. Відомо, що N-тип високопорогових кальцієвих каналів бере участь у регуляції синаптичної передачі в багатьох терміналях центральної нервової системи. Проте дотепер залишається невідомою їхня роль у кальційзалежній регуляції депресії ГАМКергічної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа. Ми досліджували чутливість ГАМКергічної депресії при парній стимуляції до селективного блокатора N-типу високопорогових кальцієвих каналів ω -конотоксину – GVIA за різної зовнішньоклітинної концентрації кальцію. Для вимірювання викликаних гальмівних постсинаптичних струмів були застосовані методики фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина» та позаклітинної локальної електричної парної стимуляції аксона пресинаптичного нейрона. Було з'ясовано, що існує нелінійна залежність між амплітудою викликаних гальмівних постсинаптичних струмів і зовнішньоклітинною концентрацією Ca^{2+} . Роль N-типу кальцієвих каналів у кальційзалежній регуляції депресії була досліджена при аплікації 200 нмоль/л ω -конотоксину. При дії блокатора нелінійна залежність зберігалася. Показано, що рівень депресії залежить від зовнішньоклітинної концентрації кальцію. Зниження концентрації Ca^{2+} у зовнішньому розчині призводило до зменшення депресії, а наявність ω -конотоксину більш ефективно знижувала рівень депресії. Також були досліджені зміни в кооперативності, які пов'язані із блокадою N-типу високопорогових кальцієвих каналів у гальмівному синапсі гіпокампа. Відповідно до отриманих результатів, для того щоб відбулося ефективно вивільнення ГАМК необхідне кооперативне зв'язування більш ніж одного іона кальцію. За наявності ω -конотоксину ступінь кооперативності збільшилася. Зроблено висновок, що N-тип високопорогових кальцієвих каналів відіграє дуже важливу роль у кальційзалежній регуляції депресії ГАМКергічної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа.

Ключові слова. N-тип кальцієвих каналів, ω -конотоксин – GVIA, ГАМКергічна синаптична передача, депресія при парній стимуляції, кооперативна дія кальцію.

ВСТУП

Відповідно до теорії кальційзалежного викиду нейромедіатора, сформульованої Катцом [7], в основі вивільнення нейромедіатора з пресинаптичної терміналі лежить екзоцитоз везикул. Запуск екзоцитозу є кальційрегульованим процесом і залежить від формування ділянок з високою концентрацією Ca^{2+} у безпосередній близькості до

пресинаптичної активної зони [21]. Відомо, що ділянки високого вмісту Ca^{2+} утворюються внаслідок його входу в нервові закінчення через потенціалкервані кальцієві канали [9]. Швидка синаптична передача в центральній нервовій системі ссавців є результатом одночасної активації різних типів високопорогових кальцієвих каналів [16]. Роль кожного із них в регуляції збудливої [6, 10] та гальмівної [6, 11]

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

синаптичної передачі в гіпокампі була продемонстрована за допомогою використання селективних блокаторів цих каналів.

Відомо, що короткочасна синаптична пластичність є результатом численних клітинних механізмів [21]. Однією із її форм є депресія при парній стимуляції під час якої спостерігається зниження ефективності синаптичної передачі в результаті попередньої активності. Хоча найбільш поширеним пресинаптичним механізмом вважають зменшення кількості вивільненого нейромедіатора [2, 7, 19, 21], депресія може бути наслідком зменшення кількості іонів кальцію, що надходять у пересинаптичну терміналь, інактивації кальцієвих каналів [5]. Зміна зовнішньої концентрації іонів кальцію – самий простий підхід, який дає змогу суттєво впливати на ймовірність вивільнення нейромедіатора для того, щоб дослідити кальційзалежну регуляцію депресії при парній стимуляції. Хоча в гіпокампі швидка синаптична передача є результатом активації обох N- та P/Q-типів кальцієвих каналів, саме N-тип відіграє більш суттєву роль у гальмівній синаптичній передачі [11].

Мета нашої роботи – дослідити роль N-типу кальцієвих каналів у кальційзалежній регуляції ГАМКергічної депресії при парній стимуляції, при використанні селективного блокатора ω -конотоксину – GVIA.

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, «Sigma», США) при кімнатній температурі (23–25°C) протягом 7 хв. Потім тканину промивали двічі 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, котре обмежувало площу посадки, наливали 200 мкл суспензії. Чашки Петрі з суспензією вміщувались в інкубатор («Jouan», Франція) з контрольованими вмістом двоокису вуглецю (5 % CO_2) в повітряно-газовій суміші і температурним режимом (37°C) і 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 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 в режимі фіксації потенціалу та визначати природний потенціал спокою нейронів у режимі фіксації струму. Підтримуваний потенціал в експериментах становив – 50 мВ. Потенціал спокою всіх клітин знаходився у межах від – 50 до – 60 мВ.

Електричні сигнали, які відводили від нервових клітин, піддавали фільтрації за допомогою апаратного високочастотного фільтру Бесселя з частотою зрізу 2 кГц. Оцифровку результатів під час експерименту здійснювали за допомогою аналого-цифрового перетворювача TL-1 («Axon Instruments», США) з частотою дискретизації 10 кГц. Для подальшої обробки та аналізу ГПСС використовувався програмний пакет pClamp 9.0 («Axon Instruments», США).

Локальну електричну стимуляцію проводили за допомогою стимулятора з ізолюваним виходом ISO-Flex («АМРІ», 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. Постсинаптичні струми були викликані подразненням аксона пресинаптичної клітини прямокутними імпульсами напруги негативної полярності тривалістю 0,4 мс. Частота стимуляції становила 0,5 Гц. Інтервал між імпульсами в парі був 150 мс, оскільки така тривалість міжімпульсного інтервалу є оптимальною для дослідження депресії вГПСС [7].

У дослідах використовували зовнішньоклітинний розчин такого складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 2, глюкозу – 30, NEPES – 20; рН 7,4 (NaOH); до цього розчину додавали також блокатори збуджувальної нейропередачі 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 реєструючої скляної піпетки містив (ммоль/л): глюконат калію – 155, MgCl₂ – 2, EGTA – 10, NEPES – 20; рН 7,4 (KOH).

Для аплікації фармакологічних речовин було застосовано методику швидкої локальної суперфузії, розробленої спеціально для роботи з моношаровою культурою клітин [16].

Для апроксимації кривої доза-ефект було використано рівняння Хілла:

$$E = V_{\max} \frac{[Ca^{2+}]_0^{n_H}}{EC_{50}^{n_H} + [Ca^{2+}]_0^{n_H}},$$

де E – це значення амплітуди вГПСС; V_{max} – ціна поділки; EC₅₀ – половина ефективної концентрації; i n_H – коефіцієнт Хілла, значення, пов'язане з кооперативністю опосередкованою залежністю величини відповіді від концентрації [18]. Результати в тексті представлені у вигляді «середнє значення» ± «середньоквадратична похибка середнього (S.E.M.)». Для визначення статистичної достовірності різниці між середніми значеннями двох груп даних було використано критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ

Основним гальмівним нейромедіатором у головному мозку ссавців є γ-аміномасляна кислота (ГАМК), яка активує різні типи її рецепторів [4]. Оскільки канали ГАМК_A-рецепторів є проникними для іонів хлору, ефект активації цих рецепторів буде залежати від електрохімічного градієнта для іонів хлору на постсинаптичній мембрані [11]. За допомогою рівняння Нернста ми визначили, що величина рівноважного хлорного потенціалу при використанні описаних вище розчинів (концентрація іонів хлору в зовнішньо- та внутрішньоклітинному середовищах становить 151 і 4 ммоль/л відповідно) при кімнатній температурі (24 °C = 297 K) дорівнював –92,88 мВ.

В експериментальних умовах, використовуючи стимуляцію аксона пресинаптичної

клітини прямокутними імпульсами струму тривалістю 0,4 мс, при різних значеннях підтримуваного потенціалу в межах від –110 до 0 мВ було зареєстровано викликані постсинаптичні струми, для яких побудовано вольт-амперні характеристики. Приклад такої кривої наведено у попередній праці [1]. Вольт-амперна характеристика мала лінійний вигляд і апроксимувалася прямою. З графіка було визначено величину потенціалу реверсії, яка дорівнювала $-90,36 \text{ мВ} \pm 3 \text{ мВ}$ ($n = 4$), що практично відповідала розрахованому рівноважному потенціалу для Cl^- . Це вказує на те, що отримані вГПСС опосередковані через ГАМК_A-рецептори, які розташовані на постсинаптичній мембрані.

Як кількісну міру синаптичної пластичності було обрано коефіцієнт парної стимуляції (КПС), який обчислювали як відношення амплітуди 2-го вГПСС у парі до 1-го. Депресія при стимуляції парою імпульсів була визначена як явище, при якому $\text{КПС} < 1$. Досліджені нейрони демонстрували тільки депресію при парній стимуляції.

Оскільки вхід Ca^{2+} в пресинаптичну терміналь через високопорогові кальцієві канали відіграє визначальну роль у механізмі вивільнення нейромедіатора, ми досліджували дію селективного блокатора N-типу високопорогових кальцієвих каналів на пластичність гальмівної синаптичної передачі в культурі нейронів гіпокампа щура за

різної концентрації іонів кальцію у зовнішньоклітинному розчині. Для того щоб відокремити роль саме N-типу від усіх високопорогових кальцієвих каналів у регуляції ефективності синаптичної передачі, був використаний селективний блокатор ω -конотоксин – GVIA. Відомо, що половина ефективної концентрації (IC_{50}) пригнічення амплітуди N-типу кальцієвого струму ω -конотоксином становить 50 нмоль/л [20], тому в даних експериментах ми використовували блокатор у концентрації 200 нмоль/л.

Взаємозв'язок зовнішньоклітинної концентрації Ca^{2+} (4, 2, 1 та 0,5 ммоль/л) і амплітуди вГПСС був досліджений у відсутності (контроль) та наявності ω -конотоксину (рис. 1,а,б). Піки амплітуд вГПСС, зареєстровані за різної зовнішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , були нормовані до значень піків амплітуд вГПСС при $[\text{Ca}^{2+}]_0 = 4 \text{ ммоль/л}$, усереднені і представлені як функція від зовнішньоклітинної концентрації Ca^{2+} (див. рис. 1,в). Отримана нелінійна залежність добре описується S-подібною кривою. На рисунку показана відмінність в кривих доза – ефект для 1-го та 2-го вГПСС у парі (табл. 1). При аплікації 200 нмоль/л блокатора N-типу високопорогових кальцієвих каналів нелінійна залежність зберігалася як для 1-го так і для 2-го вГПСС (див. рис. 1,г).

Таблиця 1. Порівняння усереднених характеристик парних викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) за різної зовнішньоклітинної концентрації Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_0$) у контролі та при дії ω -конотоксину.

Схема досліджу	Відносна амплітуда		Відносний коефіцієнт парної стимуляції
	1-го вГПСС	2-го вГПСС	
Контроль (n = 8)			
2 ммоль/л	0,78 ± 0,02***	0,88 ± 0,04*	1,14 ± 0,06*
1 ммоль/л	0,50 ± 0,02***	0,64 ± 0,05***	1,29 ± 0,11*
0,5 ммоль/л	0,24 ± 0,04***	0,35 ± 0,04***	1,48 ± 0,18*
ω -конотоксин (n = 11)			
2 ммоль/л	0,71 ± 0,05***	0,81 ± 0,07**	1,16 ± 0,04***
1 ммоль/л	0,37 ± 0,04***	0,52 ± 0,05***	1,43 ± 0,10***
0,5 ммоль/л	0,11 ± 0,01***	0,19 ± 0,03***	1,62 ± 0,20**

Примітка. Амплітуди струмів, зареєстрованих при $[\text{Ca}^{2+}]_0 = 4 \text{ ммоль/л}$ були визначені за 1. Значення коефіцієнта парної стимуляції при $[\text{Ca}^{2+}]_0 = 4 \text{ ммоль/л}$ прийнято за 1. Наведено середні значення у дослідженні групі ± середньоквадратична похибка середнього. *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001.

Криві залежності нормованої пікової амплітуди від зовнішньоклітинної концентрації Ca^{2+} апроксимувались рівнянням Хілла. Із найкращої апроксимації були визначені такі параметри як: n_H – кількість іонів Ca , що здатні кооперуватись для забезпечення вивільнення нейромедіатора (ступінь кооперативності) та EC_{50} – спорідненість між зв'язуванням Ca^{2+} та комплексом вивільнення медіатора. Була виявлена відмінність між ступенем кооперативності та значенням EC_{50} у контролі та за наявності блокатора N-типу кальцієвих каналів. Отримані результати наведено в табл.2.

Для того щоб дослідити відмінності між кривими доза–ефект у контролі та при аплікації ω -конотоксину окремо для 1-го та 2-го

вГПСС, для тих самих клітин був проведений додатковий аналіз цих кривих. При аплікації ω -конотоксину значення n_H збільшилось як для 1-го вГПСС (рис. 2,а) так і для 2-го вГПСС (див. рис. 2,б) у парі. Наявність 200 нмоль/л блокатора також підвищила EC_{50} як для 1-го вГПСС (див. рис. 2,в) так і для 2-го вГПСС (див. рис. 2,г) у парі.

Було виявлено, що зміна зовнішньоклітинної концентрації Ca^{2+} якісно впливає на КПС (див. табл. 1). Зниження концентрації Ca^{2+} у зовнішньому розчині призвело до зменшення депресії, а підвищення – до посилення (рис. 3,а). Сама наявність ω -конотоксину також знижувала рівень депресії порівняно із контролем (див. рис. 3,б).

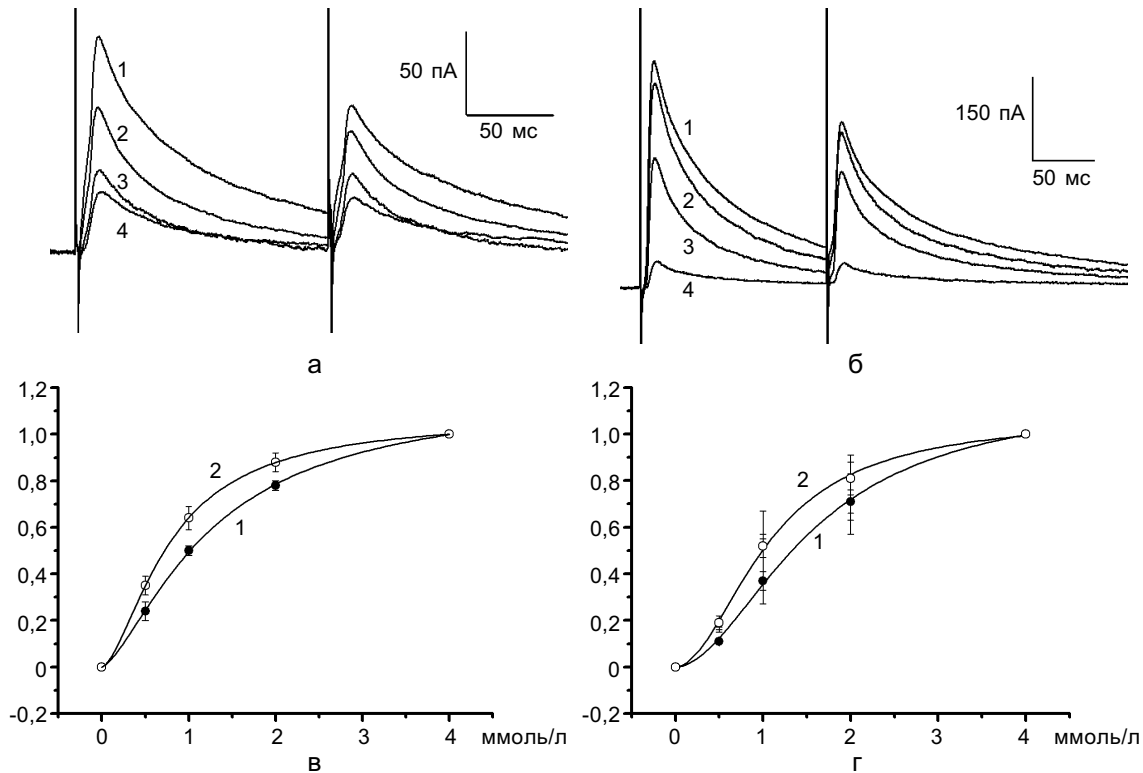


Рис.1. Залежність амплітуди викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) від зовнішньоклітинної концентрації Ca^{2+} у відсутності ($n = 8$) та за наявності ω -конотоксину ($n = 11$). а, б – приклад реєстрації усереднених вГПСС за різної зовнішньоклітинної концентрації Ca^{2+} у контролі (а) та при аплікації 200 нмоль/л ω -конотоксину (б). На (а) та (б) представлені реєстрації з двох різних клітин; 1 – 4 ммоль/л, 2 – 2 ммоль/л, 3 – 1 ммоль/л, 4 – 0,5 ммоль/л Ca^{2+} у зовнішньоклітинному розчині. Усереднення проводилося за 15 послідовними вГПСС (підтримуваний потенціал становив -50 мВ). в, г – криві, що відображають залежність нормованої усередненої амплітуди для 1-го та 2-го вГПСС у парі, зареєстрованої у контролі (в) та при аплікації ω -конотоксину (г) від зовнішньоклітинної концентрації Ca^{2+} . За одиницю прийнято амплітуду вГПСС при $[\text{Ca}^{2+}]_0 = 4$ ммоль/л; 1 – 1-й вГПСС у парі, 2 – 2-й вГПСС у парі

Таблиця 2. Порівняння усереднених значень половинної ефективної концентрації (EC_{50}) і ступеня кооперативності (n_H) для парних викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) у контролі та при дії ω -конотоксину.

Схема досліджу	n_H		EC_{50}	
	1-й вГПСС	2-й вГПСС	1-й вГПСС	2-й вГПСС
Контроль (n = 8)	1,46 ± 0,07 $R^2 = 0,999$	1,61 ± 0,01 $R^2 = 0,999$	1,87 ± 0,19 $R^2 = 0,999$	1,93 ± 0,23 $R^2 = 0,999$
ω -конотоксин (n = 11)	1,25 ± 0,06 $R^2 = 0,996$	0,78 ± 0,00 $R^2 = 0,994$	1,55 ± 0,14 $R^2 = 0,996$	1,06 ± 0,09 $R^2 = 0,994$

Примітка. Наведено середні значення у дослідженні групі ± середньоквадратична похибка середнього

ОБГОВОРЕННЯ

Ми досліджували роль N-типу високопорогових кальцієвих каналів у кальційзалежній регуляції ГАМКергічної депресії при парній стимуляції. Раніше на нейронах культури гіпокампа було показано [20], що явище депресії може бути повністю регульоване пресинаптичними механізмами, які пов'язані із входом кальцію. Оскільки в

механізмах вивільнення нейромедіатора та формування синаптичної пластичності вхід Ca^{2+} у терміналь саме через потенціалкервовані кальцієві канали відіграє вирішальну роль, у наших експериментах ми змінювали потік вхідного Ca^{2+} , використовуючи селективний блокатор N-типу високопорогових кальцієвих каналів, щоб дослідити внесок саме цих каналів у регуляцію явища депресії.

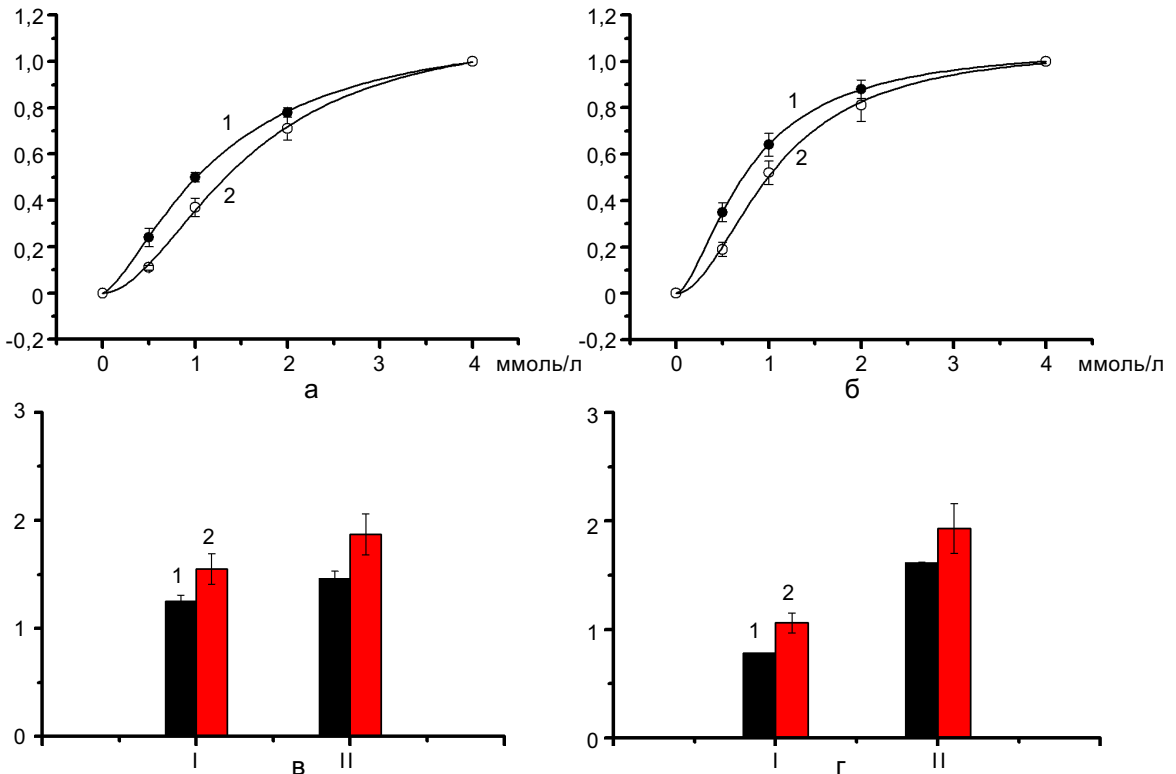


Рис.2. Зміна значення половинної ефективної концентрації (EC_{50}) і ступеня кооперативності (n_H) при аплікації 200 нмоль/л ω -конотоксину. а, б – криві, що відображають залежність нормованої усередненої амплітуди окремо для 1-го (а) та для 2-го (б) вГПСС від зовнішньоклітинної концентрації Ca^{2+} . За одиницю прийнято амплітуду вГПСС при $[Ca^{2+}]_0 = 4$ ммоль/л. в, г – гістограми, що показують значення EC_{50} і n_H для 1-го (в) та 2-го (г) вГПСС у парі. 1 – контроль, 2 – аплікація ω -конотоксину; I – EC_{50} , II – n_H

Насамперед ми показали, що рівень депресії регулюється зовнішньоклітинною концентрацією кальцію. Зниження концентрації Ca^{2+} призводило до зменшення депресії, а підвищення – до посилення. Ці результати узгоджуються із даними, отриманими у дослідженнях, проведених на культивованих нейронах гіпокампа, використовуючи метод парної реєстрації в конфігурації «ціла клітина» [7]. Роль N-типу кальцієвих каналів у кальційзалежній регуляції депресії була досліджена при аплікації 200 нмоль/л ω -конотоксину. Наявність у зовнішньому розчині блокатора більш ефективно зменшувала рівень депресії при зниженні концентрації Ca^{2+} . Наші результати узгоджуються із даними, отриманими на більшості синапсах центральної нервової системи, які свідчать про те, що зменшення потоку Ca^{2+} в пресинаптичну терміналь не тільки знижує внутрішньоклітинну концентрацію Ca^{2+} , а також і депресію, зменшуючи початкове вивільнення нейромедіатора [21] та підтверджують, що N-тип високопорогових кальцієвих каналів відіграє дуже важливе значен-

ня у кальційзалежній регуляції депресії ГАМКергічної синаптичної передачі між нейронами культури гіпокампа.

Наші результати свідчать про те, що існує нелінійна залежність між амплітудою вГПСС і зовнішньоклітинною концентрацією кальцію, що зумовлена залученням декількох іонів кальцію у вивільнення нейромедіатора (кооперативність Ca^{2+}). Вперше така нелінійна залежність була описана Доджем и Рахамімовим на нервово-м'язовому з'єднанні жаби [3]. За даними цих експериментів зробили припущення про особливий кількісний зв'язок між кальцієм і вивільненням медіатора, що для екзактотозу одного кванта медіатора потрібна сумісна дія чотирьох іонів кальцію. Відповідно до моделі, що описує роль іонів кальцію в синаптичній передачі, показникове співвідношення між зовнішньоклітинною концентрацією Ca^{2+} і амплітудою постсинаптичного струму є оцінкою кількості “закритих” місць злиття та екзоцитозу синаптичних везикул в активних зонах пресинаптичної плазматичної мембрани. Таким чином, дотримуючись цієї

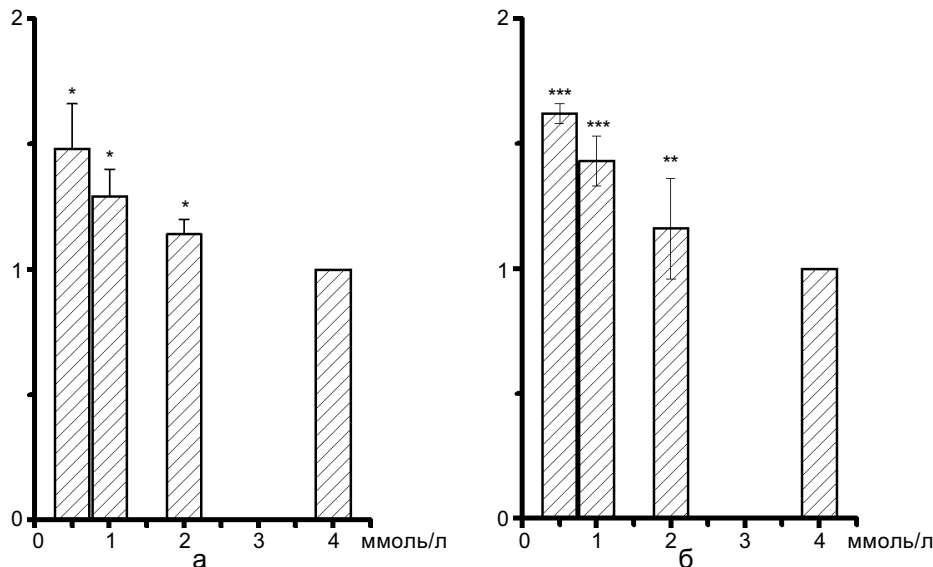


Рис.3. Нормовані значення коефіцієнта парної стимуляції (КПС) за різної зовнішньоклітинної концентрації Ca^{2+} у контролі (а) та при аплікації 200 нмоль/л ω -конотоксину (б). За одиницю прийнято значення КПС при $[\text{Ca}^{2+}]_0 = 4$ ммоль/л. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$

моделі, в сумі кількість “закритих” місць злиття і “відкритих” має дорівнювати чотирьом. Тобто, іони кальцію можуть зв’язуватися аж із чотирма рецепторами в активній зоні, що надалі призведе до “відкриття” місць злиття синаптичних везикул [15]. В нашій роботі були розраховані ступені кооперативності n_H для 1-го та 2-го вГПСС у парі, які свідчать про те, що в гальмівних синапсах гіпокампа для того щоб відбулося вивільнення ГАМК необхідне і достатнє кооперативне зв’язування більш ніж одного іона кальцію. Така низька кооперативність вказує на те, що приблизно 2–3 місця в активній зоні є постійно “відкритими”. Збільшення значення n_H кооперативності для 2-го порівняно із 1-м вГПСС (при депресії, зумовленої парною стимуляцією) можна пояснити тривалим відновленням “відкритих” місць злиття везикул, що може бути результатом повільного від’єднання іонів кальцію від рецепторів в активній зоні. Ми також дослідили зміни в кооперативності, які пов’язані із блокадою N-типу високопорогових кальцієвих каналів у гальмівному синапсі гіпокампа. Відповідно до отриманих результатів, за наявності 200 нмоль/л ω -конотоксину n_H збільшилась так, що за цих умов для ефективного вивільнення ГАМК необхідне кооперативне зв’язування двох і більше іонів кальцію. Проте на збудливих аутопсах культури нейронів гіпокампа були отримані протилежні дані [13]. Підраховане значення n_H було рівне 3,0 без блокатора і 2,6 за наявності ω -конотоксину, тобто, аплікація блокатора знижувала кооперативне зв’язування іонів кальцію з рецепторами. Раніше було показано, що ω -конотоксин потужніше зменшує силу гальмівної синаптичної передачі, ніж збудливої [6]. Таку відмінність можна пояснити неоднорідністю розподілу різних типів кальцієвих каналів у гальмівних і збудливих синапсах гіпокампа [14] та різною ефективністю блокатора N-типу високопорогових кальцієвих каналів у цих синапсах.

**О.П. Мизерна, С.А. Федулова,
Н.С. Веселовский**

КАЛЬЦИЙЗАВИСИМАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ДЕПРЕССИИ ТОРМОЗНОЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ БЛОКАТОРОМ N-ТИПА КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ В КУЛЬТУРЕ НЕЙРОНОВ ГИПОКАМПА

Разные типы высокопороговых кальциевых каналов запускают механизм освобождения нейромедиатора в центральных синапсах млекопитающих. Известно, что N-тип высокопороговых кальциевых каналов принимает участие в регуляции синаптической передачи во многих терминалях центральной нервной системы. Однако до сих пор остается неизвестной их роль в кальцийзависимой регуляции депрессии ГАМКэргической синаптической передачи между нейронами культуры гиппокампа. Мы исследовали чувствительность ГАМКэргической депрессии при парной стимуляции к селективному блокатору N-типа высокопороговых кальциевых каналов ω -конотоксина – GVIA при разной внеклеточной концентрации кальция. Для измерения вызванных тормозных постсинаптических токов были использованы методики фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» и внеклеточной локальной электрической парной стимуляции аксона пресинаптического нейрона. Было выяснено, что существует нелинейная зависимость между амплитудой вызванных тормозных постсинаптических токов и внеклеточной концентрацией Ca^{2+} . Роль N-типа кальциевых каналов у кальцийзависимой регуляции депрессии была исследована при апликации 200 нмоль/л ω -конотоксина. При действии блокатора нелинейная зависимость сохранялась. Было показано, что уровень депрессии зависит от внеклеточной концентрации кальция. Понижение концентрации Ca^{2+} во внешнем растворе привело к уменьшению депрессии, а присутствие ω -конотоксина более эффективно снижало уровень депрессии. Также были исследованы изменения в кооперативности, которые связаны с блокадой N-типа высокопороговых кальциевых каналов в тормозном синапсе гиппокампа. Согласно полученным результатам, для того чтобы произошло эффективное освобождение ГАМК необходимо кооперативное связывание более одного иона кальция. В присутствии ω -конотоксина степень кооперативности увеличилась. Таким образом, был сделан вывод, что N-тип высокопороговых кальциевых каналов играет очень важную роль в кальцийзависимой регуляции депрессии ГАМКэргической синаптической передачи между нейронами культуры гиппокампа.

Ключевые слова. N-тип кальциевых каналов, ω -конотоксин – GVIA, ГАМКэргическая синаптическая передача, депрессия при парной стимуляции, кооперативное действие кальция.

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

CALCIUM-DEPENDENT REGULATION OF DEPRESSION OF INHIBITORY SYNAPTIC TRANSMISSION BY BLOCKER OF N-TYPE Ca^{2+} CHANNELS IN CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS

Multiple types of high-voltage-activated Ca^{2+} channels trigger neurotransmitter release at the mammalian central synapse. 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 calcium-dependent paired pulse depression (PPD) mediated by GABA release at inhibitory synapses of cultured hippocampal neurons. We studied the sensitivity of GABAergic depression to selective N-type high-voltage-activated Ca^{2+} channels blocker omega-conotoxin-GVIA (ω -CgTx) under different calcium concentrations. Evoked inhibitory postsynaptic currents 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. The present data show that the relationship between eIPSC and extracellular Ca^{2+} concentration are highly nonlinear. The fraction of N-type Ca^{2+} channel in calcium-dependent PPD was estimated in presence of ω -CgTx (200 nM). The application of ω -CgTx did not change nonlinear relationship. It was shown that PPD is qualitatively affected by the extracellular Ca^{2+} concentration. Lowering external Ca^{2+} concentration reduced the depression powerfully in presence of ω -CgTx than in absence. In addition we found difference between the degree of cooperativity for transmitter release in the presence and absence of the N-type Ca^{2+} channel blocker. So, at inhibitory synapses in the hippocampus more than one Ca^{2+} ions act in a cooperative manner to cause release of GABA. After ω -CgTx application the degree of cooperativity n_H was increased. These results confirm that N-type Ca^{2+} channels are highly involved in calcium-dependent paired pulse depression at inhibitory synapse in cultured hippocampal neurons. Key words. N-type calcium channels, omega-conotoxin GVIA, GABAergic synaptic transmission, paired pulse depression, cooperative action of calcium.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Мізерна О.П., Федулова С.А., Веселовський М.С. Вплив тапсигаргіну на гальмівну синаптичну передачу в культурі нейронів гіпокампа щура// *Нейрофізіологія/Neurophysiology*. – 2007. – **39**, №4/5. – P. 374–376.
2. Debanne D., Guirineau N.C., Gdhwiler B.H., Thompson S.M. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release// *J. Physiol.* – 1996. – **491**. – P. 163–176.
3. Dodge Jr. F.A., Rahamimoff R. Co-operative action of

in-vitro фізіології ім. О.О. Богомольця, НАН України, Київ
mizerna_oksana@ukr.net

- calcium ions in transmitter release at the neuromuscular junction// *J. Physiol (Lond)*. – 1967. – **193**. – P. 419–432.
4. Fagg G.E., Foster A.C. Amino acid neurotransmitters and their pathways in the mammalian central nervous system// *Neuroscience* – 1983. – V 9. – P. 701–719.
5. Forsythe I. D., Tsujimoto T., Barnes-Davies M., Cuttle M.F., Takahashi T. Inactivation of presynaptic calcium current contributes to synaptic depression at a fast central synapse// *Neuron*. – 1998. – **20**. – P. 797–807.
6. 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.
7. 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.
8. Katz B., Miledi R. The effect of calcium on acetylcholine release from motor nerve terminals. // *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* – 1965. – **161**. – P. 496–503.
9. Katz B., Miledi R. The role of calcium in neuromuscular facilitation// *J. Physiol.* – 1968. – **195**. – P.481–492.
10. Luebke J.I., Dunlap K., Turner T.J. Multiple calcium channel types control glutamatergic synaptic transmission in the hippocampus// *Neuron*. – 1993. – **11**. – P.895– 902.
11. Macdonald R. L. and Olsen R. W. GABAA receptor channels// *Annu. Rev. Neurosci.* – 1994. – **17**. – P. 569–602.
12. 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.
13. Reid C.A., Bekkers J.M., Clements J.D. N- and P/Q-Type Ca^{2+} channels mediate transmitter release with a similar cooperativity at rat hippocampal autapses// *J. Neuroscience*. – 1998. – **18**. – P. 2849–2855.
14. Reid C.A., Clements J.D., Bekkers J.M. Nonuniform distribution of Ca^{2+} channel subtypes on presynaptic terminals of excitatory synapses in hippocampal cultures// *J. Neurosci.* – 1997. – **15**. – P. 2738–2745.
15. Stanley E. F. Decline in calcium cooperativity as the basis of facilitation at the squid giant synapse// *J. Neurosci.* – 1986. – **6**(3). – P. 782 – 789.
16. Takahashi T., Momiyama A. Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission// *Nature*. – 1993. – **366**. – P.156 – 158.
17. Veselovsky N.S., Engert F., Lux H.D. Fast local superfusion technique// *Pflugers Arch.* – 1996. – **432**. – P. 351–354.
18. Weiss J.N. The Hill equation revisited: uses and misuses// *FASEB J.* – 1997. – **11**. – P. 835–841.
19. 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.
20. Xiaoming Wang, S.N. Treistman, J.R. Lemos. Two types of high-threshold calcium currents inhibited by ω -conotoxin in nerve terminals of rat neurohypophysis// *J. Physiol.* – 1992. – **445**. – P. 181–199.
21. Zucker R.S., Regehr W.G. Short-term synaptic plasticity// *Annu. Rev. Physiol.* – 2002. – **64**. – P. 355–405.

Матеріал надійшов до редакції 10.08.09