

# Аналіз квантових показників вивільнення ГАМК при короткотривалій депресії та полегшенні синаптичної передачі

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

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця, НАН України, Київ; e-mail: mizerna\_oksana@ukr.net

*У культивованих нейронах гіпокампа щурів вимірювали зміни амплітуди викликаних парних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) методикою фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина» та позаклітинної локальної електричної стимуляції аксона пресинаптичного нейрона. У досліджених 43 нейронах спостерігалися депресія або полегшення синаптичної передачі. Згідно з аналізом коефіцієнта варіації (CV) вГПСС було розраховано, що при депресії синаптичної передачі CV другої відповіді у парі більше за CV першої на 57 % (n = 26), а при полегшенні – менше на 27 % (n = 17). Таким чином, короткотривала депресія та полегшення, що ми спостерігали, зумовлені тільки пресинаптичними механізмами. Використовуючи біноміальний розподіл з'ясували, що в умовах нашого експерименту ймовірність вивільнення ГАМК при першому і другому стимулах є 100% і незмінною як при депресії, так і при полегшенні. Для першої відповіді у парі середнє значення квантового вмісту та число місць вивільнення везикул збігалися і, відповідно, дорівнювали 9,7 при депресії та 5 при полегшенні синаптичної передачі. Для другого стимулу вони зменшилися на 28 і 26% порівняно з початковими значеннями при депресії та збільшилися на 14 і 11% при полегшенні відповідно. Отже, існує вірогідна різниця квантових показників, що характеризують вивільнення ГАМК при короткотривалій депресії та полегшенні синаптичної передачі.*

*Ключові слова: депресія та полегшення ГАМК-ергічної синаптичної передачі; міжстимульний інтервал; коефіцієнт варіації.*

## ВСТУП

Пластичність, зумовлена попередньою активацією синапсів, проявляється в зміні ефективності цієї передачі. Однією з її форм є короткотривала пластичність при парній стимуляції. Повторна стимуляція пресинаптичного нейрона призводить до зміни певних квантових показників вивільнення медіатора, що відображається на амплітуді наступного викликаного постсинаптичного струму, тобто призводить до депресії або полегшенні синаптичної передачі. Вважають, що ці явища є результатом численних клітинних механізмів, які можуть включати як пресинаптичні, так і постсинаптичні події. Найбільш поширеним пресинаптичним механізмом депресії вважають зменшення

кількості вивільненого нейромедіатора, що може відображати спустошення пулу готових до вивільнення везикул [1–3] та зменшення ймовірності вивільнення медіатора [4, 5]. Полегшення при парній стимуляції традиційно пов'язують з гіпотезою про залишковий кальцій, згідно з якою невелика його кількість, що потрапила до терміналі внаслідок першого потенціалу дії збільшує ймовірність вивільнення медіатора під час другого потенціалу дії [3]. Ці властивості синаптичної передачі можуть бути описані з використанням стандартної квантової моделі. Відповідно до теорії квантового викиду, вивільнення медіатора відбувається квантами і має ймовірнісний характер. Таким чином, амплітуда постсинаптичної відповіді відображає суму квантів медіатора з усіх місць вивільнення в

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

синапсі. Отже, найважливішими показниками викликаної синаптичної події є: ймовірність вивільнення квантів медіатора, число місць вивільнення везикул і їх квантовий вміст. У гіпокампі екзоцитоз ГАМК підпорядковується біноміальній статистиці [6].

Метою цієї роботи було з'ясувати локалізацію механізмів, які лежать в основі короткотривалої ГАМК-ергічної пластичності між культивованими нейронами гіпокампа та провести порівняльний аналіз квантових показників вивільнення ГАМК при депресії та при полегшенні синаптичної передачі.

## МЕТОДИКА

Експерименти проводили при кімнатній температурі на культивованих протягом 14–30 діб нейронах гіпокампа, який виділяли з головного мозку новонароджених щурів лінії Вістар. Відведення викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) від клітин проводили в режимі фіксації потенціалу в конфігурації „ціла клітина” при підтримуваному потенціалі  $-50$  мВ. Потенціал спокою всіх клітин знаходився у межах від  $-50$  до  $-60$  мВ. Розчин для заповнення відвідної скляної піпетки вміщував (ммоль/л): глюконат калію–155,  $MgCl_2$  – 2, EGTA – 10, NEPES – 20; рН 7,4 (KOH). До зовнішньоклітинного розчину входили (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 3,  $CaCl_2$  – 2,  $MgCl_2$  – 2, глюкоза – 30, NEPES – 20; рН 7,4 (NaOH); до цього розчину додавали також блокатори збуджувальної нейрорепердачі  $D_L$ -AP5 (20 мкмоль/л) і DNQX (20 мкмоль/л). Установка для реєстрації іонних струмів була зібрана на базі інвертованого мікроскопа. Піпетки для відведення струмів і стимуляції (діаметр отвору 1 мкм, опір 6–9 МОм) витягували із боросилікатного скла („WPI”, США). Сигнали попередньо пропускали через високочастотний фільтр Бесселя (2 кГц) і були оцифровані з частотою  $10^4$  с<sup>-1</sup>. Локальну електричну стимуляцію проводили за допомогою приладу з ізольованим виходом ISO-Flex („AMPI”, Ізраїль). Для цього вико-

ристовували піпетки, заповненні зовнішньоклітинним розчином та підведені під візуальним контролем у безпосередню близькість до аксона, що утворював гальмівні синаптичні контакти на досліджуваній постсинаптичній клітині. Амплітуду сили струму підбирали таким чином, що після кожної стимуляції ми реєстрували відповідь у вигляді постсинаптичного струму. Період між першою парою стимулів і наступною був 3 с. Для аплікації фармакологічних речовин застосовували методику швидкої локальної перфузії [7]. Обробку і аналіз результатів виконували за допомогою програмних пакетів „Clampfit 9.0” („Axon Instruments” США) та „OriginPro 8.5”. Для знаходження квантових показників вивільнення медіатора використовували біноміальним розподіл:  $I \cdot CV_{вГПСС}^2 = q \cdot (1 + CV_q^2 - P)$ , де  $I$  – середня амплітуда вГПСС,  $CV_{вГПСС}$  – коефіцієнт варіації вГПСС,  $q$  – розмір кванта,  $CV_q$  – коефіцієнт варіації мініатюрних вГПСС (мГПСС),  $P$  – ймовірність вивільнення ГАМК з пресинаптичного закінчення.

Усі результати наведені як середні значення  $\pm$  середньоквадратична похибка середнього; у дужках зазначено розмір вибірки у межах якої проводили усереднення. Для визначення статистичної вірогідності різниці між середніми значеннями двох груп даних було використано критерій  $t$  Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Першочергово була досліджена іонна природа вГПСС. Аплікація селективного антагоніста ГАМК<sub>A</sub>-рецепторів бікукуліну метоброміду в концентрації 20 мкмоль/л майже повністю (на  $91 \pm 1\%$ ,  $n = 3$ ) пригнічувала амплітуду вГПСС. Ефект зменшення був вірогідним і оборотним. Значення амплітуд вГПСС лінійно залежали від підтримуваного потенціалу на мембранах постсинаптичних нейронів ( $R^2 \geq 0,99$ ) [8]. Розрахований за вольт-амперними характеристиками потенціал реверсії для цих струмів дорівнював  $-90,36 \pm 3$  мВ ( $n = 4$ ) і відповідав рівноважному потенціалу

для хлору, розрахованому за рівнянням Нернста. Такі характеристики вказували на те, що зареєстровані струми опосередковували ГАМК<sub>A</sub>-рецептори.

Для дослідження пластичності ГАМК-ергічних вГПСС аксон пресинаптичної клітини стимулювали парними імпульсами, що наносили з інтервалом 150 мс. Під час цього спостерігалось накладання другої відповіді на пізні компоненти першої. Тому амплітуда другого вГПСС у парі визначалась за допомогою процедури віднімання пізніх компонентів першого струму від запису другого. Період між першою парою стимулів і наступною був 3 с. Цей час вважають достатнім для повного відновлення першого вГПСС.

Як кількісну міру синаптичної пластичності було обрано коефіцієнт парної стимуляції (КПС), котрий обчислювали як відношення амплітуди другого вГПСС ( $A_2$ ) у парі до першого ( $A_1$ ). Для виключення впливу

постсинаптичних механізмів на короткочасну зміну ефективності синаптичної передачі ми змінювали електрохімічний градієнт для іонів хлору та одночасно реєстрували вГПСС. Отримані результати з 12 клітин дають можливість зробити висновок, що значення КПС не залежали від підтримуваного потенціалу на мембрані постсинаптичного нейрона (рис. 1, а, б).

Тому були проведені експерименти для встановлення пресинаптичних факторів, якими може бути зумовлена ефективність ГАМК-ергічної синаптичної передачі. Досліджені нами нейрони при подразненні пресинаптичного аксона парою стимулів з інтервалом 150 мс демонстрували як явище депресії (КПС <1), так і полегшення (КПС >1; рис. 2, а, б).

Відповідно до біноміальної моделі синаптичної передачі, непрямим методом визначення пре- або постсинаптичних факторів є

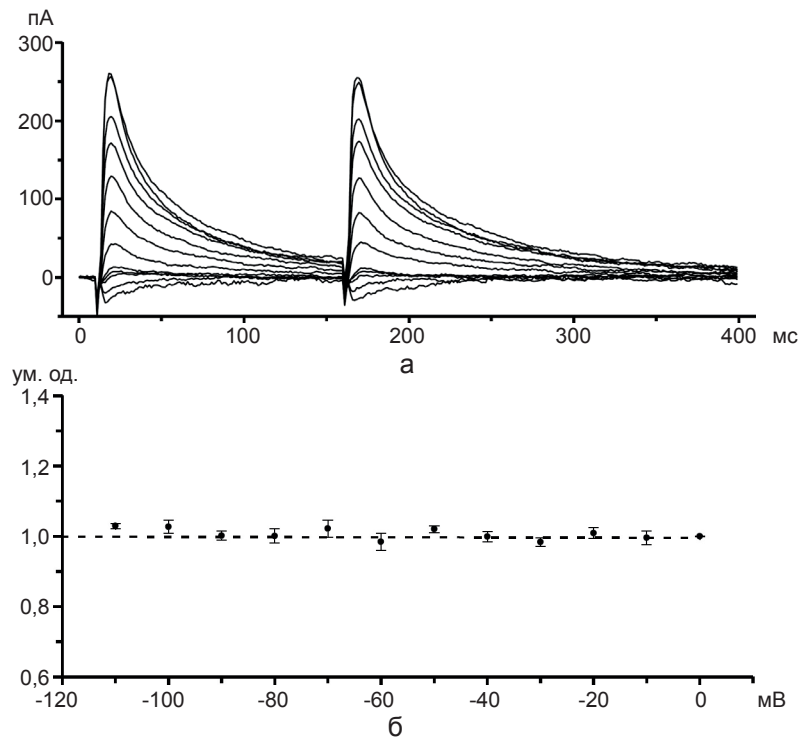


Рис. 1. Залежність коефіцієнта парної стимуляції (КПС) від підтримуваного потенціалу на мембрані постсинаптичної клітини: а – приклади реєстрації усереднених парних викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) при різному підтримуваному потенціалі. Усереднення проводили за 10 послідовними вГПСС; б – залежність КПС від підтримуваного потенціалу на мембрані постсинаптичної клітини. За 1 прийнято значення КПС при підтримуваному потенціалі 0 мВ

вивчення зміни коефіцієнта варіації амплітуд постсинаптичних струмів (CV). Він визначається як відношення стандартного відхилення амплітуд до усередненого їх значення. При пластичності синаптичної передачі, залежно від пре- або постсинаптичних механізмів, що беруть у цьому участь, може спостерігатися два випадки: квадрат відношення коефіцієнтів варіації першої відповіді ( $CV_1$ ) у парі до другої ( $CV_2$ ) може збільшуватися або зменшуватися так само, як і коефіцієнт парної стимуляції [9–11]. Для парних вГПСС, при

яких спостерігалось явище короткотривалої пластичності синаптичної передачі, були побудовані відношення  $(CV_1/CV_2)^2$  до КПС (див. рис. 2, в, г). Нами було розраховано усереднене значення, що відображається у вигляді точки. При явищі депресії вона лежить нижче від діагоналі і має координати  $(0,7 \pm 0,02; 0,52 \pm 0,04; n = 26)$ , а при полегшенні – вище від діагоналі і має координати  $(1,15 \pm 0,03; 1,56 \pm 0,19; n = 17)$ . Для цих же нейронів було розраховано, що при депресії  $CV_2$  вірогідно більше за  $CV_1$  на  $57 \pm 16 \%$ ,

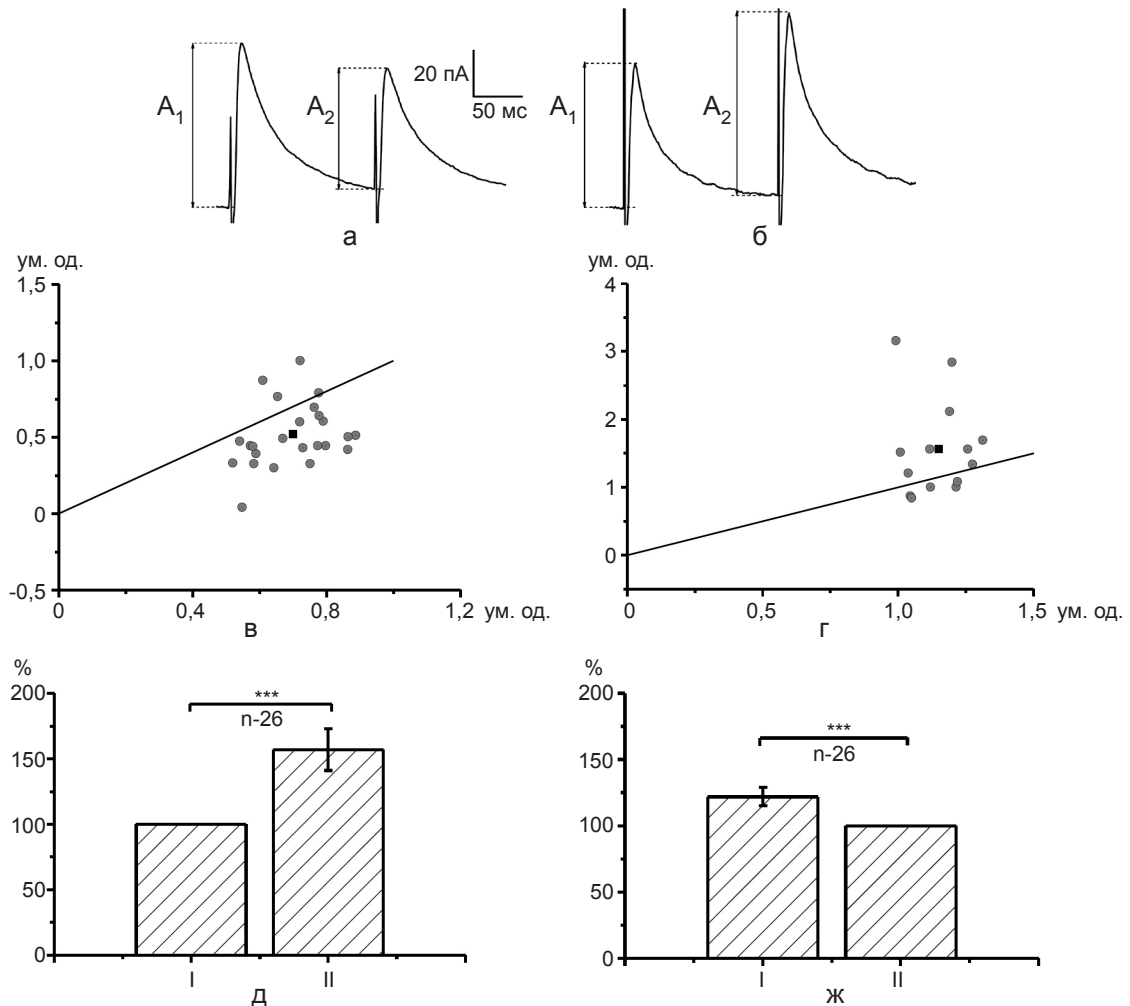


Рис. 2. Аналіз коефіцієнта варіації струмів (CV) при депресії та полегшенні синаптичної передачі: а, б – приклад реєстрації депресії та полегшення синаптичної передачі.  $A_1$  та  $A_2$  - амплітуди першого та другого викликаних гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) у парі; в, г – залежність квадрата відношення коефіцієнтів варіації першої відповіді у парі до другої від коефіцієнта парної стимуляції при депресії та полегшенні синаптичної передачі відповідно; д, ж – гістограма, що показує нормовані усереднені значення CV при депресії та полегшенні синаптичної передачі відповідно. I - CV першого вГПСС, II - CV другого вГПСС. За 100 % прийнято значення CV першого вГПСС. \*\*\* $P < 0,001$

а при полегшенні - менше на  $22 \pm 7 \%$  (рис. 2, д, ж). Згідно з цією теорією, короткотривала депресія та полегшення, що ми спостерігали, зумовлені пресинаптичними механізмами.

мГПСС та спонтанні ГПСС (сГПСС) відводили від нейронів гіпокампа при підтримуваному потенціалі - 50 мВ за наявності в зовнішньоклітинному розчині блокаторів збуджувальної нейропередачі. Перші реєстрували у зовнішньоклітинному розчині, що містив 0,5 ммоль/л  $\text{Ca}^{2+}$ , 10 ммоль/л  $\text{Mg}^{2+}$  та 0,25 мкмоль/л тетродотоксину. Такі умови реєстрації сприяли зниженню ймовірності викиду ГАМК. Амплітудні розподіли мГПСС, як правило, були унімодальними і задовільно апроксимувалися однією кривою Гауса з модою на  $13,92 \pm 0,29$  пА ( $n = 3$ ; рис. 3,а).

Амплітудні розподіли сГПСС, зареєстрованих у різних клітинах гіпокампа, демонстрували наявність 2–3, візуально ідентифікованих, піків на гістограмах, які добре апроксимувалися сумою кривих Гауса (див. рис. 3, б). В усіх випадках середня відстань між піками суміжних гаусових (нормальних) розподілів не відрізнялася від значень першої моди полімодальних амплітудних гістограм і становили у середньому  $14,22 \pm 1,7$  пА ( $n = 6$ ). Отже, згідно з аналізом сГПСС та мГПСС,

ефект вивільнення кванта ГАМК в наших експериментах дорівнює у середньому 14 пА.

Для знаходження квантових показників вивільнення медіатора використовували біноміальним розподіл. Як вже було зазначено вище, розмір кванта в наших експериментах дорівнював 14 пА ( $q$ ). Розрахований коефіцієнт варіації мГПСС становив  $0,34 \pm 0,07$  ( $\text{CV}_q$ ). Квантовий вміст (середня кількість квантів медіатора, що вивільняється на один пресинаптичний потенціал дії) розраховується як  $m = I/q$ . Ймовірність вивільнення медіатора знаходили як  $P = 1 + \text{CV}_q^2 - m \cdot \text{CV}_{\text{вГПСС}}^2$ . Біноміальний показник (число місць вивільнення везикул з медіатором) розраховується як  $N = m/P$ .

Для першої відповіді у парі середнє значення квантового вмісту було  $9,7 \pm 1,3$  і  $5,0 \pm 0,6$  відповідно при депресії ( $n = 26$ ) та полегшенні ( $n = 17$ ) синаптичної передачі. Біноміальний показник також відрізнявся при депресії та полегшенні і становив  $9,3 \pm 1,2$  та  $4,9 \pm 0,6$  відповідно. Тобто, якщо початковий квантовий вміст та число місць вивільнення везикул з ГАМК маленькі, то буде спостерігатися полегшення синаптичної передачі, якщо навпаки – то депресія. Наші результати підтверджують раніше отримані дані при дослідженні збуджувальної синаптичної пе-

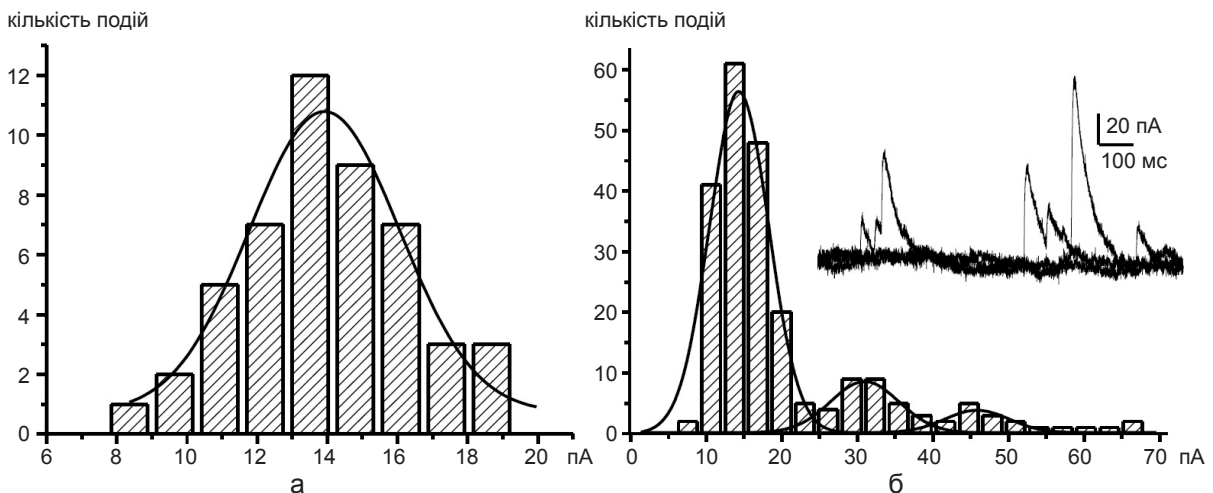


Рис. 3. Типові амплітудні розподіли мініатюрних (мГПСС) та спонтанних (сГПСС) ГАМК-ергічних струмів: а – розподіл амплітуд мГПСС та апроксимація його однією гаусіаною з максимумом на 13,9 пА; б – гістограма амплітуд сГПСС та апроксимація її трьома розподілами Гауса із модами на 14, 31 і 45 пА; на верхньому фрагменті – суперпозиція записів сГПСС. а, б : за віссю абсцис – амплітуда мГПСС та сГПСС відповідно, за віссю ординат – кількість подій



редачі між нейронами гіпокампа, що депресія синаптичної передачі при стимулюванні парою поштовхів струму, спостерігається переважно, якщо початкова амплітуда струму велика, а полегшення – коли маленька [12].

Ймовірність вивільнення медіатора була однаковою для двох цих явищ (приблизно 100%) і значення  $m$  і  $N$  збігаються, отже, в наших експериментальних умовах, на кожний стимул з усіх місць вивільнення в активній зоні вивільнюється одна везикула з ГАМК. Відомо, що при високій ймовірності вивільнення медіатора коефіцієнт варіації амплітуди струму має бути низьким [13]. Наші результати це підтверджують: у зареєстрованих струмах коефіцієнт варіації був у межах від 0,02 до 0,20.

Для парних вГПСС, при яких спостерігалось явище короткочасної пластичності синаптичної передачі, був проведений порівняльний аналіз квантових показників синаптичної передачі для першого і другого стимулу (рис. 4). Очевидно, що ймовірність вивільнення ГАМК при обох стимулах є майже незмінною як при депресії, так і при полегшенні. Проте для другого стимулу зміни квантового вмісту та

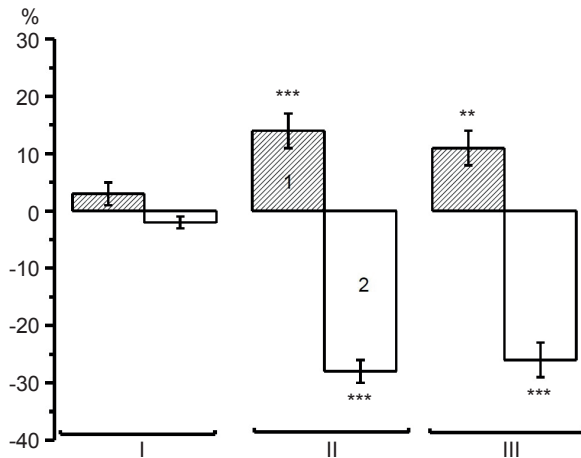


Рис. 4. Порівняльний аналіз нормованих квантових показників вивільнення ГАМК при депресії та полегшенні синаптичної передачі після першого стимулу: За 0 % прийнято нормовані значення квантових показників для першого викликаного гальмінового постсинаптичного струму у парі: 1 – полегшення, 2 – депресія; I - ймовірність вивільнення ГАМК, II - відносний квантовий вміст, III - відносний біноміальний показник. \*\* $P < 0,01$ , \*\*\* $P < 0,001$

числа місць вивільнення везикул є неоднаковими при явищах депресії та полегшенні. Для другого стимулу вони вірогідно зменшуються порівняно з початковими значеннями на 28 і 26% при депресії та збільшуються на 14 і 11% при полегшенні відповідно.

З наших результатів можна зробити висновок, що в культурі нейронів гіпокампа, за умов високої ймовірності вивільнення ГАМК, короткотривалу пластичність синаптичної передачі можна пояснити одночасним збільшенням (полегшення) або зменшенням (депресія) числа місць вивільнення везикул та квантового вмісту їх. Постсинаптичні фактори у цих процесах не задіяні.

О.П. Колесник, С.А. Федулова,  
Н.С. Веселовський

#### АНАЛИЗ КВАНТОВЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ОСВОБОЖДЕНИЯ ГАМК ПРИ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ДЕПРЕССИИ И ОБЛЕГЧЕНИИ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ

В культивированных нейронах гиппокампа крысы измеряли изменения амплитуды вызванных тормозных постсинаптических токов (вГПСТ) методикой фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» и внеклеточной локальной электрической стимуляции аксона пресинаптического нейрона. В исследованных 43 нейронах наблюдали депрессию или облегчение синаптической передачи. Согласно с анализом коэффициента вариации (CV) вГПСТ было рассчитано, что при депрессии синаптической передачи CV второго ответа в паре достоверно больше, чем CV первого на 57 % ( $n = 26$ ), а при облегчении – меньше на 27 % ( $n = 17$ ). Следовательно, кратковременная депрессия и облегчение, которые мы наблюдали, обусловлены только пресинаптическими механизмами. Используя биномиальное распределение, определили, что в условиях нашего эксперимента вероятность освобождения ГАМК при первом и втором стимулах является 100% и неизменной как при депрессии, так и при облегчении. Для первого ответа в паре среднее значение квантового содержания и число мест освобождения везикул совпали и, соответственно, были равны 9,7 при депрессии и 5 при облегчении синаптической передачи. Для второго стимула они уменьшились на 28 и на 26% при депрессии и увеличились на 14 и на 11% при облегчении соответственно. Таким образом, существует достоверная разница в квантовых показателях, которые характеризуют освобождение ГАМК при кратковременной депрессии и облегчении синаптической передачи.

Ключевые слова: депрессия и облегчение ГАМК-эргиче-

ской синаптической передачи; межстимульный интервал; коэффициент вариации.

**O.P. Kolesnyk, S.A.Fedulova, N.S. Veselovsky**

### **ANALYSIS OF QUANTAL PARAMETERS OF GABA RELEASE DURING SHORT-TERM DEPRESSION AND FACILITATION OF SYNAPTIC TRANSMISSION**

Changes in amplitudes of evoked inhibitory postsynaptic currents (eIPSCs) from rat cultured hippocampal neurons were studied using whole-cell patch-clamp technique in postsynaptic neuron and local extracellular electrical paired pulse stimulation of single presynaptic axon. Paired pulse depression (PPD) and paired pulse facilitation (PPF) were observed in studied 43 neurons. According to coefficient of variance (CV) analysis was found that CV of second respond was significantly larger than CV first by 57 % (n = 26) during depression and significantly smaller by 27 % (n = 17) during facilitation. Thus, only presynaptic mechanism underlies short-term depression and facilitation. We also estimated quantal parameters assuming that transmitter release is reasonably described by a binomial distribution. We found that under our experimental conditions there were no significant changes in GABA release probability during PPD and PPF. The values of mean quantal content and mean number of sites of transmitter release were the same for first stimulus in pair and were equal 9.7 in depression and 5 in facilitation of synaptic transmission. The values both of them for second stimulus were significant decreased by 28 and 26% during PPD and were significant increased by 14 and 11% during PPF, respectively. Thus, there is significant difference in quantal parameters characterizing GABA release during short-term depression and facilitation of synaptic transmission.

Key words: PPD and PPF of GABAergic synaptic transmission; interstimulus interval; coefficient of variation.

*O.O. Bogomolets Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: mizerna\_oksana@ukr.net*

### **REFERENCES**

1. Jensen K, Lambert JD, Jensen MS. Activity-dependent depression of GABAergic IPSCs in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol.* 1999; 82: 42-9.
2. Wu LG, Borst JG. The reduced release probability of releasable vesicles during recovery from short-term synaptic depression. *Neuron.* 1999; 23: 821-32.
3. Zucker RS., Regehr WG. Short-term synaptic plasticity. *An Rev Physiol.* 2002; 64: 355-405.
4. Dobrunz LE and Stevens CF. Heterogeneity of release probability, facilitation, and depletion at central synapses. *Neuron.* 1997; 6: 995-1008.
5. Wilcox KS, Dichter MA. Paired pulse depression in cultured hippocampal neurons is due to a presynaptic mechanism independent of GABA<sub>B</sub> autoreceptor activation. *J Neurosci.* 1994; 14: 1775-88.
6. Fedulova SA, Veselovsky NS. Quantal GABA release in hippocampal synapses: role of local Ca<sup>2+</sup> dynamics within the single terminals. *Eur J Pharmacol.* 2002; 2/3: 163-71.
7. Veselovsky N S, Engert F, Lux H D. Fast local superfusion technique. *Pflug Arch.* 1996; 432: 351-4.
8. Mizerna OP, Fedulova SA, Veselovsky MS. Effect of thapsigargin on inhibitory synaptic transmission between cultured neurons of the rat hippocampus. *Neurophysiology.* 2007; 39(4-5): 374-6.
9. Faber DS, Korn H. Applicability of the coefficient of variation method for analyzing synaptic plasticity. *Biophys. J.* 1991; 60: 1288-94.
10. Larkman A, Hannay T, Stratford K, Jack J. Presynaptic release probability influences the locus of long-term potentiation. *Nature.* 1992; 360: 70-3.
11. Sjostrom PJ, Turrigiano GG, Nelson SB. Multiple forms of long-term plasticity at unitary neocortical layer 5 synapses. *Neuropharmacology.* 2007; 52: 176-84.
12. Debanne D, Guerineau NC, Gahwiler BH, Thompson SM. Paired-pulse facilitation and depression at unitary synapses in rat hippocampus: quantal fluctuation affects subsequent release. *J Physiol.* 1996; 491: 163-76.
13. Oleskevich S, Clements J, Walmsley B. Release probability modulates short-term plasticity at a rat giant terminal. *J Physiol.* 2000; 524: 513-23.

*Матеріал надійшов до редакції 18.04.2016*