

Частотна модуляція короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної 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 гальмівних постсинаптичних струмів (вГПСС) за допомогою методики фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина» та позаклітинної локальної електричної стимуляції аксона пресинаптичного нейрона. Парна стимуляція аксона пресинаптичного ГАМК-ергічного нейрона призводила до зменшення (депресії) або збільшення (полегшення) амплітуди другого вГПСС у парі. Максимальна депресія спостерігалася при найкоротшому міжстимульному інтервалі 20 мс, коли амплітуда другого струму була меншою, ніж першого на $58 \pm 6\%$. При найдовшому інтервалі 1200 мс така різниця становила всього 2% ($n = 9$). Динаміка відновлення після депресії описувалась експоненційною функцією з $\tau = 83,5$ мс. Максимальне полегшення було зареєстровано при міжстимульному інтервалі 150 мс, коли амплітуда другого струму була більшою, ніж амплітуда першого на $18 \pm 4\%$ і протягом 500 мс відбувалося майже повне відновлення ($n = 6$). Відновлення після полегшення мало дзвіноподібну форму. При стимулюванні аксона пресинаптичного нейрона чотирма послідовними поштовхами струму ми спостерігали тільки явище депресії ($n = 7$). Динаміка депресії амплітуди вГПСС описувалась експоненційною функцією. При найкоротшому міжстимульному інтервалі (50 мс) амплітуда струму знижувалася найшвидше ($\tau = 41$ мс), а при найдовшому інтервалі (200 мс) – найбільш повільно ($\tau = 119$ мс).

Ключові слова: депресія та полегшення ГАМК-ергічної синаптичної передачі; парна стимуляція; міжстимульний інтервал.

ВСТУП

Синаптична пластичність відіграє важливу роль у нормальному розвитку нейронних мереж, у процесах навчання та формування пам'яті. Залежно від часу, протягом якого зберігаються зміни ефективності синаптичної передачі, розрізняють коро- та довготривалу пластичності. Перша триває від десятків мілісекунд до декількох секунд і проявляється в зміні ефективності синаптичної передачі при повторній стимуляції. Ці зміни відображаються на амплітуді наступного викликаного постсинаптичного струму, тобто призводять до депресії або полегшення синаптичної передачі. У ГАМК-ергічних синапсах гіпокампа можна спостерігати як явище депресії, так і полегшення. Вважають, що в їх основі лежать процеси, які відбуваються у пресинаптично-

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

му закінченні [1-6]. Тобто підвищення ефективності синаптичної передачі при короткочасній пластичності відображає збільшення ймовірності вивільнення доступних квантів, хоча при цьому не виключається й збільшення кількості місць їхнього екзоцитозу [7]. Зменшення амплітуди другої відповіді у парі відбувається через тимчасове зменшення квантового вмісту везикул [8-10]. Відомо, що зміна частоти та тривалості попередньої активності пресинаптичних нейронів здатна моделювати ефективність синаптичної передачі між ними. Це питання є важливим і досить дослідженим *in vitro* на зрізах та в культурі клітин ЦНС [11, 12]. Вплив частотної модуляції на короткотривалу депресію та полегшення синаптичної передачі між нейронами гіпокампа краще описана для збудливих синапсів [14, 13] і менше для гальмівних. Для

ГАМК-ергічних синапсів гіпокампа короткотривала пластичність при парній стимуляції була проаналізована, використовуючи парну реєстрацію струмів на зрізах клітин та в культурі [1, 15]. Для ГАМК-ергічних синапсів явище полегшення при парній стимуляції спостерігається набагато рідше, ніж депресія, тому і досліджено не так ретельно.

Метою цієї роботи було описати часові характеристики короткотривалої пластичності ГАМК-ергічної синаптичної передачі залежно від частоти стимулювань саме аксона пресинаптичного нейрона, провести порівняльний аналіз динаміки відновлення як після депресії, так і після полегшення ГАМК-ергічної синаптичної передачі.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили при кімнатній температурі на культивованих протягом 14–30 діб нейронах гіпокампа, який виділяли з головного мозку новонароджених шурів лінії Вістар. Використовуючи стимуляцію аксона пресинаптичної клітини прямокутними імпульсами струму тривалістю 0,4 мс, при значенні підтримуваного потенціалу -50 мВ було зареєстровано парні викликані гальмівні постсинаптичні струми (вГПСС) з міжстимульним інтервалом 150 мс. Викликані ГПСС від клітин відводили в режимі фіксації потенціалу в конфігурації „ціла клітина”. Потенціал спокою всіх клітин знаходився у межах від -50 до -60 мВ. Розчин для заповнення відповідної скляної піпетки вміщував (ммоль/л): глюконат калію – 155, $MgCl_2$ – 2, ЕГТА – 10, NEPES – 20; рН 7,4 (КОН). 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 нейропередачі 20 мкмоль/л D_L -AP5 і DNQX. 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 оцифровували з частотою 10^4 с⁻¹. Локальну електричну стимуляцію проводили за допомогою приладу з ізольованим виходом ISO-Flex („АМРІ”, Ізраїль). Для цього використовували 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 ГПСС. Період між першою парою стимулів і наступною був 3 с. Усереднення проводили за 15 послідовними вГПСС. Обробку і аналіз результатів виконували за допомогою програмних пакетів „Clampfit 9.0” („Axon Instruments” США) та „OriginPro 8.5”. 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 було використано критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

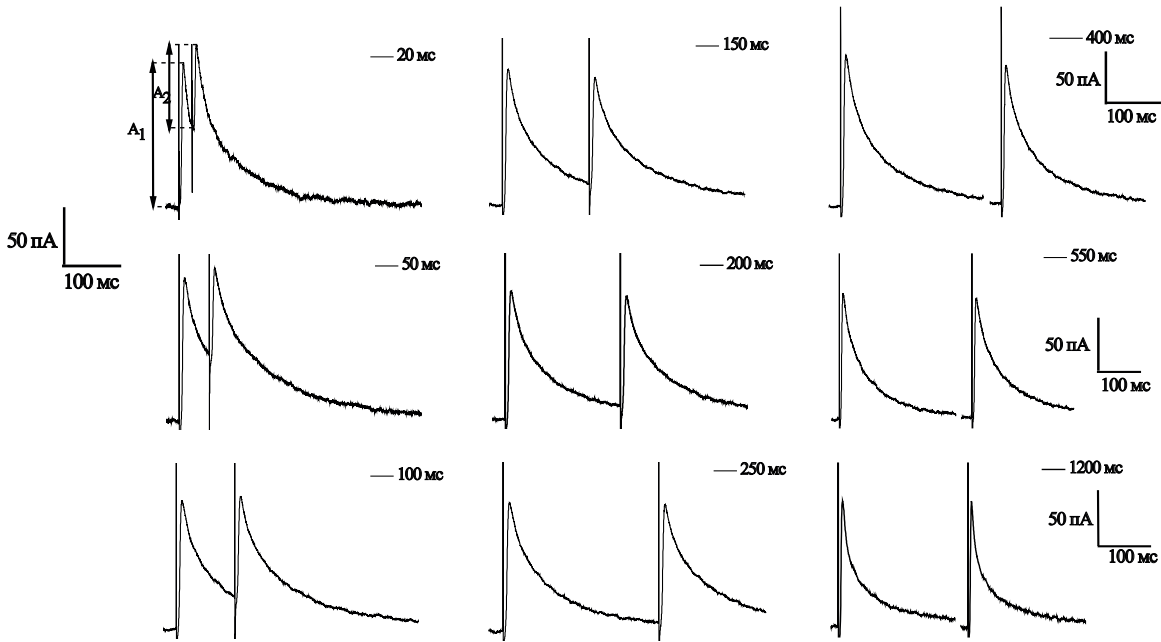
Зареєстровані вГПСС були визначені як такі, що опосередковані ГАМК_A-рецепторами, оскільки аплікація їх селективного антагоніста бікукуліну метоброміду в концентрації 20 мкмоль/л майже повністю пригнічувала амплітуду вГПСС (на $91 \pm 1\%$, $n = 3$) та розрахований за вольт-амперними характеристиками потенціал реверсії для цих струмів (-90 мВ ± 3 мВ, $n = 4$) у межах похибки відповідав рівноважному потенціалу для хлору.

Для дослідження короткотривалої пластичності ГАМК-ергічних вГПСС аксон пресинаптичної клітини стимулювали парами поштовхів струму, що наносили з певними інтервалами. Під час цього спостерігалось

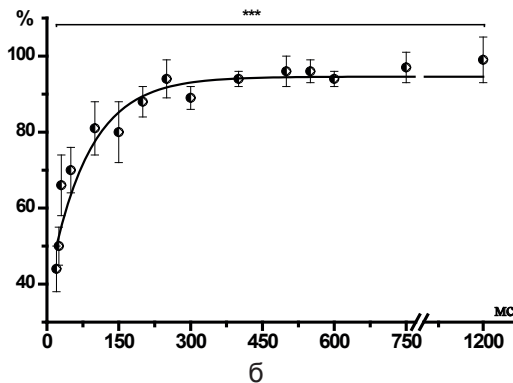
накладання другої відповіді на пізні компоненти першої. Тому амплітуда другого вГПСС у парі визначалася за допомогою віднімання пізніх компонентів першого струму від запису другого. Ця процедура представлена на рис. 1, а. Кількісною мірою синаптичної пластичності було обрано коефіцієнт парної стимуляції (КПС), котрий обчислювали як відношення амплітуди другого вГПСС у парі до першого. Досліджені нами нейрони при подразненні пресинаптичного аксона парою демонстрували як явище депресії (КПС <1), так і полегшення (КПС >1).

Щоб дослідити вплив різних частот стимуляції аксона пресинаптичного нейрона на

короткотривалу пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі ми його подразнювали парою стимулів, змінюючи міжстимульний інтервал від 20 до 1200 мс. У 12 нейронах спостерігалось явище депресії синаптичної передачі (див. рис.1,а). Максимальна депресія була при найкоротшому міжстимульному інтервалі 20 мс; в цьому разі амплітуда другого ГПСС була меншою, ніж першого струму на $58 \pm 6\%$. Майже повне відновлення після депресії реєстрували при найдовшому інтервалі між стимулами 1200 мс, коли різниця між амплітудами 1-го і 2-го вГПСС становила всього $2 \pm 6\%$ ($P < 0,001$). Наші результати узгоджуються із повідомленнями про те, що в



а



б

Рис. 1. Динаміка депресії синаптичної передачі при парній стимуляції аксона пресинаптичного ГАМК-ергічного нейрона: а – приклад реєстрації усереднених парних викликаних гальмівних синаптичних струмів (вГПСС) при стимуляції з міжстимульним інтервалом від 20 до 1200 мс. A_1 та A_2 – амплітуди 1-го та 2-го вГПСС у парі; б – залежність коефіцієнта парної стимуляції (КПС) від міжстимульного інтервала. За 100 % прийнято значення КПС = 1. * $P < 0,05$

ГАМК-ергічних синапсах гіпокампа депресія другого вГПСС може бути досить тривалою і спостерігатися протягом декількох секунд після поодинокого потенціалу дії в пресинаптичній терміналі [1,11-16]. З графіка залежності КПС від міжстимульного інтервалу визначили, що динаміку відновлення після депресії можна описати експоненційною функцією з $\tau = 83,5$ мс (див.рис.1,б), що узгоджується із даними, отриманими на збудливих [14] та гальмівних [15] синапсах гіпокампа.

При парному подразненні пресинаптичного аксона з міжстимульними інтервалами від 30 до 500 мс у 6 нейронах спостерігалось явище полегшення синаптичної передачі (рис.2,а). Максимальне полегшення було при інтервалі 150 мс, коли амплітуда другого ГПСС була більшою за першого на $18 \pm 4\%$ ($P < 0,05$). Майже повне відновлення після полегшення реєстрували при найдовшому інтервалі між стимулами 500 мс, при цьому різниця між амплітудами 1-го і 2-го вГПСС

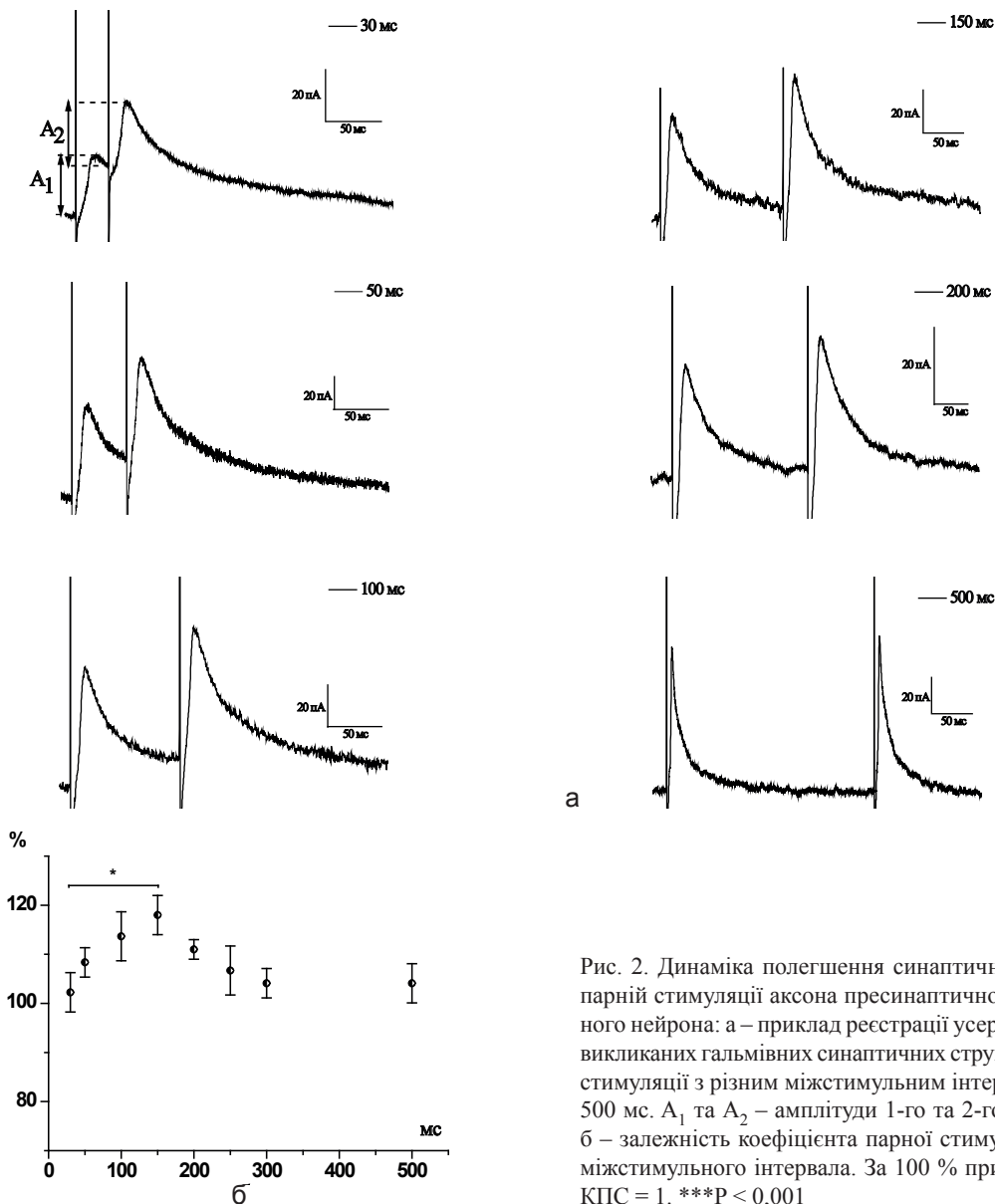


Рис. 2. Динаміка полегшення синаптичної передачі при парній стимуляції аксона пресинаптичного ГАМК-ергічного нейрона: а – приклад реєстрації усереднених парних викликаних гальмівних синаптичних струмів (вГПСС) при стимуляції з різним міжстимульним інтервалом від 30 до 500 мс. A_1 та A_2 – амплітуди 1-го та 2-го вГПСС у парі; б – залежність коефіцієнта парної стимуляції (КПС) від міжстимульного інтервалу. За 100 % прийнято значення КПС = 1. *** $P < 0,001$

становила всього $4 \pm 4\%$. З графіка залежності КПС від міжстимульного інтервалу визначили, що динаміка відновлення після полегшення має дзвіноподібну форму (див. рис.2,б). До такого самого висновку дійшли науковці, досліджуючи збудливу синаптичну передачу між нейронами гіпокампа [13].

Для вивчення зміни амплітуди вГПСС після попередньої активації ми стимулювали аксон пресинаптичного нейрона вже чотирма послідовними поштовхами струму, змінюючи міжстимульний інтервал від 50 до 200 мс (рис.3,а). У досліджених 7 нейронах спостерігалось тільки явище депресії амплітуди наступних вГПСС порівняно з попередніми. З графіка залежності нормованої амплітуди вГПСС від міжстимульного інтервалу (рис.3,б) визначили, що динаміку

депресії можна описати експоненційною функцією. При найкоротшому інтервалі (50 мс) амплітуда струму після попереднього стимулювання знижувалася найшвидше ($\tau = 41$ мс), а при найдовшому інтервалі (200 мс) – найбільш повільно ($\tau = 119$ мс). Це можна пояснити тим, що при міжстимульних інтервалах, менших за декілька секунд, після попереднього стимулювання спустошена активна зона пресинаптичної терміналі не встигає заповнитися достатньою кількістю готовими до вивільнення везикулами, отже, амплітуда наступних вГПСС стає меншою, ніж попередніх [17,18].

З наших результатів можна зробити висновок, що короткотривала пластичність ГАМК-ергічної синаптичної передачі, зумовлена попередньою активністю синапсів,

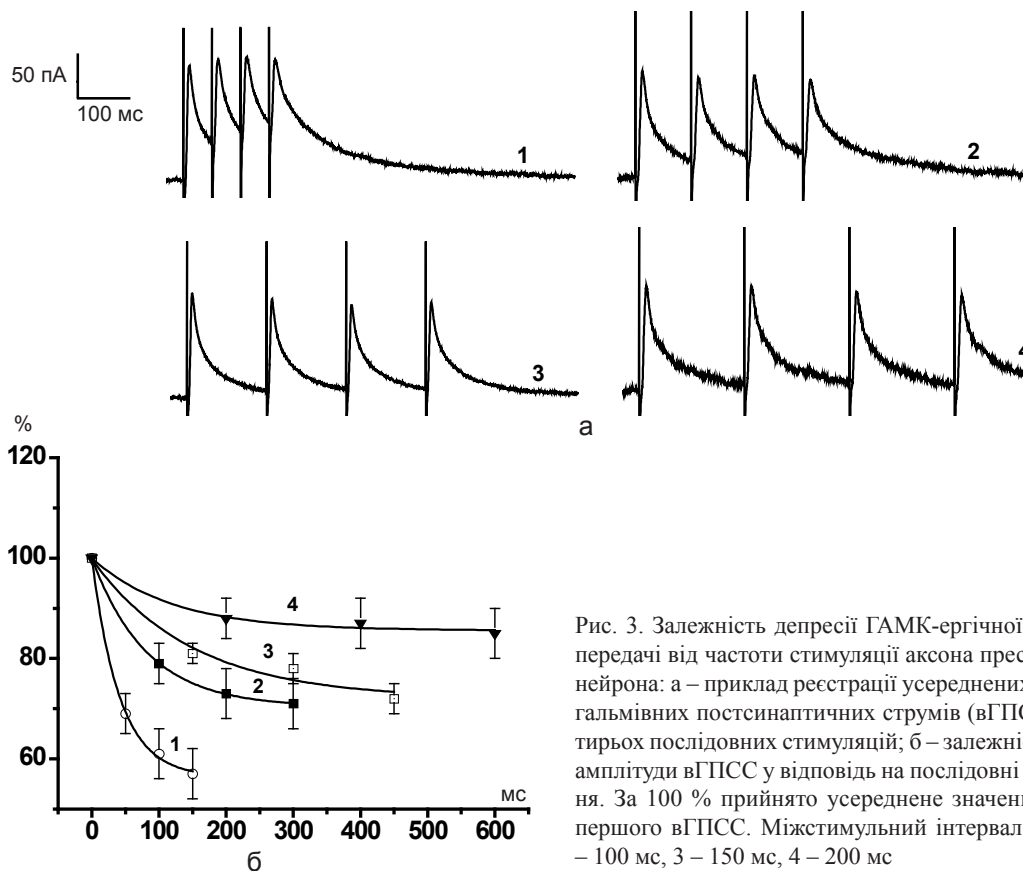


Рис. 3. Залежність депресії ГАМК-ергічної синаптичної передачі від частоти стимуляції аксона пресинаптичного нейрона: а – приклад реєстрації усереднених викликаних гальмінових постсинаптичних струмів (вГПСС) після чотирьох послідовних стимуляцій; б – залежність відносної амплітуди вГПСС у відповідь на послідовні стимулювання. За 100 % прийнято усереднене значення амплітуди першого вГПСС. Міжстимульний інтервал: 1 – 50 мс, 2 – 100 мс, 3 – 150 мс, 4 – 200 мс

залежить від частоти стимулювань. Депресія та полегшення при парній стимуляції мають різну форму залежності від неї. Динаміка відновлення амплітуди вГПСС після депресії має відмінні часові характеристики, ніж після полегшення.

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

ЧАСТОТНАЯ МОДУЛЯЦИЯ КРАТКОВРЕМЕННОЙ ПЛАСТИЧНОСТИ ГАМК-ЕРГИЧЕСКОЙ СИНАПТИЧЕСКОЙ ПЕРЕДАЧИ

В культивированных нейронах гиппокампа крысы измеряли изменения амплитуды вызванных тормозных постсинаптических токов (вТПСТ) при помощи методики фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка» и внеклеточной локальной электрической стимуляции аксона пресинаптического нейрона. Парная стимуляция аксона пресинаптического ГАМК-эргического нейрона всегда приводила к уменьшению (депрессии) или увеличению (облегчению) амплитуды второго вТПСТ в паре. Максимальная депрессия амплитуды второго вТПСТ наблюдалась при самом коротком межстимульном интервале 20 мс, когда амплитуда второго тока была меньше, чем первого на $58 \pm 6\%$. При самом длинном интервале 1200 мс такая разница составляла всего $2 \pm 6\%$ ($n = 9$). Динамика восстановления после депрессии описывалась экспоненциальной функцией с $\tau = 83,5$ мс. Максимальное облегчение наблюдалось при межстимульном интервале 150 мс, когда амплитуда второго тока была большей, чем первого на $18 \pm 4\%$ и на протяжении 500 мс происходило почти полное восстановление ($n = 6$). Восстановления после облегчения имело колоколообразную форму. При стимулировании аксона пресинаптического нейрона четырьмя последовательными толчками тока, мы наблюдали только явление депрессии ($n = 7$). Динамика депрессии амплитуды вТПСС описывалась экспоненциальной функцией. При самом коротком межстимульном интервале (50 мс) амплитуда тока уменьшалась быстрее всего ($\tau = 41$ мс), а при самом длинном интервале (200 мс) – более медленно ($\tau = 119$ мс).

Ключевые слова: депрессия и облегчение ГАМК-эргической синаптической передачи; парная стимуляция; межстимульный интервал.

О.Р. Kolesnyk, S. A. Fedulova, N. S. Veselovsky

FREQUENCY-DEPENDENT MODULATION OF SHORT-TERM PLASTICITY OF GABAERGIC 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. Both paired pulse facilitation (PPF) and paired pulse depression (PPD) were observed in postsynaptic currents in response to paired pulse stimulation of single presynaptic axon with interstimulus interval (ISI) from 20 ms to 1200 ms. In most neurons stimulation induced depression ($n = 12$). The longer interstimulus interval, the less depression was observed. Maximum depression of second eIPSC was during the shortest ISI (20 ms) with paired pulse ration (PPR) equal $42 \pm 6\%$. Minimum depression of second eIPSC was during the longest interstimulus interval (1200 ms) and PPR was equal $98 \pm 6\%$. Rate recovery from PPD is well described by a single exponential function having time constant of 83 ms. PPF was maximal at an ISI of 150 ms (PPR equal $118 \pm 4\%$) and recovered within 500 ms ($n = 6$). Rate recovery from PPF has bell-shape form. In 7 neurons we observed depression of amplitude of eIPSC after consecutive stimulations of single presynaptic axon by four stimulus at ISI ranging from 50 ms to 200 ms. The relation between normalized amplitude and frequency of stimulation well fitted by exponential function with time constant ranged from 41 ms (ISI = 50 ms) to 119 ms (ISI = 200 ms).

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

O.O. Bogomoletz 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. *Annu. Rev. Physiol.* 2002; 64: 355-405.
4. 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: 797-807.
5. Takahashi T, Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Onodera K. Presynaptic calcium current modulation by a metabotropic glutamate receptor. *Science.* 1996; 274: 594-7.
6. Wilcox KS, Dichter MA. Paired pulse depression in cultured hippocampal neurons is due to a presynaptic mechanism independent of GABA_B autoreceptor activation. *J Neurosci.* 1994; 14: 1775-88.
7. Worden MK, Bykhovskaia M, Hackett JT. Facilitation at the lobster neuromuscular junction: a stimulus-dependent mobilization model. *J Neurophysiol.* 1997; 78: 417-28.
8. Rosato-Siri M, Grandolfo M, Ballerini L. Activity-dependent modulation of GABAergic synapses in developing

- rat spinal networks in vitro. Eur J Neurosci. 2002; 16: 2123-35.
9. Rusakov DA, Fine A. Extracellular Ca²⁺ depletion contributes to fast activity-dependent modulation of synaptic transmission in the brain. Neuron. 2003; 37: 287-97.
 10. Kolesnyk OP, Fedulova SA, Veselovsky NS. Analysis of quantal parameters of GABA release during short-term depression and facilitation of synaptic transmission. Fiziol. Zh. 2016; 62(5): 12-18.
 11. Deisz RA, Prince DA. Frequency-dependent depression of inhibition in quinea-pig neocortex in vitro by GABA_B receptor feed-back on GABA release. J Physiol. 1989; 412: 513-41.
 12. Mott DD, Xie CW, Wilson WA, Swartzwelder HS, Lewis DV. GABA_B autoreceptors mediate activity-dependent disinhibition and enhance signal transmission in the dentate gyrus. J Neurophysiol. 1993; 69: 674-91.
 13. 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.
 14. Saviane C, Savtchenko LP, Raffaelli G, Voronin LL, Cherubini E. Frequency-dependent shift from paired-pulse facilitation to paired-pulse depression at unitary CA3-CA3 synapses in rat hippocampus. J Physiol. 2002; 544: 469-76.
 15. Kraushaar U, Jonas P. Efficacy and stability of quantal GABA release at a hippocampal interneuron-principal neuron synapse. J Neurosci. 2000; 20(15): 5594-607.
 16. Yoon KW, Rothman SM. The modulation of rat hippocampal synaptic conductances by baclofen and gamma-aminobutyric acid. J Physiol. 1991; 442: 377-90.
 17. Biro A, Holderith N, Nusser Z. Release probability dependent scaling of the postsynaptic responses at single hippocampal GABAergic synapses. J Neurosci. 2006; 26:12487-96.
 18. Lawrence JJ, Grinspan ZM, McBain CJ. Quantal transmission at mossy fibre targets in the CA3 region of the rat hippocampus. J Physiol (Lond). 2004;554: 175-93.

Матеріал надійшов до редакції 14.10.2016