

Вплив штучної гіпоінсулінемії на синаптичну активність та пластичність глутаматергічної нейропередачі в культурі нейронів гіпокампа

М.С. Шипшина, К.І. Кузнецов, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: shypshyna.mariia@gmail.com

Гіпоінсулінемія є наслідком патологічних змін при діабеті, що викликає ускладнення з боку функціонування центральної та периферичної нервової системи. Асоційоване з гіпоінсулінемією пригнічення сигнальних каскадів рецепторів інсуліну може стимулювати розвиток патологічних станів, пов'язаних з порушенням когнітивних процесів. Ми досліджували вплив хронічної штучної гіпоінсулінемії на рівень синаптичної активності та короткочасну пластичність у культурі нейронів гіпокампа шурів у середовищі без додаткового інсуліну протягом 1, 2 та 4 діб. Концентрація інсуліну в контролі становила 100 нмоль/л. З використанням методу patch-clamp у конфігурації «ціла клітина» та методу локальної електричної стимуляції аксона реєстрували та аналізували спонтанні та викликані глутаматергічні збуджувальні постсинаптичні струми (сЗПСС та вЗПСС відповідно) у цих нейронах. Гіпоінсулінемія сприяла суттєвому зниженню середньої частоти сЗПСС порівняно з контролем до $49,9 \pm 15,8\%$ ($n = 6$), $8,5 \pm 7,7\%$ ($n = 6$) та $16,6 \pm 5,2\%$ ($n = 8$) протягом 1-ї, 2-ї та 4-ї доби відповідно. Паралельно відзначалося зменшення середньої амплітуди сЗПСС до $52,6 \pm 5,5\%$ ($n = 6$), $36,6 \pm 5,8\%$ ($n = 6$) та $43,9 \pm 8,4\%$ ($n = 8$) відповідно щодо контролю. Аналіз амплітуд сЗПСС у рамках біноміальної моделі показав поступове зменшення частоти багатовезикулярних викидів глутамату в синапсах досліджуваних нейронів. Гіпоінсулінемія викликала зсув напрямку короткочасної пластичності глутаматергічної нейропередачі від полегшення до депресії. Коефіцієнт парної стимуляції зменшувався від $1,83 \pm 0,25$ у контролі до $0,59 \pm 0,07$, $0,77 \pm 0,07$ та $0,80 \pm 0,06$ після 1-ї, 2-ї та 4-ї доби культивування без інсуліну. Відповідно збільшувалося співвідношення коефіцієнтів варіації постсинаптичних струмів ($CV2/CV1$) від $0,82 \pm 0,07$ до $1,30 \pm 0,28$, $1,52 \pm 0,27$ та $1,61 \pm 0,24$. Представлені результати свідчать про значне послаблення синаптичної активності та зниження ймовірності багатовезикулярного викиду глутамату в синапсах культивованих нейронів гіпокампа під впливом штучної гіпоінсулінемії.

Ключові слова: гіпоінсулінемія; гіпокамп; глутаматергічна нейропередача; постсинаптичні струми; короткочасна пластичність.

ВСТУП

Гіпоінсулінемія визначається як значне зниження концентрації інсуліну порівняно з нормою для утилізації глюкози з периферичної крові. Такий стан є синдромом цукрового діабету і може спостерігатися внаслідок зменшення продукції цього гормону β -клітинами підшлункової залози як при діабеті 1-го типу, коли відбувається масова загибель клітин підшлункової залози, так і при діабеті 2-го типу внаслідок виснаження

регуляторних нейрогуморальних механізмів з компенсації гіперглікемії.

Оскільки ефекти гіпоінсулінемії реалізуються на рівні функціонування різних органів та систем організму, їх визначення доцільно проводити з застосуванням спрощених модельних систем. Тому первинна культура нейронів гіпокампа шурів може успішно використовуватися для визначення впливів тривалої депривації інсуліну на функціонування синаптичних контактів цієї мозкової структури. Протягом останніх років

© М.С. Шипшина, К.І. Кузнецов, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

зростає науковий інтерес до визначення ролі інсулінзалежної сигналізації у регуляції процесів нейрогенезу та синаптичної пластичності в гіпокампі – відділі мозку, відповідального за формування процесів навчання та пам'яті [1–4]. Описані різноманітні функції інсуліну у підтриманні метаболізму нейронів головного мозку [5], у стимуляції синаптогенезу [6] та реалізації синаптичної пластичності [7–10]. Також цей гормон стимулює проліферацію та метаболізм інсулінчутливої глії [11], яка у свою чергу впливає на функціональний стан нейронів та властивості їх синаптичних зв'язків. Отже, асоційоване з гіпоінсулінемією пригнічення сигнальних каскадів рецепторів інсуліну може мати негативні наслідки у розвитку патологічних станів, пов'язаних з порушенням когнітивних процесів.

Мета нашої роботи – дослідження впливу хронічної штучної гіпоінсулінемії на рівень синаптичної активності та короткочасну пластичність у культурі нейронів гіпокампа.

МЕТОДИКА

Всі експерименти були проведені із дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях. Біоетичний комітет Інституту фізіології імені О.О. Богомольця розглянув та схвалив протоколи всіх експериментальних процедур із використанням лабораторних тварин.

Культивування нейронів гіпокампа. Методика приготування культури нейронів гіпокампа не відрізнялася від описаної раніше [12]. Гіпокамп виділяли у неонатальних щурів лінії Вістар після декапітації, поміщали в розчин, що містив мінімальне середовище Ігла («Sigma», США), 20 ммоль/л NEPEPES, 25 од/мл натрієвої солі бензилпеніциліну та 25 мкг/мл стрептоміцину сульфату. Сегменти гіпокампа обробляли 0,05%-м розчином трипсину (тип II, «Sigma», США) при кім-

натній температурі (23–25°C) протягом 10 хв. Після механічної дезагрегації, яку проводили з використанням різних за діаметром кінчика пастерівських піпеток, нейрони висівали на покриті полі-L-орнітином чашки Петрі (щільність клітин у культурах – близько 30 тис од/см²). Культури інкубували при 37°C і 5% CO₂ у повітряному середовищі. Розчин для культивування виготовляли на базі мінімального середовища Ігла з додаванням 10% кінської сироватки, 2,3 г/л NaHCO₃, 8 мкг/мл інсуліну, 50 од/мл бензилпеніциліну натрієвої солі та 50 мкг/мл стрептоміцину сульфату. Проліферацію гліальних клітин у культурах пригнічували цитозин-А-Д-арабінофуранозидом (5 мкмоль/л). Гіпоінсулінемію індукували культивуванням зрілих (16–20 діб *in vitro*) нейронів гіпокампа щурів у середовищі без додаткового інсуліну протягом 1, 2 та 4 діб. Концентрація інсуліну в контролі становила 100 нмоль/л. Протягом дозрівання культури нейронів додатково не збагачували факторами росту. Електрофізіологічні експерименти проводили на 16–22-ту добу культивування.

Електрофізіологія. З використанням методу patch-clamp у конфігурації «ціла клітина» та методу локальної електричної стимуляції аксона реєстрували та аналізували спонтанні та викликані глутаматергічні збуджувальні постсинаптичні струми (сЗПСС та вЗПСС відповідно) в культивованих нейронах гіпокампа щурів. Експериментальний фізіологічний розчин складався з (ммоль/л): NaCl – 140; KCl – 3; CaCl₂ – 2; MgCl₂ – 2; глюкоза – 6; NEPEPES – 20; рН 7,4; внутрішньоклітинний розчин у patch-піпетках – калію глюконату – 155; EGTA – 0,5; MgCl₂ – 1; NEPEPES – 20; рН 7,4. Різницю потенціалів на мембранах нейронів гіпокампа підтримували на рівні 70 мВ. мЗПСС у нейронах реєстрували у позаклітинному розчині, що містив 0,5 ммоль/л Ca²⁺, 10 ммоль/л Mg²⁺ та 0,25 мкмоль/л тетродотоксину. Експерименти проводили при 20–22°C. При реєстрації глутаматергічних постсинаптичних струмів

гальмівну передачу блокували додаванням у позаклітинний розчин специфічних блокаторів ГАМК_A- та гліцинових рецепторів (бікукуліну метіодиду, стрихніну). Заміну розчинів, які доповнювалися блокаторами іонотропних глутаматних рецепторів (DNQX, D_L-AP5), здійснювали зі швидкістю 2 мл/хв.

Для оцінки короточасної пластичності в сенсорних синапсах розраховували коефіцієнт парної стимуляції (КПС) як частку від пікових значень амплітуд двох послідовно зареєстрованих (з інтервалом 50 мс) вЗПСС: $\text{КПС} = \text{вЗПСС}_2 / \text{вЗПСС}_1$. Коефіцієнти варіації (CV) розраховували як відношення стандартного відхилення амплітуд вЗПСС до їх середнього значення.

Аналіз результатів. Результати представлено як середні \pm похибка середнього; розміри вибірки усереднення подано в дужках. Перевірку гіпотези про належність вибірки до нормально розподіленої генеральної сукупності проводили за тестом Шапіро–Уїлка. Для статистичного порівняння розподілів аналізованих величин використовували критерій узгодженості Пірсона (χ^2). Для визначення рівня значущості розбіжностей між середніми значеннями в групах застосовували критерій t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Для визначення впливу штучної гіпоінсулінемії на рівень синапатичної активності в культурі нейронів гіпокампа аналізували частоту виникнення, а також амплітуди сЗПСС. Реєстрували сЗПСС, опосередковані викидом глутамату. Струми мали швидку кінетику наростання і спаду (час наростання $2,21 \pm 0,47$ мс та постійна часу спаду $5,10 \pm 0,72$ мс; $n = 7$). Середні значення амплітуд сЗПСС лінійно залежали від підтримуваного потенціалу на нейронах гіпокампа. Потенціал реверсії сЗПСС становив $5,72 \pm 2,03$ мВ ($n = 5$). Позаклітинна аплікація блокаторів іонотропних глутаматних рецепторів DNQX (10 мкмоль/л) та D_L-AP5 (10 мкмоль/л) при-

зводила до повного блокування сЗПСС.

Гіпоінсулінемія сприяє зниженню частоти сЗПСС у нейронах гіпокампа. Інкубація нейронів у культуральному середовищі, що не містило додаткового інсуліну, призводила до зниження частоти виникнення сЗПСС у нейронах залежно від тривалості інсулінової депривації (рис. 1; 2).

Гіпоінсулінемія протягом 1 доби викликала суттєве зниження середньої частоти сЗПСС до $46,9 \pm 15,8\%$ ($n = 6$; $P < 0,05$) порівняно з контролем (середня частота сЗПСС становила $27,7 \pm 4,7 \text{ c}^{-1}$). При інкубації нейронів у безінсуліновому середовищі впродовж 2 та 4 діб цей показник знижувався до $8,6 \pm 7,7\%$ ($n = 6$; $P < 0,005$) та $16,6 \pm 5,2\%$ ($n = 8$; $P < 0,001$) відповідно порівняно з контролем. Розподіли частот сЗПСС у нейронах, інкубованих в умовах гіпоінсулінемії, статистично вірогідно від-

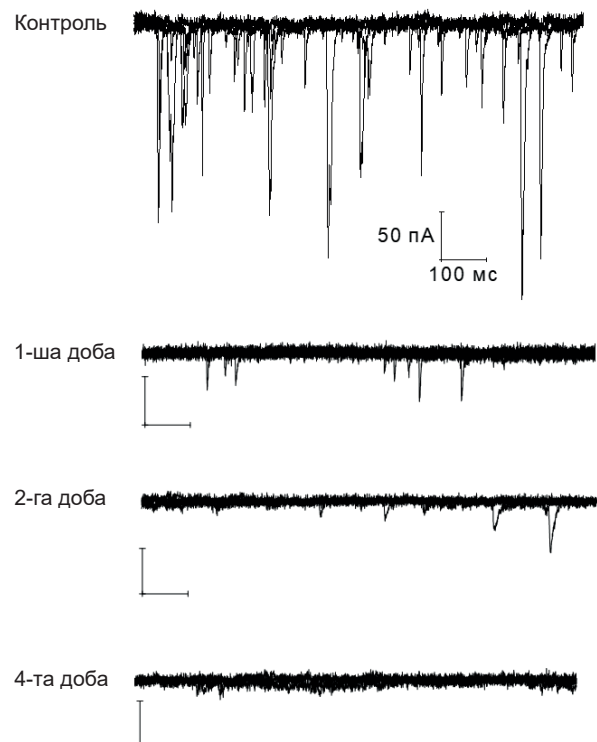


Рис. 1. Зміна спонтанної активності культивованих нейронів гіпокампа під дією тривалої гіпоінсулінемії. Приклади реєстрацій глутаматергічних спонтанних постсинапатичних струмів у нейронах гіпокампа: у контролі, в *in vitro* моделі гіпоінсулінемії протягом 1, 2 та 4 діб відповідно

різнялися від контрольних значень. Моді та медіани частотних гістограм сЗПСС також були істотно нижчими за контроль (табл. 1). Розподіли частот сЗПСС у групах нейронів,

Таблиця 1. Показники розподілів частот глутаматергічних спонтанних постсинаптичних струмів (s^{-1}) у нейронах гіпокампа під впливом гіпоінсулінемії

Схема досліджу	Середнє значення	Медіана	Мода
Контроль	$27,7 \pm 4,7$	$15,9 \pm 0,7$	$15,8 \pm 1,03$
Гіпоінсулінемія			
1-ша доба	$12,9 \pm 4,4^*$	$6,6 \pm 0,9$	$9,25 \pm 0,9$
2-га доба	$2,4 \pm 1,3^{**}$	$1,6 \pm 0,6$	$1,9 \pm 1,3$
4-та доба	$4,6 \pm 1,4^{**}$	$2,9 \pm 0,5$	$9,6 \pm 1,1$

* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$ щодо контролю

що підлягали впливу гіпоінсулінемії протягом різного часу, достовірно не відрізнялися.

Представлені результати свідчать про пригнічення глутаматергічної синаптичної активності в нейронних мережах гіпокампа під

впливом тривалої гіпоінсулінемії. Як відомо, зниження частоти спонтанних постсинаптичних відповідей нейронів тісно корелює зі зниженням ефективності функціонування синапсів на постсинаптичних нейронах

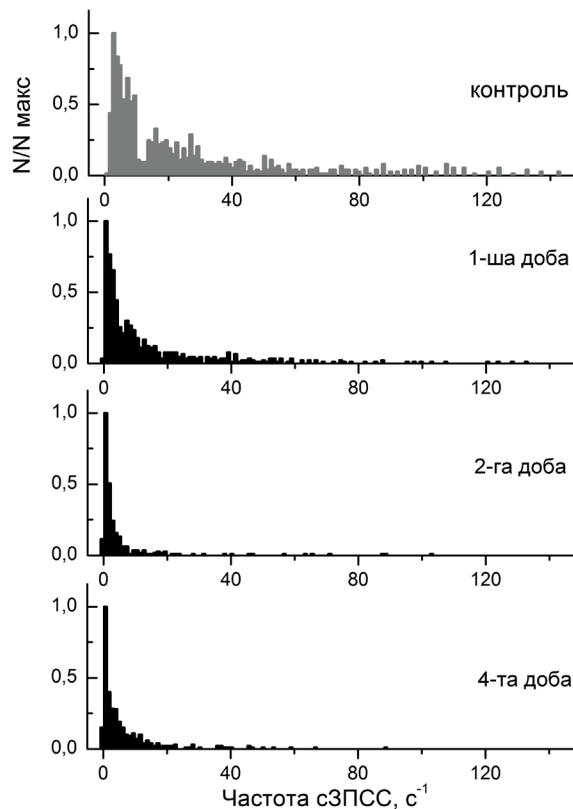


Рис. 2. Зниження частоти глутаматергічних спонтанних постсинаптичних струмів (сЗПСС) у нейронах гіпокампа при тривалій гіпоінсулінемії. Усереднені розподіли частот сЗПСС нормовані на максимальне значення (N/N_{\max}) у контролі, в *in vitro* моделі гіпоінсулінемії протягом 1,2 та 4 діб відповідно

[13], через зміни ймовірності та числа зон вивільнення нейромедіатора.

Гіпоінсулінемія сприяє зменшенню амплітуди i квантового вмісту сЗПСС у нейронах гіпокампа. Амплітудні розподіли сЗПСС у контролі та в нейронах, культивованих під впливом гіпоінсулінемії, характеризувалися наявністю декількох рівновіддалених піків, які задовільно апроксимувалися сумою кривих Гауса (рис. 3). Середня відстань між піками таких гістограм відповідала першій моді ($-20,1 \pm 2,2$ пА; $n = 12$) розподілів, що свідчить про чітко виражений багатоквантовий характер вивільнення глутамату в синапсах культивованих нейронів гіпокампа. Крім того, моди амплітудних розподілів сЗПСС були кратними моді унімодальних амплітудних гістограм мініатюрних мЗПСС ($-20,5 \pm 0,7$ пА; $n = 5$), які інтерпретуються як значення синаптичного струму внаслідок викиду одиничного кванта глутамату в синапсах культивованих нейронів [14]. Кінетика мВПСС відповідала

такій сВПСС (час наростання $3,07 \pm 0,35$ мс, постійна часу спаду $5,51 \pm 0,53$ мс; $n = 5$).

Розподіли амплітуд сЗПСС у нейронах гіпокампа, що підлягали впливу гіпоінсулінемії, відрізнялися від контрольної групи ($P < 0,001$) меншою кількістю піків при відносно постійних значеннях середньої відстані між ними. При цьому знижувалися частоти спостереження 2-,3- і 4-квантових подій, як це видно при порівнянні амплітудних гістограм (див. рис. 3). Відмінності у розподілах амплітуд сЗПСС у групах нейронів, що підлягали впливу гіпоінсулінемії різних тривалостей, не сягали статистично значущого рівня.

Середні значення амплітуд сЗПСС, зареєстрованих у нейронах під впливом гіпоінсулінемії, були суттєво та вірогідно нижчими за контрольні (табл. 2). Протягом 1-ї, 2-ї та 4-ї доби культивування без інсуліну зменшення середньої амплітуди сЗПСС сягало $52,6 \pm 5,5\%$ ($n = 6$; $P < 0,05$), $36,6 \pm 5,8\%$ ($n = 6$; $P < 0,05$) та $43,9 \pm 8,4\%$ ($n = 8$;

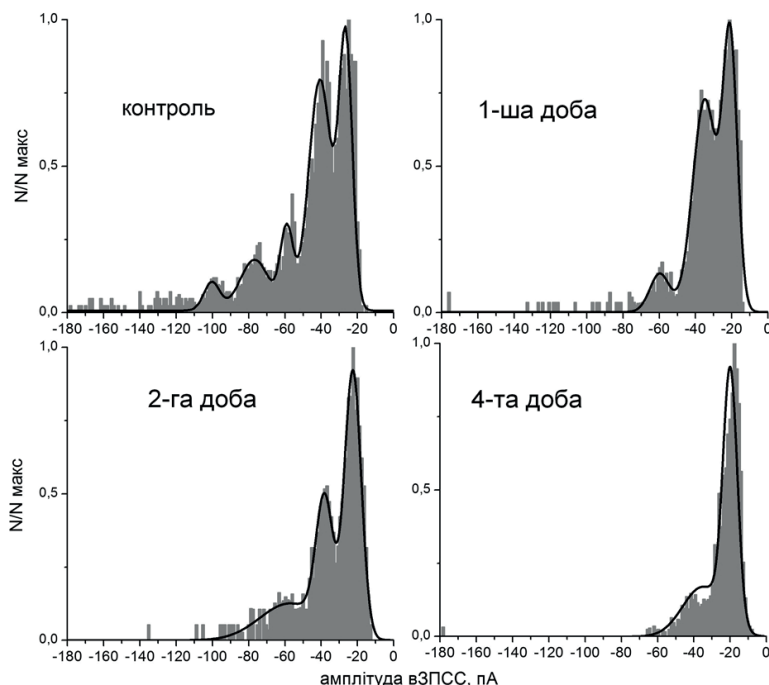


Рис. 3. Вплив тривалої гіпоінсулінемії на амплітуду глутаматергічних спонтанних постсинаптичних струмів (сЗПСС) культивованих нейронів гіпокампа. Полімодальні амплітудні розподіли сЗПСС (амплітуди нормовані на максимальні значення; N/N_{\max}) представлені у контролі та під дією гіпоінсулінемії протягом 1, 2 та 4 діб відповідно

Таблиця 2. Зміни показників амплітудних розподілів глутаматергічних спонтанних збуджувальних постсинаптичних потенціалів, зареєстрованих у нейронах гіпокампа, на фоні гіпоінсулінемії

Схема досліджу	Середнє значення, пА	Квантовий вміст
Контроль	$-78,4 \pm 2,7$	$3,9 \pm 1,03$
Гіпоінсулінемія		
1-ша доба	$-41,2 \pm 4,4^*$	$2,1 \pm 0,2$
2-га доба	$-28,7 \pm 4,6^*$	$1,6 \pm 0,3^*$
4-та доба	$-34,4 \pm 6,6^*$	$1,5 \pm 0,1^*$

* статистично вірогідна різниця порівняно зі значеннями у контролі

$P < 0,05$) відповідно щодо контролю. Аналіз амплітуд сЗПСС у рамках біноміальної моделі показав поступове зменшення частоти багатovesикулярних викидів глутамату в синапсах досліджуваних нейронів, що спостерігалось паралельно зі зменшенням квантового вмісту (див. табл. 2).

Відповідно до біноміальної моделі, прийнятної для опису ймовірності вивільнення нейромедіаторів у синапсах культивованих нейронів гіпокампа [12], квантовий вміст залежить від ймовірності викиду окремих квантів та числа зон їх вивільнення. Очевидно, що під впливом гіпоінсулінемії зменшення інтенсивності багатovesикулярного викиду глутамату синапсами гіпокампальних нейронів асоційоване зі зниженням частотних та амплітудних показників сЗПСС у наших експериментах. Такі результати узгоджуються з даними попередніх досліджень про суттєве зниження числа глутаматергічних синапсів у гіпокампі тварин, нокаутних за рецептором інсуліну 1-го типу [15]. Відомо при стимулюючу функцію інсуліну у підвищенні ефективності викиду глутамату в пресинаптичних терміналях нейронів гіпокампа, що виражається у збільшенні частоти мініатюрних постсинаптичних струмів, асоційованим зі збільшенням числа функціональних синапсів у цих нейронах [16].

Гіпоінсулінемія модулює короткочасну пластичність глутаматергічної нейропередачі в синапсах нейронів гіпокампа. Для оцінки впливу гіпоінсулінемії на короткочасну пластичність у синапсах нейронів гіпокампа

досліджували одну з її найбільш поширених форм – пластичність при парній стимуляції (ППС). З використанням методу стимуляції поодиноких аксонів у комбінації з методами patch-clamp аналізували глутаматергічні вЗПСС, викликані парами імпульсів у пресинаптичних аксонах з інтервалом 50 мс.

Гіпоінсулінемія суттєво впливала на параметри ППС, сприяючи зміні напрямку короткочасної пластичності глутаматергічної нейропередачі в синапсах гіпокампальних нейронів (рис. 4). У контрольній групі відзначалася виражене полегшення ППС (КПС = $1,83 \pm 0,25$; $n = 8$). При культивуванні у безінсуліновому середовищі зазначених тривалостей виявлялася депресія ППС, ступінь якої статистично вірогідно не відрізнявся в групах гіпоінсулінемії різної тривалості: значення КПС становило $0,59 \pm 0,07$ ($n = 6$; $P < 0,01$) після 1-ї доби, $0,77 \pm 0,07$ ($n = 4$; $P < 0,01$) після 2-ї та $0,80 \pm 0,06$ ($n = 5$; $P < 0,01$) після 4-ї доби без інсуліну відповідно.

При аналізі ППС порівнювали коефіцієнти варіації амплітуд 1-го та 2-го вЗПСС (CV1 та CV2). Для нейронів контрольної групи співвідношення CV2/CV1 сягало $0,82 \pm 0,07$ ($n = 8$). Таке зменшення варіації 2-го вЗПСС порівняно з 1-м вказує на пресинаптичні механізми розвитку полегшення при парній стимуляції [17], пов'язані зі збільшенням ймовірності викиду квантів медіатора при відповіді на 2-й стимул у парі. Під впливом гіпоінсулінемії протягом 1, 2 та 4 діб визначалися вищі за контрольний рівень значення співвідношень CV2/CV1: $1,3 \pm 0,3$ ($n = 6$;

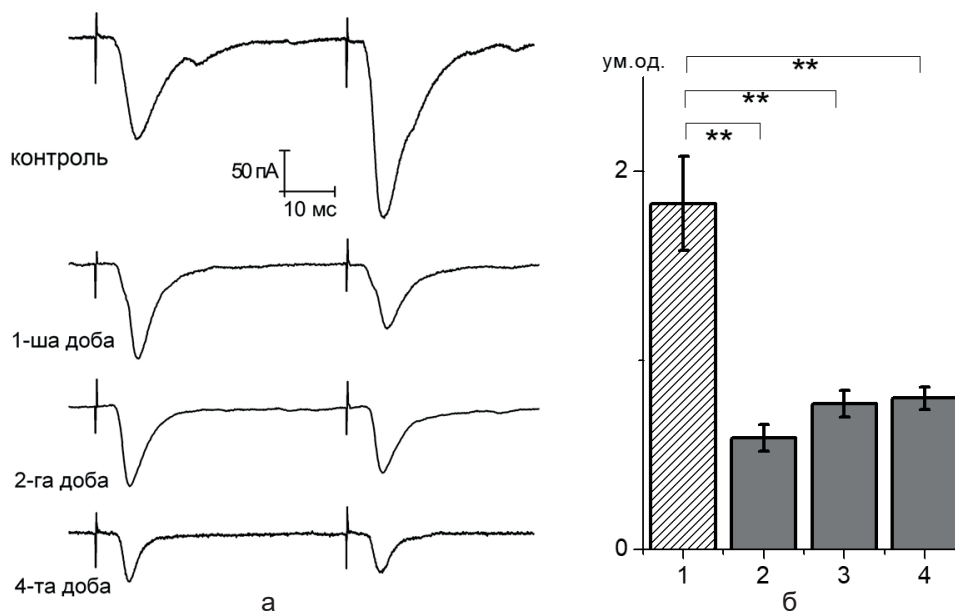


Рис. 4. Вплив тривалої гіпоінсулінемії на пластичність при парній стимуляції в глутаматергічних синапсах нейронів гіпокампа: а – усереднені записи збуджувальних постсинаптичних струмів у контролі та *in vitro* моделі гіпоінсулінемії; б – гістограма середніх значень коефіцієнтів парної стимуляції у контролі (1), при гіпоінсулінемії (2, 3 та 4 відповідно). ** $P < 0,01$ щодо контролю

$P < 0,05$), $1,5 \pm 0,3$ ($n = 4$; $P < 0,01$) та $1,6 \pm 0,2$ ($n = 5$; $P < 0,01$) відповідно. У цих групах нейронів суттєве підвищення варіації 2-го вЗПСС порівняно з 1-м вказує на значне зменшення ймовірності викиду глутамату під впливом гіпоінсулінемії. Отримані результати узгоджуються з даними інших досліджень щодо пресинаптичної модуляції пластичності в глутаматергічних синапсах нейронів гіпокампа під дією інсуліну [18], коли блокада інсулінових рецепторів призводить до зниження ефективності збуджувальної нейропередачі через зменшення ймовірності пресинаптичного вивільнення глутамату.

ВИСНОВКИ

Представлені результати свідчать про значне послаблення синаптичної активності та зниження ймовірності багатовезикулярного викиду глутамату в нейронних мережах культивованих нейронів гіпокампа під впливом штучної гіпоінсулінемії. Модуляція короточасної пластичності у синапсах ней-

ронів гіпокампа при гіпоінсулінемії залучає пресинаптичні механізми, що стимулюють істотне зниження ймовірності вивільнення глутамату в окремих синапсах цих нейронів.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

M.S. Shypshyna, K.I. Kuznetsov, S.A. Fedulova, M.S. Veselovsky

EFFECTS OF ARTIFICIAL HYPOINSULINEMIA ON SYNAPTIC ACTIVITY AND PLASTICITY OF GLUTAMATERGIC NEUROTRANSMISSION IN CULTURE OF HIPPOCAMPAL NEURONS

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology, NAS of Ukraine, Kyiv; e-mail: shypshyna.mariia@gmail.com

We investigated the effect of chronic hypoinsulinemia on the level of synaptic activity and short-term plasticity in cultured hippocampal neurons. Hypoinsulinemia was induced by culturing mature (16-20 days *in vitro*) rat's hippocampal

neurons without insulin for 1, 2, and 4 days. The control insulin concentration was 100 nmol/l. Spontaneous and evoked glutamatergic excitatory postsynaptic currents (sEPSC and eEPSC, respectively) in these neurons were analyzed using the whole-cell patch-clamp method and the method of local electrical stimulation of individual axon. Hypoinsulinemia during the 1st, 2nd and 4th days led to significant reduction of the mean sEPSC's frequency to $49.9 \pm 15.8\%$ ($n = 6$), $8.5 \pm 7.7\%$ ($n = 6$) and $16.6 \pm 5.2\%$ ($n = 8$) respectively, relative to control. Also, there was a decrease of the average sEPSC's amplitudes to $52.6 \pm 5.5\%$ ($n = 6$), $36.6 \pm 5.8\%$ ($n = 6$) and $43.9 \pm 8.4\%$ ($n = 8$), respectively, relative to control. Quantal analysis of the sEPSC's amplitudes showed a decrease of multivesicular glutamate release at the synapses under such conditions. Hypoinsulinemia caused a shift in the direction of short-term plasticity in glutamatergic hippocampal synapses from potentiation to depression. The paired-pulse ratio decreased from 1.83 ± 0.25 in the control to 0.59 ± 0.07 , 0.77 ± 0.07 , and 0.80 ± 0.06 after the 1st, 2nd, and 4th days under cultivation without insulin. Accordingly, the ratio of the coefficients of variation of eEPSC's amplitudes (CV2/CV1) increased from 0.82 ± 0.07 to 1.30 ± 0.28 , 1.52 ± 0.27 , and 1.61 ± 0.24 . The presented results indicate a significant reduction of synaptic activity and decrease in the probability of multivesicular release of glutamate at the synapses of cultured hippocampal neurons under hypoinsulinemia.

Key words: hypoinsulinemia; hippocampus; glutamatergic neurotransmission; postsynaptic currents; short-term plasticity.

М.С. Шипшина, К.И. Кузнецов, С.А. Федулова, Н.С. Веселовский

ВЛИЯНИЕ ГИПОИНСУЛИЕМИИ НА СИНАПТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ И ПЛАСТИЧНОСТЬ ГЛУТАМАТЕРГИЧЕСКОЙ НЕЙРОПЕРЕДАЧА В КУЛЬТУРЕ НЕЙРОНОВ ГИПОКАМПА

Мы исследовали влияние хронической гипoinsуліемії на уровень синаптической активности и кратковременную пластичность в культуре нейронов гиппокампа. Гипoinsуліемію индуцировали культивированием зрелых (16–20 сут *in vitro*) нейронов гиппокампа крыс в среде без добавленного инсулина на протяжении 1, 2 и 4 сут. Концентрация инсулина в контроле составляла 100 нмоль/л. С использованием метода patch-clamp в конфигурации «целая клетка» и метода локальной электрической стимуляции аксона регистрировали и анализировали спонтанные и вызванные глутаматергические возбуждающие постсинаптические токи (сВПСТ и вВПСТ соответственно) в данных нейронах. Гипoinsуліемією приводила к существенному снижению средней частоты сВПСТ в сравнении с контролем до $49,9 \pm 15,8\%$ ($n = 6$), $8,5 \pm 7,7\%$ ($n = 6$) и $16,6 \pm 5,2\%$ ($n = 8$) в течение 1, 2 и 4 сут соответственно. Параллельно отмечалось уменьшение средней амплитуды сВПСТ до $52,6 \pm 5,5\%$ ($n = 6$), $36,6 \pm$

$5,8\%$ ($n = 6$) и $43,9 \pm 8,4\%$ ($n = 8$) от контроля. Анализ амплитуд сВПСТ в рамках биномиальной модели показал постепенное снижение частоты многовезикулярных выбросов глутамата в синапсах исследованных нейронов. Гипoinsуліемія вызвала смещение направления развития кратковременной пластичности глутаматергической нейропередачі от облегчения до депрессии. Коэффициент парной стимуляции уменьшался от $1,83 \pm 0,25$ в контроле до $0,59 \pm 0,07$, $0,77 \pm 0,07$ и $0,80 \pm 0,06$ после 1, 2 и 4 сут культивирования без инсулина. Соответственно увеличивалось соотношение коэффициентов вариации постсинаптических токов (CV2/CV1) от $0,82 \pm 0,07$ до $1,30 \pm 0,28$, $1,52 \pm 0,27$ и $1,61 \pm 0,24$. Представленные результаты свидетельствуют о существенном ослаблении синаптической активности и снижении вероятности многовезикулярного выброса глутамата в синапсах культивированных нейронов гиппокампа на фоне гипoinsуліемії.

Ключевые слова: гипoinsуліемія; гиппокамп; глутаматергическая нейропередача; постсинаптические токи; кратковременная пластичность.

REFERENCES

1. Dou JT, Chen M, Dufour F, Alkon DL, Zhao WQ. Insulin receptor signaling in long-term memory consolidation following spatial learning. *Learn Mem.* 2005;12(6):646-55.
2. Zhao WQ, Chen H, Quon MJ, Alkon DL. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol.* 2004;490(1-3):71-81.
3. Park CR, Seeley RJ, Craft S, Woods SC. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav.* 2000; 68(4):509-14.
4. McNay EC, Ong CT, McCrimmon RJ, Cresswell J, Bogan JS, Sherwin RS. Hippocampal memory processes are modulated by insulin and high-fat-induced insulin resistance. *Neurobiol Learn Mem.* 2010;93(4):546-53.
5. Kleinridders A, Ferris HA, Cai W, Kahn CR. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. *Diabetes.* 2014;63(7):2232-43.
6. Chiu SL, Chen CM, Cline HT. Insulin receptor signaling regulates synapse number, dendritic plasticity, and circuit function *in vivo*. *Neuron.* 2008;58(5):708-19.
7. Grillo CA, Piroli GG, Lawrence RC, Wriught SA, Green AG, Reagan LP. Hippocampal insulin resistance impairs spatial learning and synaptic plasticity. *Diabetes.* 2015;64(11):3927-36.
8. Huang CC, Lee CC, Hsu KS. An investigation into signal transduction mechanisms involved in insulin-induced long-term depression in the CA1 region of the hippocampus. *J Neurochem.* 2004;89(1):217-31.
9. Spinelli M, Fusco S, Grassi C. Brain insulin resistance and hippocampal plasticity: mechanisms and biomarkers of cognitive decline. *Front Neurosci.* 2019;13:788.
10. Zhao F, Siu JJ, Huang W, Askwith C, Cao L. Insulin modulates excitatory synaptic transmission and synaptic

- plasticity in the mouse hippocampus. *Neuroscience*. 2019;411:237-54.
11. Heni M, Hennige AM, Peter A, Siegel-Axel D, Ordelheide AM, Krebs N, Machicao F, Fritsche A, Häring HU, Staiger H. Insulin promotes glycogen storage and cell proliferation in primary human astrocytes. *PLoS One*. 2011;6(6):e21594.
 12. Fedulova SA, Vasilyev DV, Veselovsky NS. Temporal regularity of neurotransmitter release at single terminal in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience*. 2000;100(2):229-39.
 13. Gottmann K, Pfrieder FW, Lux HD. The formation of glutamatergic synapses in cultured central neurons: selective increase in miniature synaptic currents. *Brain Res Dev Brain Res*. 1994;81(1):77-88.
 14. Edwards FA, Konnerth A, Sakmann B. Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study. *J Physiol*. 1990;430:213-49.
 15. Trejo JL, Llorens-Martín MV, Torres-Alemán I. The effects of exercise on spatial learning and anxiety-like behavior are mediated by an IGF-I-dependent mechanism related to hippocampal neurogenesis. *Mol Cell Neurosci*. 2008;37(2):402-11.
 16. Lee CC, Huang CC, Hsu KS. Insulin promotes dendritic spine and synapse formation by the PI3K/Akt/mTOR and Rac1 signaling pathways. *Neuropharmacology*. 2011;61(4):867-79.
 17. 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(3):1775-88.
 18. Ferrario CR, Reagan LP. Insulin-mediated synaptic plasticity in the CNS: Anatomical, functional and temporal contexts. *Neuropharmacology*. 2018;136(Part B):182-91.

Матеріал надійшов до редакції 08.06.2021