

ВЛАСТИВОСТІ КВАНТОВОГО ВИВІЛЬНЕННЯ ГЛУТАМАТУ ТА ГЛІЦИНУ В СИНАПСАХ ПЕРВИННИХ АФЕРЕНТНИХ НЕЙРОНІВ НА НЕЙРОНАХ ДОРСАЛЬНОГО РОГУ В КОКУЛЬТУРІ.

В. І. Шпильовий^{1, а}, М. С. Шипшина^{2, б}

¹Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

²Інститут Фізіології ім. Богомольця

Анотація

З використанням методів петч-клемп реєстрації трансмембранних струмів та потенціалів в парах синаптично зв'язаних кокультивованих нейронів спінальних гангліїв (СГ) та дорсальних рогів (ДР) щурів визначали особливості вивільнення глутамату та гліцину в синапсах первинних аферентних нейронів. В результаті аналізу розподілів постсинаптичних струмів, зареєстрованих у нейронах ДР, були визначені квантові параметри викиду даних нейромедіаторів. Показано, що внаслідок пресинаптичного потенціалу дії (ПД) в синапсах глутамат- та гліцинергічних нейронів СГ вивільнення квантів нейромедіаторів здійснюється незалежно. Ймовірність викиду медіаторів підпорядковується біноміальній статистиці. Є підстави вважати, що пресинаптичний нейрон СГ формує на постсинаптичній клітині ДР в кокультурі декілька синапсів. Передбачається, що пресинаптичні терміналі даних синапсів містять більше однієї зони викиду нейромедіатора; це не виключає багатоквантове вивільнення гліцину або глутамату в декількох зонах викиду синапсів у процесі нейропередачі.

Ключові слова: спінальні ганглії, дорсальні роги спинного мозку, синаптична передача, квантовий аналіз, біноміальний закон, глутамат, гліцин.

Вступ

Синаптична передача є ключовим елементом в розповсюдженні аферентного сигналу у провідних шляхах та його модуляції в нейронних мережах на різних рівнях передачі. Однією з властивостей нейропередачі, що неодноразово спостерігалася в різних регіонах мозку, є варіація ваги синаптичної передачі, що виражається у флуктуаціях амплітуд постсинаптичних відповідей одного синаптичного входу [1]. Такі властивості синаптичної передачі можуть бути описані через стандартну квантову модель.

Відповідно до теорії квантового викиду, викликане пресинаптичним потенціалом дії вивільнення нейромедіатора відбувається дискретно (квантами) і має ймовірнісний характер [2]. Постсинаптична відповідь в даному випадку відображує суму квантових викидів медіатора в усіх зонах вивільнення синапсу. Таким чином, найважливішим параметром викликаної синаптичної передачі є ймовірність вивільнення квантів трансмітера. Вважається, що процес вивільнення медіаторів в окремих синапсах, що враховує варіацію числа квантів, вивільнених у відповідь на пресинаптичний імпульс, задовольняє статистичному закону Пуассона [3]. В багатьох регіонах ЦНС вивільнення нейромедіаторів в синапсах нейронів також підпорядковується біноміальній статистиці [4].

В попередніх роботах було виявлено, що в кокультурі нейронів СГ та ДР щурів нейропередача в синапсах первинних аферентів на нейронах ДР від-

бувається в основному завдяки пресинаптичному вивільненню глутамату та гліцину. В даній роботі охарактеризовані особливості квантового вивільнення цих нейромедіаторів у збуджувальних та гальмівних синапсах поодиноких первинних аферентних нейронів в умовах кокультивування з нейронами ДР.

1. Методика

Кокультуру нейронів ДР та СГ щурів отримували згідно з методикою, що була описана раніше. З використанням методу «patch clamp» в конфігурації «ціла клітина» у парі синаптично зв'язаних нейронів, в нейронах ДР реєстрували моносинаптичні збуджувальні та гальмівні постсинаптичні струми (ЗПСС та ГПСС відповідно), викликані генерацією ПД у нейроні СГ, а також спонтанні та мініатюрні постсинаптичні струми. ПД в нейронах СГ викликали поштовхами струму тривалістю 30 мс та амплітудою 50 пА.

Внутрішньоклітинний розчин у петч-піпетках містив (у мілімолях на 1 л): калію глюконату – 155; EGTA – 0,5; gCl₂ – 1; NEPES – 20 (рН доводили до 7,4 додаванням КОН). Базовий позаклітинний розчин містив (у мілімолях на 1 л): NaCl – 140; KCl – 3; CaCl₂ – 2; gCl₂ – 2; глюкози – 12; NEPES – 20 (рН доводили до 7,4 додаванням NaOH). Мініатюрні ЗПСС та ГПСС в клітинах ДР реєстрували у позаклітинному розчині, що містив Ca²⁺ 0,5 мМ Mg²⁺ 10 мМ та ТТХ 0,25 мкМ. Експерименти виконували при температурі 20 – 22°C в кокультурі низької щільності (20 – 30 тис. клітин/см²). Аплікація розчинів,

^аv.shpyliovyi@ukr.net

^бshypshyna.mariia@gmail.com

що містили блокатори збуджувальної (DNQX, DL-AP5,) та гальмівної (бікукуліну метіодид, стрихнін) нейропередачі, відбувалася за допомогою системи зміни розчинів зі швидкістю 2 мл/хв. Реактиви для електрофізіологічних експериментів були отримані від «Sigma» (США).

Основні квантові параметри вивільнення нейромедіаторів (величина ефекту вивільнення одного кванту Q , середній квантовий вміст m , кількість квантових подій n) визначали наступними методами. 1. Гістограмний метод з апроксимацією амплітудних розподілів вЗПСС та вГПСС декількома функціями Гауса використовували для візуальної ідентифікації рівновіддалених піків із визначеним періодом, що інтерпретуються як набір незалежних квантових подій. Аналізували вЗПСС та вГПСС, які були ідентичними за кінетичними параметрами наростання та спаду. 2. Метод аналізу мініатюрних та спонтанних постсинаптичних струмів (мПСС та сПСС відповідно), реєстрованих в нейронах ДР, використовували для підтвердження припущення про величину одиничної квантової події. Для опису ймовірності вивільнення нейромедіаторів використовували просту біноміальну статистику. Згідно простої біноміальної моделі ймовірність спостереження викиду певної кількості квантових одиниць x в даній реєстрації вПСС має вигляд: $P(x) = \frac{n!}{(n-x)!x!} p^x (1-p)^{(n-x)}$, де n – загальна кількість квантів, що можуть вивільнятися на пресинаптичний ПД, («запас» квантів), p – ймовірність вивільнення окремих квантів. Теоретичні значення середнього квантового вмісту m (середньої кількості квантів медіатору, що вивільняються у відповідь на пресинаптичний імпульс) розраховували за біноміальним законом: $m = np$. Експериментальні значення m розраховували як відношення середньої амплітуди постсинаптичних струмів ($I_{сер}$) до середньої величини постсинаптичної відповіді, еквівалентної викиду одиничного кванту медіатору (Q) (прямий метод). Придатність біноміальної статистики для опису експериментальних даних визначали за відповідністю величин m , розрахованих із застосуванням першого та другого методів [5].

Аналіз даних виконували за допомогою програмних пакетів «Clampfit 9.0» («Axon Instruments», США), «Excel 2007» («Microsoft Corporation», США), «OriginPro 8» («OriginLab Corporation», США). Числові дані представлені як середні \pm похибка середнього (s.e.m.); розміри вибірки усереднення подані в дужках.

2. Результати

Вивільнення глутамату та гліцину в синапсах нейронів СГ на нейронах ДР досліджували на 14 добу кокультивування. Квантовий аналіз проводили для пар нейронів, де постсинаптичні струми флукутували в широких межах.

1. Квантові властивості викиду глутамату. Викликані, мініатюрні та спонтанні ЗПСС відводили від нейронів ДР при підтримуваному потенціалі -70 мВ за наявності у позаклітинному розчині блокаторів

гліцинергічної та ГАМК-ергічної нейропередачі стрихніну (1 мкМ) та бікукуліну метіодиду (10 мкМ) відповідно. Спонтанні ЗПСС мали швидку кінетику наростання та спаду (час наростання = $2,31 \pm 0,58$ мс; $\tau_{спаду} = 4,50 \pm 0,92$ ($n = 5$)). Середнє значення амплітуд сЗПСС залежало від підтримуваного потенціалу на нейронах ДР. Потенціал реверсії таких сЗПСС складав $-5,12 \pm 2,31$ мВ ($n = 5$). Додавання у зовнішньоклітинний розчин блокаторів глутаматергічної нейропередачі DNQX (10 мкМ) та DL-AP5 (10 мкМ) призводило до повної та зворотної блокади сЗПСС, що характеризує дані струми як глутамат-індуковані. Розподіли амплітуд сЗПСС, зареєстрованих у 8 різних клітинах ДР, виявили наявність 2–4 візуально ідентифікованих піків на гістограмах, які задовільно апроксимувалися сумою кривих Гауса (рис. 1, Б). В усіх випадках значення середньої відстані між піками суміжних нормальних розподілів не відрізнялися від значень першої моди полімодальних амплітудних гістограм і дорівнювали $20,62 \pm 0,82$ пА ($n = 12$). Мініатюрні ЗПСС в клітинах ДР реєстрували в умовах зниженої ймовірності викиду медіатора. Час наростання мЗПСС дорівнював $3,07 \pm 0,35$ мс, а $\tau_{спаду} = 5,51 \pm 0,53$ мс ($n = 5$). Розподіли амплітуд мЗПСС були унімодальними і задовільно апроксимувалися однією гаусіаною з модою на $20,47 \pm 0,69$ пА ($n = 5$) (рис. 1, А). Глутаматергічні вЗПСС, які реєстрували в клітинах ДР у відповідь на поодинокі ПД у нейронах СГ, за своїми кінетичними та потенціалзалежними характеристиками відповідали сЗПСС та мЗПСС. Апроксимації амплітудних гістограм вЗПСС ($n = 10$) суперпозицією декількох гаусових кривих виявляли декілька рівновіддалених мод, середня відстань між якими складала $20,40 \pm 1,96$ пА. Кількість явних мод варіювала від 3 до 7 для різних пар нейронів (рис. 1, В) Оскільки відстань між окремими модами розподілів амплітуд інтерпретується як величина ефекту вивільнення одного кванту медіатору у складі інтегрального постсинаптичного струму, середня величина одиничної квантової події викиду глутамату при підтримуваному потенціалі -70 мВ складає приблизно 20 пА. Це повністю відповідає величині ефекту викиду одиничного кванту, розрахованої при аналізі сЗПСС та мЗПСС ($n = 9$). Для опису ймовірності вивільнення глутамату в синапсах поодиноких нейронів СГ використовували біноміальну статистику, для чого був здійснений перехід від неперервного амплітудного розподілу до розподілу дискретних квантових подій (рис. 1, Г). Оскільки величини окремих квантових подій розподілені за нормальним законом, в серії реєстрацій вЗПСС кількість викидів одного кванту медіатору визначали як кількість вЗПСС з амплітудою в діапазоні $-10 \dots -30$ пА, двох квантів – як число вЗПСС з амплітудою в діапазоні $-30 \dots -50$ пА і т. д. Експериментально визначені таким чином кількості квантових подій n (0, 1, 2, і т.д.) у відповідь на пресинаптичний ПД добре корелювали з такими, визначеними за біноміальним законом ($r_2 = 0,92$). Значення квантового вмісту m для досліджуваних пар нейронів були розраховані відповідно до біно-

міального закону та прямим методом. Графічна репрезентація відповідності між величинам квантового вмісту, розрахованих для 10 пар нейронів, задовільно апроксимувалася лінійною функцією із нахилом 45° (рис. 1, Д). Така кореляція ($r = 0,97$) підтримує початкову гіпотезу про величину квантової події та про придатність біноміального закону розподілу для опису експериментальних даних.

2. Квантовий аналіз вивільнення гліцину в синапсах нейронів СГ на клітинах ДР. Гліцинергічні викликані, мініатюрні та спонтанні ГПСС реєстрували в нейронах ДР при підтримуваному потенціалі -60 мВ у присутності блокаторів гутаматергічної (20 мкМ DNQX та 20 мкМ DL-AP5) та ГАМК-ергічної (10 мкМ бікукуліну метіодиду) нейропередачі. Додавання у позаклітинний розчин стрихніну в концентрації 0,5 мкМ призводило до повного та оборотного блокування ГПСС. Значення амплітуд сГПСС флукутували відносно декількох кратних величин, що відповідали пікам розподілів амплітуд даних струмів (рис. 2, Б). Гістограми амплітуд сГПСС апроксимувалися декількома кривими Гауса. Значення першої моди таких розподілів дорівнювало $11,6 \pm 1,43$ пА ($n = 12$) і відповідало значенню середньої амплітуди мГПСС, зареєстрованих в нейронах ДР (рис. 2, А). За результатами аналізу сГПСС та мГПСС ефект вивільнення кванту гліцину дорівнює у середньому 10 пА. Гістограми амплітуд вГПСС апроксимувалися сумою кривих Гаусса (рис. 2, В). Для кожного розподілу були характерні декілька рівновіддалених мод, кількість яких варіювала від 2 до 7 для різних пар нейронів ($n = 10$). Середня відстань між модами складала $10,8 \pm 1,03$ пА і вірогідно не відрізнялася

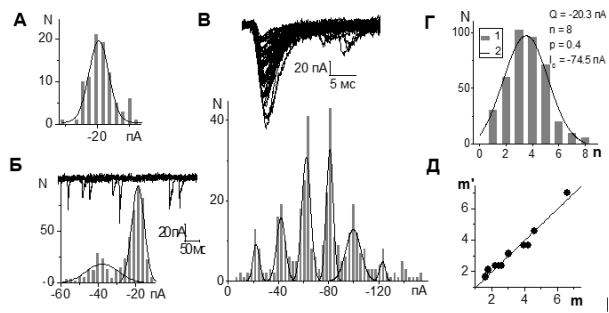


Рис. 1. Квантовий викид глутамату в синапсах нейронів спінальних гангліїв на нейронах дорсального рогу. На А,

Б та В – типові амплітудні розподіли мініатюрних (мЗПСС), спонтанних (сЗПСС) та викликаних (вЗПСС) глутаматергічних постсинаптичних струмів відповідно.

На верхніх фрагментах Б та В – суперпозиції записів сЗПСС та вЗПСС. По вісі абсцис А, Б та В – амплітуда мЗПСС, сЗПСС та вЗПСС, по вісі ординат – число подій (N). Г – розподіл кількості одночасно вивільнених квантів n , побудований на основі гістограми В: 1 – експериментальні дані; 2 – апроксимація розподілу 1 біноміальною функцією. Д – графік лінійної регресії величин m та m' : m – середній квантовий вміст, розрахований за біноміальним законом (вісь абсцис), m' – середній квантовий вміст, визначений відношенням середньої амплітуди вЗПСС до середньої величини кванта (вісь ординат).

від середньої величини квантової події, розрахованої при аналізі сГПСС та мГПСС. Аналогічно викиду глутамату ймовірність вивільнення гліцину в синапсах нейронів СГ підпорядковувалася біноміальній статистиці. Про це свідчить кореляція ($r = 0,98$) між кількостями квантових подій, що опосередковують вГПСС, та такими, визначеними за біноміальним законом (рис. 2, Г). За кількість реалізацій одного кванту гліцину приймали число подій у діапазоні $6 \dots 16$ пА амплітудних гістограм, двох – у діапазоні $16 \dots 26$ пА і т.д. Про адекватність використання біноміальної статистики свідчить висока кореляція ($r = 0,97$) величин квантового вмісту m , розрахованих за біноміальним законом та прямим методом (рис. 2, Д).

3. Обговорення

В даній роботі охарактеризована квантова природа вивільнення нейротрансмітерів глутамату та гліцину в синапсах нейронів СГ на нейронах ДР в кокультурі. Результати дослідження доводять, що амплітуди глутамат- та гліцинергічних вГПСС опосередковані кількістю одночасно вивільнених квантів медіатора з активних зон синапсів, залучених до збудження. Відомо, що в умовах *in vivo* та при сумісному культивуванні поодинокі первинні аферентні нейрони формують значну кількість синаптичних контактів (45 – 55) на окремих постсинаптичних нейронах спинного мозку. За нормальних умов, імпульсація пресинаптичного нейрону СГ забезпечує великі значення квантового вмісту при передачі збуджувальних сигналів. Очевидно, що невеликі значеннями квантового вмісту (2 – 7 для глутаматергічних та 2 – 10 для гліцинергічних синапсів) в наших експе-

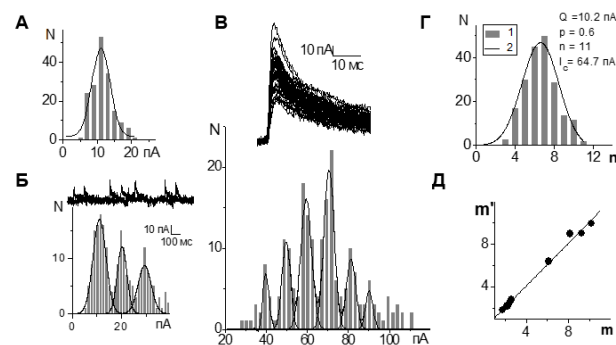


Рис. 2. Квантовий викид гліцину в синапсах нейронів спінальних гангліїв на нейронах дорсального рогу. На А,

Б та В – типові амплітудні розподіли мініатюрних (мЗПСС), спонтанних (сЗПСС) та викликаних (вЗПСС) струмів відповідно. На верхніх фрагментах Б та В – суперпозиції записів сЗПСС та вЗПСС. По вісі абсцис А, Б та В – амплітуда відповідей, по вісі ординат – число подій (N). Г – розподіл кількості квантів n , побудований на основі розподілу В: 1 – експериментальні дані; 2 – апроксимація розподілу біноміальною функцією. Д – графік лінійної регресії величин m та m' : m – середній квантовий вміст за біноміальним законом (вісь абсцис), m' – середній квантовий вміст, визначений відношенням середньої амплітуди вЗПСС до середньої величини кванта (вісь ординат).

риментах вказують на наявність невеликої кількості синапсів від поодиноких нейронів СГ на нейронах ДР у кокультури низької щільності.

За даними електронно-мікроскопічних досліджень бутони первинних аферентів на нейронах спинного мозку *in vivo* є гетерогенними за кількістю зон вивільнення нейромедіатора і містять від 1 до 4 активних зон. Виходячи з вищезазначеного, полімодальність амплітудних розподілів вЗПСС та вГПСС очевидно відображує квантове вивільнення у декількох первинних аферентних синапсах з кількома зонами вивільнення, що характеризує такий викид як багатоквантовий.

Біноміальна статистика широко використовується для опису квантового вивільнення в синапсах нейронів у різних структурах мозку за умови відносно високої ймовірності вивільнення медіатора [6]. За нашими даними проста біноміальна модель задовільно описує властивості вивільнення глутамату та гліцину в синапсах поодиноких первинних аферентних нейронів на нейронах ДР в умовах кокультури і може бути адекватно використана для визначення ймовірності викиду квантів в даних синапсах. Придатність біноміальної моделі була також визнана в ряді попередніх досліджень *in vivo* при статистичному описі квантового вивільнення глутамату в синапсах поодинокого первинного аферентного волокна на мотонейронах спинного мозку.

В умовах *in vivo* при нейропередачі від нейронів СГ нейронам ДР відбувається синхронне вивільнення нейротрансмітера в багатьох синапсах первинного аферентного нейрона при проходженні ПД по його волокну. Інтегральні відповіді в такому випадку характеризуються великими значеннями квантового вмісту, але квантова природа процесу при цьому

виявляється менш очевидною. На фізіологічному рівні активація значної кількості терміналей мінімізує вплив флуктуацій відповідей у окремих з них на величину інтегральної відповіді, збільшуючи тим самим надійність передачі соматосенсорного сигналу. Дослідження в нашій моделі з невеликою кількістю синапсів, а, отже, з невеликим значенням квантового вмісту, дозволяє адекватно вивчати квантову природу викиду нейромедіаторів в первинних аферентних синапсах.

Перелік використаних джерел

1. "Multiquantal release underlies the distribution of synaptic efficacies in the neocortex," / A. Loebel, G. Silberberg, D. Helbig — M. : Front Comput. Neurosci., 27, No. 3, 1-13 2009. — 1-13 с.
2. Castillo J., Katz B. "Quantal components of the end-plate potential," J. Physiol., 124, No 3 — 1954. — 560-573 с.
3. Fedulova N. S., Veselovsky N.S. "Quantal GABA release in hippocampal synapses: role of local Ca²⁺ dynamics within the single terminals," — K. : Neuroscience, 56, No. 2, 275-304, (1993). — 163-171 с.
4. H. Korn and D. S. Faber, "Quantal analysis and synaptic efficacy in the CNS," — K. : Trends Neurosci., 14, No. 10, 439-445, 1991. — 439-445 с.
5. Voronin L. L. "On the quantal analysis of hippocampal long-term potentiation and related phenomena of synaptic plasticity," Neuroscience, 56, No. 2 — 1993. — 275-304 с.
6. Redman S. "Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system,". — 1990. — T. 70, № 1. — с. 165-198.