

АНАЛІЗ КВАНТОВИХ ТА КІНЕТИЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК СПОНТАННИХ ЗБУДЖУВАЛЬНИХ СТРУМІВ В НЕЙРОНАХ SUPERFICIAL SUPERIOR COLLICULUS IN VITRO

Д. І. Зусько^{1, a}, Г. В. Думанська², М. С. Веселовський²

¹Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»,
Фізико-технічний інститут

²Інститут фізіології імені О. О. Богомольця Національної Академії Наук України

Анотація

Ми дослідили квантові та кінетичні характеристики збуджувальних спонтанних постсинаптичних струмів нейронів superficial superior colliculus (SSC) in vitro за різної зовнішньоклітинної концентрації кальцію: $[Ca^{2+}]_{\text{зовн}} = 2$ ммоль, 1 ммоль та 0,5 ммоль. Кількісний аналіз частотних характеристик струмів показав, що вивільнення нейромедіатора глутамату – кальційзалежний процес. Зареєстровані струми поділялися на три групи за часом наростання, дві з яких спостерігались за будь-якої концентрації $[Ca^{2+}]_{\text{зовн}} = 2$. Третя група високоамплітудних струмів присутня лише за максимальної концентрації іонів, що свідчить про залежність амплітуди від зовнішньоклітинної концентрації кальцію. З унімодалних гістограм розподілу амплітуд ми визначили величину кванту – постсинаптичну відповідь на вивільнення одного кванту глутамату ($-10,3 \pm 2,5$ пА) в синапсах між гангліозними клітинами сітківки та нейронами SSC. Отримані данні виявили наявність диференційованих груп струмів, що відображає різну стадію формування даних синапсів з відмінною рецепторною композицією.

Ключові слова: кокультура, superficial superior colliculus, спонтанні постсинаптичні струми, квантові характеристики

Вступ

Superior colliculus – один із підкоркових зорових центрів, являється важливим елементом механізму обробки зорової інформації. Його верхні шари – superficial superior colliculus (SSC), отримують прямі входи від гангліозних клітин сітківки (ГКС). Синапси між ГКС та нейронами SSC є першими контактами на шляху передачі зорового сигналу від сітківки у вищі відділи центральної нервової системи (ЦНС). Тому вивчення даних синапсів є необхідним для розуміння процесів передачі та обробки зорової інформації.

Основним збуджувальним нейромедіатором ЦНС є глутамат. Саме за рахунок вивільнення глутамату пресинапсами ГКС та активацією постсинаптичних НМДА- та АМПА-рецепторів на нейроні SSC опосередковується швидка передача зорового сигналу в даних проєкціях.

Спонтанні постсинаптичні струми (сПСС) відображають активність всіх аферентних входів даної клітини. Аналіз флуктуацій амплітуд сПСС та їх кінетичних характеристик дозволяє оцінити характеристики квантового вивільнення нейромедіатора в синапсах.

В нашій роботі ми сфокусувалися на аналізі характеристик збуджувальних сПСС для оцінки особливостей вивільнення глутамату та активації постси-

наптичних НМДА- та АМПА-рецепторів в синапсах кокультивованих ГКС та нейронів SSC.

Методика

Дані були отримані у ході електрофізіологічних експериментів на кокультурі клітин сітківки та нейронів SSC. Детальний опис усіх методик було представлено раніше [1]. СПСС реєстрували методом «patch-clamp» у конфігурації «ціла клітина» в режимі фіксації напруги за різних концентрацій зовнішньоклітинного кальцію: $[Ca^{2+}]_{\text{зовн}} = 2$ ммоль – перший інтервал; 1 ммоль – другий інтервал; 0,5 ммоль – третій інтервал.

Файл реєстрації активності клітини оброблявся за допомогою програмного пакету Clampfit 9.0 («Axon Instruments», США). Дане ПО дозволяє в автоматичному режимі («Threshold search») відбирати події з амплітудами, вищими встановленого порогового значення, а також обчислювати значення амплітуд та часу наростання сПСС. Час наростання розраховувався в інтервалі від 10% до 90% наростаючої частини струму.

Величина кванту (A_{min}) – постсинаптична відповідь на вивільнення одного кванту, розраховувалась як середньостатистичне з унімодалних гістограм розподілу амплітуд струмів.

Для побудови графіків та гістограм використовували програмний пакет Origin 8.5 Pro («OriginLab Corporation», США). Для перевірки незалежності оброблюваних інтервалів використовували тест

^aelxf123@gmail.com

Колмогорова-Смірнова, а для перевірки адекватності розподіленню струмів на групи використовувався парний тест Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Ми аналізували спонтанну активність нейронів SSC за різних концентрацій зовнішньоклітинного кальцію.

Аналіз ймовірності виникнення сПСС. Проаналізувавши інтервали між кожними двома послідовними сПСС за різної зовнішньоклітинної концентрації кальцію, ми побудували графік кумулятивної ймовірності (рис. 1).

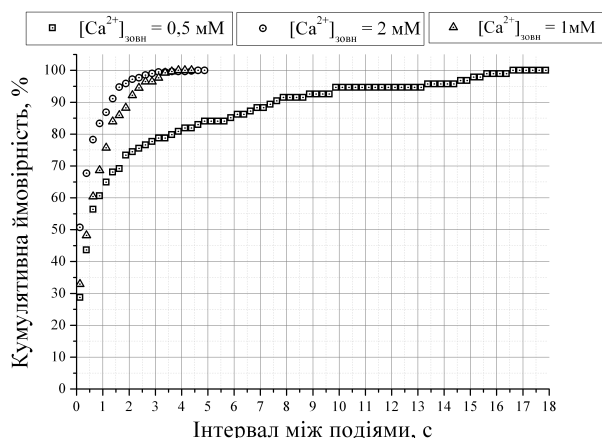


Рис. 1. Графік кумулятивних ймовірностей інтервалів між спонтанними постсинаптичними струмами за зовнішньоклітинної концентрації кальцію 2 ммоль, 1 ммоль, 0,5 ммоль.

Як видно з графіку, збільшення зовнішньоклітинної концентрації кальцію призводить до збільшення ймовірності виникнення події, тобто зменшення інтервалу між двома послідовними подіями. Дані результати підтверджують кальційзалежність вивільнення глутамату.

Аналіз кінетичних характеристик сПСС. Ми побудували загальні гістограми розподілу амплітуд сПСС (рис. 2,А; рис. 3,А; рис. 4,А), які виявилися полімодальними, без чітких рівновіддалених піків та не описувалися кривими Гаусса. Це підтверджує наше припущення про неоднорідність вибірки сПСС та необхідність розділення їх на певні групи. Було вирішено поділити струми на групи за їх кінетикою, а саме – часом наростання, для чого використали гістограми розподілу часу наростання (рис. 2,В; рис. 3,В; рис. 4,В).

Рецепторний склад синапсів представлений двома групами рецепторів: АМПА – «швидкі» рецептори із малим часом наростання струму, та НМДА – «повільні» рецептори. Очевидно, що кінетика наростання струму події буде залежати від співвідношення рецепторів, що приймали участь в генерації сПСС.

Взявши за основу інтервал з найбільшою кількістю зареєстрованих сПСС (розчин з $[Ca^{2+}] = 2$ ммоль), ми побудували гістограму розподілу за часом наростання струму (рис. 2,В). Отримана гістограма

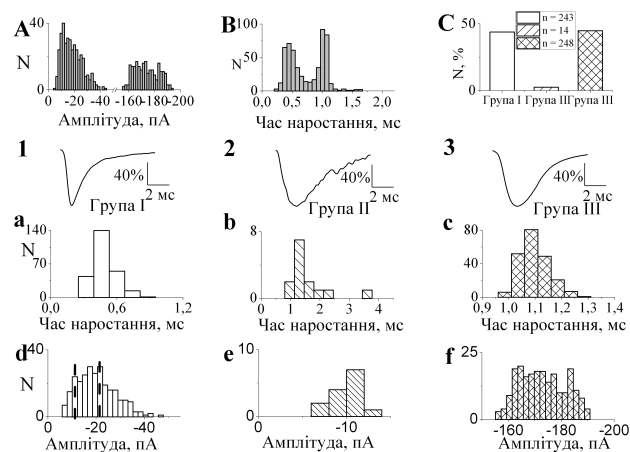


Рис. 2. Розподіл амплітудних та кінетичних характеристик збуджувальних спонтанних постсинаптичних струмів (сПСС) при зовнішньоклітинній концентрації кальцію $[Ca^{2+}]_{зовн} = 2$ ммоль. А – загальна гістограма розподілу амплітуд сПСС; В – загальна гістограма розподілу часу наростання сПСС; С – відсотковий склад сПСС групи I, групи II та групи III в зареєстрованій вибірці; 1,2,3 – усереднені записи сПСС гр. I, гр. II та гр. III, відповідно; а,б,с – гістограми розподілу часу наростання сПСС гр. I, гр. II та гр. III, відповідно; d,e,f – гістограми розподілу амплітуд сПСС гр. I, гр. II та гр. III відповідно.

мала два піки, тому природньо було розділити струми на дві групи за часом наростання. Однак, окрім швидких та повільних струмів, даний інтервал містив також високоамплітудні струми, час наростання яких частково перекривав гаусіану другої групи. При усередненні струмів кожної з груп, за рахунок наявності в них високоамплітудних струмів, дві групи різної кінетики вироджувались в одну. Тому, аби уникнути спотворення, високоамплітудні струми було виділено в окрему групу, присутню лише в розчині з найбільшою концентрацією кальцію (рис.2,1; рис.2,2; рис.2,3).

Гістограми розподілу часу наростання для струмів групи I, групи II та групи III представлені на рис. 2,а; рис. 2,б; рис. 2,с відповідно. Їх відсотковий внесок до загальної кількості зареєстрованих сПСС показано на рис. 2,С. Час наростання швидкої групи (група I) становив $t = 0,5 \pm 0,1$ мс. Всього було відібрано 243 (44% від загальної кількості) таких струмів. Повільна група (група II) складалась із 14 струмів (3%), час наростання яких становив $t = 1,6 \pm 0,7$ мс. До високоамплітудної групи (група III), наявної лише в інтервалі з $[Ca^{2+}]_{зовн} = 2$ ммоль, увійшло 248 струмів (45%) із $t = 1,1 \pm 0,1$ мс.

В інтервалі з $[Ca^{2+}]_{зовн} = 1$ ммоль були наявні струми першої та другої групи (рис. 3,1; 3,2); струмів третьої групи не було. Побудувавши гістограми розподілу за часом наростання для кожної з груп (рис. 3,а; 3,б), ми отримали час наростання $t = 0,5 \pm 0,1$ мс для швидкої групи, та $t = 1,0 \pm 0,3$ мс для повільної. Кількість повільних струмів, відібраних вручну, становила $< 10\%$ (рис. 3,С), що достовірно корелює із попередньо описаним інтервалом.

Для інтервалу з $[Ca^{2+}]_{зовн} = 0,5$ ммоль вдалось порахувати час наростання всього для 54-х струмів, половина з яких – повільні (рис. 4,С). Тим не менше, загальний вигляд усередненого струму (рис. 4,1; 4,2), а також гістограми розподілу (рис. 4,а; 4,б) для кожної з груп добре співпадає з такими ж групами для попередніх інтервалів. Обчислений час наростання становив: для швидкої групи $t = 0,6 \pm 0,1$ мс, для повільної $t = 1,8 \pm 0,6$ мс. Струми третьої групи не спостерігались.

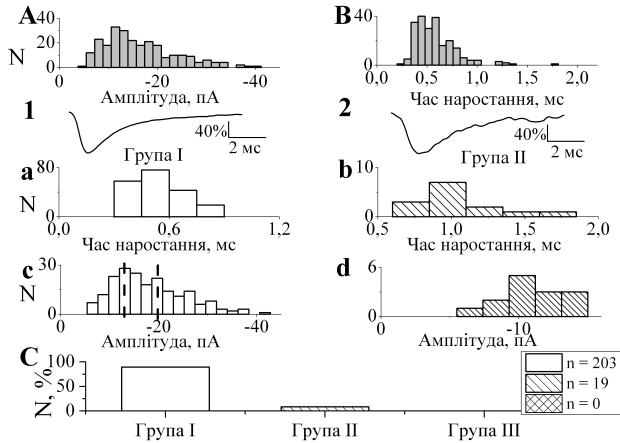


Рис. 3. Розподіл амплітудних та кінетичних характеристик збуджувальних спонтанних постсинаптичних струмів (сПСС) при зовнішньоклітинній концентрації кальцію $[Ca^{2+}]_{зовн} = 1$ ммоль. А – загальна гістограма розподілу амплітуд сПСС; В – загальна гістограма розподілу часу наростання сПСС; С – відсотковий склад сПСС групи I, групи II та групи III в зареєстрованій вибірці; 1,2,3 – усереднені записи сПСС гр. I, гр. II та гр. III, відповідно; а,б,с – гістограми розподілу часу наростання сПСС гр. I, гр. II та гр. III, відповідно; d,e,f – гістограми розподілу амплітуд сПСС гр. I, гр. II та гр. III відповідно.

Аналіз квантових характеристик. Поділивши сПСС на групи за часом наростання, ми також побудували гістограми розподілу амплітуд окремо для кожної групи, аби впевнитись, що квантування амплітуд не є наслідком накладання різних струмів, а притаманне кожній із груп.

Для інтервалу з $[Ca^{2+}]_{зовн} = 2$ ммоль гістограма розподілу амплітуд швидких струмів (рис. 2,д) була полімодальною, із піками на ~ -10 пА та -20 пА. Розподіл амплітуд повільних струмів (рис. 2,е) – унімодальний з $A_{min} = -10,0 \pm 1,7$ пА. Нажаль, добитись чіткого розподілу для високоамплітудних струмів не вдалось (рис. 2,ф).

При зовнішньоклітинній концентрації кальцію $[Ca^{2+}]_{зовн} = 1$ ммоль та $[Ca^{2+}]_{зовн} = 0,5$ ммоль гістограми розподілу амплітуд швидких сПСС (рис. 3,с; 4,с) були бімодальними з піками на ~ -13 пА та -20 пА; ~ -15 пА та -30 пА, відповідно. Із унімодальних гістограм розподілу повільних струмів (рис. 3,д; 4,д) ми отримали $A_{min} = -11,0 \pm 2,1$ пА при $[Ca^{2+}]_{зовн} = 1$ ммоль та $A_{min} = -9,9 \pm 2,5$ пА при $[Ca^{2+}]_{зовн} = 0,5$ ммоль.

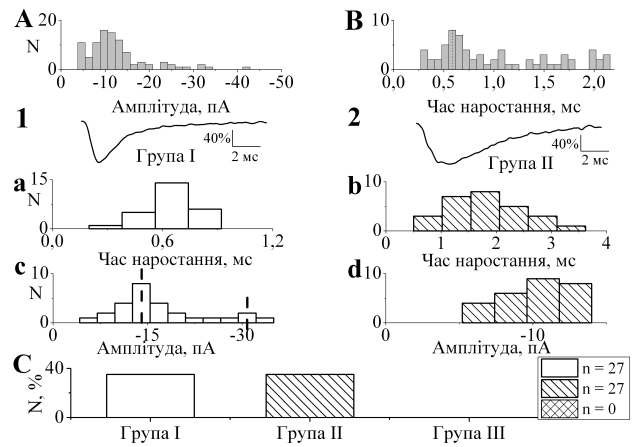


Рис. 4. Розподіл амплітудних та кінетичних характеристик збуджувальних спонтанних постсинаптичних струмів (сПСС) при зовнішньоклітинній концентрації кальцію $[Ca^{2+}]_{зовн} = 0,5$ ммоль. А – загальна гістограма розподілу амплітуд сПСС; В – загальна гістограма розподілу часу наростання сПСС; С – відсотковий склад сПСС групи I, групи II та групи III в зареєстрованій вибірці; 1,2,3 – усереднені записи сПСС гр. I, гр. II та гр. III, відповідно; а,б,с – гістограми розподілу часу наростання сПСС гр. I, гр. II та гр. III, відповідно; d,e,f – гістограми розподілу амплітуд сПСС гр. I, гр. II та гр. III відповідно.

Згідно із квантовою теорією, кількість нейромедіатора, що вивільняється із пресинаптичної терміналі, є величина дискретна. Таким чином, пік унімодальної гістограми розподілу амплітуд буде не що інше, як величина мінімального кванту глутамату. Тому ми можемо оцінити величину кванту досліджуваного нейрону: $A_{min} = -10,3 \pm 2,5$ пА. Крім того, зі збільшенням зовнішньоклітинної концентрації кальцію збільшується кількість піків гістограм. Це вказує на те, що амплітуда сПСС є функцією від зовнішньоклітинної концентрації кальцію.

Наявність різних груп сПСС означає, що синапси нейрона мають різну композицію АМПА- та НМДА-рецепторів. Було показано [2], що в ході синаптогенезу відбувається перерозподіл ролі АМПА- та НМДА-струмів: на ранніх стадіях онтогенезу формуються НМДА-рецептори, а на стадії завершеного формування синаптичних зв'язків основний внесок в передачу зорової інформації вносять саме АМПА-рецептори. Тому наявність як швидких, так і повільних груп струмів пояснюється різними стадіями формування синапсів, що в свою чергу є причиною для різної рецепторної композиції останніх.

Перелік використаних джерел

1. H. Dumanska, N. Veselovsky Short-term hypoxia induces bidirectional pathological long-term plasticity of neurotransmission in visual retinocollicular pathway // *Experimental Eye Research*. – 2019. – № 179. – С. 25–31.
2. B. Schalagar, K. Fox and D. O'Leary Postsynaptic control of plasticity in developing somatosensory cortex // *Nature*. – 1995. – № 369. – С. 482–485.