

ЗМІНА ДИНАМІКИ $[Ca^{2+}]$ ПІД ЧАС ВИСОКОЧАСТОТНОЇ СИМУЛЯЦІЇ ГІПОКАМПУ

К. С. Сьоміна^{1, a}, С. В. Войтенко²

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

²Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України

Анотація

Було проведено дослідження зміни динаміки кальцієвого сигналу, що виникає при зв'язуванні кальцію з барвником indo-1, у нейронах гіпокампу у відповідь на високочастотну стимуляцію. Було проаналізовано 12 записів кальцієвої відповіді на високочастотну стимуляцію. Під час стимуляції клітин гіпокампу виникала стаціонарна кальцієва відповідь, що продовжувалась після закінчення стимуляції. Розроблено алгоритм, що дозволяє визначити наявність стаціонарної кальцієвої відповіді у сигналі. Проведений аналіз показав наявність двоекспоненційного розподілу у спаді кальцієвого сигналу після виникнення стаціонарної відповіді на стимуляцію. Було встановлено, що роль у виникненні кальцієвого плато у сигналі переважно належить внутрішньоклітинним буферам.

Ключові слова: кальцієве плато, алгоритм, внутрішньоклітинні буфери

Вступ

Нейрони гіпокампу приймають участь у обробці просторової інформації та перенесенню даних з короткотривалої пам'яті у довготривалу [1]. Зміна форми кальцієвого сигналу у цих нейронах становить вагомий інтерес з боку наукової спільноти.

Іони кальцію беруть участь у великій кількості регуляторних процесів нейрональних клітини, виконуючи роль вторинного посередника. Динаміка рівню кальцію використовується для внутрішньоклітинної сигналізації, тому нейрональна клітина оснащена рядом регуляторних механізмів, що сприяють підвищенню або зниженню внутрішньоклітинної концентрації кальцію.

Одним із таких механізмів є внутрішньоклітинні буфери, що поглинають надлишковий рівень кальцію та вивільняють через внутрішньоклітинні канали у цитозоль під дією стимуляції [2, 3]. Цитотоксичність, яка виникає під час збільшення концентрації кальцію [4], виконує важливу функцію, яка остаточно не з'ясована. Буферизація клітинного кальцію та виведення його із клітини є основними механізмами захисту клітини від цитотоксичної дії кальцію.

Подразнення клітини високочастотною стимуляцією призводить до відкриття потенціал-керованих кальцієвих каналів, що призводить до експоненційного підвищення рівню кальцію у цитозолі. Зміна динаміки кальцієвої концентрації має визначальну роль у патофізіології захворювань пов'язаних з дисфункцією гіпокампу [5, 6].

Використання програмних методів дослідження дає змогу отримати детальний математичний аналіз отриманих даних кальцієвої відповіді на стимуляцію

та дослідити зв'язок з фармакокінетичними особливостями. Метою цього дослідження було проаналізувати динаміку стаціонарної кальцієвої відповіді на високочастотне збудження та її залежність від кінетики пов'язування кальцію з внутрішньоклітинними буферами.

1. Методика

Культивування нейронів гіпокампу. Культивування нейронів гіпокампу відбувалося за описаною раніше методикою [7] Отримані з новороджених щурів лінії Вістар нейрони гіпокампу обробляли розчином 0,025% трипсину впродовж 10 хвилин при 34°C. Після механічної дезагрегації клітини висівали пастерівськими піпетками на покриті L-ламіном чашки Петрі. Культивация клітин відбувалась у розчині зі складом мінімального середовища ігла (MEM), 2,3 г/л $NaHCO_3$ 10%-ї кінської сироватки, 6 мг/мл інсуліну. Для припинення поліферації гліальних клітин на третю добу культивування додавали 1 мкмоль/л Ага-С на 24 години.

Електрофізіологія. Дослідження проводилось за допомогою техніки «path-clamp» у конфігурації «ціла клітина». Хімічний склад розчину ззовні клітини: $NaCl$ – 140, KCl – 3, $CaCl_2$ – 2, $MgCl_2$ – 2, $HEPES$ – 10, глюкоза – 12. Склад внутрішньоклітинного розчину: K -глюконат – 100, KCl – 40, $MgCl_2$ – 5, $HEPES$ – 20, EGTA – 0,15, Na -АТФ – 3, Na -АДФ – 0,5, Na -ГТФ – 0,5, Indo-1 (барвник чутливий до кальцію) – 0,1. Потенціал на мембрані підтримували у межах –70 мВ. Стимуляція нейронів відбувалась деполяризувальними струмами амплітудою 80 мВ та тривалістю 3 мс з частотою 50 Гц упродовж 5 – 25 с. Інтервал між серіями був щонайменше 4 хв для відновлення

^aaquelta.group@gmail.com

внутрішньоклітинного рівню кальцію у стані спокою. Зміна концентрації кальцію всередині клітини реєструвалась за допомогою спектрофлуориметричної установки. Збудження флуорисценції indo-1 відбувалось на довжині хвилі 360 нм, випромінювання флуорисценції від пов'язаних з indo-1 іонів кальцію реєструвалось при довжинах 408 та 480 нм двома фотоелектронними помножувачами. Відношення інтенсивностей випромінювання (R) перераховували за формулою:

$$[Ca]_i = K_d \cdot \beta \cdot \left(\frac{R - R_{\min}}{R_{\max} - R} \right)$$

Аналіз даних. Результати були проаналізовані за допомогою мови програмування Python пакетами Scipy [8], Numpy [9], Matplotlib [10] та Pandas [11]. Аналіз проводився згідно з однокомпартментною моделлю [12]. Отриманий сигнал був поділений на три набори даних, що відповідають кальцієвому сигналу до початку стимуляції, під час стимуляції та після її закінчення. Апроксимація наростання сигналу проводилась залежністю (1) на наборі даних, що відповідає кальцієвому сигналу під час стимуляції.

$$f(t) = -A \exp[-\tau t] - C_1 \quad (1)$$

Різниця $C_1 - A$ відповідає рівню плато P , біля якого коливається стаціонарний кальцієвий сигнал. Апроксимація спаду сигналу обраховувалась рівнянням (2) на наборі даних, що відповідає ділянці після закінчення стимуляції.

$$f(t) = -P \exp[-\tau t] \cdot \exp[\tau \mu] - C_2 \quad (2)$$

Де μ – момент часу, коли відбувається перегин апроксимуючої кривої, перехід від $\exp \tau \cdot \mu$ до $\exp -\tau \cdot t$, C_2 – рівень кальцію на кінець стимуляції. У випадку, коли стаціонарна відповідь відсутня апроксимуюча залежність має вигляд (3)

$$f(t) = -P \exp[-\tau t] - C_2 \quad (3)$$

Обрахунок коефіцієнтів P, τ, μ, C_2 проводився методом найменших квадратів за допомогою `scipy.optimize.curve_fit` з максимальним числом спроб зміни моделі `maxfev = 350`. У випадку коли плато відсутнє, програма не знайде апроксимації (2) та перейде до виразу (3). Перевірка наявності плато під час стимуляції може бути виконана підстановкою часу закінчення стимуляції у вираз (1) та порівнянням зі значенням P . Якщо стаціонарна відповідь виникає під час стимуляції та продовжується після її коефіцієнти P у виразах (1) та (2) будуть співпадати з невеликою похибкою.

2. Результати та їх обговорення

Вплив високочастотної стимуляції на концентрацію кальцію було досліджено на 12 записах кальцієвої відповіді однієї клітини. Після утворення конфігурації «ціла клітина», у внутрішньоклітинний розчин завантажувалась кальційчутливий барвник Indo-1 (0,1 ммоль/л) протягом 5 – 10 хв, після чого інтенсивність флуорисцентного випромінювання барвником відповідала концентрації кальцію, досягаючи стаціонарного рівня. Імітація виникнення потенціалу

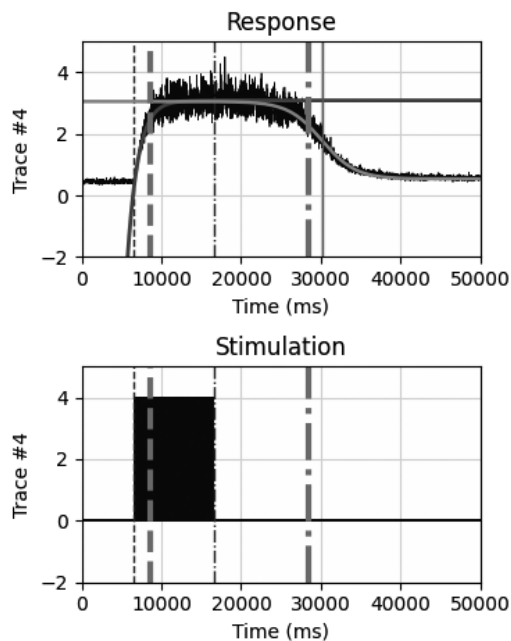


Рис. 1. Кальцієва відповідь на високочастотну стимуляцію з частотою 50 Гц. Приклад обробки кальцієвого сигналу, що містить плато, за допомогою Python: отримані апроксимуючі залежності

дії відбувалась за рахунок короточасного неполяризувального струму амплітудою 80 мВ тривалістю 3 мс з частотою 50 Гц при потенціалі спокою -70 мВ. Під дією високочастотної стимуляції відбувалась зміна характеру динаміки кальцієвого сигналу, який демонстрував стаціонарну кальцієву відповідь. З 12 проаналізованих записів, 3 кальцієві відповіді не містили «плато», стаціонарного кальцієвого сигналу. Результати аналізу розташовані у табл. 1. Похибка отриманих коефіцієнтів не обраховувалась, оскільки апроксимуючі залежності співпадають з кальцієвим сигналом (рис. 1).

Отриманий апроксимацією рівень плато P на спаді кальцієвого сигналу для клітин, де була присутня стаціонарна кальцієва відповідь, дорівнює обрахованому методом найменших квадратів рівню кальцієвого плато при зростанні кальцієвого сигналу з похибкою $\pm 0,1$. Для клітин, у яких кальцієве плато було відсутнє коефіцієнт μ , що відповідає часу перегину апроксимуючої залежності спаду кальцієвої відповіді, був менший за час закінчення стимуляції на запису T_{end} або відрізнявся не більше, ніж на 7 с. Для одного з записів не вдалось обрахувати коефіцієнти проксимації (1), оскільки зріст кальцію відбувався за короткий проміжок часу і мав лінійну залежність, що пов'язано з короткою тривалістю високочастотної стимуляції. Для одного з записів алгоритм пошуку апроксимації не зміг за зазначену кількість спроб зміни моделі визначити коефіцієнти біекспоненційної апроксимуючої залежності, тому в якості апроксимуючої залежності був обраний вираз (3). Виявилось, що даний запис не містив стаціонарної відповіді на стимуляцію і одразу після її закінчення кальцієвий сигнал спадав (рис. 2).

Табл. 1. Значення коефіцієнтів апроксимації спаду dec. та наростання inc., довжини стимуляції T та часу закінчення стимуляції T_{end}

T , мс	T_{end} , мс	$P_{inc.}$	$\tau_{inc.}$	$P_{dec.}$	$\tau_{dec.}$	$\mu_{dec.}$, мс
9983	16545	3,1	$7,47 \cdot 10^{-4}$	3,1	$4,72 \cdot 10^{-4}$	30122
4983	11545	2,8	$8,68 \cdot 10^{-4}$	2,9	$4,26 \cdot 10^{-4}$	23091
1983	8545	3,9	$4,42 \cdot 10^{-4}$	17,86	$2,39 \cdot 10^{-4}$	
9983	16545	2,7	$6,95 \cdot 10^{-4}$	2,8	$2,55 \cdot 10^{-4}$	32880
14983	21545	2,6	$6,34 \cdot 10^{-4}$	2,7	$2,32 \cdot 10^{-4}$	43825
19983	26545	2,6	$5,58 \cdot 10^{-4}$	2,7	$2,13 \cdot 10^{-4}$	52207
24983	31545	2,6	$4,69 \cdot 10^{-4}$	2,7	$1,98 \cdot 10^{-4}$	59273
9983	16545	2,6	$4,56 \cdot 10^{-4}$	2,7	$1,83 \cdot 10^{-4}$	34738
2983	9545			6,9	$1,25 \cdot 10^{-4}$	659
4983	11545	2,7	$3,71 \cdot 10^{-4}$	3,0	$1,48 \cdot 10^{-4}$	18632
6983	13545	2,5	$4,47 \cdot 10^{-4}$	2,7	$1,51 \cdot 10^{-4}$	27727
9983	16545	2,4	$3,59 \cdot 10^{-4}$	2,4	$1,40 \cdot 10^{-4}$	38608

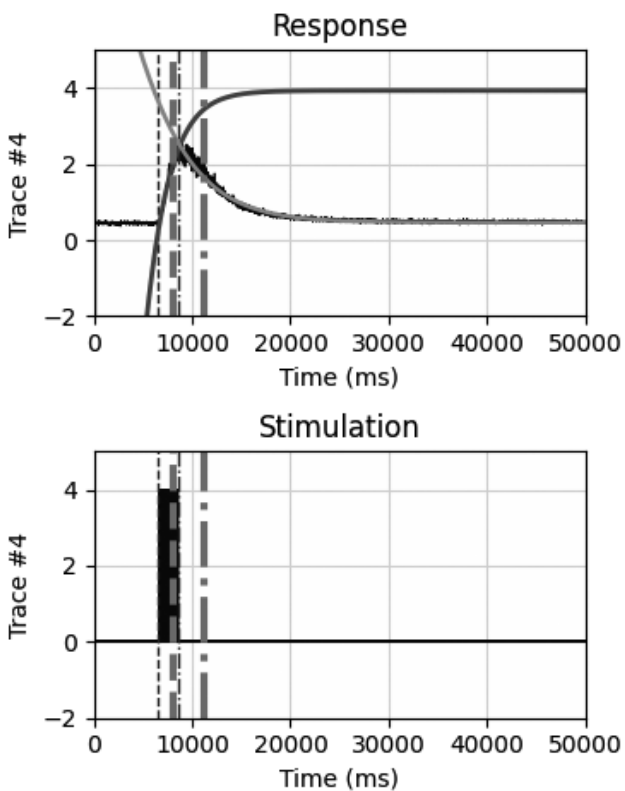


Рис. 2. Кальцієва відповідь на високочастотну стимуляцію з частотою 50 Гц. Приклад обробки кальцієвого сигналу, що не має стаціонарної відповіді: апроксимуюча залежність спаду містить одну експоненту

Затримка спаду кальцієвого сигналу виникала у клітин час стимуляції яких перевищував 5 с.

Наявність двоекспоненційного розподілу свідчить про присутність ще одного кальцієвого буфера, що доповнює систему кінетичних рівнянь однокомпартментної моделі. Біекспоненціальна модель спаду продемонстрована також у [13] на корзинкових ГАМК-ергічних нейронах гіпокампу, де це пояснюється наявністю швидкої та повільної компонент у спаді внутрішньоклітинної концентрації кальцію.

Парвальбумін [14] перетворює однокспоненційний розподіл у двоекспоненційний. Воодночас, було продемонстровано [15] біекспоненційний спад концентрації кальцію на нейронах, що не містить парвальбумін, де факт наявності такого типу розподілу пояснюється наявністю повільного кальцієвого буфера. Затримка спаду кальцієвого сигналу спостерігалась на моделі черепно-мозкової травми, де концентрація кальцію була вищою за стаціонарний рівень протягом 10 хв. Автори пояснюють виникнення ефекту зміною у гомеостазі кальцію у результаті черепно-мозкової травми.

Висновки

Високочастотна стимуляція, що діяла на нейрони гіпокампу, викликала зміну динаміки кальцієвого сигналу. Під час стимуляції виникала стаціонарна кальцієва відповідь, при цьому спад концентрації кальцію на деякий час затримувався. На 9 з 12 проаналізованих записах спостерігався ефект кальцієвого плато. Для високочастотної стимуляції з частотою 50 Гц найменший час стимуляції при якому виникав вище згаданий ефект становив більше 5 с. Було з'ясовано, що рівень кальцієвого плато, обрахований з констант апроксимуючих кривих спаду концентрації кальцію та наростання, у випадку його наявності відрізняється з похибкою $\pm 0,1$. Спад концентрації кальцію апроксимувався біекспоненціальною функцією. Константа, що відповідає за перегин функції, відрізнялась від часу закінчення стимуляції більше ніж на 7 с у випадку затримки спаду кальцієвої концентрації. Було встановлено, що при виникненні кальцієвого плато, кальцієвий сигнал апроксимується двома експонентами. При відсутності стаціонарної кальцієвої відповіді на високочастотну стимуляцію спад сигналу відбувається одразу після закінчення стимуляції і апроксимуюча залежність має вигляд однієї експоненти. Отриманий біекспоненціальний розподіл може пояснюватись наявністю низькоафінного буфера, що затримує спад сигналу, компенсуючи виведений з клітини кальцієвим насосом іони.

Перелік використаних джерел

1. Сума Van Petten. Relationship between hippocampal volume and memory ability in healthy individuals across the lifespan: review and meta-analysis // *Neuropsychologia*. — 2004. — Vol. 42, no. 10. — P. 1394–1413.
2. Simons T.J.B. Calcium and neuronal function // *Neurosurgical Review*. — 1988. — Vol. 11. — P. 119–129.
3. Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores / Pozzan T., R. Rizzuto, P. Volpe, and J. Meldolesi // *Physiological Reviews*. — 1994. — Vol. 74, no. 3. — P. 607–617.
4. Meldrum BS. Cell damage in epilepsy and the role of calcium in cytotoxicity // *Advances in Neurology*. — 1986. — no. 44. — P. 849–855.
5. Traumatic brain injury causes a long-lasting calcium (Ca^{2+})-plateau of elevated intracellular Ca levels and altered Ca^{2+} homeostatic mechanisms in hippocampal neurons surviving brain injury / Sun David A., Deshpande Laxmikant S., Sombati Sompong, Baranova Anya, Wilson Margaret S., Hamm Robert J., and DeLorenzo Robert J. // *European Journal of Neuroscience*. — 2008.
6. Role of the calcium plateau in neuronal injury and behavioral morbidities following organophosphate intoxication / Deshpande Laxmikant S., Blair Robert E., Phillips Kristin F., and DeLorenzo Robert J. // *ANNALS of the New York Academy of Science*. — 2016. — Vol. 1374, no. 1. — P. 176–183.
7. Possibility of multiquantal transmission at single inhibitory synapse in cultured rat hippocampal neurons / Fedulova S.A., Vasilyev D.V., Isaeva E.V., and Romanyuk S.G. and Veselovsky N.S. // *Neuroscience*. — 1999. — no. 92. — P. 1217–1230.
8. SciPy. — Access mode: <https://www.scipy.org/>.
9. NumPy. — Access mode: <https://numpy.org/>.
10. Matplotlib. — Access mode: <https://matplotlib.org/>.
11. Pandas. — Access mode: <https://pandas.pydata.org/>.
12. Depner T.A. Single-Compartment Model // *Prescribing Hemodialysis. Developments in Nephrology*. — 1991. — Vol. 29.
13. Aponte Y., Bischofberger J., Jonas P. Efficient Ca^{2+} buffering in fast-spiking basket cells of rat hippocampus // *The Journal of Physiology*. — 2008. — Vol. 586, no. 8.
14. B. Schwaller. Efficient Ca^{2+} buffering in fast-spiking basket cells of rat hippocampus // *Cold Spring Harb Perspect Biol*. — 2019. — no. 12.
15. Differences in Ca^{2+} buffering properties between excitatory and inhibitory hippocampal neurons from the rat / Lee Suk-Ho, Rosenmund C., Schwaller B., and Neher E. // *The Journal of Physiology*. — 2000. — Vol. 525, no. 2. — P. 405–418.