

ОСОБЛИВОСТІ ДИНАМІКИ КАЛЬЦІЄВОГО СИГНАЛУ, ВИКЛИКАНОГО ДОВГОТРИВАЛОЮ ВИСОКОЧАСТОТНОЮ СТИМУЛЯЦІЄЮ КУЛЬТИВОВАНИХ НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПА

О. С. Лисенко¹, А. О. Москалюк², С. В. Войтенко², С. А. Федулова², М. С. Веселовський²

¹Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

²Інститут Фізіології ім. Богомольця

Анотація

В роботі досліджуються зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) в культивованих нейронах гіпокампа з використанням кальцій-чутливого флуоресцентного барвника Indo-1. Зміни $[Ca^{2+}]_i$ під впливом довготривалої стимуляції (в режимі фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина») було досліджено на 56 нейронах; за характером динаміки кальцієвого сигналу після закінчення стимуляції нейрони були поділені на 2 групи: в першій групі ($n = 24$) $[Ca^{2+}]_i$ знижувалась одразу після припинення стимуляції; у другій групі ($n = 32$) було зареєстровано затримку спаду кальцієвого сигналу після припинення стимуляції; тривалість затримки варіювала від 1 до 27 секунд та залежала від тривалості та частоти стимуляції. Максимальне підвищення $[Ca^{2+}]_i$ достовірно відрізнялось у клітин першої (1820 ± 195 нмоль/л, $n = 24$) та другої (2618 ± 165 нмоль/л, $n = 23$) груп. Лінійна залежність між постійною часу спаду та частотою стимуляції існувала тільки для клітин другої групи. Після виникнення ефекту затримки спаду достовірно змінювалась постійна часу спаду – у всіх випадках вона збільшилась (в середньому на 41 ± 8). Зміна динаміки спаду кальцієвого сигналу та значне підвищення $[Ca^{2+}]_i$ можуть бути зумовлені наявністю низькоафінного буфера та потребують подальшого фармакологічного дослідження.

Ключові слова: кальцієві сигнали, Indo-1, нейрони гіпокампа

Вступ

Впродовж останніх років вивчення властивостей імпульсної активності нейронів кортекса [1], зорового кортекса [13], гіпокампа [10, 11], спінальних гангліїв [5] привертає значний науковий інтерес. Багатьма авторами було проведено електрофізіологічну класифікацію нейронів в залежності від їхньої відповіді на тривалу ($0.5 - 1$ с) ін'єкцію деполяризуючого струму [7, 8, 10, 13]. При цьому значну увагу приділяють нейронам, для яких характерна високочастотна генерація потенціалів дії (ПД) у відповідь на тривалу ($0.5 - 1$ с) ін'єкцію деполяризуючого струму, тобто частота ПД перевищує 50 Гц [2, 4, 14]. Оскільки серія ПД викликає значне підвищення концентрації Ca^{2+} в клітині, то кінетика його подальшого зв'язування внутрішньоклітинними буферами та динаміка виведення із клітини представляють собою безумовний фундаментальний інтерес та практичне значення, бо саме іони Ca^{2+} є основними вторинними посередниками, що регулюють значну кількість внутрішньоклітинних процесів. Тому метою даного дослідження було вивчення зміни кінетики кальцієвого сигналу при довготривалій стимуляції нейронів гіпокампа.

1. Методика

Культивування нейронів гіпокампа. Методика культивування нейронів гіпокампа не відрізнялась від описаної раніше [6]. Після декапітації новонароджених щурів лінії Вістар, гіпокамп виділявся та оброблявся 0,025% розчином трипсину 10 хвилин

при температурі 34°C. Після механічної дисоціації за допомогою Пастерівських піпеток клітини висівалися на покриті полі-L-орнітином/ламініном чашки Петрі. Клітини культивувалися у середовищі, що складалося із середовища MEM, 10% кінської сироватки, 2,3 г/л $NaHCO_3$, 6 мг/мл інсуліну, пеніциліну та стрептоміцину. На третій день культивування 1 М Ага-С додавався на 24 години до культурального середовища для припинення проліферації гліальних клітин. Експерименти проводилися на 14 – 28 дні культивування.

Електрофізіологія. В експериментах використовувалися наступні розчини, (ммоль/л) – зовнішньоклітинний: $NaCl$ 140, KCl 3, $CaCl_2$ 2, $MgCl_2$ 2, NaH_2PO_4 10, глюкоза 12; внутрішньоклітинний: K -глюконат 100, KCl – 40, $MgCl_2$ 5, $HEPES$ 20, $EGTA$ 0,15, Na -АТФ 3, Na -АДФ 0,5, Na -ГТФ 0,5, кальцій-чутливий барвник Indo-1 (пентакалієва сіль) 0,1.

Реєстрацію проводили в режимі фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина», на мембрані підтримували потенціал -70 мВ. Нейрони стимулювали деполяризуючими імпульсами амплітудою 80 мВ, тривалістю 3 мс, частотою 30 – 125 Гц протягом 2 – 30 секунд. Інтервали між серіями стимулів становили не менше 4 хвилин, чого було достатньо для відновлення базової внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію.

Зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію реєстрували за допомогою спектрофотометричної установки («Carin Research Ltd», Великобританія).

Збудження флуоресценції барвника відбувалось на довжині хвилі 360 нм, флуоресцентне випромінювання від об'єкта реєструвалось на 408 нм та 480 нм двома фотоелектронними помножувачами, сигнали від яких оцифровувались та записувались за допомогою АЦП DigiData 1322A. Зміни флуоресцентного випромінювання перераховували в $[Ca]_i$ і з використанням співвідношення $[Ca]_i = K_d(R_{min} - R)/(R - R_{max})$, де R – відношення флуоресцентного випромінювання на 408 та 480 нм довжинах хвиль; $R_{min} = 0,31$ та $R_{max} = 2,71$ – значення R при мінімальній та максимальній концентраціях кальцію у внутрішньоклітинному розчині, $K_d = 0,545$ мкмоль/л – ефективне значення константи дисоціації барвника, які були визначені експериментально в калібрувальних дослідках з використанням внутрішньоклітинних розчинів з різною фіксованою концентрацією кальцію.

2. Результати та їх обговорення

Зміну внутрішньоклітинної концентрації кальцію під впливом довготривалої стимуляції було досліджено на 56 нейронах. У внутрішньоклітинний розчин додавався кальцій-чутливий флуоресцентний барвник Indo-1 (0,1 ммоль/л), після утворення конфігурації «ціла клітина» протягом 5 – 10 хвилин клітина завантажувалась барвником, після чого інтенсивність флуоресцентного випромінювання досягала стаціонарного рівня та відповідала концентрації кальцію в середньому $(43,7 \pm 2,5)$ нмоль/л ($n = 48$).

Стимуляцію нейронів виконували в режимі фіксації потенціалу, використовуючи деполяризуючі імпульси від потенціалу покою (-70 мВ) амплітудою 80 мВ і тривалістю 3 мс, частота варіювала від 30 до 125 Гц, тривалість паттерна була від 2 до 30 секунд. Короткочасний деполяризуючий зсув мембранного потенціалу клітини від -70 до $+10$ мВ імітував виникнення ПД.

За характером динаміки кальцієвого сигналу після закінчення стимуляції нейрони були поділені на 2 групи. У першій групі, яка складалася із 24 нейронів, концентрація кальцію знижувалась одразу після припинення імпульсації (рис 1., а). У другій групі 32 нейрони починаючи з тривалості стимулу 2 – 30 с було зареєстровано затримку спаду кальцієвого сигналу після припинення стимуляції (рис 1., б). Тривалість затримки варіювала від 1 до 27 секунд.

У першій групі, концентрація кальцію моноекспоненціально знижувалась одразу після припинення стимуляції (рис 2. сигнал 1) з постійною часу спаду $(10,6 \pm 0,9)$ с ($n = 24$). У другій групі після затримки кальцієвий сигнал моноекспоненціально спадав з постійною часу $(11,0 \pm 0,9)$ с ($n = 32$) (рис 1., сигнал 2), яка достовірно ($p < 0,05$) не відрізнялась від постійної спаду сигналів у першій групі.

Затримка спаду концентрації кальцію виникала, при варіюванні частоти стимуляції від 30 до 125 Гц і тривалості серії коротких стимулів від 2 до 30 секунд; середня частота стимуляцій, при якій спостерігалась максимальна затримка, становила (66 ± 3) Гц. В наших експериментах тривалість затримки спаду

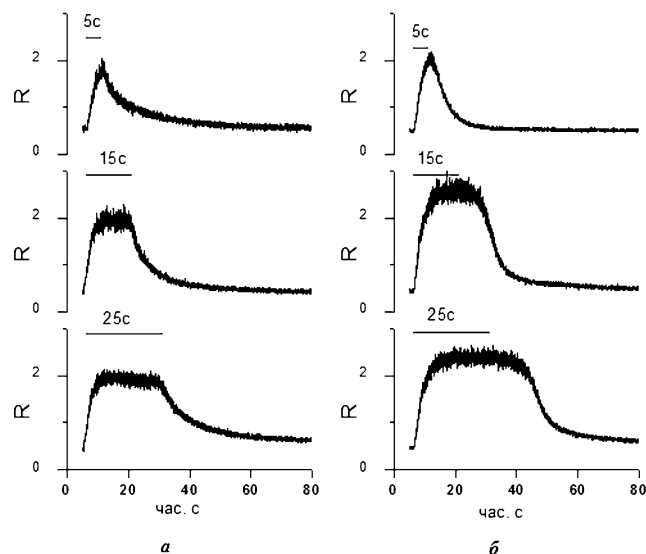


Рис. 1. Два типи кальцієвих сигналів (R) нейронів гіпокампа у відповідь на стимуляції різної тривалості (5, 15, 25 с). Записи кальцієвого сигналу від нейронів першої групи (знижка концентрації кальцію одразу ж після припинення стимуляції, а) та другої (затримка спаду концентрації кальцію, б) Поява затримки спостерігається починаючи з 15 с стимуляції, (б)

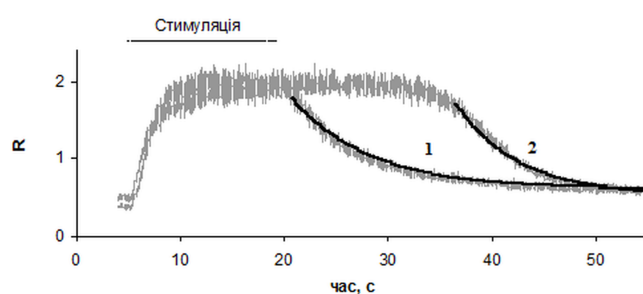


Рис. 2. Кальцієві сигнали (R) двох різних нейронів гіпокампа у відповідь на стимуляцію тривалістю 15 с (частота 80 Гц, тривалість окремого деполяризуючого стимулу 3 мс). Спад сигналів апроксимовано моноекспоненційною функцією. Кальцієвий сигнал у клітині з першої групи нейронів спадає одразу після закінчення стимуляції (1), у нейроні з другої групи сигнал (2) знаходиться на стаціонарному рівні не менше 12 с після закінчення стимуляції.

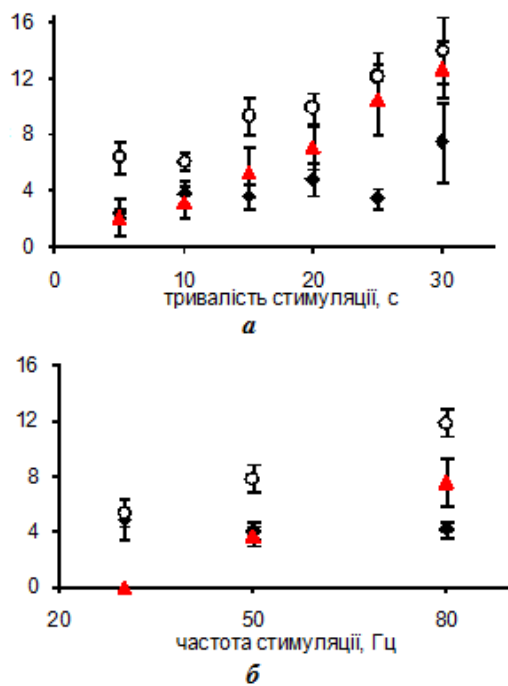


Рис. 3. Залежності середніх значень постійної часу зростання(●), постійної часу спаду (○) та тривалості затримки(△) від тривалості (а) та частоти (б) стимуляції. Представлено дані, отримані при усередненні значень для 8 (а) та 7 клітин (б).

лінійно залежала від тривалості та частоти стимуляції. Ці параметри стимуляції також впливали на постійну часу спаду і не впливали на постійну часу зростання кальцієвого сигналу (рис. 3).

Середня частота стимуляції, при якій виникала затримка, становила (59 ± 3) Гц. Порівняння постійної часу спаду кальцієвого сигналу, викликаного стимуляцією з частотою, яка ще не викликала появу затримки спаду сигналу і за умови, що затримка виникне при збільшенні частоти, у клітин другої групи ($n = 18$) та постійної часу спаду сигналу в клітинах першої групи ($n = 24$) свідчить про достовірність ($p < 0,05$) різниці. Крім того, у 18 клітин другої групи була проаналізована динаміка кальцієвого сигналу, викликаного стимуляцією з частотами, які недостатні і достатні для виникнення затримки спаду. Після виникнення ефекту затримки спаду достовірно змінювалась постійна часу спаду – у всіх випадках вона збільшилась (в середньому на $41 \pm 8\%$), в той самий час постійна часу зростання достовірно ($p < 0,05$) не змінилась.

Лінійна залежність амплітуди кальцієвого сигналу від частоти стимуляції спостерігалась при частоті стимуляції до ≈ 60 Гц, що відповідає середній частоті виникнення затримки (59 ± 3 Гц). При збільшенні частоти стимуляції амплітуда сигналу мала тенденцію виходу на стаціонарний рівень. При стимуляції нейрона з частотою більшою за частоту виникнення затримки (59 ± 3 Гц) подальшого зростання амплітуди кальцієвого сигналу не відбувалось (рис. 5).

Постійна часу спаду кальцієвого сигналу в клітинах першої групи не залежала від частоти стимуляції,

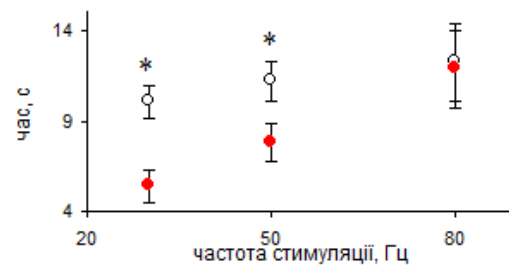


Рис. 4. Залежність середніх значень постійних часу спаду для клітин першої (○) та другої (●) груп. При стимуляції з частотами 30 та 50 Гц відповідні середні значення відрізняються статистично достовірно.

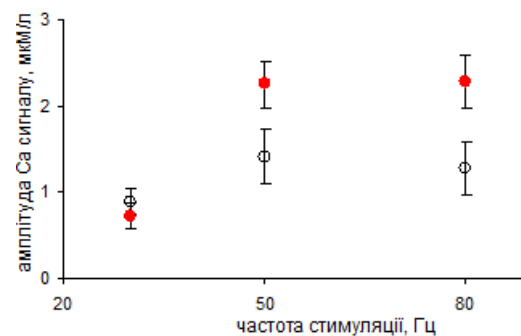


Рис. 5. Залежність середньої амплітуди кальцієвого сигналу від частоти стимуляції для нейронів першої (○, $n = 5$) та другої (●, $n = 7$) груп.

для клітин другої групи постійна часу спаду сигналу лінійно залежала від частоти стимуляції (рис 4).

Максимальне підвищення концентрації внутрішньоклітинного кальцію достовірно відрізнялось у клітин першої (1820 ± 195 нмоль/л, $n = 24$) та другої (2618 ± 165 нмоль/л, $n = 23$) груп.

Таким чином, описані дві групи нейронів, що відрізняються за формою кальцієвого сигналу (з затримкою та без затримки спаду), також відрізняються за кінетичними характеристиками та максимальною амплітудою кальцієвого сигналу, що може свідчити про відмінності в механізмах регуляції внутрішньоклітинної концентрації кальцію в різних нейронах культури гіпокампа.

В наших експериментах кальцієвий сигнал моноекспоненціально спадав або одразу ж після припинення стимуляції, або після деякої затримки. В роботі [1] на корзинчатих ГАМК-ергічних нейронах гіпокампу в спаді концентрації внутрішньоклітинного кальцію були присутні швидка та повільна компоненти, тому спад значно краще апроксимувався двома експонентами. Згадані нейрони були імунореактивні до парвальбумін-специфічного типу антитіл, і саме присутність парвальбуміну перетворює моноекспоненціальний спад у біекспоненціальний [15]. Однак в роботі [9] було показано наявність біекспоненціального спаду кальцієвого сигналу, викликаного поодиноким ПД, в пірамідних клітинах гіпокампа, які, як відомо, не містять парвальбумін. Автори цей факт намагаються пояснити наявністю повільного кальцієвого буферу.

Деяко подібний ефект затримки спаду концентрації кальцію викликаний титанічною стимуляцією (20 Гц, 15 с) в експериментах на нейронах симпатичних гангліїв земноводних спостерігали інші автори [12]. Також затримку спаду концентрації кальцію при попередньо індукованій черепно-мозковій травмі спостерігали на нейронах гіпокампа при аплікації глутамату (50 мкМоль, 4 хвилини) [16]. Більш того, після такої збуджуючої стимуляції концентрація кальцію не поверталась на базовий рівень впродовж щонайменше 10 хвилин. За думкою авторів, цей ефект було викликано порушенням кальцієвого гомеостазу внаслідок травми.

На нашу думку, зміна динаміки спаду кальцієвого сигналу та значне підвищення концентрації внутрішньо клітинного кальцію можуть бути зумовлені наявністю низькоафінного буфера. Після короткотривалої або низькочастотної стимуляції вільні іони кальцію або зв'язуються внутрішньоклітинними депо чи буферами, або виводяться з клітини назовні. При збільшенні тривалості або частоти стимуляції концентрація вільного кальцію в клітині підвищується і в дію вступає низькоафінний буфер, поріг роботи якого залежить від концентрації іонів кальцію в цитозолі. Після закінчення стимуляції, коли кальцій припиняє поступати в клітину, починається поступове спустошення буфера і цей процес підтримує стаціонарний рівень концентрації кальцію і таким чином змінює динаміку викиду кальцію з клітини.

Перелік використаних джерел

1. Aponte Y., Bischofberger J., and Jonas P. (2008) Efficient Ca^{2+} buffering in fast-spiking basket cells of rat hippocampus. *J. Physiol.* 586, 2061–2075.
2. Bartos M., Vida I., and Jonas P. (2007) Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 45–56.
3. Connors B.W. and Gutnick M.J. (1990) Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons. *Trends Neurosci.* 13, 99–104.
4. Csicsvari J., Jamieson B., Wise K.D., and Buzsaki G. (2003) Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat. *Neuron.* 37, 311–322.
5. Fang X., McMullan S., Lawson S., and Djouhri L. (2005) Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo. *J. Physiol.* 565, 927–943.
6. Fedulova S.A., Vasilyev D.V., Isaeva E.V., Romanyuk S.G., and Veselovsky N.S. (1999) Possibility of multiquantal transmission at single inhibitory synapse in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 92, 1217–1230.
7. Kawaguchi Y. (1995) Physiological subgroups of non-pyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex. *J. Neurosci.* 15, 2638–2655.
8. Kawaguchi Y. and Kubota Y. (1997) GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex. *Cereb. Cortex* 7, 476–486.
9. Lee S.H., Rosenmund C., Schwaller B., and Neher E. (2000) Differences in Ca^{2+} buffering properties between excitatory and inhibitory hippocampal neurons from the rat. *J. Physiol.* 525 Pt 2:405–18., 405–418.
10. Martina M., Schultz J.H., Ehmke H., Monyer H., and Jonas P. (1998) Functional and molecular differences between voltage-gated K^+ channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus. *J. Neurosci.* 18, 8111–8125.
11. McBain C.J. and Fisahn A. (2001) Interneurons unbound. *Nat. Rev. Neurosci.* 2, 11–23.
12. Nohmi M., Hua S.Y., and Kuba K. (1992) Intracellular calcium dynamics in response to action potentials in bullfrog sympathetic ganglion cells. *J. Physiol.* 458:171–90., 171–190.
13. Nowak L.G., Azouz R., Sanchez-Vives M.V., Gray C.M., and McCormick D.A. (2003) Electrophysiological classes of cat primary visual cortical neurons in vivo as revealed by quantitative analyses. *J. Neurophysiol.* 89, 1541–1566.
14. Rudy B. and McBain C.J. (2001) Kv3 channels: voltage-gated K^+ channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends Neurosci.* 24, 517–526.
15. Rudy B. and McBain C.J. (2001) Kv3 channels: voltage-gated K^+ channels designed for high-frequency repetitive firing. *Trends Neurosci.* 24, 517–526.
16. Sun D.A., Deshpande L.S., Sombati S., Baranova A., Wilson M.S., Hamm R.J., and DeLorenzo R.J. (2008) 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. *Eur. J. Neurosci.* 27, 1659–1672.