

А.О. Москалюк, С.В. Войтенко, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

Особливості динаміки кальцієвого сигналу, викликаного довготривалою високочастотною стимуляцією культивованих нейронів гіпокампа

Досліджували зміни внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію ($[Ca^{2+}]_i$) в культивованих нейронах гіпокампа з використанням кальційчутливого флуоресцентного барвника Indo-1. Зміни $[Ca^{2+}]_i$ під впливом довготривалої стимуляції (в режимі фіксації потенціалу в конфігурації «ціла клітина») було вивчено 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 зниження. Затримка варіювала від 1 до 27 с і 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 (у середньому на $41 \pm 8\%$). Зміна динаміки 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

Упродовж останніх років вивчення властивостей імпульсної активності нейронів кортекса [3], зорового кортекса [13], гіпокампа [10, 11], спінальних гангліїв [5] привертає значний науковий інтерес. Багатьма авторами було проведено електрофізіологічну класифікацію нейронів залежно від їхньої відповіді на тривалу (0,5–1 с) ін'єкцію деполяризувального струму [7, 8, 10, 13]. При цьому значну увагу приділяють нейронам, для яких характерна високочастотна генерація потенціалів дії (ПД) у відповідь на вище згадану ін'єкцію, тобто частота ПД перевищує 50 Гц [2, 4, 14]. Оскільки серія ПД значно підвищує концентрацію Ca^{2+} в клітині, то кінетика його подальшого зв'язування внутрішньоклітинними буферами та динаміка виведення із клітини викликають безумовний фундаментальний інтерес та практичне значення, бо саме іони

кальцію є основними вторинними посередниками, що регулюють значну кількість внутрішньоклітинних процесів. Тому метою цього дослідження було вивчення зміни кінетики кальцієвого сигналу при довготривалій стимуляції нейронів гіпокампа.

МЕТОДИКА

Культивування нейронів гіпокампа. Культивування нейронів гіпокампа проводили як описано раніше [6]. Після декапітації новонароджених щурів лінії Вістар гіпокамп виділяли та обробляли 0,025%-м розчином трипсину протягом 10 хв при 34°C. Після механічної дисоціації за допомогою пастерівських піпеток клітини висівали на покриті полі-L-орнітином/ламніном чашки Петрі. Клітини культивували у розчині, що складався з мінімального середовища ігла (MEM), 10%-ї

© А.О. Москалюк, С.В. Войтенко, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

кінської сироватки, 2,3 г/л NaHCO_3 , 6 мг/мл інсуліну, пеніциліну та стрептоміцину. На третю добу культивування 1 мкмоль/л Ara-C на 24 год додавали до культурального розчину для припинення проліферації гліальних клітин. Експерименти проводилися на 14–28 добу культивування.

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

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

Зміни внутрішньоклітинної концентрації кальцію реєстрували за допомогою спектрофотометричної установки («Carin Research Ltd», Великобританія). Флуоресценція барвника збуджувалася на довжині хвилі 360 нм, флуоресцентне випромінювання від об'єкта реєструвалось при $\lambda = 408$ і 480 нм двома фотоелектронними помножувачами, сигнали від яких оцифровувались та записувались за допомогою АЦП DigiData 1322A. Відношення інтенсивності флуоресцентного випромінювання на довжинах хвиль 408 та 480 нм (R) перераховували в $[\text{Ca}]_i$ з використанням співвідношення $[\text{Ca}]_i = K_d(R_{\min} - R)/(R - R_{\max})$, де $R_{\min} = 0,31$ та $R_{\max} = 2,71$ – значення при мінімальній і максимальній концентраціях кальцію у внутрішньоклітинному розчині, $K_d = 0,54$ мкмоль/л – ефективне значення константи дисоціації барвника, які були визначені експериментально в калібрувальних

дослідах з використанням внутрішньоклітинних розчинів з різною фіксованою концентрацією кальцію.

Результати аналізували за допомогою програмного пакета pClamp 9.0 (Axon Instruments) та програм Origin 7.0 (OriginLab Corporation) та Excel 2003 (Microsoft Corporation). Перевірку на відповідність нормальному розподілу здійснювали тестом Шапіро–Уїлка. Результати представлені як середнє \pm стандартна похибка середнього. Достовірність різниці середніх значень перевірялися за критерієм t Стьюдента ($P < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Зміну внутрішньоклітинної концентрації кальцію під впливом довготривалої стимуляції було досліджено на 56 нейронах. У внутрішньоклітинний розчин додавався кальційчутливий флуоресцентний барвник Indo-1 (0,1 ммоль/л), після утворення конфігурації «ціла клітина» протягом 5–10 хв клітина завантажувалася барвником, після чого інтенсивність флуоресцентного випромінювання сягала стаціонарного рівня та відповідала концентрації кальцію $43,7 \pm 2,5$ нмоль/л ($n=48$). Стимуляцію нейронів виконували в режимі фіксації потенціалу, використовуючи деполяризувальні імпульси від потенціалу покою (-70 мВ) амплітудою 80 мВ і тривалістю 3 мс, частота варіювала від 30 до 125 Гц, тривалість серії імпульсів була від 2 до 30 с. Короткочасний деполяризувальний 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 (24 нейрони) 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 від 1 до 27 с після припинення імпульсації (рис. 1, б).

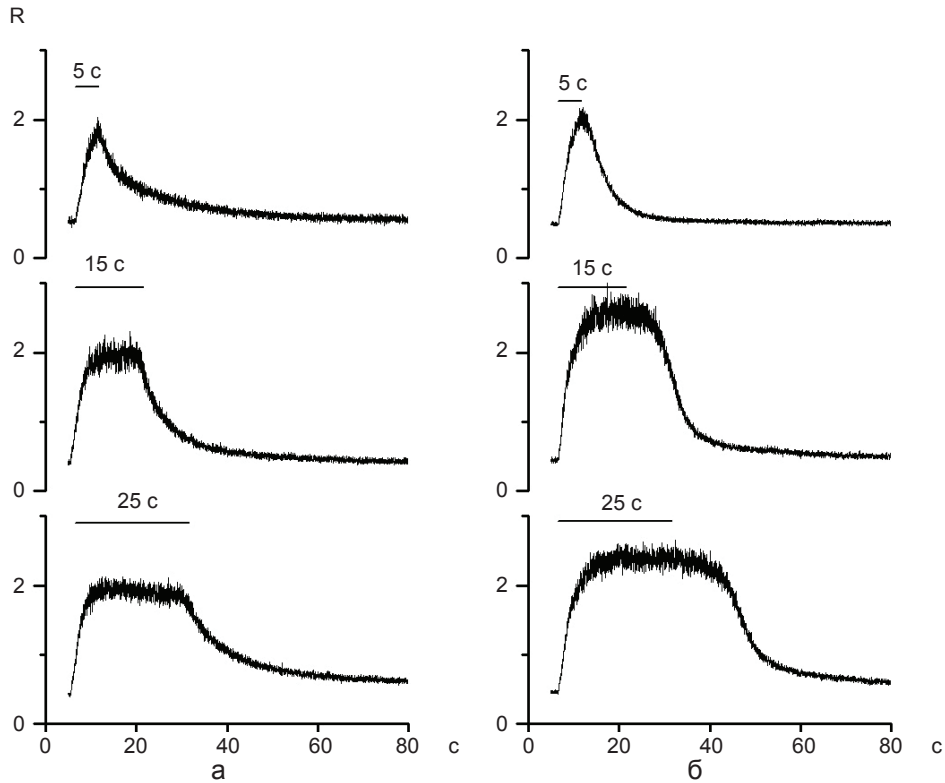


Рис. 1. Два типи кальцієвих сигналів (R) нейронів гіпокампа у відповідь на стимуляції різної тривалості (5, 15, 25 с): а – кальцієвий сигнал від нейронів першої групи (зниження концентрації кальцію одразу після припинення стимуляції), б – другої групи (затримка спаду концентрації кальцію)

Зниження концентрації кальцію в нейронах обох груп апроксимувалося однією експонентою. Постійні часу спаду для першої та другої груп були: $10,6 \pm 0,9$ с ($n=24$) і $11,0 \pm 0,9$ с ($n=32$), які достовірно ($P<0,05$) не відрізнялись між собою (рис. 2).

Затримка спаду концентрації кальцію виникала при варіюванні частоти стимуляції від 30 до 125 Гц і тривалості серії стимулів від 2 до 30 с; середня частота стимуляцій, при якій спостерігалась максимальна затримка, становила 66 ± 3 Гц.

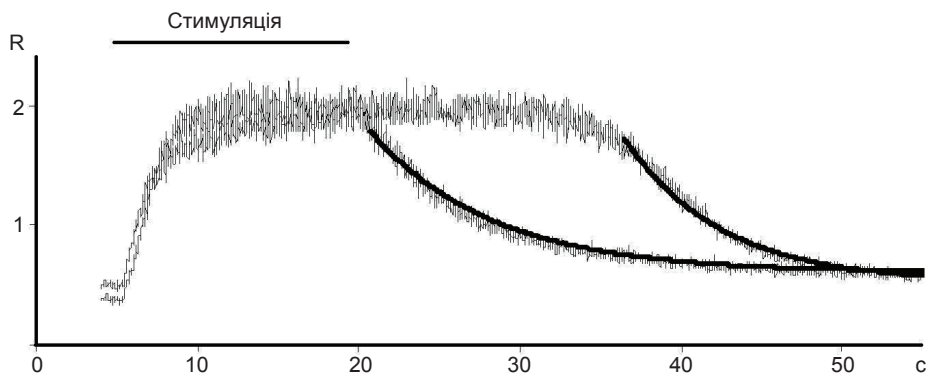


Рис. 2. Кальцієві сигнали (R) двох різних нейронів гіпокампа у відповідь на стимуляцію тривалістю 15 с (частота 80 Гц, тривалість окремого деполаризувального стимулу 3 мс). Спад сигналів апроксимовано моноекспоненційною функцією. Кальцієвий сигнал у клітині першої групи нейронів спадає одразу після закінчення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

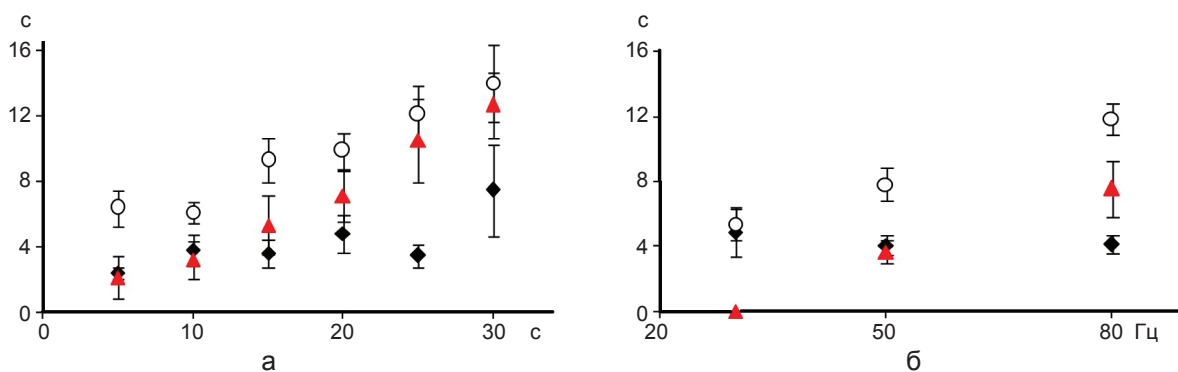


Рис. 3. Залежності середніх значень постійної часу зростання (◆), постійної часу спаду (○) та тривалості затримки (▲) від тривалості (а) та частоти (б) стимуляції. Представлено результати, отримані при усередненні значень для 8 (а) та 7 клітин (б)

У наших експериментах тривалість затримки спаду 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).

Постійна часу спаду кальцієвого сигналу в клітинах першої групи не залежала від частоти стимуляції, для клітин другої групи постійна часу спаду сигналу лінійно залежала від частоти стимуляції (рис. 4).

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 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

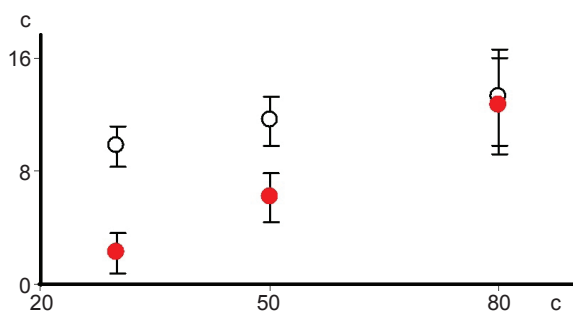


Рис. 4. Залежність середніх значень постійних часу спаду для клітин першої (○) та другої (●) груп. $P < 0,05$ – при стимуляції з частотами 30 та 50 Гц

достовірність ($P < 0,05$) різниці. Крім того, у 18 клітин другої групи була проаналізована динаміка кальцієвого сигналу, викликаного стимуляцією з частотами, які недостатні та достатні для виникнення затримки спаду. Після виникнення ефекту затримки спаду достовірно змінювалася постійна часу спаду – у всіх випадках вона збільшилася (в середньому на 41 ± 8 %), водночас постійна часу зростання достовірно ($P < 0,05$) не змінилась.

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

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, які відрізняються за формою (з затримкою та без затримки спаду), за кінетичними характеристиками та максимальною амплітудою кальцієвого сигналу, що може свідчити про відмінності в механізмах регуляції внутрішньоклітинної концентрації кальцію в

різних нейронах культури гіпокампа.

У наших експериментах кальцієвий сигнал моноекспоненціально спадає або одразу після припинення стимуляції, або після затримки. Аронте та співавт. [1] показали, що на корзинкових ГАМК-ергічних нейронах гіпокампа в спаді концентрації внутрішньоклітинного кальцію були наявні швидка та повільна компоненти, тому він значно краще апроксимувався двома експонентами. Згадані нейрони імунореактивні до парвальбумін-специфічного типу антитіл, і саме наявність парвальбуміну перетворює моноекспоненціальний спад у біекспоненціальний [15]. Однак Lee та співавт. [9] показали наявність останнього, викликаного поодиноким ПД, в пірамідальних клітинах гіпокампа, які, як відомо, не містять парвальбумін. Автори цей факт намагаються пояснити наявністю повільного кальцієвого буфера.

Деяко подібний ефект затримки спаду концентрації кальцію, викликаний тетанічною стимуляцією (20 Гц, 15 с) в експериментах на нейронах симпатичних гангліїв земноводних, спостерігали інші автори [12]. Аналогічна затримка при попередньо індукованій черепно-мозковій травмі відбувалася на нейронах гіпокампа при аплікації глутамату (50 мкмоль/л, 4 хв) [16]. Більше того, після такої збуджувальної стимуляції концентрація кальцію не поверталась на базовий рівень

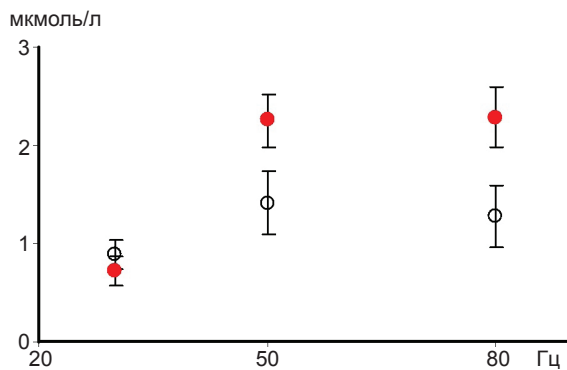


Рис. 5. Залежність середньої амплітуди кальцієвого сигналу від частоти стимуляції для нейронів першої (○, n=5) та другої (●, n=7) груп

упродовж щонайменше 10 хв. За поясненням авторів, цей ефект було викликано порушенням кальцієвого гомеостазу внаслідок травми.

На нашу думку, динаміка спаду кальцієвого сигналу та значне підвищення концентрації внутрішньоклітинного 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 надходити до клітини, починається поступове спустошення буфера. Цей процес підтримує стаціонарний рівень концентрації кальцію і, таким чином, змінює динаміку його викиду з клітини.

Ця робота є частиною проекту спільних наукових досліджень НАН України та Російського фонду фундаментальних досліджень (№ реєстрації 0112U004111).

А.А. Москалюк, С.В. Войтенко, С.А. Федулова, Н.С. Веселовський

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ КальциЕВого СИГНАЛА, ВЫЗВАННОГО ДОЛГОДЛЯЩЕЙСЯ ВЫСОКОЧАСТОТНОЙ СТИМУЛЯЦИЕЙ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА

Исследовали изменения внутриклеточной концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в культивируемых нейронах гиппокампа с использованием кальцийчувствительного флуоресцентного красителя Indo-1. Изменение $[Ca^{2+}]_i$ под влиянием долгодлительной стимуляции (в режиме фиксации потенциала в конфигурации «целая клетка») было изучено на 56 нейронах; по характеру динамики кальциЕвого сигнала после окончания стимуляции нейроны были разделены на 2 группы: в первой группе (n=24) $[Ca^{2+}]_i$ моноэкспоненциально снижалась сразу же после окончания стимуляции; во второй группе (n=32) была зарегистрирована задержка спада кальциЕвого сигнала после окончания стимуляции, длительность задержки варьировала от 1 до 27 с и зависела

от длительности и частоты стимуляции. Максимальное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ достоверно отличалось у клеток первой (1820 ± 195 нмоль/л, $n=24$) и второй (2618 ± 165 нмоль/л, $n=23$) групп. Линейная зависимость между постоянной времени спада и частотой стимуляции существовала только у клеток второй группы. После возникновения эффекта задержки постоянная времени спада достоверно изменялась – во всех случаях она увеличилась (в среднем на $41 \pm 8\%$). Предполагается, что изменение динамики кальциевого сигнала и значительное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ могут быть обусловлены наличием низкоаффинного буфера, что требует дальнейшего фармакологического исследования. Ключевые слова: кальциевые сигналы, Indo-1, нейроны гиппокампа.

A. Moskalyuk, S. Voytenko, S. Fedulova, N. Veselovsky

CHANGES IN THE KINETICS OF CALCIUM SIGNALS IN RESPONSE TO HIGH FREQUENCY STIMULATION IN THE CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS

Dynamic changes in the intracellular free Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) were studied in hippocampal cultured neurons using fluorescent Ca^{2+} -indicator dye Indo-1 and somatic whole-cell recordings. During the tetanus stimulation Ca^{2+} -transient increased their amplitude up to a steady-state level during repetitive stimulation. We identified two groups of neurons based on Ca-signal dynamics after the end of stimulation: the first group ($n=24$) with the monoexponential decay of $[Ca^{2+}]_i$ direct after the end of the tetanus; the second group ($n=32$) with the monoexponential delayed $[Ca^{2+}]_i$ decay after the end of the tetanus, the duration of delay varied from 1 to 27 s and depended on duration and frequency of stimulation. Peak amplitudes of Ca^{2+} -transients were statistically different between the first (1820 ± 195 nM, $n=24$) and the second (2618 ± 165 nM, $n=23$) groups. A linear dependence between decay time constant and frequency of stimulation was found for the second group of neurons only. In all cases when the delayed decay was observed the decay time constant changed reliably after emergence of delayed decay; the average rise made up $41 \pm 8\%$. We suggest dynamic changes and essential rise in the intracellular free Ca^{2+} concentration arise from the presence of intracellular low-affinity buffer. This statement is to be further tested using pharmacological approach. Key words: calcium signals, Indo-1, hippocampal cultured neurons.

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Science of Ukraine, Kyiv

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Aponte Y., Bischofberger J., Jonas P. Efficient Ca^{2+}

buffering in fast-spiking basket cells of rat hippocampus // *J. Physiol.* – 2008. – **586**. – P. 2061–2075.

2. Bartos M., Vida I., Jonas P. Synaptic mechanisms of synchronized gamma oscillations in inhibitory interneuron networks // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2007. – **8**. – P. 45–56.
3. Connors B.W., Gutnick M.J. Intrinsic firing patterns of diverse neocortical neurons // *Trends Neurosci.* – 1990. – **13**. – P. 99–104.
4. Csicsvari J., Jamieson B., Wise K.D., Buzsaki G. Mechanisms of gamma oscillations in the hippocampus of the behaving rat // *Neuron.* – 2003. – **37**. – P. 311–322.
5. Fang X., McMullan S., Lawson S., Djouhri L. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat in vivo // *J. Physiol.* – 2005. – **565**. – P. 927–943.
6. Fedulova S.A., Vasilyev D.V., Isaeva E.V., Romanyuk S.G., Veselovsky N.S. Possibility of multiquantal transmission at single inhibitory synapse in cultured rat hippocampal neurons // *Neuroscience.* – 1999. – **92**. – P. 1217–1230.
7. Kawaguchi Y. Physiological subgroups of nonpyramidal cells with specific morphological characteristics in layer II/III of rat frontal cortex // *J. Neurosci.* – 1995. – **15**. – P. 2638–2655.
8. Kawaguchi Y., Kubota Y. GABAergic cell subtypes and their synaptic connections in rat frontal cortex // *Cereb. Cortex.* – 1997. – **7**. – P. 476–486.
9. Lee S.H., Rosenmund C., Schwaller B., Neher E. Differences in Ca^{2+} buffering properties between excitatory and inhibitory hippocampal neurons from the rat // *J. Physiol.* – 2000. – **525**. – P. 405–418.
10. Martina M., Schultz J.H., Ehmke H., Monyer H., Jonas P. Functional and molecular differences between voltage-gated K^+ channels of fast-spiking interneurons and pyramidal neurons of rat hippocampus // *J. Neurosci.* – 1998. – **18**. – P. 8111–8125.
11. McBain C.J., Fisahn A. Interneurons unbound // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2001. – **2**. – P. 11–23.
12. Nohmi M., Hua S.Y., Kuba K. Intracellular calcium dynamics in response to action potentials in bullfrog sympathetic ganglion cells // *J. Physiol.* – 1992. – **458**. – P. 171–190.
13. Nowak L.G., Azouz R., Sanchez-Vives M.V., Gray C.M., McCormick D.A. Electrophysiological classes of cat primary visual cortical neurons in vivo as revealed by quantitative analyses // *J. Neurophysiol.* – 2003. – **89**. – P. 1541–1566.
14. Rudy B., McBain C.J. Kv3 channels: voltage-gated K^+ channels designed for high-frequency repetitive firing // *Trends Neurosci.* – 2001. – **24**. – P. 517–526.
15. Schwaller B. Cytosolic Ca^{2+} buffers // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – **2**. – a004051.
16. Sun D.A., Deshpande L.S., Sombati S., Baranova A., Wilson M.S., Hamm R.J., DeLorenzo R.J. 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.* – 2008. – **27**. – P. 1659–1672.

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: nast@petrov.com.ua*

*Матеріал надійшов
до редакції 08.10.2012*