

ВЛАСТИВОСТІ КВАНТОВОГО ВИВІЛЬНЕННЯ ГЛУТАМАТУ ТА ГЛІЦИНУ В СИНАПСАХ МІЖ ПЕРВИННИМИ АФЕРЕНТНИМИ НЕЙРОНАМИ ТА НЕЙРОНАМИ ДОРСАЛЬНОГО РОГА В КОКУЛЬТУРІ

Надійшла 31.10.12

З використанням методики „петч-клемп” реєстрували трансмембранні струми та потенціали в парах синаптично зв'язаних кокультивованих первинних аферентних нейронів (клітин спінальних гангліїв – СГ) та нейронів дорсальних рогів (ДР) спинного мозку щурів, визначаючи особливості вивільнення глутамату та гліцину у відповідних синапсах. Аналізуючи розподіли амплітуд постсинаптичних струмів, зареєстрованих у нейронах ДР, визначали квантові параметри викиду даних нейротрансмітерів. Показано, що вивільнення квантів нейротрансмітерів внаслідок надходження пресинаптичного потенціалу дії до синапсів глутамат- та гліцинергічних нейронів СГ здійснюється незалежно. Ймовірність викиду трансмітера підпорядковується біноміальній статистиці. Є підстави вважати, що пресинаптичний нейрон СГ формує на постсинаптичній клітині ДР в умовах кокультури декілька синаптичних з'єднань. Зроблено висновок, що пресинаптичні терміналі даних синапсів можуть мати більше однієї зони вивільнення трансмітера; це не виключає можливості багатоквантового вивільнення гліцину або глутамату в декількох зонах викиду в процесі нейропередачі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: нейрони спінальних гангліїв (СГ), нейрони дорсальних рогів (ДР) спинного мозку, синаптична передача, глутамат, гліцин, квантовий аналіз, біноміальний закон.

ВСТУП

Процес синаптичної передачі є ключовим моментом розповсюдження аферентних сигналів по нейронних шляхах; цей процес у нейронних мережах зазнає модуляції на різних рівнях передачі. Однією з властивостей нейропередачі, що неодноразово відмічалась у нейронах різних регіонів мозку, є варіабельність відносної інтенсивності („ваги”) синаптичної дії; така варіабельність відображується у флуктуаціях амплітуд постсинаптичних відповідей, викликаних активацією поодинокого синаптичного входу [1–3]. Дані властивості синаптичної передачі можуть бути описані з використанням стандартної квантової моделі.

Відповідно до теорії квантового викиду, викликане пресинаптичним потенціалом дії (ПД) вивіль-

нення нейротрансмітера відбувається дискретно (квантами) і має імовірнісний характер [4]. Амплітуда постсинаптичної відповіді в даному випадку відображує суму квантових викидів медіатора в усіх зонах вивільнення в синапсі. Таким чином, найважливішим параметром викликаного синаптичної події є ймовірність вивільнення квантів трансмітера. Як вважається, процес його вивільнення в окремих синапсах, якщо врахувати варіацію числа квантів, вивільнених у відповідь на пресинаптичний ПД, задовольняє статистичному закону Пуассона [5]. У багатьох структурах ЦНС вивільнення нейротрансмітерів у міжнейронних синапсах може підпорядковуватися біноміальній статистиці [6–8].

У попередніх роботах було виявлено, що в умовах кокультивування первинних сегментарних аферентних нейронів (клітин спінальних гангліїв – СГ) та нейронів дорсальних рогів (ДР) спинного мозку щурів нейропередача в синапсах між нейронами СГ та ДР відбувається в основному завдяки пресинаптичному вивільненню глутамату та гліцину [9, 10]. У даній роботі охарактеризовані особли-

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).

²Міжнародний центр молекулярної фізіології НАН України, Київ (Україна).

Ел. пошта: shypshyna.mariia@gmail.com (М. С. Шипшина).

вості квантового вивільнення цих нейромедіаторів у збуджувальних та гальмівних синапсах поодиноких первинних аферентних нейронів в умовах кокультивування з нейронами ДР.

МЕТОДИКА

Кокультуру нейронів ДР та СГ шурів отримували згідно з методикою, що була описана раніше [10]. З використанням методу «петч-клемп» у конфігурації «ціла клітина» від нейронів ДР, синаптично зв'язаних з нейронами СГ, відводили моносинаптичні постсинаптичні струми (ПСС), викликані генерацією ПД у нейроні СГ (вПСС), а також спонтанні ПСС. Як виявилось, такі струми найчастіше є збуджувальними (зПСС), але в частині нейронів ДР в умовах наших експериментів реєструвались і моносинаптичні гальмівні ПСС (ГПСС). ПД у нейронах СГ викликали, прикладаючи до них поштовхи струму 50 пА тривалістю 30 мс.

Внутрішньоклітинний розчин у петч-піпетках вміщував (у мілімолях на 1 л): калію глюконат – 155, EGTA – 0.5, $MgCl_2$ – 1, NEPES – 20 (рН доводили до 7.4, додаючи КОН). До складу базового позаклітинного розчину входили (у мілімолях на 1 л): NaCl – 140, KCl – 3, $CaCl_2$ – 2, $MgCl_2$ – 2, глюкоза – 12, NEPES – 20 (рН доводили до 7.4 за допомогою додавання NaOH). Мініатюрні ПСС (мзПСС та мГПСС) у клітинах ДР реєстрували в позаклітинному розчині, що вміщував $0.5 Ca^{2+}$, 10 мМ Mg^{2+} та 0.25 мкМ ГТХ. Експерименти виконували при температурі 20–22 °С; кокультура мала низьку щільність (20–30 тис. клітин/см²), що дозволяло візуально виявляти місця можливих синаптичних контактів. Аплікацію розчинів, до складу яких входили блокатори збуджувальної (DNQX, D_L -AP5) та гальмівної (бікукуліну метіодид, стрихнін) нейропередачі, виконували з використанням системи швидкої зміни розчинів (2 мл/хв). Реактиви для електрофізіологічних експериментів були отримані від компанії «Sigma» (США).

Основні квантові параметри вивільнення нейротрансмітерів (величину ефекту вивільнення одного кванта Q , середній квантовий вміст m та кількість квантових подій n) визначали із застосуванням наступних методик. Гістограмний метод з апроксимацією розподілів амплітуд викликаних ПСС (взПСС та вГПСС) декількома функціями Гауса використовували для візуальної ідентифікації рівновіддалених мод, що повторювались із визначеним

періодом; це інтерпретується як набір незалежних квантових подій [11]. Аналізували параметри взПСС та вГПСС, які були ідентичними за кінетичними параметрами наростання та спаду. Результати аналізу мініатюрних та спонтанних постсинаптичних струмів (мПСС та сПСС відповідно), спостережуваних у нейронах ДР, використовували для підтвердження припущення про величину поодинокій квантової події. Для опису ймовірності вивільнення нейромедіаторів застосовували просту біноміальну статистику. Згідно з простою біноміальною моделлю ймовірність спостереження викиду певної кількості квантових одиниць x у даній реєстрації вПСС має вигляд: $P(x) = \frac{n!}{(n-x)!x!} p^x (1-p)^{n-x}$, де n – загальна кількість квантів, здатних вивільнюватися після надходження пресинаптичного ПД («запас» квантів), а p – імовірність вивільнення окремих квантів. Теоретичні значення середнього квантового вмісту m (середньої кількості квантів трансмітера, що вивільняються у відповідь на пресинаптичний імпульс) розраховували за біноміальним законом: $m = n \cdot p$. Експериментальні значення m розраховували як відношення середньої амплітуди ПСС ($I_{сер}$) до середньої величини постсинаптичної відповіді, еквівалентної викиду поодинокого кванта медіатору (Q , прямий метод). Придатність біноміальної статистики для опису експериментальних даних визначали за відповідністю величин m , розрахованих із застосуванням першого та другого методів [12].

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

РЕЗУЛЬТАТИ

Вивільнення глутамату та гліцину в синапсах нейронів СГ на нейронах ДР досліджували на 14-ту добу кокультивування. Квантовий аналіз проводили для пар нейронів з істотною флуктуацією амплітуд ПСС.

Квантові властивості вивільнення глутамату. взПСС, мзПСС та спонтанні зПСС (сзПСС) відводили від нейронів ДР при підтримуваному потенціалі –70 мВ за наявності в позаклітинному розчині блокаторів гліцинергічної та ГАМК-ергічної

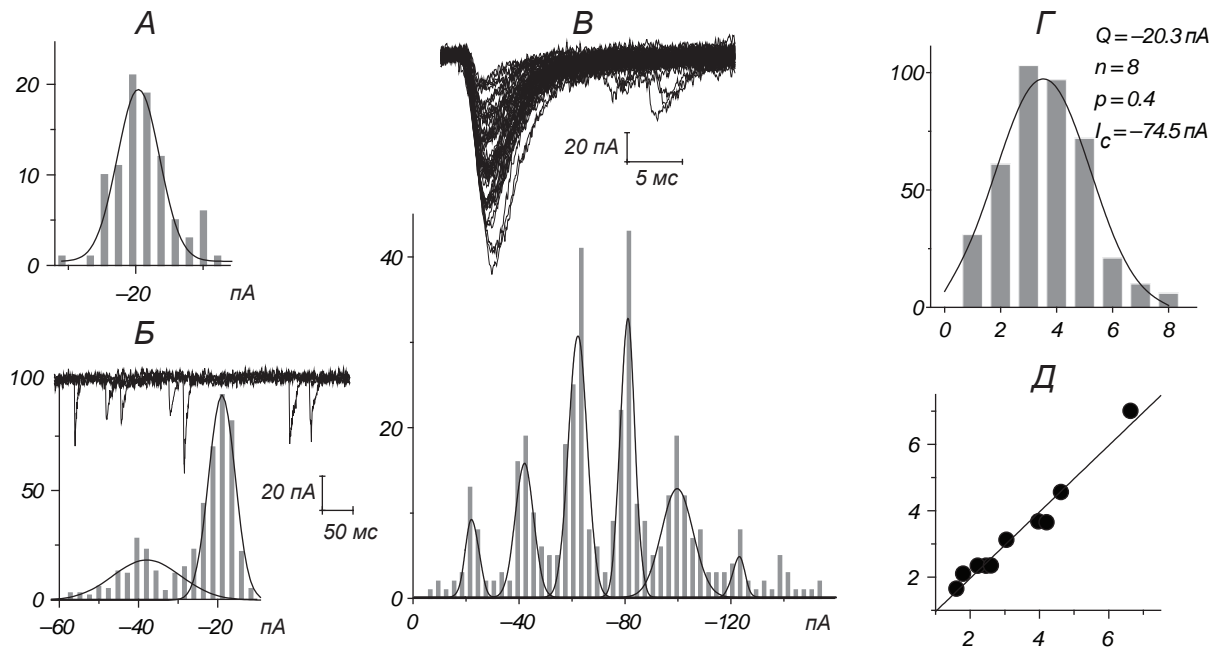


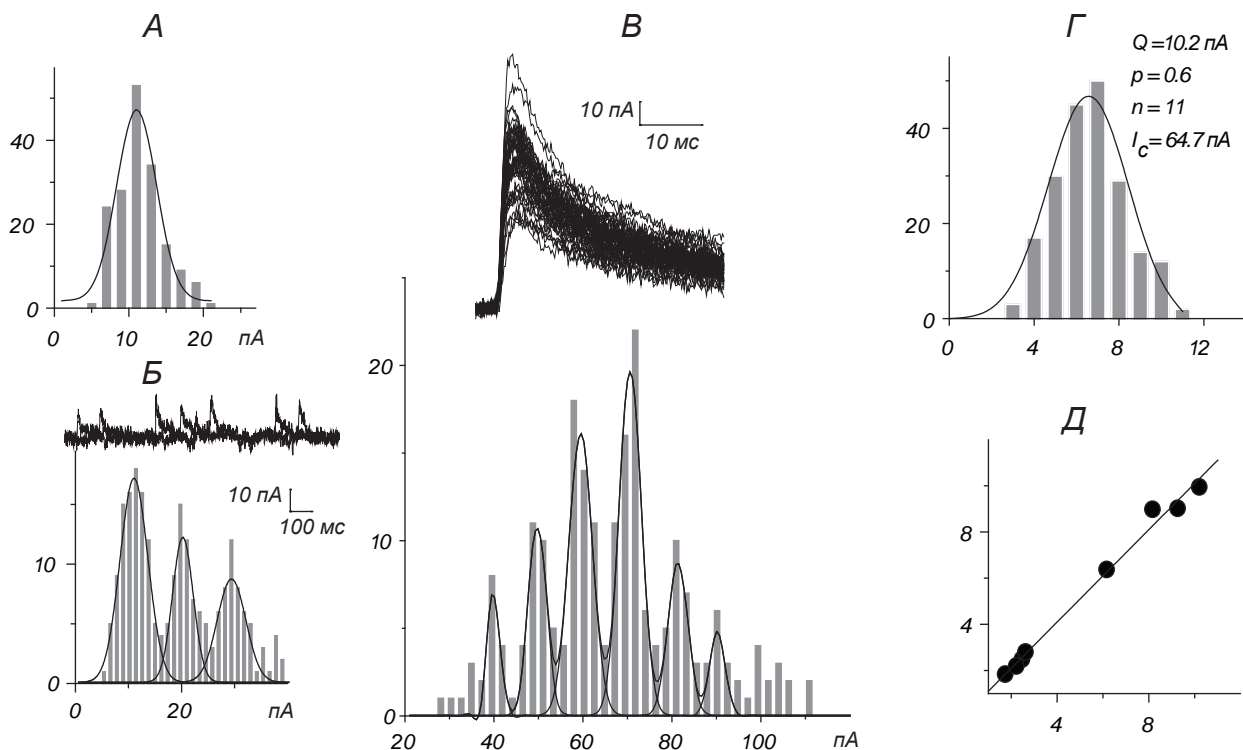
Рис. 1. Квантовий викид глутамату в синапсах нейронів спінальних гангліїв на нейронах дорсального рога спинного мозку щура. *A–B* – типові розподіли амплітуд мініатюрних (мЗПСС), спонтанних (сЗПСС) та викликаних (вЗПСС) глутаматергічних постсинаптичних струмів відповідно. На верхніх фрагментах *Б* та *В* – суперпозиції записів сЗПСС та вЗПСС. По осі абсцис – амплітуда мЗПСС (*A*), сЗПСС (*Б*) та вЗПСС (*В*); по осі ординат – число подій. *Г* – розподіл кількості одночасно вивільнених квантів *n* (вісь абсцис), побудований на основі гістограми *В*: стовпчаста гістограма – експериментальні дані, крива – апроксимація розподілу біноміальною функцією. *Д* – графік лінійної регресії величин *m* та \hat{m} : *m* – середній квантовий вміст, розрахований за біноміальним законом (вісь абсцис), \hat{m} – середній квантовий вміст, визначений за відношенням середньої амплітуди вЗПСС до середньої величини кванта (вісь ординат).

нейропередачі, 1 мкМ стрихніну та 10 мкМ бікуліну відповідно. сЗПСС мали швидку кінетику наростання та спаду (середній час наростання складав 2.31 ± 0.58 , а τ спаду – 4.50 ± 0.92 мс; $n = 5$). Середнє значення амплітуд сЗПСС залежало від підтримуваного потенціалу на мембрані нейронів ДР. Потенціал реверсії таких сЗПСС складав у середньому -5.12 ± 2.31 мВ ($n = 5$). Додавання у зовнішньоклітинний розчин блокаторів глутаматергічної нейропередачі DNQX (10 мкМ) та D_L -AP5 (10 мкМ) призводило до повного оборотного блокування сЗПСС, що характеризує дані струми як глутаматіндуковані. У розподілах амплітуд сЗПСС, зареєстрованих у восьми різних клітинах ДР, спостерігалися дві–чотири добре візуально ідентифікованих моди; розподіли задовільно апроксимувалися сумою кривих Гауса (рис. 1, *Б*). В усіх випадках значення середньої відстані між модами суміжних нормальних компонентів розподілу не відрізнялися від значень для першої моди полімодальних амплітудних гістограм і дорівнювали в

середньому 20.62 ± 0.82 пА ($n = 12$).

мЗПСС у клітинах ДР реєстрували в умовах зниженої ймовірності викиду трансмітера. Середній час наростання мЗПСС дорівнював 3.07 ± 0.35 , а τ спаду – 5.51 ± 0.53 мс ($n = 5$). Розподіли амплітуд мЗПСС були унімодальними і задовільно апроксимувались однією гаусіаною з модою на значенні 20.47 ± 0.69 пА ($n = 5$) (рис. 1, *A*).

Глутаматергічні вЗПСС, які виникали в клітинах ДР у відповідь на прикладання поодиноких ПД у нейронах СГ, за своїми кінетичними характеристиками та потенціалзалежністю відповідали сЗПСС та мЗПСС. Апроксимації амплітудних гістограм вЗПСС ($n = 10$) суперпозицією декількох гаусових кривих виявили декілька рівновіддалених мод, середня відстань між якими складала 20.40 ± 1.96 пА. Кількість чітко розрізняваних мод у різних парах нейронів варіювала від трьох до семи (рис. 1, *В*). Оскільки відстань між окремими модами розподілів амплітуд інтегральних ПСС інтерпретується як величина ефекту вивільнення одного кванта



Р и с. 2. Квантовый выкид глицину в синапсах спинальных ганглий на нейронах дорсального рога. Позначення та пояснення ті ж самі, що й на рис. 1.

трансмітера, середня величина поодинокі квантової події, пов'язної з викидом глутамату, при підтримуваному потенціалі -70 мВ складає приблизно 20 пА. Це повністю відповідає ефекту викиду поодинокого кванта, розрахованому 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, у серії реєстрацій вЗПСС кількість викидів одного кванта трансмітера визначали як кількість вЗПСС з амплітудою в діапазоні $-10...-30$ пА, двох квантів – як число вЗПСС з амплітудою в діапазоні $-30...-50$ пА і т. д. Експериментально визначені таким чином кількості квантових подій n ($0, 1, 2$ і т. д.) у відповідь на дію пресинаптичного ПД добре корелювали з такими, визначеними за біноміальним законом ($r^2 = 0.92$).

Значення квантового вмісту m для досліджува-

них пар нейронів були розраховані відповідно до біноміального закону та за прямим методом. Графічна репрезентація відповідності між величинами квантового вмісту, розрахованими для 10 пар нейронів, задовільно апроксимувалася лінійною функцією із нахилом 45° (рис. 1, Д). Жорстка кореляція ($r = 0.97$) є фактом, що підтримує початкову гіпотезу про величину квантової події та про придатність біноміального закону розподілу для опису отриманих експериментальних даних.

Квантовий аналіз вивільнення глицину в синапсах нейронів СГ на клітинах ДР. Гліцинергічні викидані, мініатюрні та спонтанні ГПСС (мГПСС та сГПСС відповідно) реєстрували в нейронах ДР при підтримуваному потенціалі -60 мВ у присутності блокаторів глутаматергічної (20 мкМ DNQX та 20 мкМ D_L -AP5) та ГАМК-ергічної (10 мкМ бікукуліну метиодиду) нейропередачі. Додавання в 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 положенням мод у розподілах амплі-

туд даних струмів (рис. 2, Б). Гістограми амплітуд сГПСС добре апроксимувалися декількома кривими Гауса. Значення першої моди таких розподілів дорівнювало 11.6 ± 1.43 пА ($n = 12$), що відповідало значенню середньої амплітуди мГПСС, зареєстрованих у нейронах ДР (А). Згідно з результатами аналізу сГПСС та мГПСС ефект вивільнення кванта гліцину дорівнював у середньому 10 пА.

Гістограми амплітуд вГПСС також апроксимувалися сумою кривих Гауса (рис. 2, В). Для кожного розподілу були характерні декілька рівновіддалених мод, кількість яких у різних парах нейронів ($n = 10$) варіювала від двох до семи. Середня відстань між модами складала 10.8 ± 1.03 пА, і це значення вірогідно не відрізнялося 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 жорстка кореляція ($r = 0.98$) між кількостями квантових подій, що опосередковують вГПСС, та такими, визначеними за біноміальним законом (рис. 2, Г). За кількість реалізацій одного кванта гліцину приймали число подій у діапазоні 6...16 пА гістограм амплітуд, двох – у діапазоні 16...26 пА і т. д. На адекватність використання біноміальної статистики вказує висока кореляція ($r = 0.97$) величин квантового вмісту m , розрахованих за біноміальним законом та прямим методом (Д).

ОБГОВОРЕННЯ

У даній роботі охарактеризована квантова природа вивільнення нейротрансмітерів глутамату та гліцину в синапсах нейронів СГ на нейронах ДР в умовах кокультури. Факт наявності гальмівних гліцинергічних синаптичних з'єднань між частиною нейронів СГ та ДР у згаданих умовах обговорювався раніше [9, 10].

Результати нашого дослідження доводять, що амплітуди глутамат- та гліцинергічних вПСС опосередковані кількістю одночасно вивільнених квантів медіатору з активних зон синапсів, залучених у 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 [13, 14]. У нормальних умовах імпульсація пресинаптично-

го нейрона СГ забезпечує досить великі значення квантового вмісту при передачі збуджувальних сигналів. Очевидно, що невеликі значення квантового вмісту (два–сім для глутаматергічних та два–10 для гліцинергічних синапсів) у наших експериментах вказують на наявність відносно невеликої кількості синаптичних контактів, утворених поодинокими нейронами СГ на нейронах ДР у кокультури низької щільності.

За даними електронномікроскопічних досліджень, бутони первинних аферентів на нейронах спинного мозку в умовах *in vivo* розрізняються за кількістю зон вивільнення нейротрансмітера і мають від однієї до чотирьох таких активних зон [15, 16]. Враховуючи вищезазначене, полімодальність амплітудних розподілів вЗПСС та вГПСС, очевидно, відображує квантове вивільнення в декількох первинних аферентних синапсах із кількома зонами вивільнення, що характеризує такий викид як багатоквантовий [2, 5, 17].

Біноміальна статистика широко використовується для опису квантового вивільнення в синапсах нейронів у різних структурах мозку в умовах відносно високої ймовірності вивільнення трансмітера [6–8, 18]. 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 застосована для визначення ймовірності викиду квантів у вказаних синапсах. Придатність біноміальної моделі була також визнана в низці попередніх досліджень *in vivo* при статистичному описі квантового вивільнення глутамату в синапсах, утворених поодиноким первинним аферентним волокном на мотонейронах спинного мозку [19, 20].

В умовах *in vivo* під час нейропередачі від нейронів СГ до нейронів ДР відбувається синхронне вивільнення нейротрансмітера в багатьох синапсах первинного аферентного нейрона після проходження ПД по його волокну. Інтегральні відповіді в такому випадку характеризуються великими значеннями квантового вмісту, але квантова природа процесу при цьому виявляється менш очевидно. На фізіологічному рівні активація значної кількості терміналей мінімізує вплив флуктуацій відповідей, зумовлених збудженням окремих закінчень, на величину інтегральної відповіді. Тим самим збільшується надійність передачі соматосенсорного сигналу. Дослідження в нашій моделі (кокультури низької щільності) з невеликою кількістю синапсів, а отже,

з невеликим значенням квантового вмісту дозволяє адекватно вивчати квантову природу викиду нейротрансмітерів у первинних аферентних синапсах.

Робота виконана за часткової фінансової підтримки Програми наукових досліджень НАН України (грант № 010U004760), проекту НАН України «Функціональна геноміка міжнейронної взаємодії та субнейронних процесів в нормальних та патологічних умовах» (0112U001476) та сумісного російсько-українського проекту наукових досліджень (0112U004111).

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. S. Lefort, C. Tómm, J. C. Floyd, et al., "The excitatory neuronal network of the C2 barrel column in mouse primary somatosensory cortex," *Neuron*, **61**, No. 2, 301-316 (2009).
2. A. Loebel, G. Silberberg, D. Helbig, et al., "Multiquantal release underlies the distribution of synaptic efficacies in the neocortex," *Front Comput. Neurosci.*, **27**, No. 3, 1-13 (2009).
3. S. Song, P. J. Sjöström, M. Reigl, et al., "Highly nonrandom features of synaptic connectivity in local cortical circuits," *PLoS Biol.*, **3**, No. 3, e68 (2005).
4. J. Castillo and B. Katz, "Quantal components of the end-plate potential," *J. Physiol.*, **124**, No. 3, 560-573 (1954).
5. S. A. Fedulova and N. S. Veselovsky, "Quantal GABA release in hippocampal synapses: role of local Ca²⁺ dynamics within the single terminals," *Eur. J. Pharmacol.*, **447**, Nos. 2/3, 163-171 (2002).
6. A. D'Errico, F. Prestori, and E. D'Angelo, "Differential induction of bidirectional long-term changes in neurotransmitter release by frequency-coded patterns at the cerebellar input," *J. Physiol.*, **587**, No. 24, 5843-5857 (2009).
7. E. Sola, F. Prestori, P. Rossi, et al., "Increased neurotransmitter release during long-term potentiation at mossy fibre-granule cell synapses in rat cerebellum," *J. Physiol.*, **557**, No. 3, 843-861 (2004).
8. H. Korn and D. S. Faber, "Quantal analysis and synaptic efficacy in the CNS," *Trends Neurosci.*, **14**, No. 10, 439-445 (1991).
9. M. S. Shipshina, S. A. Fedulova, and N. S. Veselovsky, "Induction of long-term depression of synaptic transmission in a co-culture of DRG and spinal dorsal horn neurons of rat," *Neurophysiology*, **43**, No. 4, 356-368 (2011).
10. M. S. Shypshyna and M. S. Veselovsky, "Characteristics of sensory neurotransmission in co-culture of neurons from the dorsal root ganglion and dorsal horn spinal cord in rats," *Fiziol. Zh.*, **56**, No. 4, 26-36 (2010).
11. F. A. Edwards, A. Konnerth, and B. Sakmann, "Quantal analysis of inhibitory synaptic transmission in the dentate gyrus of rat hippocampal slices: a patch-clamp study," *J. Physiol.*, **430**, 213-249 (1990).
12. L. L. Voronin, "On the quantal analysis of hippocampal long-term potentiation and related phenomena of synaptic plasticity," *Neuroscience*, **56**, No. 2, 275-304 (1993).
13. A. G. Brown, "The dorsal horn of the spinal cord," *Quart. J. Exp. Physiol.*, **67**, No. 2, 193-212 (1982).
14. E. A. Neale, P. G. Nelson, R. L. MacDonald, et al., "Synaptic interactions between mammalian central neurons in cell culture. III. Morphophysiological correlates of quantal synaptic transmission," *J. Neurophysiol.*, **49**, No. 6, 1459-1468 (1983).
15. M. A. Henry, N. A. Nousek-Goebl, and L. E. Westrum, "Light and electron microscopic localization of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in lamina II of the feline trigeminal pars caudalis/medullary dorsal horn: a qualitative study," *Synapse*, **13**, No. 2, 99-107 (1993).
16. B. Walmsley, E. Wieniawa-Narkiewicz, and M. J. Nicol, "The ultrastructural basis for synaptic transmission between primary muscle afferents and neurons in Clarke's column of the cat," *J. Neurosci.*, **5**, No. 8, 2095-2106 (1985).
17. H. Korn, C. Sur, S. Charpier, et al., "The one-vesicle hypothesis and multivesicular release," *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.*, **29**, 301-322 (1994).
18. S. Redman, "Quantal analysis of synaptic potentials in neurons of the central nervous system," *Physiol. Rev.*, **70**, No. 1, 165-198 (1990).
19. A. I. Shapovalov and B. I. Shiriaev, "Dual mode of junctional transmission at synapses between single primary afferent fibres and motoneurons in the amphibian," *J. Physiol.*, **306**, 1-15 (1980).
20. P. G. Nelson, K. C. Marshall, R. Y. Pun, et al., "Synaptic interactions between mammalian central neurons in cell culture. II. Quantal analysis of EPSPs," *J. Neurophysiol.*, **49**, No. 6, 1442-1458 (1983).