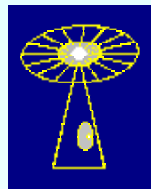


ЧТО ДАЕТ ПОИСК КЛЕТОК ПУРКИНЬЕ БЛИЗНЕЦОВ В КОРЕ МОЗЖЕЧКА: РЕЗУЛЬТАТЫ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Подладчикова Л.Н.



**Лаборатория нейроинформатики
сенсорных и моторных систем**



НИИ нейрокибернетики им. А.Б. Когана РГ

Работа поддержана РФФИ, грант № 03-04-48369

http://nisms.krinc.ru/papers/Rep_PCTW.pdf http://nisms.krinc.ru/papers/Fig_PCTW.pdf

Аннотация

Обобщаются результаты поиска и исследования активности клеток Пуркинье (КП) коры мозжечка, имеющих идентичный вход по лианным волокнам (ЛВ), или лианных близнецов. Обосновывается, что до начала данных исследований регистрация активности КП-близнецов была нерешенной экспериментальной задачей. Проводится аналитический обзор работ с описанием результатов, косвенно указывающих на то, что каждая клетка нижних олив управляет работой, в среднем, 10 КП. Анализируются возможные причины отсутствия в литературе описаний активности КП-близнецов, в частности, - низкая вероятность их обнаружения при случайном поиске и расположение лианных близнецов в узких полосках (шириной не более 200 мкм), ориентированных строго в саггитальной плоскости. Рассматривается постановка задачи поисковых исследований и комплекс специально разработанных методов для направленного поиска КП-близнецов. Задача поиска, критерии идентификации и стартовые методы ее решения были предложены В.Л.Дуниным-Барковским и экспериментально реализованы в НИИ нейрокибернетики РГУ. В частности, для увеличения вероятности их обнаружения предложен модифицированный метод поиска ЭЭГ-кванта А.Гутмана. Описаны особенности активности 26 пар КП-близнецов. Показано, что КП, иннервируемые одним и разными оливарными афферентами, имеют существенные различия в степени синхронизации не только их сложными (СИ), но и простых (ПИ) импульсов. Представлена совокупность новых фактов об особенностях активности КП, позволяющих по новому взглянуть на механизмы взаимодействия ЛВ и параллельных волокон. Проведена классификация параметров формы СИ у разных КП, ранее разнообразие форм СИ лишь констатировалось. По совокупности свойств СИ и ПИ выделены медленные и быстрые КП. Показано, что незначительное увеличение длительности СИ приводит к резкому изменению характера активности ПИ после СИ - от активационных до инактивационных. Обнаружен характерный сдвиг интервала в активности ПИ после СИ, который может нести информацию о состоянии клеток нижних олив. В свете полученных результатов рассматриваются возможные причины известных разночтений в характере взаимодействия СИ и ПИ. Заключается, что эффективная экспериментальная реализация задачи поисковых исследований и выявление ряда новых свойств активности КП с помощью лианных близнецов свидетельствуют о широких возможностях применения выбранного объекта

Слайд 2. Реализованные этапы исследования нейронных ансамблей в зрительной коре мозга

- **Идентификация групп нейронов как функциональных аналогов структурной колонки Дж. Сентаготаи – завершена, получены четкие критерии, выявлена существенная гетерогенность нейронов, образующих НА**
- **Организация внешних входов и внутренних связей в НА – исследована частично, выявлена структурная закрепленность зон формирования НА и приуроченность всех видов связей**
- **Динамика активности НА при различных условиях функционирования – исследована частично, выявлен переход от синхронизации активности при простых стимулах к десинхронизации при более сложных и зависимость межнейронных взаимодействий от характера активности**

Слайд 3. Нерешенные проблемы нейронных ансамблей в зрительной коре мозга

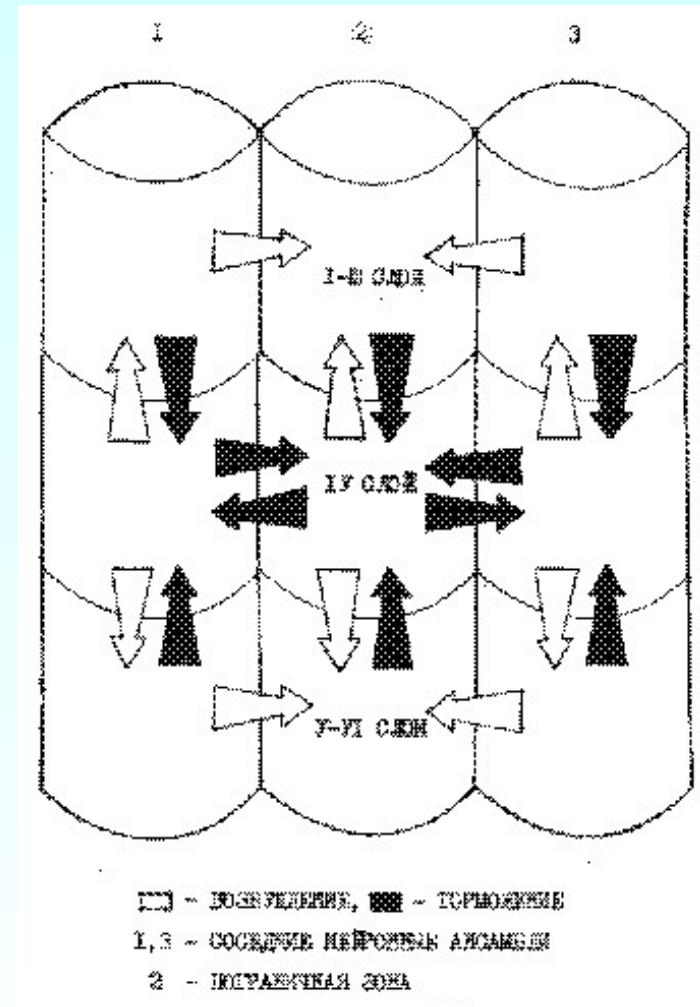
- **Внутренняя структура как функциональные отношения специализированных частей – детально в эксперименте не исследовалась**
- **Способ(ы) функционирования как механизм преобразования входной информации через систему внутренних связей в выходную активность – экспериментально не исследовался**
- **Методические и концептуальные ограничения при изучении гетерогенных структурированных групп клеток с распределенными входами и выходами**
- **До сих пор – игнорирование гетерогенности нейронов и внутренней структуры НА; доминирование представлений об усреднении активности (например, в функциональных колонках - синхронизация по Зингеру и Грейю)**

Слайд 4. Схема внутри- и межансамблевых взаимодействий в ЗКМ (Л.Н.Подладчикова, 1988)

II-III слои

IV слой

V-VI слои



**Слайд 5. Возможные подходы к
экспериментальному изучению способа
функционирования НА (дискуссии с А.Б.Коганом,
1969-1989)**

- **1. Идентификация в пределах структурных колонок их специализированных частей - групп функционально однотипных нейронов**
- **2. Идентификация в пределах ансамбля групп нейронов, связанных между собой по типу вход-выход**
- **3. Исследование природы и функциональной роли сильных и слабых межнейронных взаимодействий**
- **4. Использование более простого объекта – трехслойной структуры коры мозжечка (результаты Фам Хыу Хоана, 1968)**

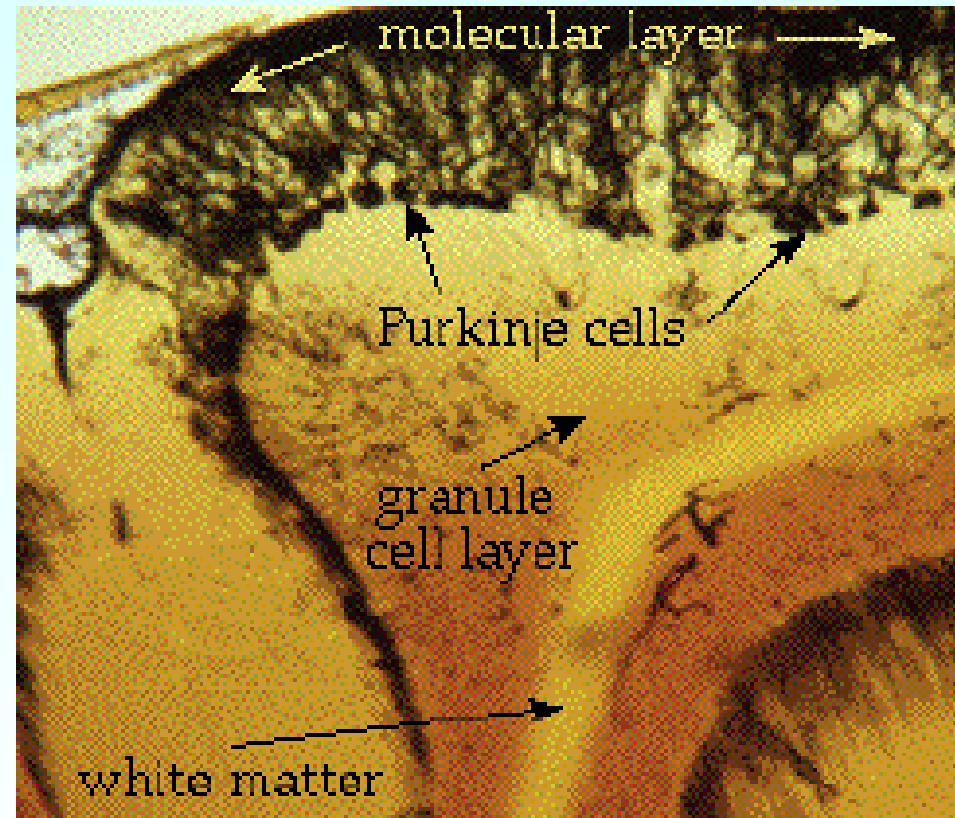
Слайд 6. Некоторые особенности морфологии

МОЗЖЕЧКА (www.cvm.edu,

www.thalamus.wustl.edu/course/cbell18.gif)

Сагиттальный срез

**Трехслойная структура
лепестка**



Слайд 7. Клетка Пуркинье. Препарат, окрашенный по методу Гольджи (www.cvm.edu/golgi-stained_purkinje-cell)



Слайд 8. Стерео-диаграмма коры мозжечка (цит. по М.Ито, 1984; J. Szentagothai, 1968, modified by J. Eccles, 1977)

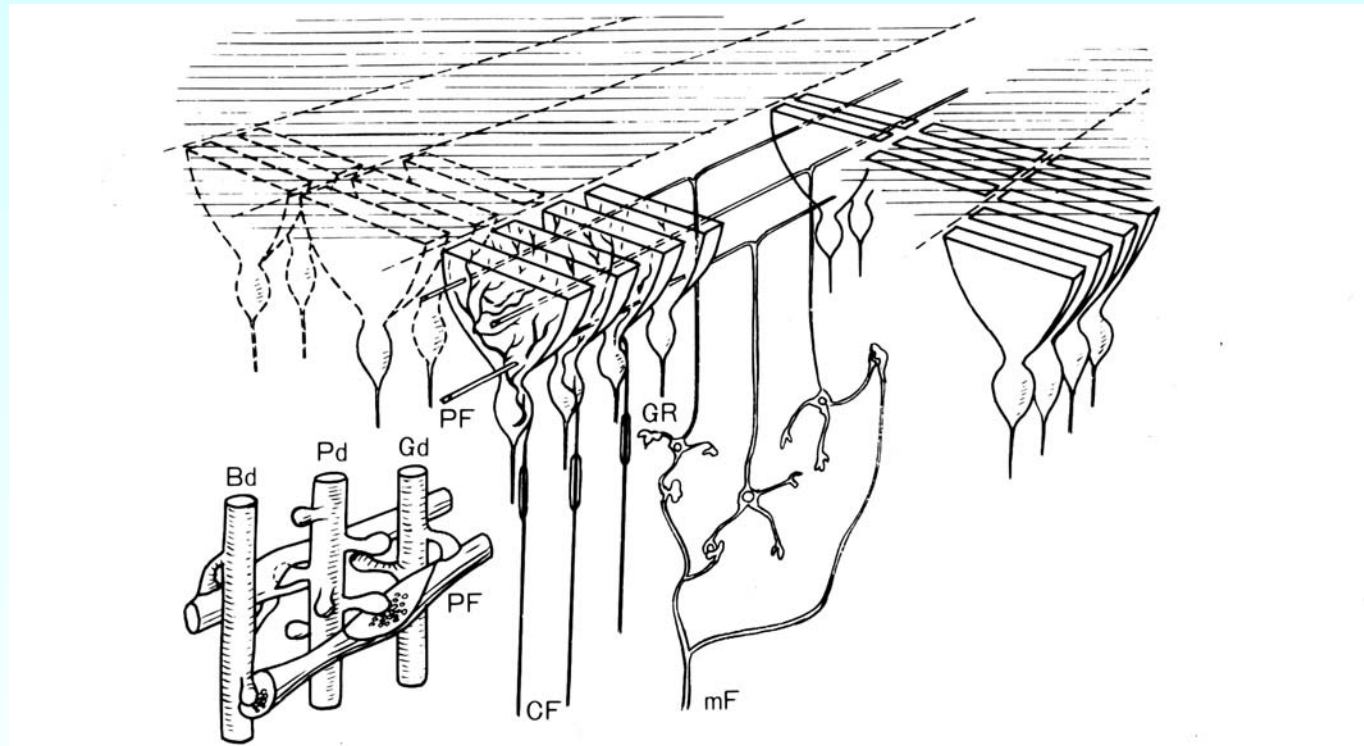


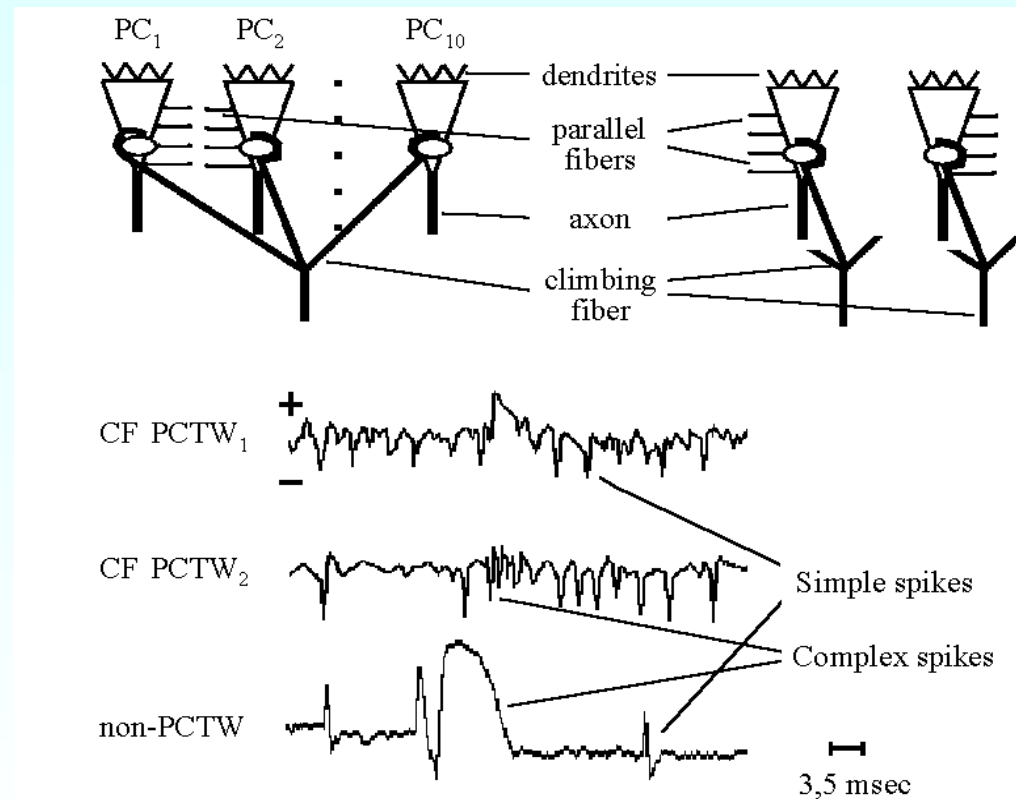
FIG. 19. Stereo diagram of the cerebellar cortex showing 5 rows of Purkinje cells with their dendrites arranged in parallel arrays. Pd, Purkinje cell dendrite; Gd, Golgi cell dendrite; Bd, basket cell dendrite. Other abbreviations are the same as in Fig. 3 (Szentágothai, 1968, modified by Eccles, 1977) (Copyright © 1968 IEEE).

Слайд 9. Задача поиска клеток Пуркинье мозжечка (КП-близнецы, PCTW, нейронные ансамбли высокой специфичности), управляемых общей клеткой нижних олив (В.Л. Дунин-Барковский, 1978-1989)

Схема

PCTW

non-PCTW



Ожидаемая
активность

Слайд 10. Методы и критерии идентификации КП-близнецов (дискуссии с В.Л. Дунин-Барковским, 1989-1990)

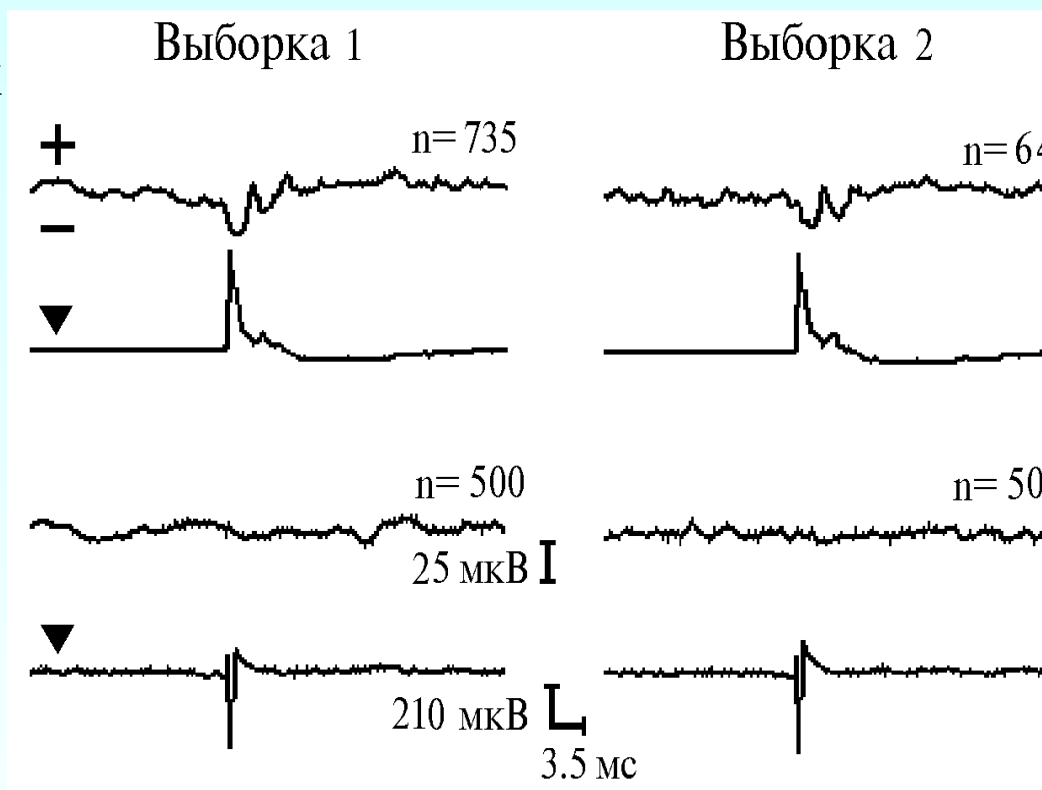
1. Детальное сканирование активности в окрестностях референтной КП

2. Суммация полевых потенциалов

3. Использование нескольких независимых выборок импульсов

4. Синхронность сложных импульсов двух КП

5. Стабильность задержки между СИ



6. Асинхронность простых импульсов

Слайд 11. М.Ито о КП – близнецах
(The Cerebellum and Neural Control. 1984).

- **`...The number of Purkinje cells that are innervated by climbing fiber branches from a single olivocerebellar afferent has been estimated by numerical comparison between PCs and inferior olivary neurons... Therefore, an olivocerebellar afferent may divide into 10 to 15 branches in the cerebellum, and each branch may innervate a single PC...`**

Слайд 12. Распределение концевых разветвлений аксонов клеток нижних олив в коре мозжечка (Н. Sugihara et al, 2001)

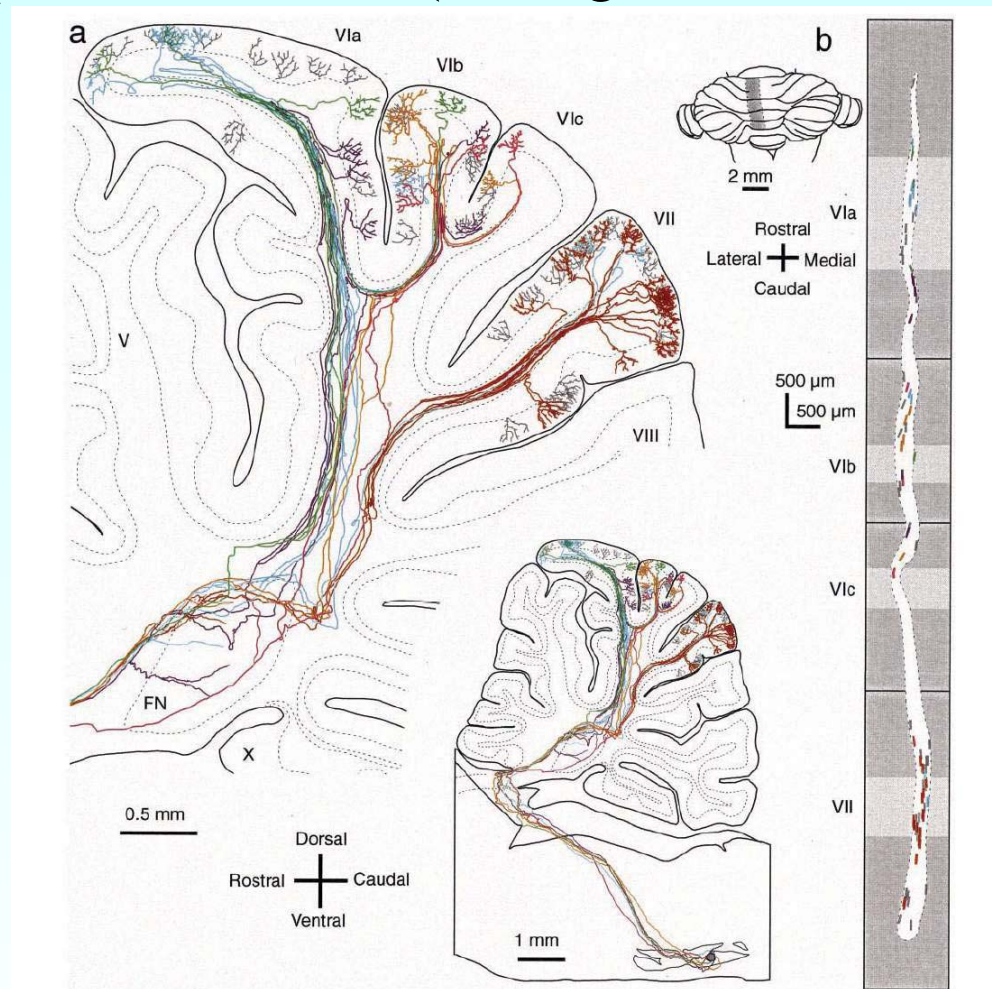


Figure 3. Climbing fibers originating from small areas in the inferior olive distribute within narrow longitudinal bands in the cerebellar cortex. *a*, Lateral view of six olivocerebellar axons (colored) reconstructed from 81 serial parasagittal sections. Forty-two climbing fibers arising from these six axons, and the other 36 labeled climbing fibers (gray) are included. *Inset* shows lateral view under low magnification of the entire axonal trajectories from the injection site in the centromedial portion of the MAO (single injection of 0.01 μ l of BDA). *b*, The distribution of climbing fibers plotted on the unfolded vermal cortex from the midline to the left by 1.3 mm. Colors used for the climbing fibers in *b* correspond to those used for individual axons in *a*. *Light* and *dark gray* areas in the unfolded scheme represent the cerebellar cortex exposed in the cerebellar surface and hidden in the sulci, respectively. *Dotted line* indicates the contour of the distribution area. *Inset* shows the area for the unfolded display.

Слайд 13. Распределение ответов по типу аксон-рефлекса при стимуляции ОЛИВО-МОЗЖЕЧКОВЫХ ВОЛОКОН В КОРЕ МОЗЖЕЧКА (D.Armstrong et al, 1973)

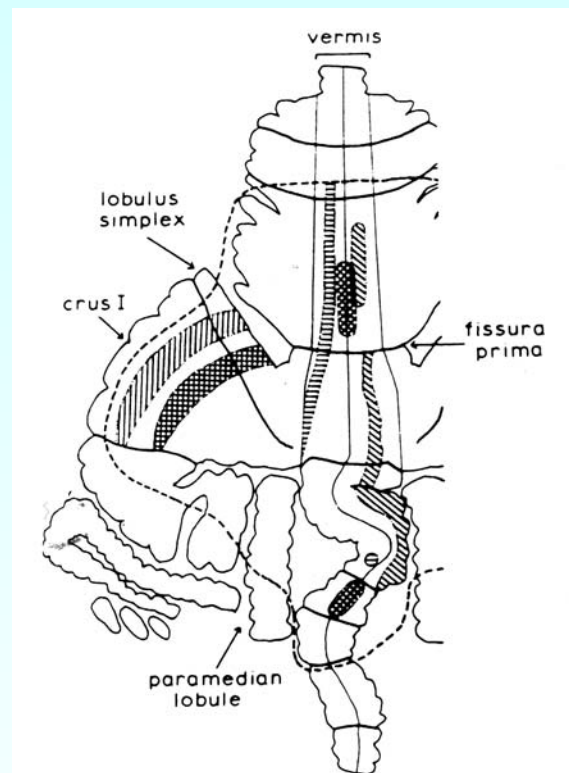


FIG. 43. Distribution of some axon reflex responses in the vermis and left hemisphere. Surface responses. Stimulation within any one of the *hatched areas* evoked axon reflex responses elsewhere in the similarly hatched portion of the cerebellum. *Dashed line* indicates the approximate limits of the area of the cerebellum which was accessible for stimulating or recording (Armstrong, Harvey, and Schild, 1973c).

Слайд 14. Результаты С. Bell, Т. Kawasaki (Relation among climbing fiber responses of nearby Purkinje cells, 1972)

non-PCTW

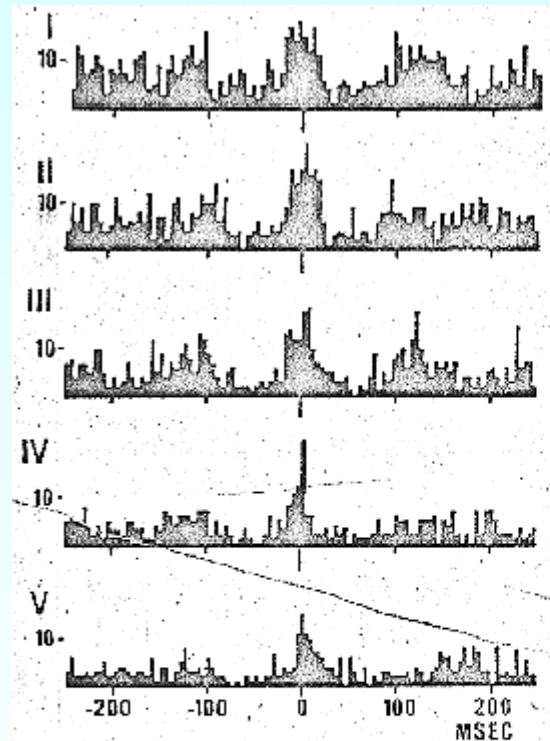


FIG. 2. Cross-correlograms between climbing fiber responses of two neighboring Purkinje cells. The pair in *IV* were separated in the transverse direction by 500 μ ; others were less than 50 μ apart in the longitudinal direction. The total number of events during the analysis period in the reference train, i.e., the train correlated from, was 713, 690, 538, 424, and 387 in *I*, *II*, *III*, *IV*, and *V*, respectively.

CF PCTW

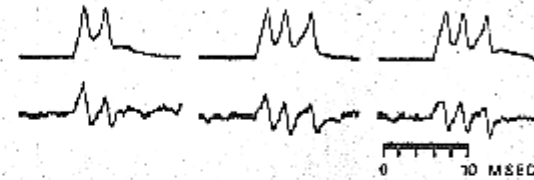


FIG. 5. Simultaneously recorded CFs from two Purkinje cells. One is shown in the upper trace, another in the lower. The three sections of the figure are successive. Only the long intervening parts of traces without CFs have been deleted. Positivity is up. The peak in the upper trace is about 2 mv, while the positive excursion in the lower trace is about 0.4 mv.

Слайд 15. К.Sasaki et al о КП-близнецах (Multiple Purkinje cell recording in rodent cerebellar cortex. 1989)

non-PCTWs

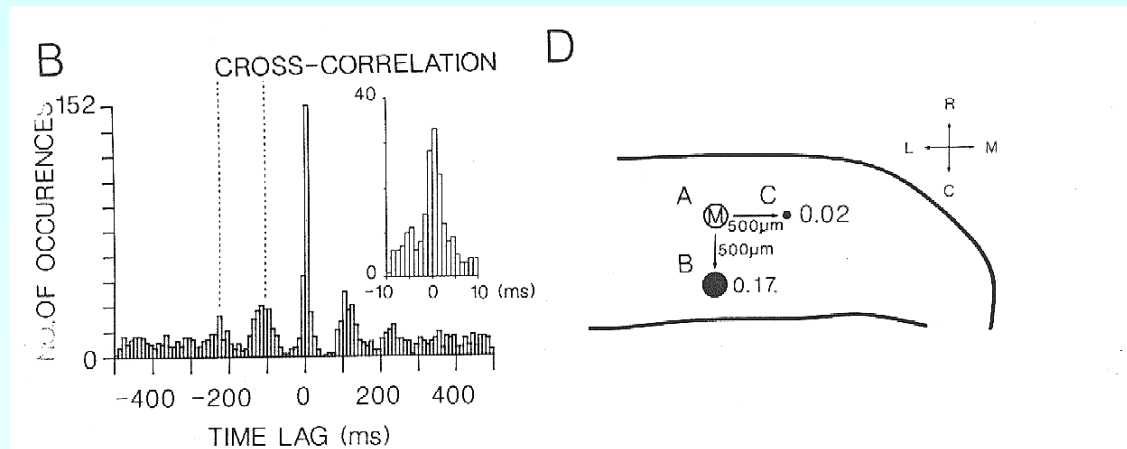


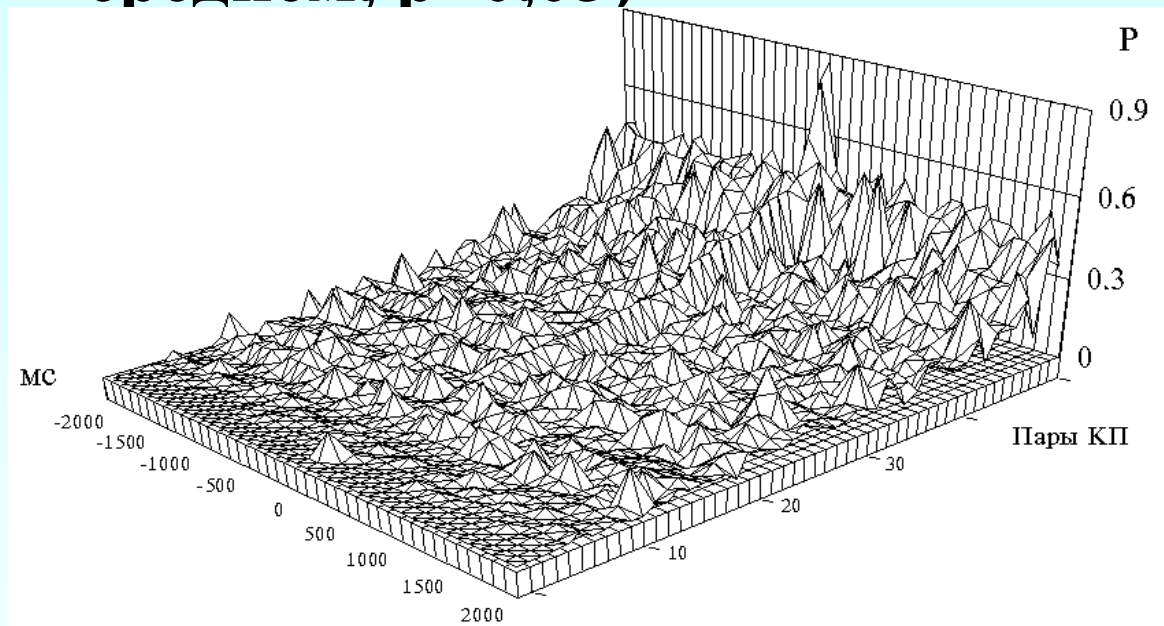
FIG. 7. Auto- and cross-correlograms of complex spikes recorded simultaneously from three Purkinje cells. Their location is described in D. (A) Auto-correlogram of spontaneously occurring complex spikes recorded in cell (A). (B) Cross-correlation of the activity in cell (B) with respect to the activity in cell (A). (C) Cross-correlation between the activity of cell (C) with respect to the activity of cell (A). The ordinate of these histograms gives the number of action potentials per unit time interval (10 ms). (D) (A) is the master cell (M), (B) is a Purkinje cell located 500 μm caudally, and (C) is a third Purkinje cell located 500 μm medially to the master neuron. Note that the dots in B and C represent, not only the location of the recordings, but their area relating to the degree of cross-correlation between each of the cells and the master neuron. This form of description of the degree of cross-correlation will be utilized for other figures in this paper.

about CF PCTWs

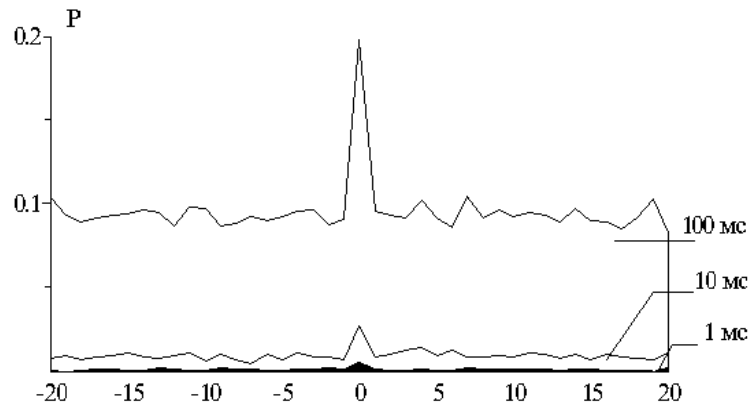
... On the other hand in no case did we observe a cross-correlation of 1, as would be expected if neighbouring Purkinje cells were often innervated by axonal branches of single inferior olivary neurons (Armstrong et al., 1971; Armstrong et al., 1973). This is perhaps not surprising since the probability of finding Purkinje cells with twin climbing fibres is quite remote. In fact, Bell and Kawasaki (1972) described only one such case out of 114 pairs...

Слайд 16. Кросскорреляция между СИ в парах клеток Пуркинье (n=51) с низким уровнем синхронизации активности (в среднем, $p=0,05$)

ККГ для всей выборки пар КП, квант - 100 мс

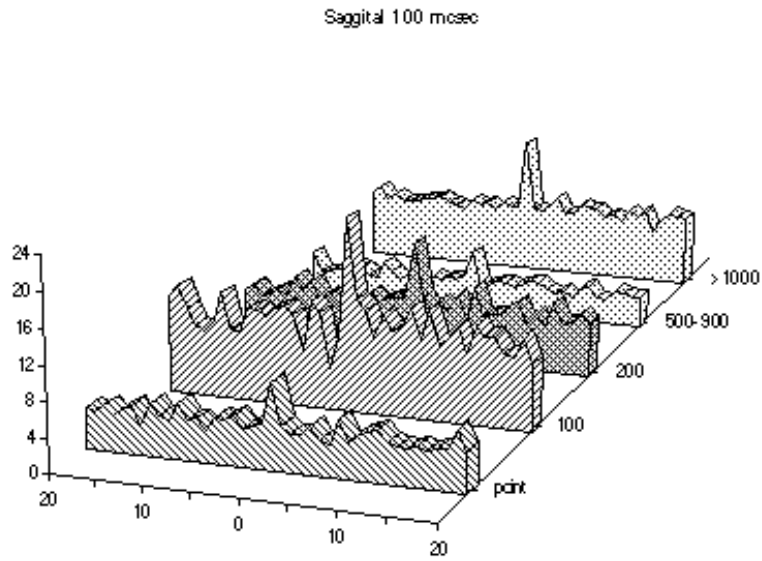


Усредненные ККГ, квант - 100, 10, 1 мс

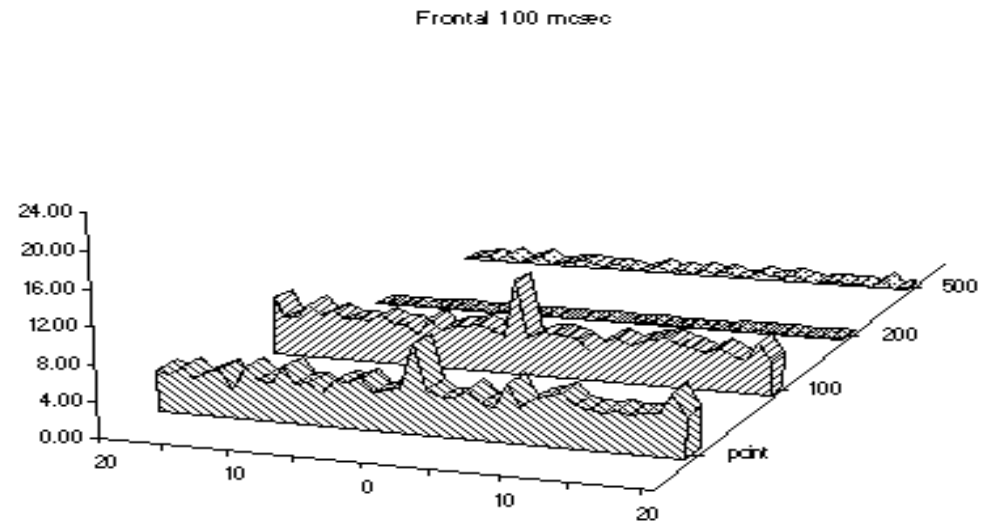


Слайд 17. Пространственное распределение КП с низким уровнем синхронизации СИ

Сагиттальная плоскость



Фронтальная плоскость



Слайд18. Пример активности одной и той же пары КИ с низким уровнем синхронизации сложных импульсов при асинхронной и синхронной генерации импульсов

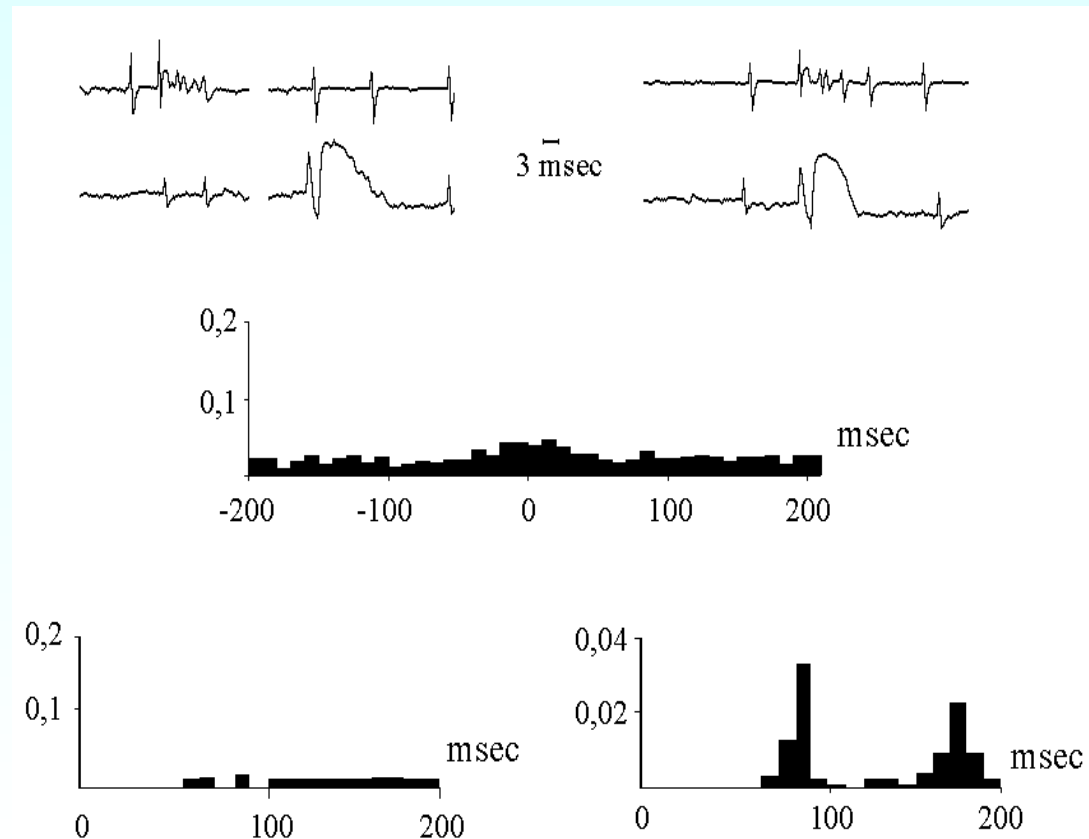
Асинхронная генерация СИ

Синхронная генерация СИ

Фрагменты активности

Усредненная ККГ между СИ

АКГ СИ в двух состояниях активности



Слайд 19. Характеристика спаренных разрядов СИ (интервал до 200 мс) в активности отдельных клеток при асинхронной и синхронной генерации импульсов парах КП с низким уровнем синхронизации (n = 51)

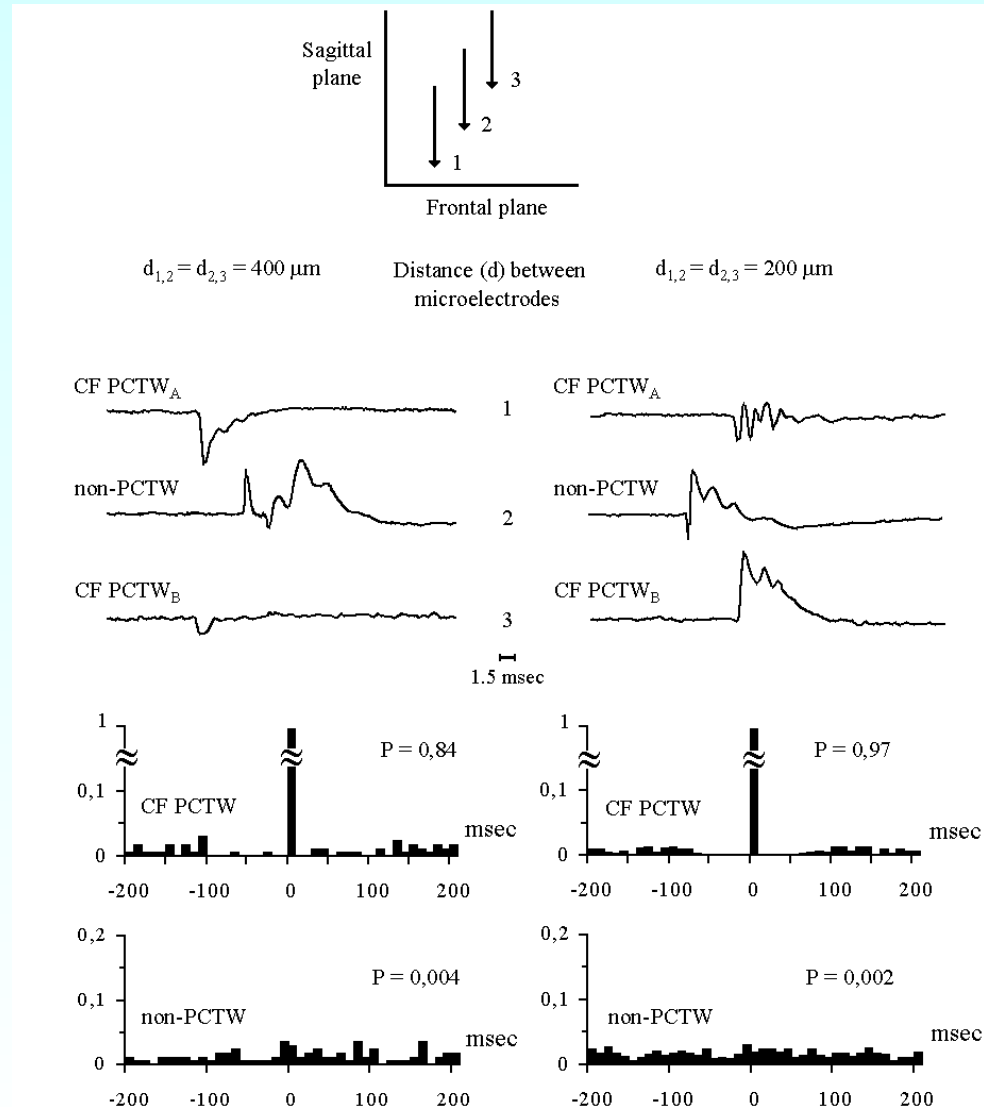
Сравниваемые параметры	Асинхронная активность	Синхронная активность
Вероятность спаренных разрядов	0,06 (n = 371)	0,17 (n = 195)
Средний интервал, мс	113 ± 26,02	94 ± 38,43

Слайд 20. Два первых случая одновременной регистрации CF PCTW (1, 3) and non-PCTW (2)

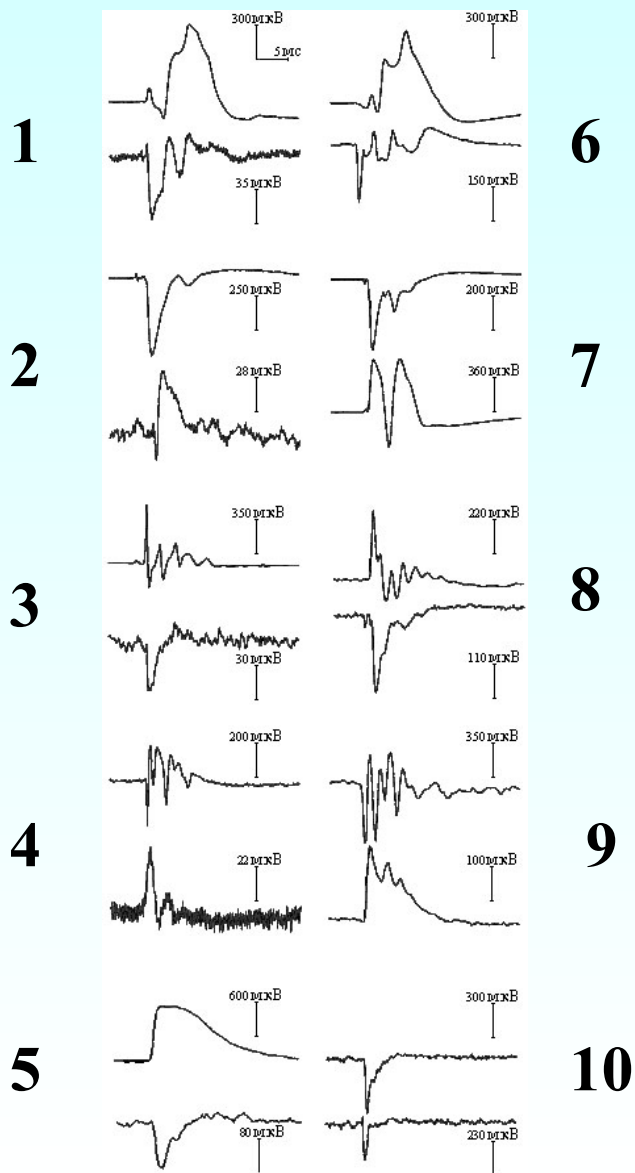
Схема
расположения
микроэлектродов

Фрагменты
активности трех
одновременно
регистрируемых КП

ККГ между СИ у
PCTW (вверху) и
non-PCTW (внизу)



Слайд 21. 10 примеров сложных импульсов у пар КП-близнецов



1

**Суммация потенциалов
синхронно со СИ референтной
КП (верхний канал в каждой
паре отведений); количество
референтных СИ – не менее 100**

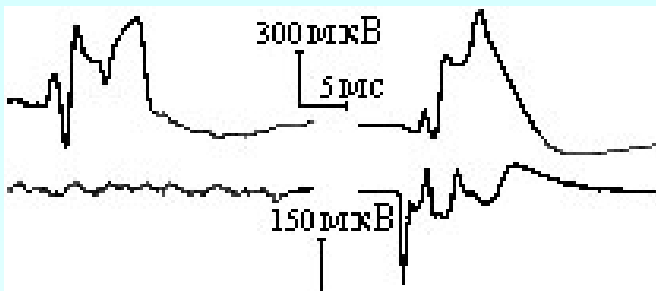
Слайд 22. Динамика синхронизации СИ у КП-близнецов

Асинхронная генерация

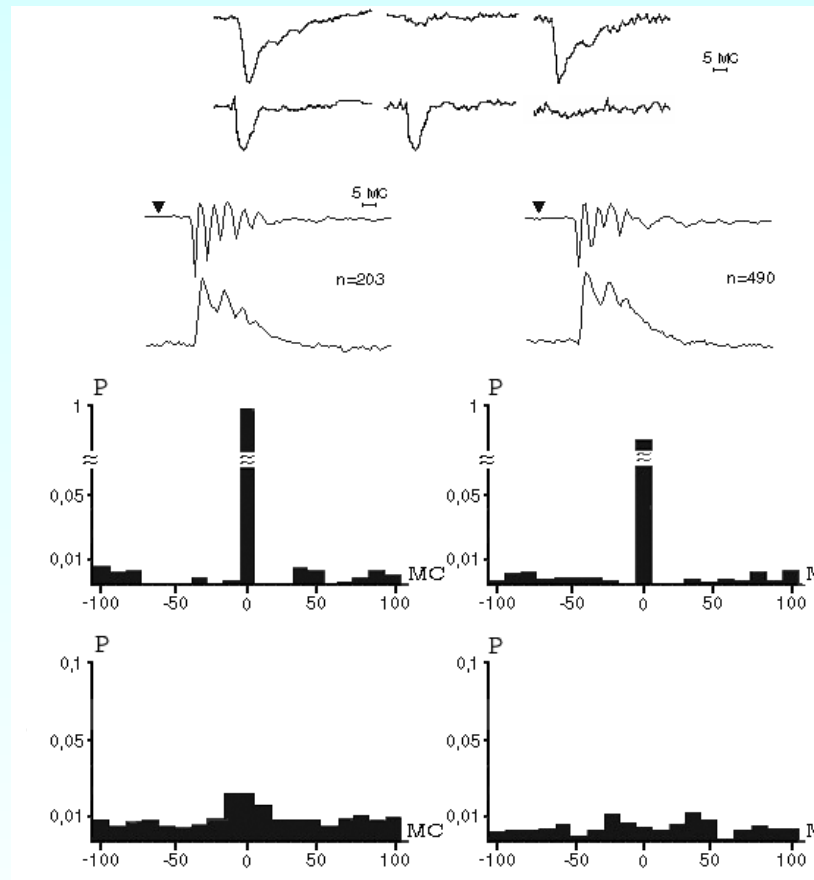
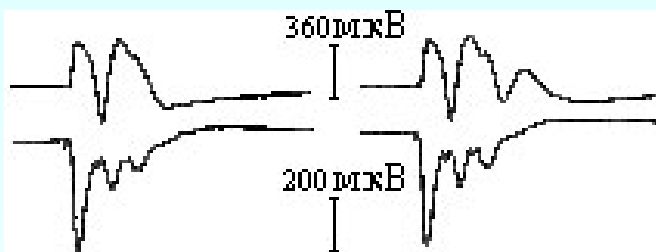
Синхронная генерация

Поочередная блокада СИ у каждой КП

Полная блокада СИ у одной из КП



Блокада компонент СИ



PCTW

Non-PCTW

ККГ между СИ одних и тех же КП при изменении длительности СИ

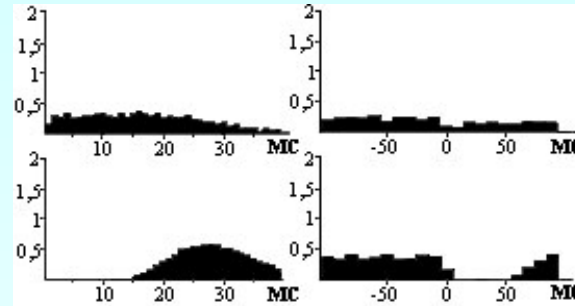
Слайд 23. Корреляция активности трех пар КП-близнецов

АКГ ПИ

ККГ между СИ и ПИ

Номер пары

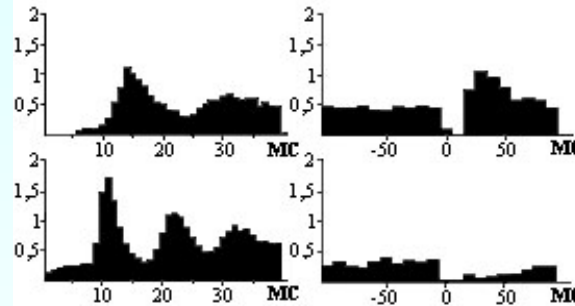
6



Референтная КП

Тестовая КП

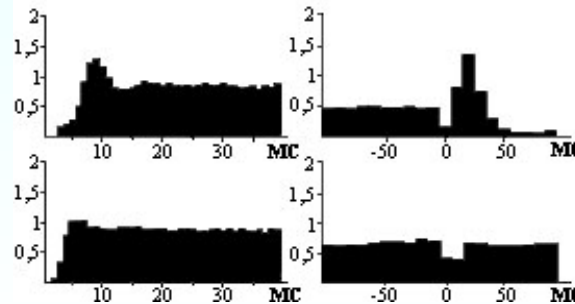
8



Референтная КП

Тестовая КП

9



Референтная КП

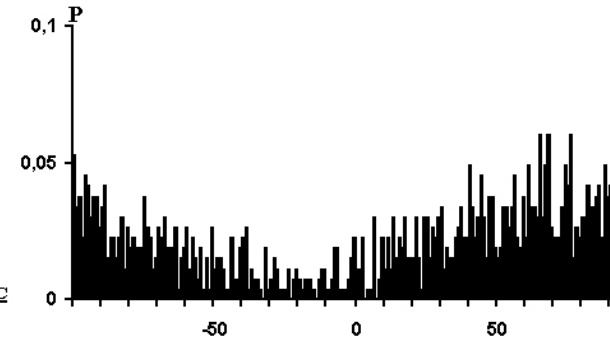
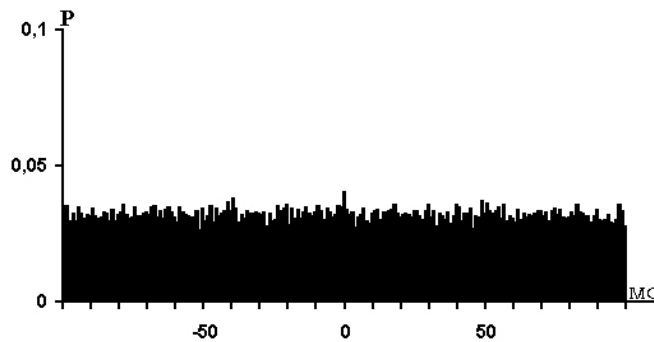
Тестовая КП

Слайд 24. Кросскорреляция между простыми импульсами в парах КП

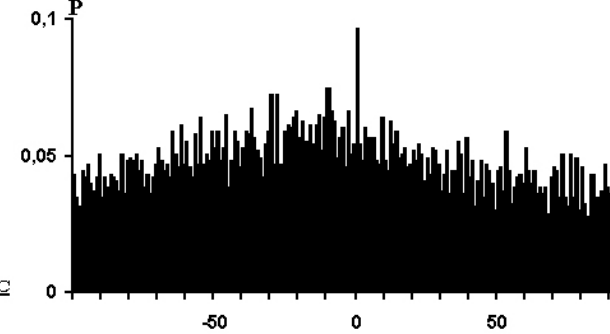
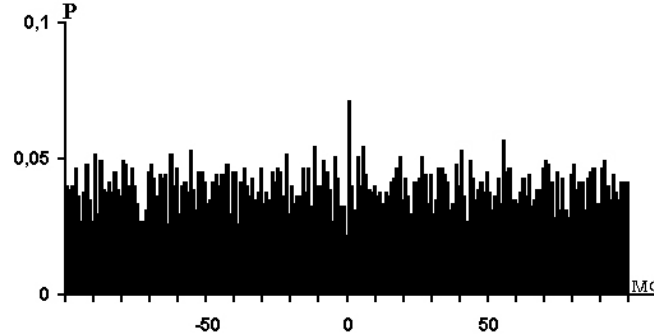
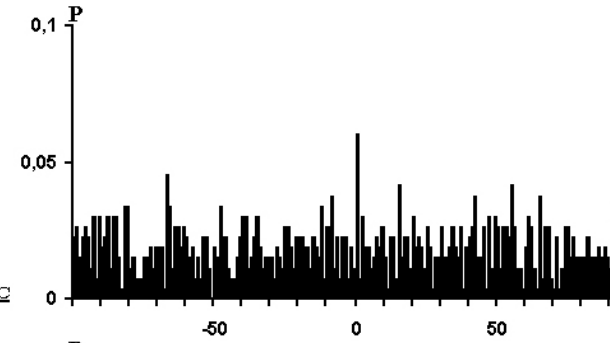
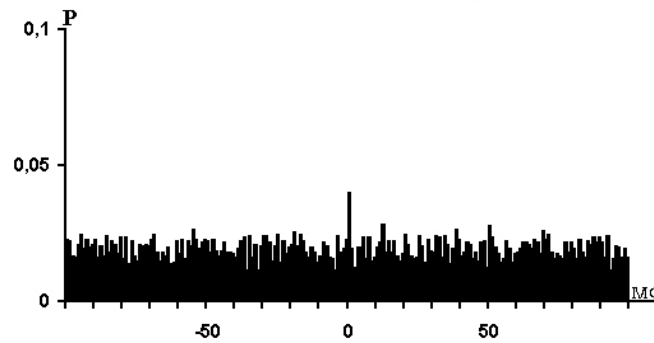
Активность до СИ

Активность после СИ

Пара КП с
разными ЛВ

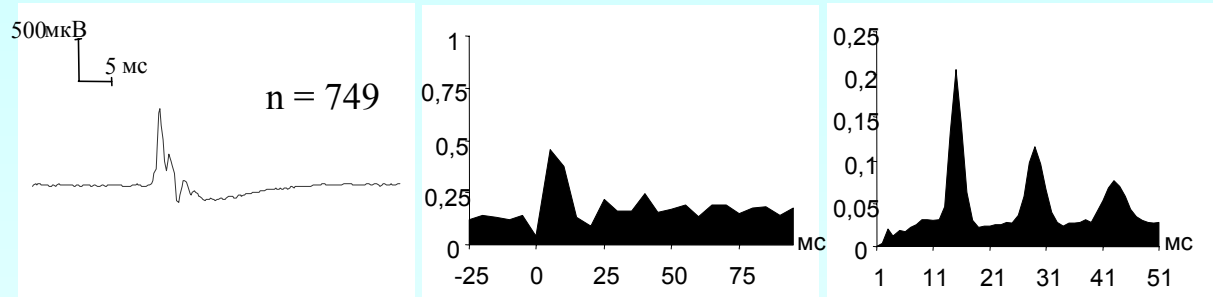


Две пары КП -
близнецов

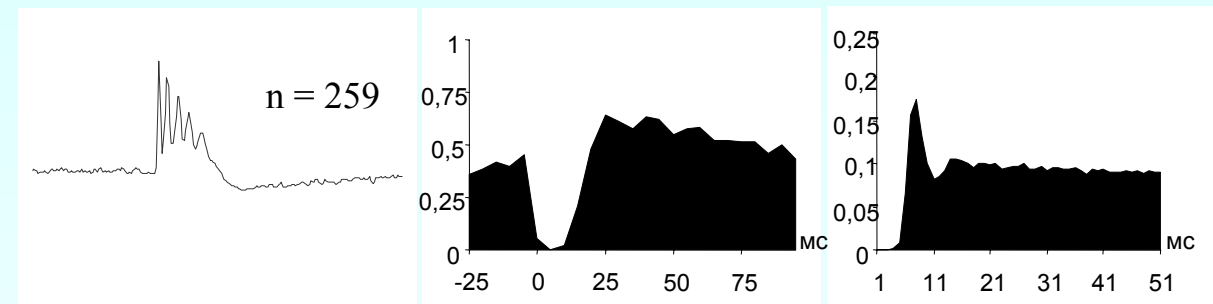


Слайд 25. Примеры активности КП со сложными импульсами разного типа

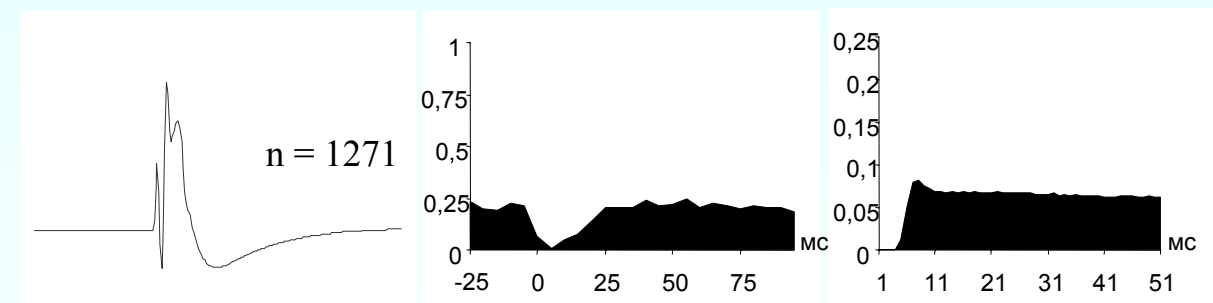
Быстрый



Промежуточный



Медленный



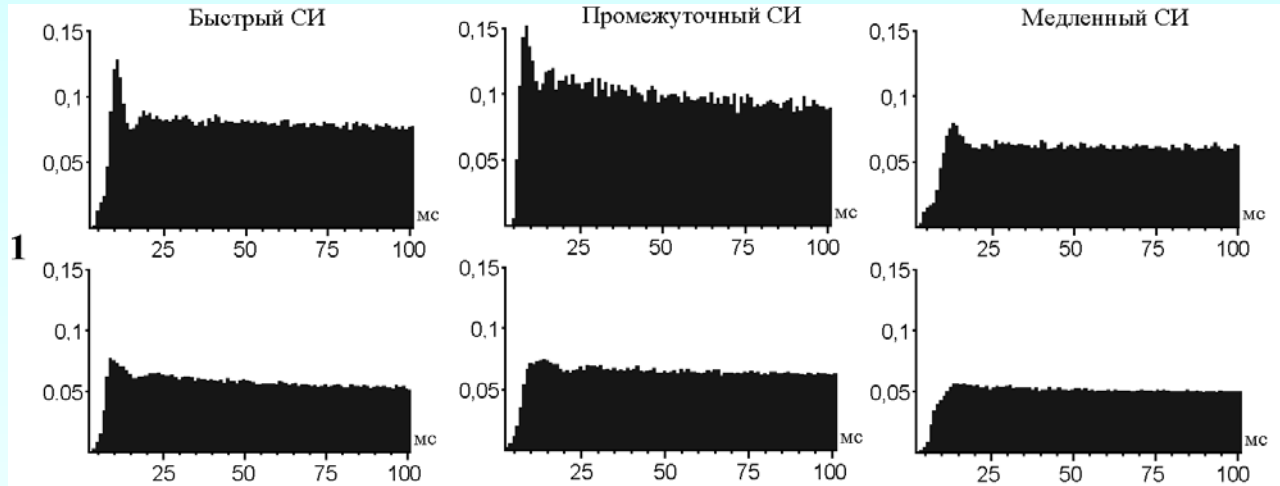
Форма сложных импульсов

ККГ между СИ и ПИ

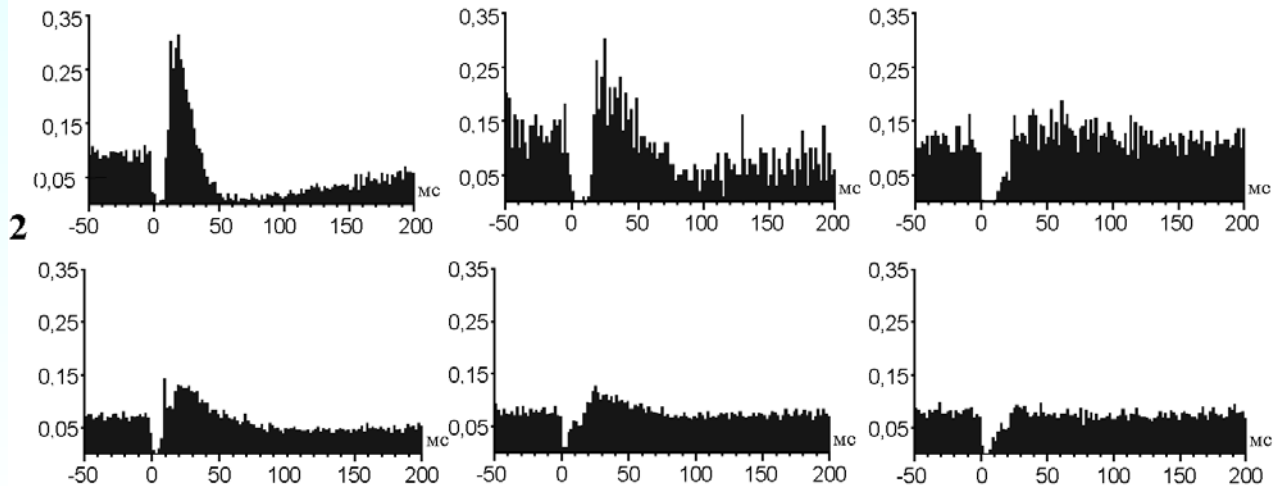
АКГ простых импульсов

Слайд 26. Усредненные АКГ простых импульсов (1б) ККГ (2б) между СИ и ПИ для всех КП со сложными импульсами данного типа

1, б



2, б



Слайд 27. Параметры активности КП со сложными импульсами быстрого, промежуточного и медленного типов

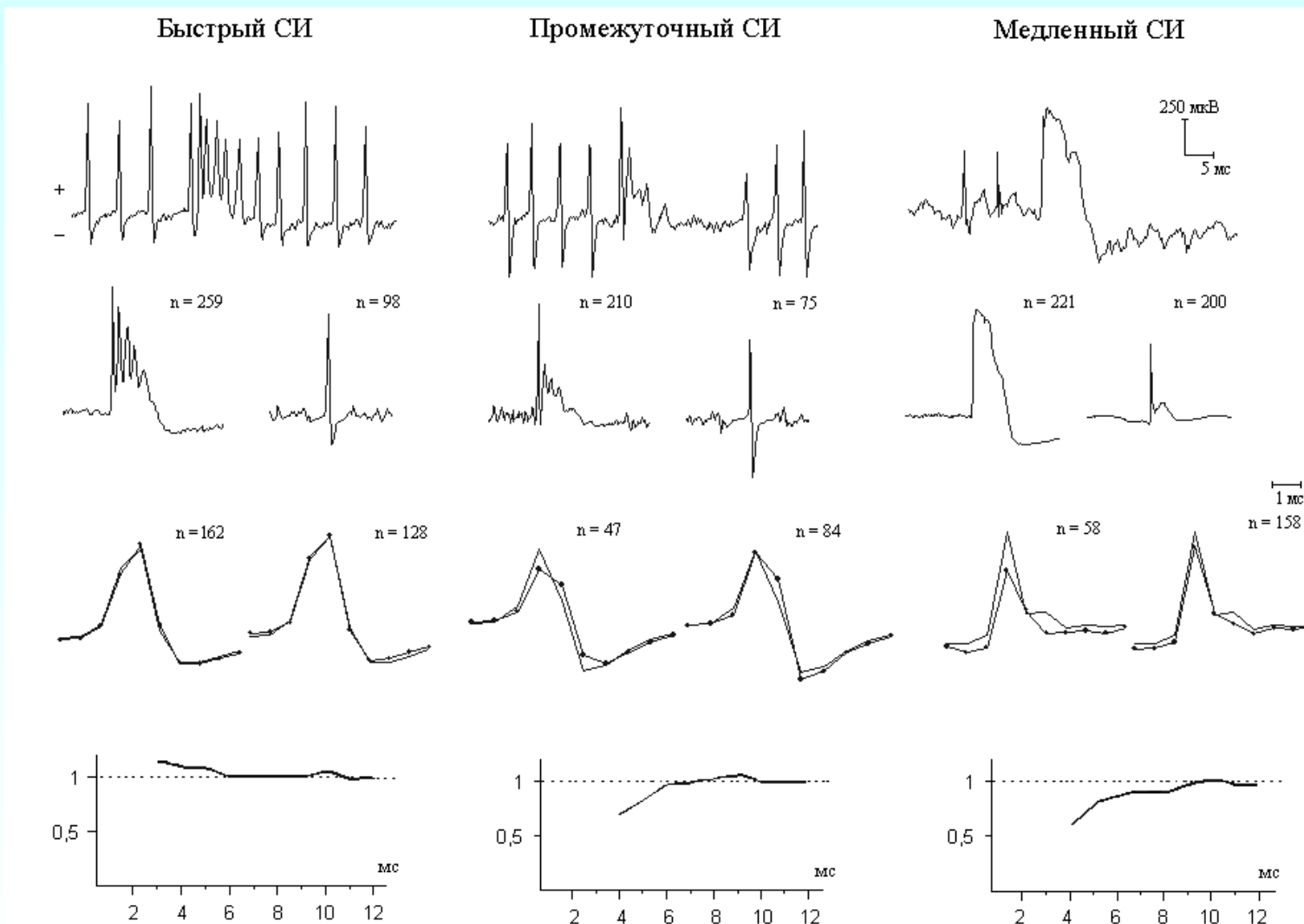
Параметры активности		Тип сложного импульса		
		Быстрый n=11	Промежуточный n=19	Медленный n=14
СИ	Длительность, мс.	7,79±1,54	8,45±1,63	10,60±2,40
	Частота, Гц	1,06±0,50	1,09±0,29	0,93±0,45
ПИ	Частота, Гц	64,65±34,97	56,28±27,28	62,43±28,98
	Длительность инактивации после СИ, мс.	21,22±10,00	18,32±6,50	35,31±24,07
	Интенсивность активации после СИ, отн.ед.	2,81±1,64	1,75±0,85	1,26±0,52
	Интенсивность активации в АКГ ПИ, отн.ед.	3,09±2,12	1,63±0,51	1,45±0,36
	Латентный период пика АКГ ПИ, мс.	9,25±2,95	8,71±3,37	9,12±3,94

Слайд 28. Свойства простых импульсов у КП с разными типом сложных импульсов

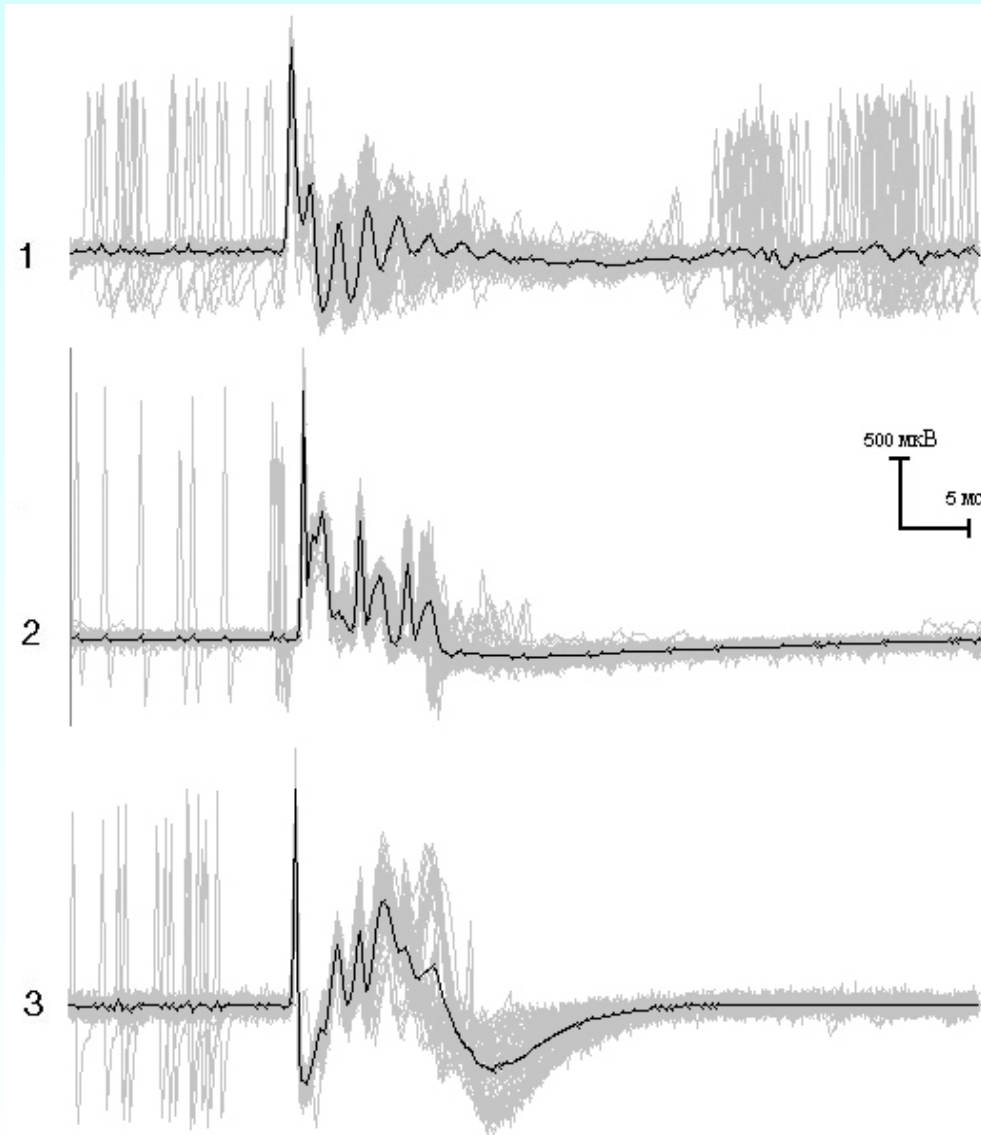
Фрагменты активности

Усредненные СИ и ПИ

Динамика амплитуды ПИ



Слайд 29. Пример динамики компонент СИ у КП быстрого, промежуточного и медленного типов (1-3)

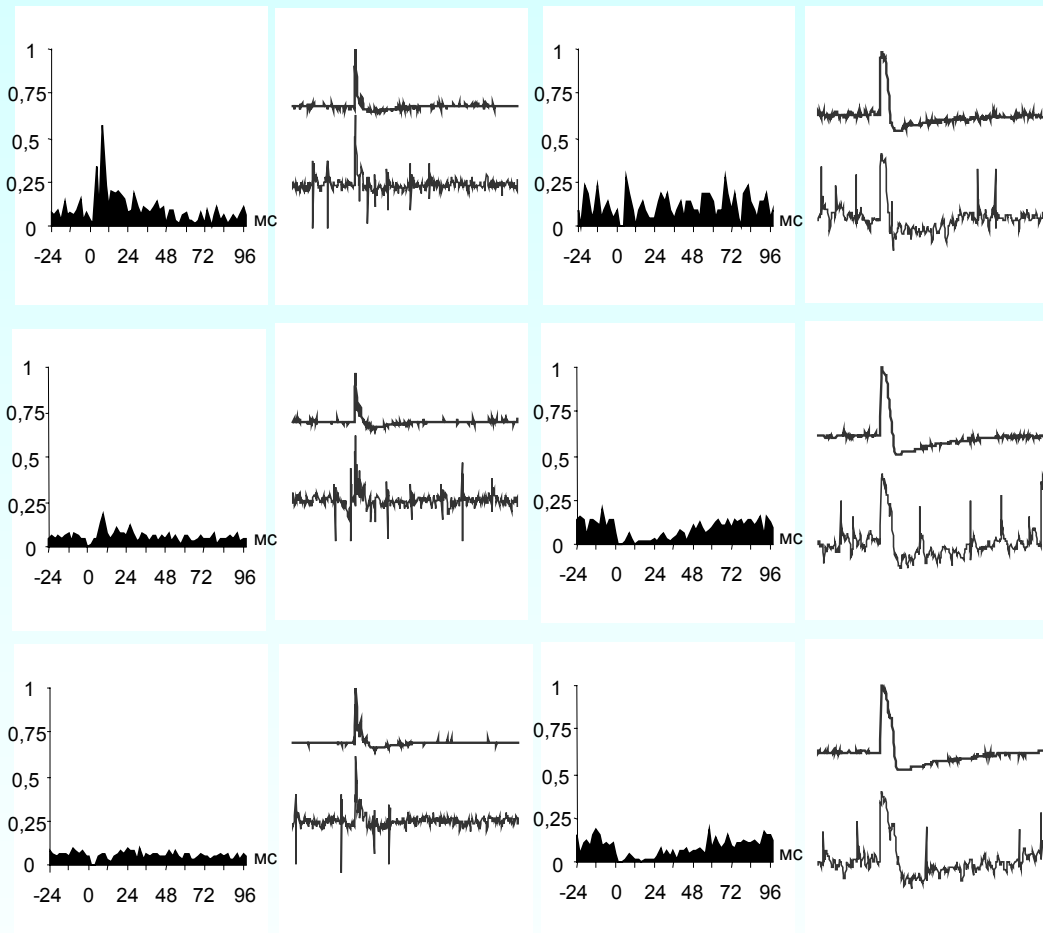


Отдельные регистрации
совмещены по начальному
фронту СИ; темные линии -
усредненные СИ; светлые
линии -- потенциалы в
исходных регистрациях

Слайд 30. Пример активности КП быстрого и медленного типов при увеличении длительности их СИ (сверху вниз)

ККГ между СИ и ПИ

Фрагменты активности



Быстрая КП

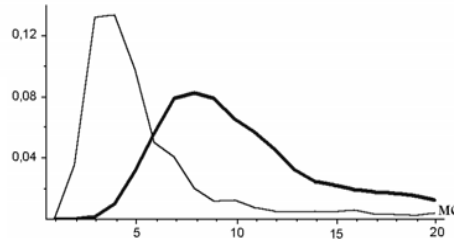
Медленная КП

Слайд 31. Параметры активности одних и тех же КП в зависимости от длительности их сложных импульсов

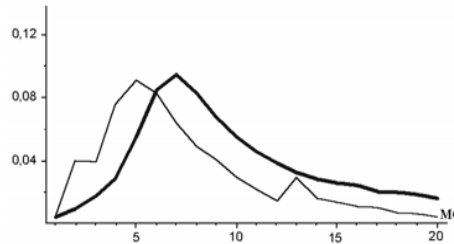
Параметры активности		Выборки сложных импульсов	
		Короткий	Длительный
Сложный импульс	Длительность СИ, мс	8,35±3,92	10,92±4,322
	Количество компонент СИ	2,68±1,15	3,84±1,48
	Амплитуда основного колебания СИ, мкВ	727,20±208,07	782,40±259,33
	Амплитуда плато-потенциала, мкВ	135,30±80,38	165,60±104,86
Активность простых импульсов после СИ	Длительность инактивации, мс	21,6±12,33	41,54±41,63
	Интенсивность коротко-латентной активации	2,75±3,644	1,656±3,06

Слайд 32. Сводное распределение интервалов между ПИ

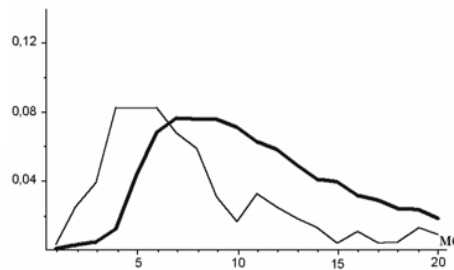
**Быстрые
КП**



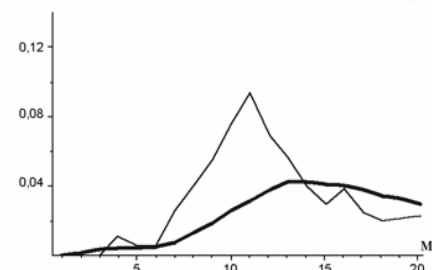
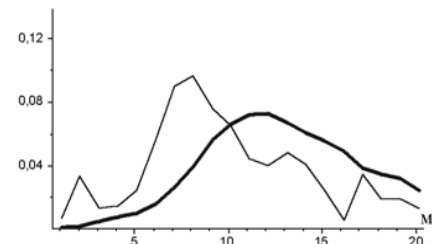
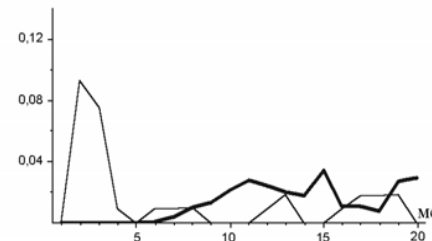
**Промежуточные
КП**



**Медленные
КП**



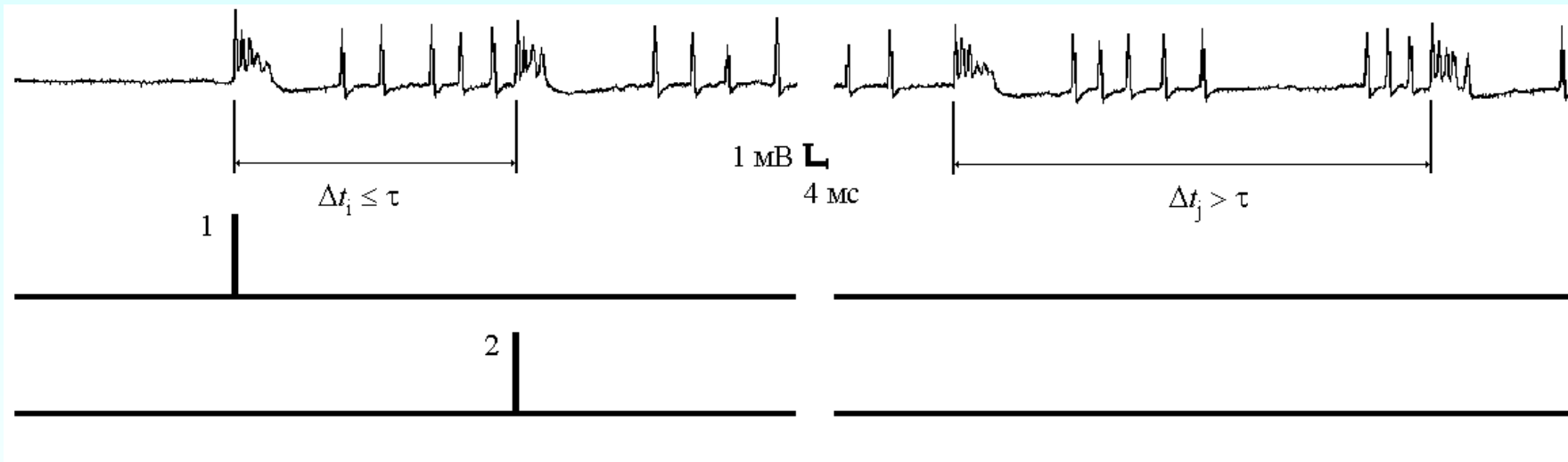
**КП со средним
интервалом в фоне
до 10 мс**



**КП со средним
интервалом в фоне
ПИ более 10 мс**

**Темные линии –
до СИ, светлые
за период 20-70 мс
после СИ**

Слайд 33. Два фрагмента активности клетки Пуркинье и схема выбора пар импульсов с интервалом в определенном временном окне

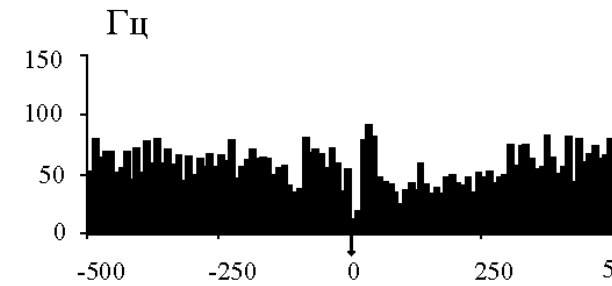
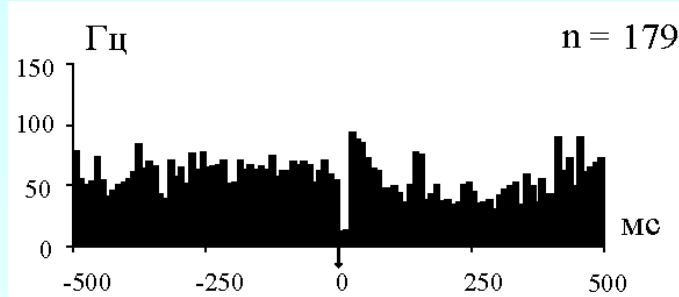


Есть событие

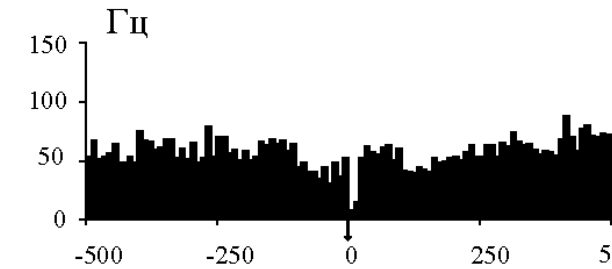
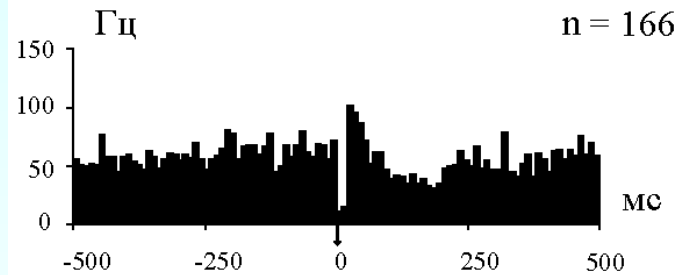
Нет события

Слайд 34. Динамика взаимодействия сложных и простых импульсов у одной и той же КП в зависимости от интервала между СИ

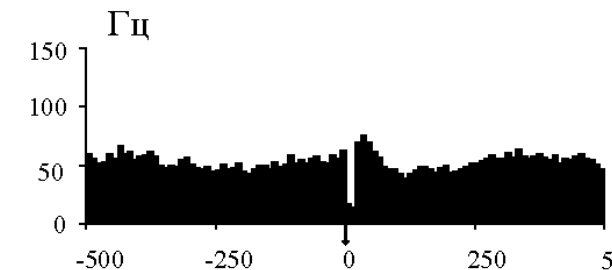
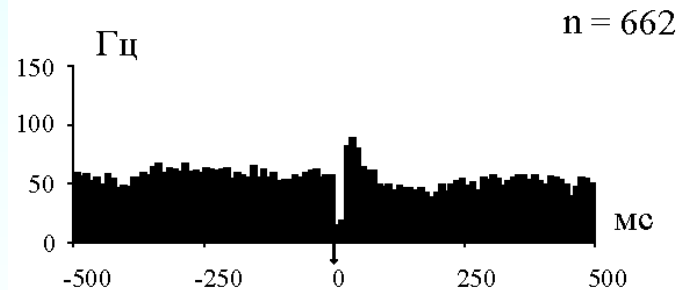
Интервал между СИ до 150 мс



Интервал между СИ 151 мс - 250 мс



Интервал между СИ 251 мс - 500 мс



Первый СИ

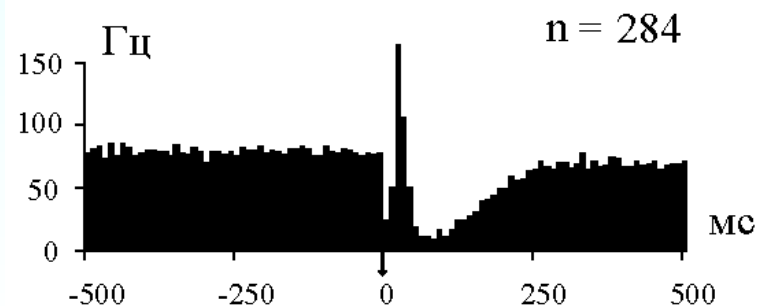
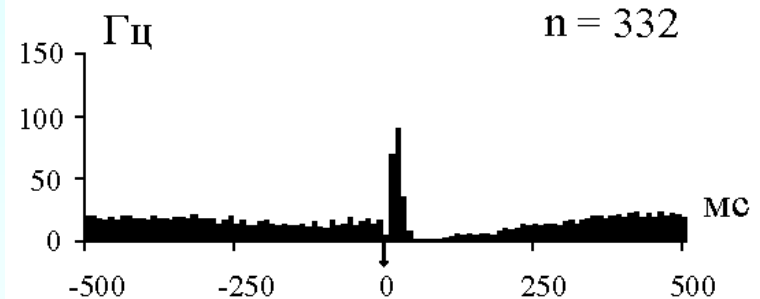
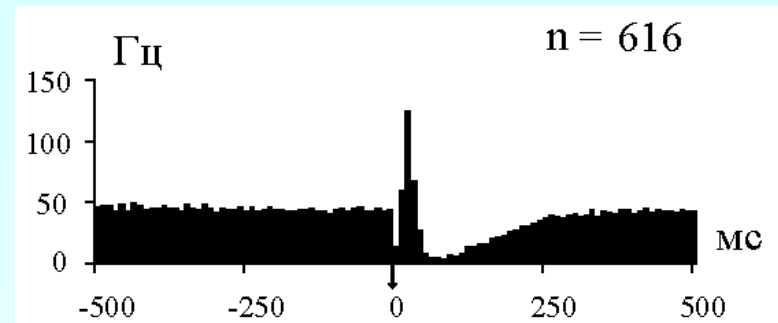
Второй СИ

Слайд 35. Динамика взаимодействия сложных и простых импульсов у одной и той же КП в зависимости от частоты фоновой активности ПИ

Усредненная ККГ без дополнительных условий

ККГ при дополнительном условии: частота ПИ в окне 500 мс до СИ ниже средней

ККГ при дополнительном условии: частота ПИ в окне 500 мс до СИ выше средней



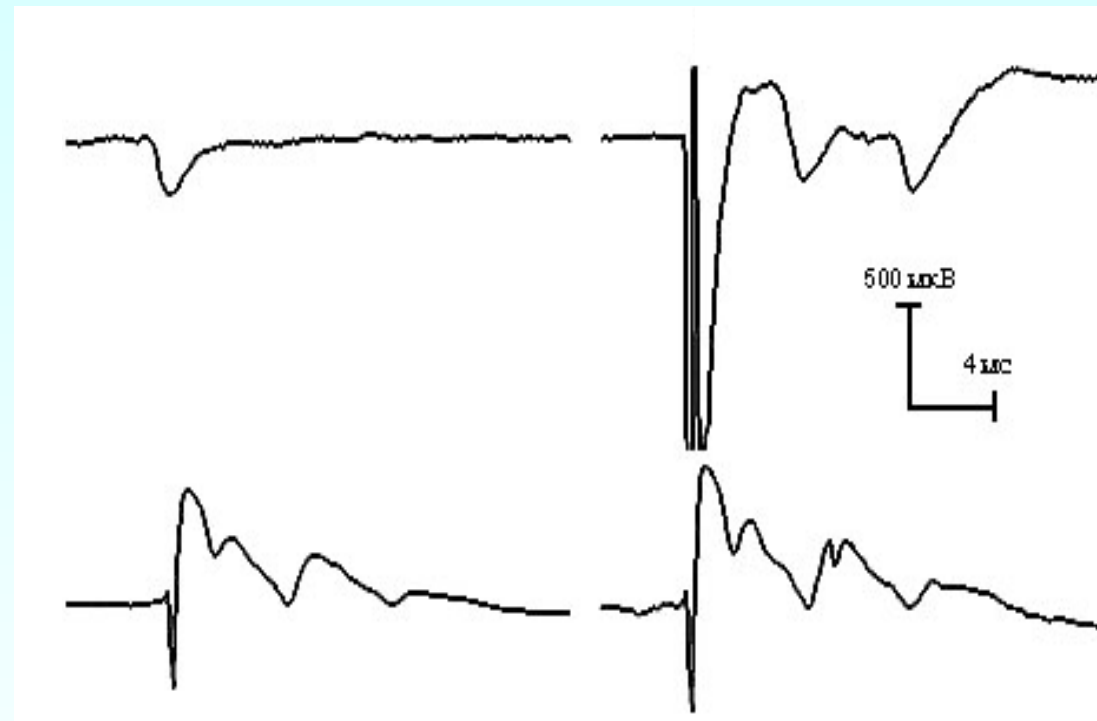
Слайд 36. Динамика формы СИ у одних и тех же КП (1,2) в условиях фоновой активности и при стимуляции

Стимуляция
молекулярного
слоя коры
мозжечка

(1)

Тактильная
стимуляция

(2)



Фоновая
активность

Стимуляция

ВЫВОДЫ

- **1. Клетки Пуркинье-близнецы по отношению к входам лианых волокон найдены**
- **2. Благодаря специально разработанной технике проведения эксперимента их в том или ином виде удастся регистрировать практически в каждом опыте**
- **3. Предположения о возможной функциональной идентичности КП-близнецов не подтвердились, поскольку они оказались существенно гетерогенны по всем проявлениям активности**

ВЫВОДЫ

- **4. С помощью КП-близнецов получена группа новых фактов. Они позволили объяснить ряд противоречий в известных экспериментальных данных о нейронных механизмах взаимодействия входов ЛВ и ПВ на уровне КП коры мозжечка**
- **5. Из полученных результатов вытекают основные задачи перспективных исследований:**
 - – изучение иерархии феноменов variability активности КП, ее возможных механизмов и функциональной роли
 - - изучение механизмов интеграции активности гетерогенных нейронов в их функциональных группах