

ACTIVITY-RELATED CHANGES IN EXTRACELLULAR ρH , K^+ AND VOLUME: ROLE OF GLIA IN ION HOMEOSTASIS IN SPINAL CORD

E. Sykova, A. Chvatal, P. Jendelova, J. Svoboda

Laboratory of Neurohumoral Regulation, Institute of Physiological
Regulations, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague, Czechoslovakia

The microenvironment of nerve cells is usually identified with the extracellular space (ECS). The close proximity of neuronal elements in the CNS and the narrowness of the intercellular spaces provide a basis not only for interaction between the cells themselves, but also between the elements and their microenvironment. Chemical substances, ions, neurotransmitters and enzymes which can cross the cell membranes can easily find their way through the ECS to adjacent cellular elements. In this way the microenvironment can assure non-synaptic communication between the neurones and between neurones and glia. We studied the ionic changes in the neuronal microenvironment, including changes in the extracellular ρH (ρH_o), their mechanisms, and the possible role of glia in ion homeostasis and in dynamic changes in the ECS volume.

The ionic and volume changes were studied by means of double-barrel ISMs. Using the method of Nicholson and Phillips (1) the ECS volume fraction (α) and its tortuosity (λ) were measured using the modified diffusion equation to which α and λ were introduced. Volume fraction is synonymous with the ECS volume and tortuosity is a measure of the total path length that a diffusing particle travels because of the presence of obstructions in ECS. The α and λ were calculated from the diffusion measurements in spinal cord and in agar (free diffusion). The iontophoretic pipette filled with tetramethylammonium chloride (TMACl) and K^+ -ISM were glued together (tip distance 80-200 μm) and inserted into the spinal cord. The K^+ -ISM are about 600 times more sensitive to TMA^+ than to K^+ . Since cellular membranes have a low permeability for TMA^+ , their concentration is inversely proportional to the volume of ECS. The TMA^+ concentration changes were measured during iontophoretic injections with constant current pulses applied at constant intervals before and after a stimulation and the changes in ECS volume were calculated.

In spinal cord the activity-related $[K^+]_o$ rises to 5-9 mM, and its clearance is largely attributed to the Na/K pump activity (2). In experiments in vivo as well as in vitro the stimulation-evoked increase in $[K^+]_o$ was accompanied by triphasic alkaline-acid-alkaline changes in pH and by decrease in $[Ca^{++}]$ activity (3, 4). The ionic changes had a typical depth profile in the spinal dorsal horns which corresponded to stimulation evoked neuronal excitation.

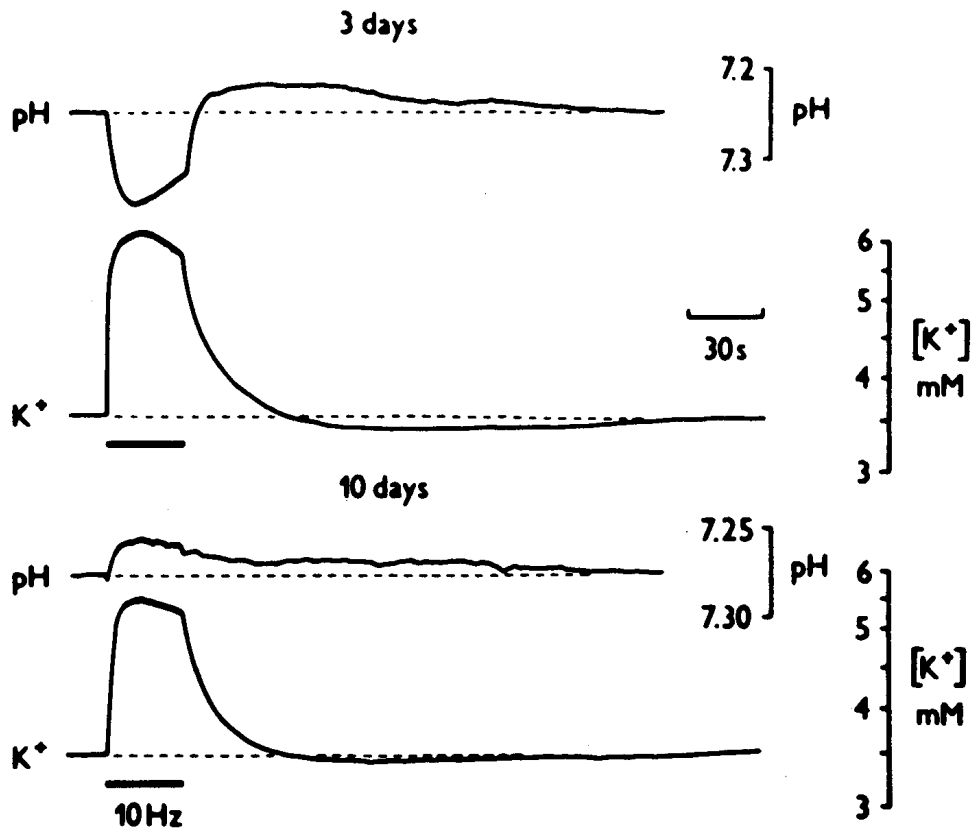


Fig. 1. pH_o and $[K^+]_o$ changes in the isolated rat spinal cord evoked by repetitive electrical stimulation (10 Hz, 30 s) of a dorsal root. Recordings from a depth 200 μm in the spinal cord of a 3-day-old and a 10-day-old animal.

Besides active K^+ uptake by the Na/K pump it has been suggested that the glial spatial buffer mechanism in the mammalian brain implements K^+ redistribution much more efficiently than K^+ diffusion in the ECS (5, 6, 7). In the spinal cord the glial cells are well shaped for spatial buffering, since they form a syncytium and processes from the intermediate region to

the surface of the cord (8). Our experiments on isolated spinal cord of the frog suggest that the glial cell spatial buffer mechanism contributes to the clearance of the stimulation-evoked increase in $[K^+]_o$, since clearance was slowed down in high pCO_2 . This procedure decreased glial electrical coupling and glial spatial buffering of K^+ . In high pCO_2 the clearance of K was slowed down and the regions where K accumulated were more restricted (8).

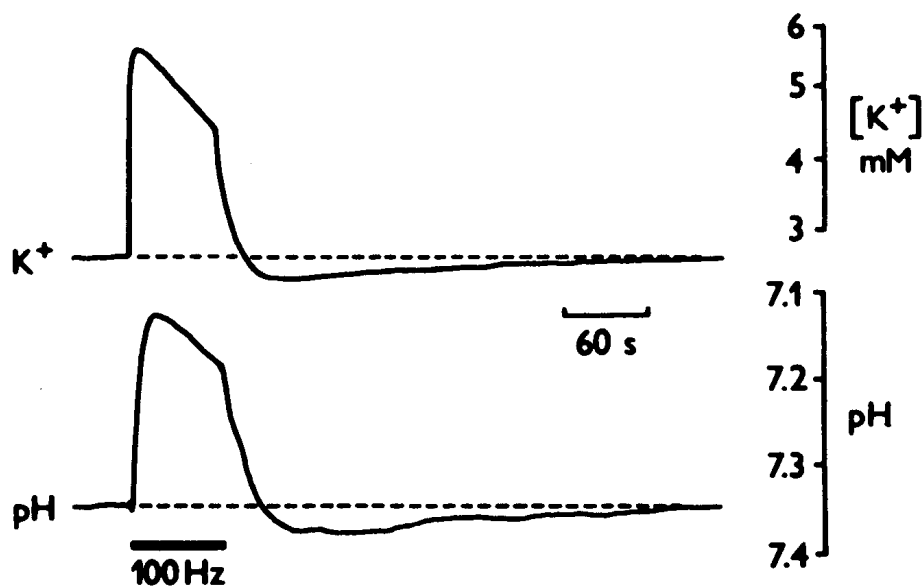


Fig. 2. $[K^+]_o$ and pH_o changes in the dorsal horn of segment L4 of an adult rat spinal cord. Repetitive bipolar electrical stimulation with acupuncture needles (100 Hz, 60 s) in the plantar muscles of the ipsilateral hind paw.

In the neonatal spinal cord isolated from 1-3-day-old pups where gliogenesis is not yet complete, the stimulation-evoked changes in $[K^+]_o$ were significantly larger than in adult animals. In the dorsal horn, a single orthodromic stimulus increased $[K^+]_o$ by 1.5-2.0 mM from a base line of 3.5 mM and the poststimulation K^+ undershoot was not present after stimulation has been discontinued. With repetitive stimulation the $[K^+]_o$ reached the ceiling level of 6-7 mM and when stimulation ended the $[K^+]_o$ returned to the original base line and the K^+ undershoot occurred, similarly as in adult animals (Fig. 1). We conclude that in the immature rat spinal cord the Na/K pump plays an important role in $[K^+]_o$ recovery after the

stimulation. However, the dynamics of $[K^+]_o$ evoked by single electrical stimuli may depend upon glial development as has been demonstrated in the immature optic nerve (9) and in the cerebral cortex (10). The glial cell spatial buffer mechanism may be important for the diffusion of K^+ from its source to more remote areas during repetitive stimulation.

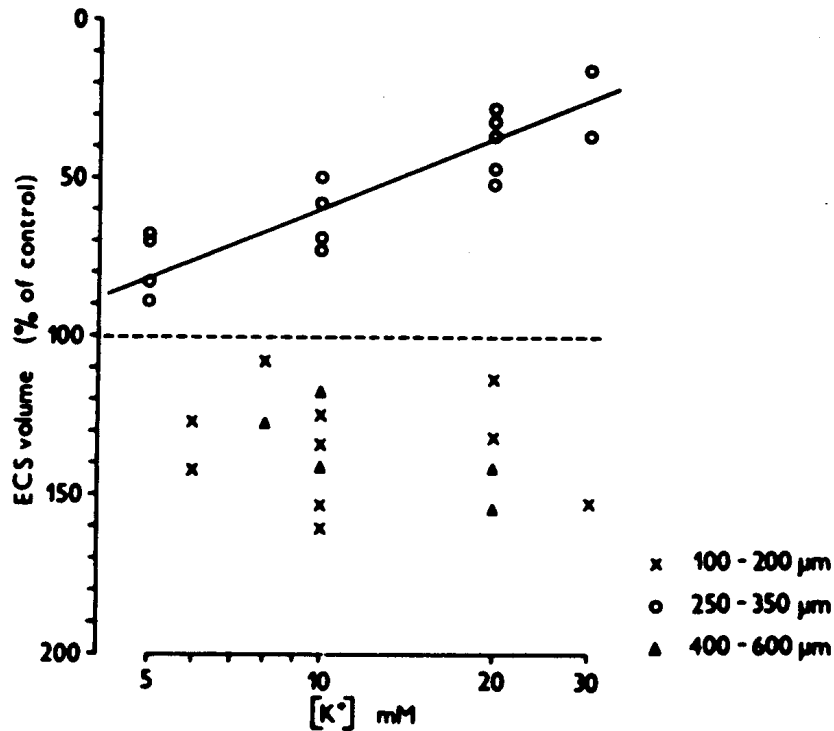


Fig. 3. ECS volume changes at different depths of the dorsal horns of an isolated frog spinal cord during its perfusion with Ringer solution with a raised K^+ concentration (6, 8, 10, 20 and 30 mM). The size of the ECS in 3 mM represents 100%. At a depth of 250-350 μm ECS volume decreases, while in the superficial layers (100-200 μm) and the deep layers (400-600 μm) it increases.

In adult rats, repetitive electrical stimulation of a peripheral nerve evoked transient pH_o changes, consisting of a rapid initial alkaline shift by 0.01 pH units which was followed by a prolonged acid shift of about 0.2 pH units (Fig. 2). The latency of the initial alkaline shift corresponded to the rise in K^+ and Ca activity. The acid phase reached a plateau after 15-20 s of stimulation, i.e. it had a slower rise time than the increase in K^+ activity which reached a plateau after 6-9 s. When stimulation was discontinued, the pH_o returned to the base line with a similar time course

as the simultaneously recorded K^+ and Ca^{++} transients. The poststimulation K^+ undershoot recorded in the rat spinal cord in vivo, was associated with an alkaline shift below the original pH_o base line by 0.02-0.03 pH units (Fig. 2). Various inhibitors of enzymatic activity and of ion transport were used to study pH homeostasis. We found that the amiloride sensitive Na^+/H^+ exchange, furosemide sensitive K^+-Cl^- co-transport, ouabain sensitive Na^+/K^+ pump activity, SITS sensitive Cl^-/HCO_3^- -exchange and acetazolamide sensitive carbonic anhydrase play an important role in pH_o homeostasis.

Recently, it has been demonstrated that the relatively alkaline pH of glial cells is due to at least two mechanisms, Na^+/H^+ exchange and electrogenic Na^+/HCO_3^- -cotransport (11, 12). It is therefore reasonable to assume that glial cell may buffer the activity-related shifts in pH_o . Our experiments on the isolated immature spinal cord of the rat showed that glial cells in the spinal cord can play an important role in buffering the pH_o shifts evoked by stimulation. The typical pH_o changes in the mature spinal cord are the alkaline-acid-alkaline shift, with the acid shift dominance (Fig. 2). However, in 1-3-day-old pups the acid shift is diminished and the initial alkaline shift is, therefore, enhanced (Fig. 1). The acid shift become pronounced in about 9-10-day-old pups, presumably in connection with an increase in the number of glial cells. The role of the glia in buffering the alkaline changes in the ECS is supported by experiments on the isolated frog spinal cord. The initial alkaline shift was enhanced by acetazolamide (3) in HEPES buffered Ringer solution to which we added SITS or DIDS.

The cell swelling and the ECS volume decrease accompany ionic changes in dorsal horns of frogs (13) and rats (14). The α and λ found in the unstimulated spinal cord were $\alpha=0.24\pm 0.01$ and $\lambda=1.54\pm 0.04$ ($n=21$). The values does not significantly differ at various depths in dorsal horns. The α after the repetitive electrical stimulation decreased to about 13%, the λ was not significantly changed. The transient decrease in ECS volume was maximal at sites where the disturbances in ion homeostasis were largest. The ECS shrinkage increased with the stimulation frequency, intensity and duration. When the stimulation was discontinued, the volume recovered during 20-60 min. The block of synaptic transmission by Mn^{++} , K^+ depolarization, block of Na^+/K^+ pump activity by ouabain, and the

acidification or alkalinization of the ECS, significantly affected ECS volume changes in the isolated frog spinal cord.

It was shown that in the nervous tissue, neuronal, nerve fibre and glial cell volume can increase at the expense of the ECS. We do not know the proportion of the volume increase in the individual elements during neuronal activity. The molecular mechanisms of volume changes in the neuronal elements and glia are likewise probably different. Ransom et al. (15) demonstrated a decrease in ECS volume in the optic nerves of adult rats during stimulation, but not in the nerves of newborn rats which are not yet myelinated. The activity-related decrease in the ECS volume may be partly due to enlargement of glial cell volume mediated by the spatial buffer mechanism. The stimulation or K^+ evoked ECS volume decrease in the isolated frog spinal cord developed only in the area of stimulated interneurons in the lower dorsal horn, while in the upper dorsal horn and in the ventral horn the ECS volume increased (Fig. 3). The possible explanation of our findings is that ion shifts lead to an increase in glial cell volume in the close vicinity of the stimulated neurones and to a decrease of their volume in more remote areas where the concentration is low.

It is clear from existing studies that the glial cells are important for extracellular ion homeostasis and in the regulation of ECS volume. Nevertheless, their participation in the observed dynamic activity-related changes requires further studies.

REFERENCES

1. Nicholson C., Phillips J. M. *J. Physiol.*, 1981, 321, 225-257.
2. Sykova E. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 1983, 42, 135-189.
3. Chvatal A., Jendelova P., Kriz N., Sykova E. *Physiol. Bohemoslov.*, 1988, 37, 203-212.
4. Sykova E., Svoboda J. *Brain Res.*, in press, 1989.
5. Orkand R. K., Nicholls J. G., Kuffler S. W. *J. Neurophysiol.*, 1986, 29, 788-806.
6. Gardner-Medvin A. R. *J. Physiol.*, 1983, 335, 353-374.
7. Coles J. A., Orkand R. K., *J. Physiol.*, 1983, 340, 157-174.
8. Sykova E., Orkand R. K., Chvatal A., Hajek I., Kriz N. *Pflugers Arch.*, 1988, 412, 183-187.
9. Ransom B. R., Yamate C. L., Connors B. W. *J. Neurosci.*, 1985, 5, 532-535.
10. Mutani R., Futamachi K. J., Prince D. A. *Brain Res.*, 1974, 75, 27-39.

11. Astion M. L., Orkand R. K. *Glia*, 1988, 1, 355-357.
12. Deitmer J. W., Schlue W. R. *J. Physiol.*, 1989, 411, in press.
13. Sykova E. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 1987, 65, 1058-1066.
14. Svoboda J., Sykova E. *Acta Physiol. Scan.*, 136, 86.
15. Ransom B. R., Carlini W. G., Connors B. *Ann. New York Acad. Sci.*, 1985, 481, 87-105.

ИЗМЕНЕНИЯ ВНЕКЛЕТОЧНОГО рН, К⁺ И ОБЪЕМА, СВЯЗАННЫЕ С АКТИВНОСТЬЮ: РОЛЬ ГЛИИ В ИОННОМ ГОМЕОСТАЗЕ СПИННОГО МОЗГА

Е. Сыкова

Институт физиологических регуляций Чехословацкой Академии наук,
лаборатория нейрогормональной регуляции, Прага, Чехословакия

ДИСКУССИЯ

К а р в о с к и. Клаус Баллани показал в лаборатории Шлю, что ТМА+ТЕА быстро поглощаются глиальными клетками пиявки. ТМА быстро поглощается эпителиальными клетками позвоночных. Не могут ли регистрируемые изменения активности быть вызваны поглощением ТЕА, а не изменениями во внеклеточном пространстве.

С ы к о в а. Мы не можем исключить некоторого поглощения ТМА, но я думаю, что в наших экспериментах на спинном мозге крыс и лягушек проникновение ТМА в глию в течение 50-60 сек аппликации не играет существенной роли. Никольсон и Филлипс (1981) показали, что поглощение в этот период незначительно. Более того, мы получили такие же результаты при ионофоретической аппликации холина. Мы также обнаружили сходные изменения относительно объема внеклеточного пространства в течение лишь 5 сек аппликации ТМА, ТЕА и холина.

Ш л ю. Каков механизм вызываемых изменений объема в ваших препаратах?

С ы к о в а. Механизм зависимых от активности изменений объема непростой. Мы можем в конечном счете учесть 3 механизма, которые могут участвовать в рассматриваемых изменениях объема, т.е. в набухании клетки и в компенсаторном уменьшении объема внеклеточного пространства. Изменения объема могут быть результатом: 1) конформационных изменений белков; 2) метаболической активности; 3) процессов транспорта через мембрану. Также как и другие (Ренсом и др., Никольсон и др.) мы обнаружили, что изменения объема прямо зависят от ионных изменений во внеклеточном пространстве (в частности, изменений К⁺ и рН) и от развития глии. Различные системы мембранного

транспорта, участвующие в регуляции K^+ и рН, также могут участвовать в регуляции объема и изменениях объема. Например, подавление транспорта KCl с помощью фуросемида влияло на изменения объема. После аппликации оубаина изменения объема, индуцированные стимуляцией, удвоились. Мы изучаем участие других транспортных систем (Na^+/H^+ обмен и Na^+/HCO_3^- -котранспорт).

Л е м е н к ю л л е р. Исходя из Ваших исследований, Вы наблюдали депрессию начального щелочного сдвига рН от La^{3+} . Наблюдали ли Вы также влияние La^{3+} на сужение внеклеточного пространства?

С ы к о в а. Нет, мы не изучали влияния La^{3+} на изменения объема внеклеточного пространства.

Р я б о в. Каков механизм уменьшения межклеточного объема, какими клеточными элементами это обеспечивается?

С ы к о в а. Это важный вопрос - с чем связаны рассматриваемые изменения объема: с набуханием нейронов или набуханием глиальных клеток. При различных экспериментальных условиях было показано, что оба элемента (нейроны и глиальные клетки) могут менять свой объем. В течение стимуляции объем внеклеточного пространства увеличивается, вероятно в связи с уменьшением объема активированных нейронных элементов, как показал Графе и сотр. в мотонейронах. Мы обнаружили, что уменьшение объема внеклеточного пространства после стимуляции имеет как пресинаптическую, так и постсинаптическую природу, т.е. оно может быть частично блокировано блокаторами Ca^{++} каналов. Указание на набухание глиии состоит в том, что уменьшение объема внеклеточного пространства не имеет места в спинном мозге незрелых крыс, где глиогенез не завершен полностью. Более того, пространственное распределение изменений объема, вызванных аппликацией K^+ , указывает на сморщивание глиальных клеток, связанное с механизмом пространственного буфера K^+ .

С о т н и к о в. Можно ли, по Вашему мнению, обнаружить динамику объема межклеточного пространства при электростимуляции с помощью электронной микроскопии?

С ы к о в а. Да, я думаю, что это возможно. Уменьшение объема внеклеточного пространства продолжается в течение многих минут, особенно после повторной электростимуляции. После периферического повреждения оно продолжается 1-2 часа.

С о т н и к о в. Нами опубликованы данные о локальном сужении межклеточной щели с образованием плотных контактов при синаптической электроактивации. О каком-либо значительном тотальном сужении нейрит-глиальной щели наверное говорить не приходится.

С ы к о в а. Будет трудно увидеть сужения в уже очень узкой щели. Может быть Вы сможете увидеть, не происходит ли набухания аксонов или глиальных клеток во время стимуляции.

АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ ГРУЗИЯ
ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF GEORGIA
ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ им. И. С. БЕРИТАШВИЛИ
I. S. BERITASHVILI INSTITUTE OF PHYSIOLOGY

ФУНКЦИИ НЕЙРОГЛИИ

ТРУДЫ МЕЖДУНАРОДНОГО СИМПОЗИУМА

Под редакцией А. И. Ройтбака и И. В. Очерашвили

FUNCTIONS OF NEUROGLIA
PROCEEDINGS OF THE INTERNATIONAL SYMPOSIUM

Edited by A. I. Roitbak and E. V. Ocherashvili

Москва
Издательство "Кабур"
1993



Moscow
The Publishing House "Kabur"
1993