

В.А. Яворський, О.О. Лук'янець

Використання серійних тахограм для дослідження викликаної імпульсної активності ізольованих нейронів гіпокампа

При тривалому відведенні мембранного потенціалу від ізольованих нейронів гіпокампа, досліджувалися зміни їх генераційної активності у часі. Описано використання тахограм для оцінки електричної активності та запропоновано використання серійних тахограм, аналіз яких дає змогу підвищити достовірність результатів. Виділено три фази зміни імпульсної активності ізольованого нейрона в процесі експериментальної реєстрації: фаза посилення активності, фаза стабільної активності і фаза спаду активності. Встановлено, що в умовах перфорованого patch-clamp фаза стабільної активності починається через 10÷15 хв після отримання цільного контакту та має середню тривалість 30 хв. Показано, що використання серійних тахограм та фаз розвитку активності підвищує якість оцінки значень міжімпульсних інтервалів при вимірюванні імпульсної генерації нейронів. Ключові слова: нейрони гіпокампа, перфорований patch-clamp, потенціал дії, гіпокамп, акомодация, міжімпульсний інтервал.

ВСТУП

При вивченні впливу експериментальних факторів на вихідну активність нейрона переважно реєструють зміни у послідовностях генерованих нейроном потенціалів дій (ПД), тоді як випадки застосування альтернативних оцінок поодинокі [1]. Зазвичай вираховують часові відліки моментів генерації, на основі яких будують різноманітні похідні оцінки з урахуванням декількох гіпотез про принципи кодування інформації нейроном [5, 7]. Різнопланові оцінки імпульсної активності в дослідженнях різних авторів вказують на недостатню розробку підходів і методик вимірювань активності нейронів, але навпаки, викликають багато запитань щодо методології підходу до опису імпульсної активності [6]. Загальною проблемою є те, що за однакових умов стимуляції послідовності ПД (що складаються з міжімпульсних інтервалів при одному стимулі деполяризації) ізольованого нейрона можуть істотно різнитися в

двох послідовних тестах, тому достовірність отримуваних результатів зазвичай досягається тільки багаторазовим тестуванням. Однак лише у частині дослідів проводяться повторні реєстрації відповідей нейронів та практично не оцінюється похибка кількісно вимірюваних ознак активності. Відповідно, оцінка імпульсної генерації може набутися суттєвих відхилень, що ставить під сумнів надійність висновків, які робляться дослідником.

У цій роботі пропонуються методичні підходи для отримання та оцінки імпульсної активності нейронів в умовах тривалої реєстрації на прикладі дослідження акомодційних властивостей ізольованих нейронів гіпокампа в конфігурації «перфорований patch-clamp».

МЕТОДИКА

Ізолювання нейронів зони CA1 гіпокампа. Методика отримання ізольованих нейронів гіпокампа щурів у цілому відповідала описаній у

наших попередніх працях [2, 8, 9]. Тварин (30 щурів 14-добового віку) декапітували після анестезії ефіром; мозок швидко витягували та переносили в холодний (4 °C) розчин А. Зрізи гіпокампа товщиною 0,4–0,5 мм нарізали за допомогою леза та витримували 60 хв у розчині Б при кімнатній температурі (21–25 °C), розміщували їх на нейлоновій сіточці в камері; аерація середовища забезпечувалася карбогеном. Ферментативна обробка в розчині Б з 0,1% пронази (тип 23) і 0,1% трипсину («Sigma», США) тривала 20–35 хв без зміни температури середовища. Така послідовність обробки давала змогу при диспергуванні зрізів отримувати ізольовані нейрони потрібної зони, які зберігали невеликі частини апікальних і базальних дендритів і мали сому діаметром 15–20 мкм і довжиною 30–50 мкм.

Розчини та реактиви. Розчин А містив (в ммоль/л): NaCl – 120, KCl – 5, HEPES – 10, MgCl₂ – 1, CaCl₂ – 2, глюкози – 25. Розчин Б: NaCl – 125, KCl – 5, NaH₂PO₄ – 1,25, NaHCO₃ – 25, MgCl₂ – 1, CaCl₂ – 2, глюкози – 10. Склад піпеткового розчину був таким: цитрат калію трьохзамісний – 60, KCl – 20, HEPES – 10, MgCl₂ – 5; амфотерицин-В розчиняли в диметилсульфоксиді (DMSO) та додавали із розрахунку кінцевої концентрації 1 мг/мл. Всі речовини отримані від фірми «Sigma-Aldrich», США.

Електрофізіологічні відведення. Транс-мембранні струми та потенціали вимірювали з використанням стандартної методики patch-clamp в умовах перфорації ділянки клітинної мембрани під дією амфотерицину-Б [4, 9]. Склад позаклітинного розчину змінювали подачею необхідного розчину в камеру з одночасним відкачуванням надлишку перистальтичним насосом з іншого боку камери. Використовували програмне забезпечення «NewProg» (Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України) і підсилювача PC-ONE („Dagan Corp.”, США); мікропіпетки виробляли на пулері P97 („Sutter Instruments”, США).

Тестова серія складалась із 12 прямокутних стимулів тривалістю 2,5 с при підтримуваному потенціалі спокою нейронів –80 мВ. За такої тривалості деполяризації було можливо цілковито оцінити здатність нейронів до генерації (отримували в основному 20÷60 імпульсів ПД у відповідь на подразнення) та визначити показники стаціонарної активності після процесів акомодатії. Частина нейронів генерувала тільки упродовж 1–2 с у відповідь на деполяризацію, і застосований нами протокол давав змогу це виявити. В експериментах переважно використовували 5-секундний період стимуляції в серії для загальної тривалості серії в межах 1 хв. Триваліший період в серії потребував підвищеної уваги щодо зсуву потенціалу спокою та збільшував ризик зміни властивостей генерації клітин під час серійного тестування. Збільшення періоду стимуляції (до 10 с) незначно впливало на генераторну здатність нейронів, однак збільшувало час реєстрації до 2 хв, що не є виправданим.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Самовільні зміни імпульсної активності. Найбільш відомою зміною викликаного імпульсної активності нейрона у часі є акомодатійний ефект генерації, який виявляється у поступовому зменшенні частоти генерації ПД при постійному рівні деполяризації та, відповідно, збільшенні міжімпульсних інтервалів (МІ) на графіках тахограм. На рис. 1 цей ефект відображено загальною тенденцією до збільшення значень міжімпульсних інтервалів із збільшенням порядкового номера інтервалу, із більш швидким наростанням МІ на початку тестового стимулу.

Нами запропонована нова методика реєстрації імпульсної активності, при якій замість однієї тахограми ми записували їх серію. Такий підхід забезпечує більш точну характеристику імпульсної активності нейрона та її зміни. Ми виявили, що розмір МІ залежить від кількості раніше прикладених стимулів у

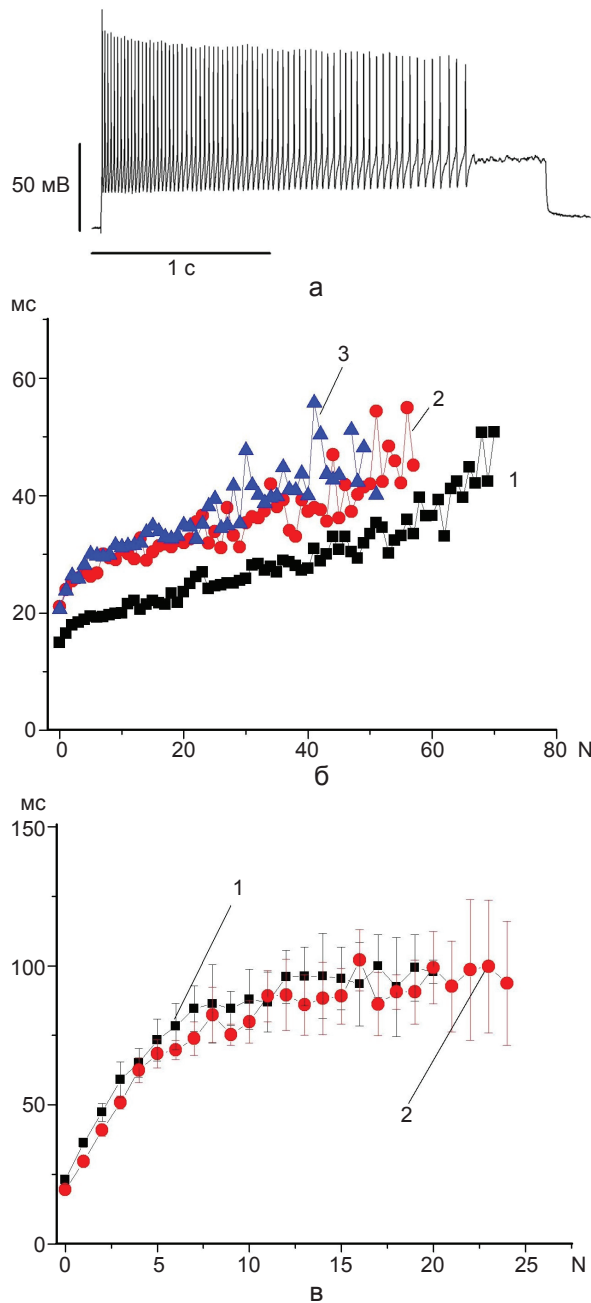


Рис. 1. Імпульсна генерація нейрона та її тахограмний аналіз: а – мембранний потенціал нейрона в умовах подразнення прямокутним стимулом струму 80 пА; б – імпульсна генерація в серії тестувань. За віссю абсцис – номер міжімпульсного інтервала; за віссю ординат – тривалість відповідних міжімпульсних інтервалів; 1, 2, 3 – послідовні тахограми в серії, інтервал між тестами 5 с; в – генерація при інтервалах стимуляції 5 с (1) та 10 с (2), МІ на тахограмах замінені на відповідні середні значення та стандартні відхилення по серії

серії. Значення МІ можуть збільшуватися в серії тестових стимулів, і, в основному, припиняють зростати тільки після двох–трьох тривалих деполяризуючих імпульсів у серії (див. рис. 1, б, криві 1–3 які зняті послідовно). Цей ефект є загальним і був нами зареєстрований у всіх 25 випадках відведень із застосуванням серій деполяризуючих стимулів. Збільшення МІ при другій реєстрації в серії відносно першої було в межах 5–50%. Тому при оцінці імпульсної генерації нейронів таку зміну активності ми враховували як додаткову акомодативну складову та виключали перші два записи із серії при аналізі тахограм. На рис. 1, б приведено порівняння значень першої та другої тахограм у серії в умовах деполяризуючого стимулу 80 пА із значним збільшенням тривалостей МІ на 50 %. Друга і наступні тахограми в серії достовірно не відрізнялися. В експериментах були застосовані такі показники стимуляції: тривалість стимулу становила 2,5 с, потім нейрон утримувався 2,5 с на коректованому рівні мембранного потенціалу -80 мВ, що блокувало самовільну генерацію; загалом застосовувався інтервал 5 с між реєстраціями в серії.

Подовження інтервалу між тестовими стимулами значно зменшувало ефект впливу серійної стимуляції на значення МІ. За результатами відведень від 2-х нейронів, збільшення інтервалу між реєстраціями в серії з 5 до 10 с зменшувало середні значення МІ на 6 мс (див. рис. 1, в). При подовженому інтервалі стимуляції перша та друга тахограми в серії достовірно не різнилися, проте загальна тривалість серії із 12 стимуляцій збільшувалася до двох хвилин.

Активність нейронів у серії стимуляцій могла супроводжуватися не тільки збільшенням значення МІ, але і зменшенням кількості ПД, які генеруються у відповідь на повторну деполяризацию. При серії прямокутних імпульсів з підвищеною амплітудою 100 пА (біля порогу пригнічення генерації) кількість генерованих ПД поступово зменшувалася

(рис. 2, а); цей ефект може бути відображений як послідовне зменшення кількості точок графіка МІ із збільшенням порядкового номера тахограми (див. рис. 2, б). Кількість ПД зменшувалася при повторній стимуляції з 63-х ПД до стаціонарного рівня в 20 ПД, в серії з 12 стимуляцій амплітудою 100 пА та тривалістю 2,5 с (див. рис 2, в). Такий ефект зменшення кількості генерованих ПД значною мірою залежав від підбору амплітуди деполяризації, при якій стимульована клітина генерує багато ПД і одночасно припиняє таку генерацію до кінця дії стимулу (див. рис. 2, а).

Імпульсна активність нейронів значно залежала від тривалості та умов експериментального відведення і могла мати специфічний характер. В умовах тривалої контрольної реєстрації ми завжди спостерігали поступове збільшення МІ при відведенні активності. Як показано на рис. 3, відбувається зростання значень тахограм активності нейрона у часі при тестовому стимулі 20 пА. У двох нейронів запис потенціалу вказав на припинення імпульсної активності у відповідь на тестовий стимул амплітудою 10 і 20 пА через 30 хв після старту експериментальної реєстрації. Імпульсна активність інших клітин послідовно збільшувалася залежно від умов подразнення: якщо тестові стимули мали амплітуду понад 50 пА, ми спостерігали зростання кількості викликаних ПД та, відповідно, точок послідовності МІ на тахограмах (див. рис. 3 б).

Усереднення тахограм імпульсної активності в серії тестових стимулів однакової амплітуди. Застосування тестової серії із 12 стимулів дає змогу більш точно визначити значення МІ. При аналізі сукупності тахограм для кожного номера МІ можуть бути статистично обчислені та відображені на графіках відповідні значення середньої амплітуди МІ, а також середньоквадратичне відхилення (дисперсія) або похибка.

Між деполяризаційними поштовхами струму нейрон утримували на рівні потенціалу -80 мВ в умовах нульового вхідного

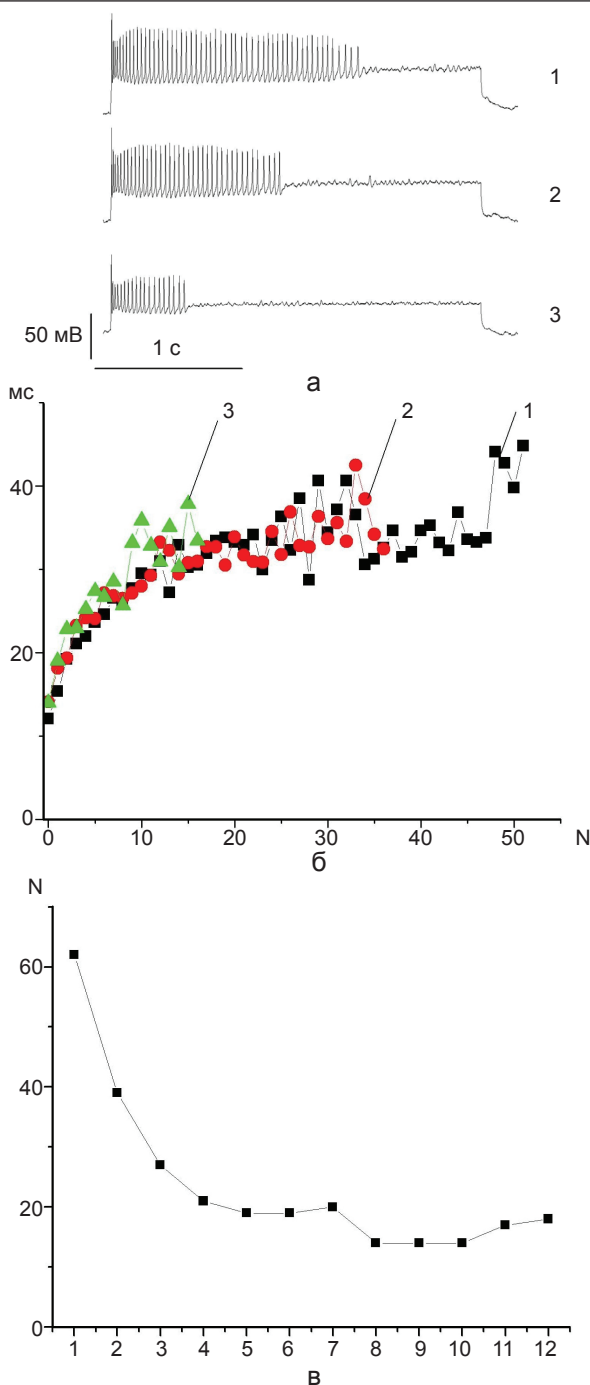


Рис. 2. Динаміка кількості викликаних потенціалів дії в умовах подразнення нейрона серією прямокутних тест-стимулів: а – мембранний потенціал нейрона в повторних стимуляціях, 1, 2 і 3-я реєстрації в серії; б – відповідні тахограми активності, позначення цифрами ті ж. За віссю абсцис – номер міжімпульсного інтервала; по осі ординат – тривалість відповідних міжімпульсних інтервалів; в – динаміка кількості ПД в серії. За віссю абсцис – кількість ПД; за віссю ординат – номер тест-стимулу в серії

струму, можливі самовільні повільні коливання потенціалу клітини коригували вручну під час відведення потенціалу. Невиконання такої процедури могло викликати суттєвий дрейф мембранного потенціалу клітини і навіть незначну імпульсну генерацію. Підтримуваний мембранний потенціал на рівні -80 мВ, з одного боку, є близьким до звичайного потенціалу спокою нейронів *in vivo*, а з

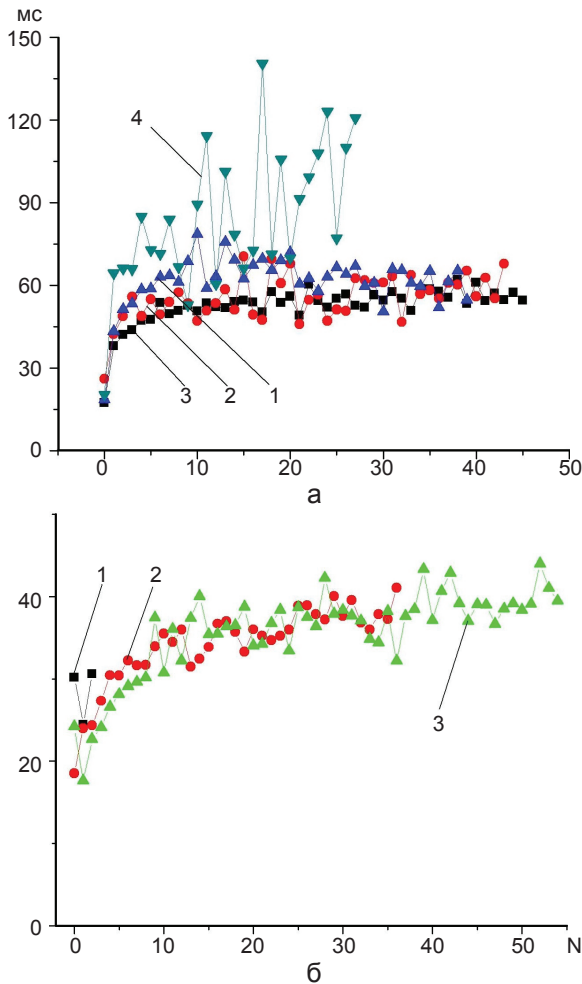


Рис. 3. Вплив часу на імпульсну активність нейрона в умовах тривалої контрольної реєстрації. За віссю абсцис – номер потенціалу дії; за віссю ординат – тривалість відповідних міжпікових інтервалів; а – імпульсна активність нейрона при деполяризації струмом 20 пА. 1, 2, 3, 4 – реєстрації на 0-й, 30-й, 60-й і 70-й хвилинах експериментального відведення відповідно; б – динаміка тахограм при тестовому стимулі 70 пА в контрольних умовах; 1, 2, 3 – реєстрації на 10-й, 30-й і 50-й хвилинах відведення відповідно

іншого – давав змогу запобігти самовільній активності, покращити точність одержуваних тахограм через зменшення похибки амплітуд МІ. При аналізі серії тестових стимулів ми обчислювали послідовності МІ для кожного поштовху струму. Оскільки не враховувалися дві початкові реєстрації в серії, ми вираховували «усереднену» тахограму із інших 10 послідовних тахограм.

Просте усереднення значень серії тахограм дає тахограму із значною дисперсією значень на графіку, тому ми застосовували попередній аналіз значень МІ. Так, при явищах пропуску генерації ПД, усереднення є некоректним, тому що порівнюються неоднорідні значення, отримані при різних паттернах генерації. Тому перед статистичним аналізом проводилася первинна обробка результатів для отримання вибірки даних, рівноцінних за генераційними властивостями. Поодинокі значення МІ, що були аномальними порівняно із загальною послідовністю МІ, вибраковувалися. Також майже завжди не брали до уваги дві початкові послідовності в серії, бо їх значення МІ були значно менше, ніж значення на наступних тахограмах. Статистичну обробку ми виконували тільки для тих порядкових номерів МІ, для яких число значень у різних тахограмах в серії було не менше 5 . З цієї причини відкидалося $3\div 5$ останніх точок усередненої залежності МІ, які мали надмірну дисперсію. Така процедура забезпечувала суттєво плавніший вигляд усередненої послідовності МІ порівняно з окремою тахограмою, а також давала змогу відокремити нехарактерні прояви імпульсної активності.

Відведення імпульсної активності від 6 нейронів із застосуванням цього протоколу й інтервалом між серіями в 10 хв, показало існування фаз розвитку імпульсної активності як загальної закономірності її зміни з плином часу в процесі реєстрації. Нами було виділено три фази активності окремого нейрона: фаза посилення активності, фаза стабільної активності і фаза згасання активності. Так, після старту відведення ми спостерігали загалом

зростання імпульсної генерації (рис. 4, а); цей період вважали фазою посилення активності. У цій фазі послідовно зменшувався період генерації та зростала кількість ПД у відповідь на поштовх струму тієї самої амплітуди. Тривалість цієї фази становила близько 10 хв. Підвищення активності супроводжувалося зменшенням послідовного опору між піпеткою та клітиною, можливо, через посилення перфорації мембрани амфотерицином. Для двох клітин з групи фази посилення активності не розпізнавалися, оскільки зростання їх імпульсної генерації не було достовірним.

Друга фаза розвитку імпульсної активності тривала від 10 хв до 1 год, в середньому близько 30 хв. У цій фазі спостерігалася добра відтворюваність усереднених послідовностей МІ, без достовірних змін їх форми та абсолютних значень (див. рис. 4, б). Нейрони найбільш ритмічно генерували імпульси із найменшою дисперсією значень МІ. Отримані нами результати показують, що саме фаза стабільної активності має використовуватися для аналізу імпульсної генерації при проведенні експериментів. При цьому деполяризація клітин тестовими імпульсами у 100 пА або більше значно скорочує тривалість фази стабільної активності, та може обмежити час відведення від окремого нейрона.

Реакція нейронів на подразнення посилено змінюється в третій фазі згасання активності, яка характеризується послідовним її зменшенням у часі до припинення імпульсної генерації (див. рис. 4, в). З рисунку видно, що значення МІ генеруючого нейрона мали незначні зміни протягом 60 хв, однак відповідні період і дисперсія на 70-й і 80-й хвилині різко збільшувалися. Після 80-ї хвилини нейрон відповідав на стимул тільки одним ПД, і ми припинили відведення. У фазі згасання активності значно зменшувалася кількість генерованих ПД у відповідь на поштовх струму, що відображалось на тахограмі зменшенням кількості точок МІ.

Ми вважаємо, що для експериментальної реєстрації найкращими є нейрони із тривалою фазою стабільної активності. Для визначення

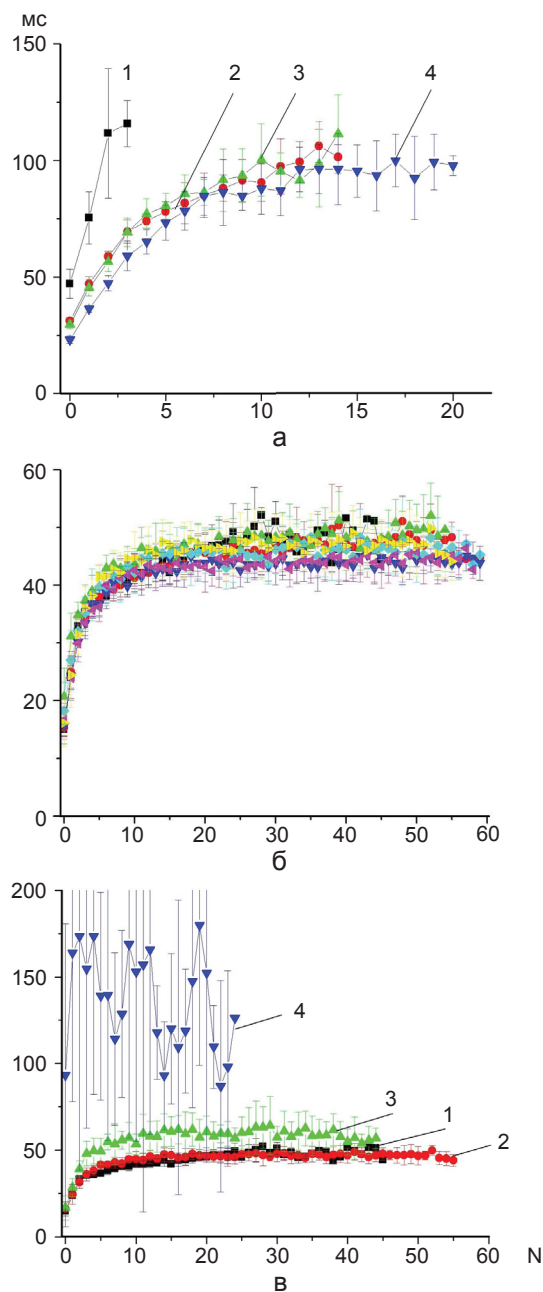


Рис. 4. Фази змін імпульсної генерації в умовах тривалої контрольної реєстрації. За віссю абсцис – номер потенціалу дії; за віссю ординат – середня по серії тривалість міжімпульсних інтервалів (МІ), рисками зазначено відповідне стандартне відхилення по серії; а – фаза посилення активності. Цифрами 1, 2, 3, 4 позначені реєстрації на 0-й, 10-й, 20-й і 30-й хвилині відповідно; б – фаза стаціонарної активності з відтворюваною імпульсною генерацією з 0-ї по 60-ту хвилину, інтервал реєстрації 10 хв; в – підвищення амплітуд МІ і дисперсії генерації на тахограмах в фазі згасання імпульсної активності; 1 – 1-ша, 2 – 60-та, 3 – 70-та, 4 – 80-та хвилини відведення відповідно

тривалості фаз активності необхідно постійно контролювати, чи наявне посилення або її спад аби запобігти ендогенних спотворень реакції нейрона під час тривалої реєстрації. На початку відведення (до фази стабільної активності) слід визначити оптимальну амплітуду тест-поштовхів для протоколу серійної реєстрації. За таких умов отримані усереднені послідовності МІ надійно репрезентують імпульсну генерацію та можуть бути використані у подальшому аналізі.

Контроль фази стаціонарної активності може ґрунтуватися на наших результатах, що у фазах посилення або згасання активності тахограми мають підвищену дисперсію значень. Оцінювати вплив експериментальних факторів слід за допомогою порівняння усереднених значень серії послідовностей МІ, схема побудови яких запропонована вище. У графічній презентації значення мають точніший вигляд порівняно із простою тахограмою.

Усереднені послідовності МІ як емпірична база дослідження можуть бути використані для побудови моделей імпульсної генерації. Послідовності МІ добре апроксимуються функціями як раціонального, так і експоненціального типу залежності, причому достатньо трьох параметрів для їх опису. Тому функціональні моделі активності на основі тахограм є значно простішими, ніж параметричні моделі типу Ходжкіна–Хакслі або Іжikeвича [3], які засновані на обчисленні мембранного потенціалу. У моделях на основі тахограм розрахункові параметри мають наочне фізичне значення, береться до уваги ефект акомодатії та цілком можливий облік випадковості генерації. Такі моделі легко піддаються алгоритмізації і калькуляції в обчислювальних системах.

Наші спостереження вказують на можливу роль внутрішньоклітинних компартментів в імпульсній активності нейронів. Дійсно, тільки набором каналів на поверхневій мембрані клітини важко пояснити зміну ритмічності генерації, наявність фаз активності. Вплив внутрішнього вмісту клітини можна спостерігати, якщо застосувати не перфо-

рацію ділянки мембрани, а конфігурацію реєстрації «на цілій клітині» з проривом мембрани під піпеткою та діалізом клітини. За нашими спостереженнями, нейрони в такій конфігурації відведення були здатні генерувати ПД не більше 5 хв, з розвитком ознак спаду активності з самого початку відведення. Це пояснюється існуванням цитоплазматичних та інших внутрішньоклітинних факторів, рівень яких змінюється під час відведення або за імпульсації нейрона, що в свою чергу впливає на генераційну здатність клітини [10]. В умовах перфорації мембрани, ці фактори виявляються краще стабілізовані, що і є основою для тривалої спроможності клітини до імпульсної реакції на подразнення.

В.А. Яворский, Е.А. Лукьянец

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СЕРИЙНЫХ ТАХОГРАММ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ ВЫЗВАННОЙ ИМПУЛЬСНОЙ АКТИВНОСТИ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА

При длительном отведении мембранного потенциала от изолированных нейронов гиппокампа исследовали изменения генерационной активности во времени. Описано использование тахограмм для оценки электрической активности нейронов и предложено использование серийных тахограмм, анализ которых позволяет повысить достоверность результатов. Выделено три фазы изменения импульсной активности изолированного нейрона в процессе экспериментальной регистрации: фаза усиления активности, фаза стабильной активности и фаза спада активности. Установлено, что в условиях перфорированного patch-clamp фаза стабильной активности начинается через 10–15 мин после получения плотного контакта и имеет среднюю продолжительность 30 мин. Показано, что использование серийных тахограмм и фаз развития активности повышает качество оценки при измерении импульсной генерации нейронов.

Ключевые слова: нейроны гиппокампа, перфорированный patch-clamp, потенциал действия, гиппокамп, аккомодация, межимпульсный интервал.

V.A. Yavorsky, E.A. Lukyanetz

USING SERIAL TACHOGRAMS TO MEASURE THE EVOKED IMPULSE ACTIVITY OF ISOLATED HIPPOCAMPAL NEURONS

In these studies, we investigated the phenomenon of change in impulse activity of isolated hippocampal neurons during

longtime recording. We described the use of serial tachograms during registering the electrical activity of neurons, analysis of which can improve the reliability of data. An analysis of the data identified three phases of changes in impulse activity of isolated neurons in the experimental registrations: a phase of increased activity, phase of stable activity and the phase of declining activity. It is established that in conditions of the perforated patch-clamp the phase of stable activity started at 10-15 minutes after formation of the tight junction and had an average duration of 30 minutes. It is shown that the use of the serial tahograms and phases of activity improves the quality of assessment in the measurement of the electrical activity of neurons.

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

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Haag J., Borst A. Active membrane properties and signal encoding in graded potential neurons // *J.Neurosci.* – 1998. – **18**. – P. 7972–7986.
2. Iavorskii V.A., Luk'ianets E.A. [Role of calcium ions in frequency accomodation of rat hippocampal neurons] // *Ukr.Biokhim.Zh.* – 2001. – **73**. – P. 123–127.
3. Izhikevich E.M. Simple model of spiking neurons // *IEEE Trans.Neural Netw.* – 2003. – **14**. – P. 1569–1572.
4. Korn S.J., Marty A., Connor J.A., Horn R. Perforated patch recording // *Methods in Neuroscience* – 1991. – **4**. – P. 364–373.
5. Nirenberg S., Latham P.E. Decoding neuronal spike trains: how important are correlations? // *Proc.Natl.Acad. Sci.U.S.A* – 2003. – **100**. – P. 7348–7353.
6. Oram M.W., Wiener M.C., Lestienne R., Richmond B.J. Stochastic nature of precisely timed spike patterns in visual system neuronal responses // *J.Neurophysiol.* – 1999. – **81**. – P. 3021–3033.
7. Shinomoto S., Shima K., Tanji J. Differences in spiking patterns among cortical neurons // *Neural Comput.* – 2003. – **15**. – P. 2823–2842.
8. Yavorskii V., Kostyuk P., Lukyanetz E. Accommodation properties of isolated hippocampal neurons under conditions of an experimental model of epilepsy // *Neurophysiology* – 2006. – **38**. – P. 175–181.
9. Yavorskii V.A., Lukyanetz E.A. Evoked impulse activity of isolated hippocampal neurons in the perforated patch-clamp configuration // *Neurophysiology* – 2012. – **43**. – P. 417–424.
10. Yavorsky V.A., Lukyanetz E.A. An effect of mitochondrial ionophore CCCP on impulse activity of isolated CA1 hippocampal neurons // *Fiziol.Zh.* – 2008. – **54**. – P. 124.

Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ
E-mail: jva@biph.kiev.ua

Матеріал надійшов до редакції 04.05.2013