

Характеристика електричної активності нейронів ганглія трійчастого нерва в первинній культурі

М.В. Телька, О.В. Рихальський, М.С. Веселовський

Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: mariyka.t@gmail.com

Досліджено властивості електричної активності малих нейронів (з діаметром менше ніж 25 мкм) ганглія трійчастого нерва (ГТН) у первинній культурі. Залежно від відповіді на тривалу внутрішньоклітинну деполяризацію прямокутними поштовхами струму нейрони поділені на групи: адаптивні, тонічні та затриманої генерації потенціалів дії (ПД). Адаптивні нейрони у більшості випадків на початку стимулу генерували поодинокі ПД. Тонічні нейрони характеризувалися частотною генерацією ПД. Нейрони з затриманою генерацією відповідали поодиноким або серією ПД з затримкою на початку стимулу. Ця затримка лінійно зменшувалася зі збільшенням інтенсивності деполяризації. Нейрони з різними видами електричної активності відрізнялися електрофізіологічними та фармакологічними характеристиками. Тонічні нейрони мали відмінні відповіді на гіперполяризацію мембрани, а також найбільше значення вхідного опору (1104 ± 300 МОм, $n=16$) порівняно з нейронами затриманої генерації (716 ± 82 МОм, $n=6$) та адаптивними нейронами (746 ± 200 МОм, $n=10$). Нейрони з різними типами електричної активності достовірно відрізнялися за деякими показниками ПД: амплітуда ПД та слідова гіперполяризація, реобаза та поріг генерації ПД. У нейронів кожної групи помічена гетерогенність за показниками тривалості ПД, що підтверджено наявністю декількох піків у гістограмі розподілу цієї величини. Спостерігалась певна неоднорідність в частотних показниках тонічних нейронів. Це доводить гістограма розподілу максимальних частот, яка містить два піки. Аплікація тетродотоксину (ТТХ) в концентрації 500 нмоль/л призводила до повного або часткового пригнічення електричної активності, а в деякій частині клітин дія цього токсину не викликала ніяких змін. Нейрони з нечутливою до ТТХ імпульсною активністю генерували триваліший ПД ($3,6 \pm 1,1$ мс, $n=10$), ніж ті у яких спостерігалось повне пригнічення відповіді ($2,1 \pm 0,7$, $n=7$). ТТХ не призводив до змін у нейронах з затриманою генерацією ($n=3$) та в більшій частині адаптивних нейронів (4 з 5). Наші експерименти показали, що ноцицепторам ГТН властиві різні види електричної активності, а одиниці, які генерують адаптивну, резистивну до ТТХ відповідь, у нативних умовах формують немієлінізовані волокна С-типу.

Ключові слова: нейрони ганглія трійчастого нерва; первинна культура; електрична активність; показники потенціалу дії; чутливість до тетродотоксину.

ВСТУП

Ганглій трійчастого нерва (ГТН) складається з сом нейронів аферентних волокон, що переносять сенсорну інформацію від механорецепторів, терморецепторів, ноцицепторів, м'язів обличчя, епітелію ротової, носової порожнини та рогівки ока [1, 2]. У роботах *in vivo* детально описано електрофізіологічні показники нейронів ГТН відповідно до типу модальності сигналу та швидкості проведення нервового імпульсу [3, 4]. Цей

© М.В. Телька, О.В. Рихальський, М.С. Веселовський

ганглій, як усі сенсорні ганглії, складається з гетерогенних за морфологічними та електрофізіологічними показниками нейронів [5,6]. Вивчення властивостей нейронів сенсорних волокон представляє великий інтерес, бо у більшості випадків порушення периферичних волокон призводять до змін в іонній провідності мембрани сом та нейритів, внутрішньоклітинних механізмах, синтезі білків та пептидів [7, 8]. Найбільше уваги приділяється ноцицепторам – нейронам,

волокна яких проводять більшову інформацію. Це високопорогові немієлінізовані С- або мієлінізовані А δ -нервові волокна. Показано, що розмір клітини, показники електричної активності корелюють з модальністю сенсорного сигналу [5, 9]. Ці дані дають можливість в експериментах *in vitro* досліджувати властивості різних типів нейронів.

В електрофізіологічних дослідженнях показано, що для ноцицепторів сенсорних гангліїв характерна генерація тривалих потенціалів дії (ПД) з «горбом» на фазі реполяризації [3, 6]. Окрім електричних характеристик ноцицептори вирізняються такими фармакологічними показниками, як чутливість до капсаїцину, резистивність до тетродотоксину тощо [10–12]. Таким чином, прикладання деяких агентів є додатковими маркерами у визначенні типу нейрона.

Властивості електричної активності нейронів зручно вивчати на таких простих модельних біосистемах, як первинна культура дисоційованих клітин. Ця модель корисна для визначення повільних змін у клітинних та міжклітинних механізмах, вивчення впливу нейротропних факторів, які виконують нейротрофічну та нейропротекторну функції і, навпаки, відіграють ключову роль при невропатичних порушеннях [13, 14]. Однак для з'ясування впливу згаданих агентів потрібно дослідити електрофізіологічні показники цих нейронів у первинній культурі.

Мета нашої роботи – детально охарактеризувати електричну активність малих нейронів (діаметром менше ніж 25 мкм) та виділити ті з них, які своїми електрофізіологічними та фармакологічними показниками відповідають ноцицепторам.

МЕТОДИКА

Для приготування первинної культури нейронів виділяли ганглії однодобових шурів лінії Вістар обох статей та поміщали в розчин, що містив буфер НЕРЕС, мінімальне середовище Ігла («Sigma», США) та ан-

тибіотики. Для ферментативної обробки використовували 0,2%-й розчин пронази («Sigma», США). Після цього етапу приготування препарат механічно дисоціювали пастерівськими піпетками різного діаметра. Клітини розвивалися при 37°C в повітряно-газовому середовищі, збагаченому CO₂ до 5%, розчин для культивування містив мінімальне середовище Ігла з додаванням 10% кінської сироватки («Gibco», США), 6 мкг/мл інсуліну («Sigma», США) 5 нг/мл фактора росту нервової тканини («Sigma», США) та антибіотиків. Проліферацію гліальних клітин зупиняли додаванням на другу добу культивування цитозин-А-Д-арабинофуранозиду (ARA-C) («Sigma», США) таким чином, щоб кінцева концентрація цього агента в розчині становила 7 мкмоль/л, заміну розчину здійснювали на наступну добу.

Експерименти виконували при кімнатній температурі на 15-18-ту добу культивування. Зразки культивованих клітин вміщували у камеру зі зовнішньоклітинним розчином такого складу (ммоль/л.): NaCl – 140, KCl – 3, MgCl₂ – 2, CaCl₂ – 2, глюкоза – 10, НЕРЕС – 10 (всі реактиви фірми «Sigma», США); рН 7,4 (доведено NaOH). Піпетки для відведення електричних відповідей нейронів заповнювали внутрішньоклітинним розчином, до складу якого входили (ммоль/л.): калій глюконат – 155, EGTA – 10, MgCl₂ – 2, НЕРЕС – 10 (всі реактиви «Sigma», США); рН 7,3 (доводили КОН). Опір піпетки зі внутрішньоклітинним розчином становив 4–6 МОм. Для нейронів визначали середній розмір соми як середнє арифметичне значення великого і малого діаметрів.

Електрофізіологічні дослідження виконували на клітинах розміром менше ніж 25 мкм із застосуванням методу patch – clamp у конфігурації «ціла клітина». Для відведення відповідей від клітин використовували підсилювач Axopatch-1D («Axon Instruments», США). Сигнали оцифровували і записували за допомогою аналогово-цифрового перетворювача DigiData 1322A і програмного

пакета pClamp 9.0 («Axon Instruments», США) з частотою оцифровки 10 кГц. У режимі фіксації потенціалу контролювали якість контакту «мембрана – піпетка» за значенням сталої часу ємнісного струму у відповідь на прикладання коротких (10 мс) гіперполяризувальних прямокутних поштовхів напруги невеликої амплітуди (-10 мВ).

Мембранний потенціал визначали у режимі «фіксації струму» через декілька секунд після прориву мембрани за умови відсутності прикладання зовнішнього струму. У електрофізіологічні дослідження брали нейрони мембранний потенціал яких становив менше ніж -30 мВ. У відповідях на внутрішньоклітинні гіперполяризувальні поштовхи струму невеликої амплітуди (-10 – -3 пА) визначали вхідний опір та ємність мембрани. Викликану електричну активність ідентифікували у режимі «фіксації струму» за відповіддю на внутрішньоклітинні поштовхи струму тривалістю 2000 мс з інкрементом 10 пА. Деполяризацію та гіперполяризацію мембрани здійснювали від підтримуючого потенціалу -50 мВ, який досягали за допомогою пропускання через мембрану від'ємного струму.

Деякі активні показники (реобазу, поріг генерації потенціалу дії (ПД), амплітуда та тривалість ПД, амплітуда слідової гіперполяризації) обчислювали у реєстраціях, коли розпочиналася генерація поодиноких ПД. Якщо виникала серія ПД, то враховували параметри першого з них. Реобазу визначали як величину імпульсу струму, при якому починалася генерація ПД. Поріг генерації ПД – це значення потенціалу, при якому починає змінюватися похідна його за часом. Амплітуда ПД і слідової гіперполяризації дорівнювала різниці між порогом і максимальним, мінімальним відповідно значенням потенціалу. У розрахунок амплітуд не брали одиниці, які генерували патерн замість ПД. У разі генерації патерна брали тривалість ПД в середині відповіді. Для опису тонічної електричної активності аналізували зміну

середньої частоти від сили струму. Цей показник вимірювали на проміжку часу, коли частота набувала стаціонарного значення.

Для визначення впливу безкальцієвого розчину та тетродотоксину (ТТХ) використовували локальну суперфузію подачі розчинів [15]. ТТХ додавали в зовнішньоклітинний розчин таким чином, що його концентрація становила 500 нмоль/л, а безкальцієвий розчин містив (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 4, MgCl₂ – 3, глюкоза – 10, HEPES – 10, EGTA-0,2 («Sigma», США); рН 7,4.

Результати перевіряли на нормальність розподілу за критерієм Шапіро – Уїлка ($P < 0,05$) та подали як середнє арифметичне \pm стандартне відхилення ($M \pm m$). Вірогідність відмінностей середніх значень ($P < 0,05$) оцінювали за критерієм t Стьюдента (при нормальному розподілі) та критерієм U Манна – Уїтні (при відмінності від нормального розподілення). Зміни параметрів ПД в безкальцієвому розчині порівняно з контролем визначали за допомогою t тесту рівності/нерівності середніх у разі нерівних дисперсій ($P = 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Всі клітини ($n = 194$) відповідно до типу електричної активності були поділені на групи: адаптивні, тонічні та затриманої генерації потенціалів дії (ПД) (рис. 1). Адаптивні нейрони, кількість яких становила 38 % ($n = 74$), у відповідь на зростаючі поштовхи струму генерували декілька ПД (1 – 3). Тонічні нейрони (58 %, $n = 113$) у відповідь на деполаризувальні поштовхи струму генерували серію ПД протягом усього стимулу без помітної адаптації. У 4 % ($n = 7$) нейронів електрична активність характеризувалася затримкою генерації ПД на початку стимулу (див. рис. 1). Подальша деполаризація у всіх нейронах призводила до зриву генерації ПД. Ці типи електричної активності були описані на свіждисоційованих нейронах та в цілому організмі [3 – 5, 16].

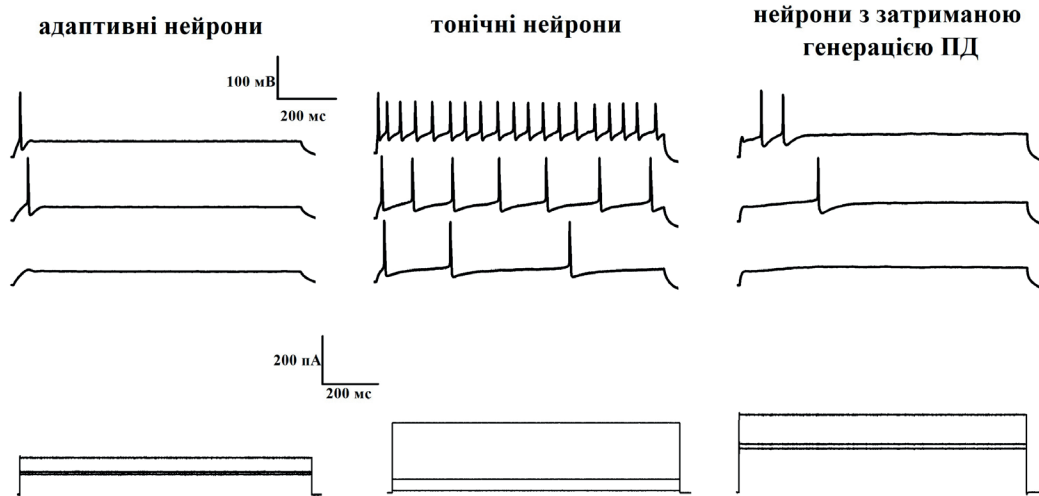


Рис. 1. Характерні відповіді на зростаючі деполаризувальні поштовхи струму, за якими поділено нейрони ганглія трійчастого нерва :адаптивні, тонічні нейрони, нейрони з затриманою генерацією потенціалів дії

Такі пасивні електричні показники, як потенціал спокою (V_m), вхідний опір (R_{in}) та ємність мембрани (C_m) наведені в табл. 1. Ці характеристики клітин з різними типами імпульсної активності помітно не відрізнялися. Лише клітини з тонічною імпульсною активністю мали найбільше значення вхідного опору, що відображалось у малому значенні реобазис (див.табл.1, табл. 2).

У відповідь на гіперполяризувальні поштовхи струму в наших експериментах практично всі нейрони ГТН (96%, n=190) генерували «вигин» на початку зміни мембранного потенціалу з поверненням до стаціонарного стану (рис.2, а). У літературних джерелах подібні відповіді на гіперполяризацію називаються аномальним випрямленням мембрани, що залежить від часу [12]. Кількісно аномальне випрямлення, що залежить

від часу, оцінювали за формулою

$$\eta = \frac{U_{peak} - U_{steady}}{U_{peak}} \cdot 100\%$$

де η - коефіцієнт аномального випрямлення, U_{peak} – мінімальне значення потенціалу у піку вигину, U_{steady} – стаціонарне значення у реєстраціях в період гіперполяризації. Під час експерименту мембрану нейрона гіперполяризували імпульсом струму амплітудою, достатньою для досягнення піку потенціалу на мембрані -120 мВ і потім продовжували гіперполяризацію з інкрементом 10 пА. Вважається, що нейронам властиве аномальне випрямлення, якщо значення його коефіцієнта більше ніж 5% за умови, що U_{peak} знаходиться в межах -120 – -100мВ [12]. Вищеописаний коефіцієнт обчислювали при різних рівнях гіперполяризації, де U_{peak} лежало в межах: -120 – -110 мВ;

Таблиця 1. Пасивні параметри нейронів ганглія трійчастого нерва з різними типами електричної активності ($M \pm m$)

Показник	Тонічні нейрони	Адаптивні нейрони	Нейрони затриманої генерації
Вхідний опір, МОм	1104 ± 300 (n=16)	746 ± 200 (n=10)*	716 ± 82(n=6)*
Мембранний потенціал, мВ	-42 ± 6 (n=16)	-46 ± 7(n=10)	-44 ± 8 (n=6)
Розмір, мкм	19 ± 1 (n=16)	19 ± 2 (n=10)	20 ± 1 (n=6)
Ємність, пФ	32 ± 8 (n=16)	28 ± 7 (n=10)	27 ± 5(n=6)
Коефіцієнт аномального випрямлення, %	44 ± 9 (n=37)	24 ± 7 (n=16)*	20 ± 7 (n=6)*

* $P < 0,05$ відносно групи тонічних нейронів.

Таблиця 2. Деякі характеристики першого потенціалу дії (ПД) у відповіді на деполяризувальний поштовх струму пораховані для підгруп тонічних нейронів, груп адаптивних нейронів та нейронів затриманої генерації ($M \pm m$)

Показники	Тонічні нейрони		Адаптивні нейрони	Нейрони з затриманою генерацією ПД
	підгрупа 1	підгрупа 2		
Реобазис, пА	17 ± 2 (n = 57)	10 (n=56)*	81 ± 28 (n=74)*, **	68 ± 14 (n=8)*, **
Поріг генерації ПД, мВ	-25 ± 7, (n= 35)	-32 ± 5, (n=56)*	-22 ± 7, (n=74)*, **	-17 ± 7 (n=7)*, **,***
Амплітуда ПД, мВ	102 ± 2, (n = 57)	112 ± 9, (n=45)	96 ± 11, (n =74)*, **	86 ± 9, (n=8)*, **,***
Амплітуда слідової гіперполяризації, мВ	-29 ± 6, (n = 57)	-18 ± 6 (n=56)*	-32 ± 8, (n=74)*, **	-40 ± 5, (n=8)*, **,***

* P<0,05 відносно першої підгрупи тонічних нейронів; ** P<0,05 відносно другої підгрупи групи тонічних нейронів; *** P<0,05 відносно групи адаптивних нейронів

-110 – -100 мВ; -100 – -90 мВ; -80 – -90мВ (див. рис. 2, б). Подібне співвідношення часток нейронів, у яких спостерігається аномальне випрямлення, показано на зрізах ГТН морської свинки [16]. Значення цього показника за умови, що пік «вигину» лежить в межах -120 – -100 мВ найбільше у тонічних нейронів (див. табл. 1). У дослідженнях *in vivo* показано, що у значній частині нейронів, більшість яких формують С-волокна, аномальне випрямлення, що залежить від часу відсутнє [4,13]. У нашій роботі показано, що

при незначній гіперполяризації мембрани «вигин» у відповідях був малопомітний для адаптивних нейронів та нейронів з затриманою генерацією (див. рис.2, б) Аномальне випрямлення, що залежить від часу в сенсорних нейронах, пояснюється експресією потенціалзалежних іонних каналів, що активуються гіперполяризацією. За літературними даними, виявлено чотири підтипи цих каналів, які відрізняються фармакологічними і кінетичними характеристиками [17]. Всі підтипи вищеописаних

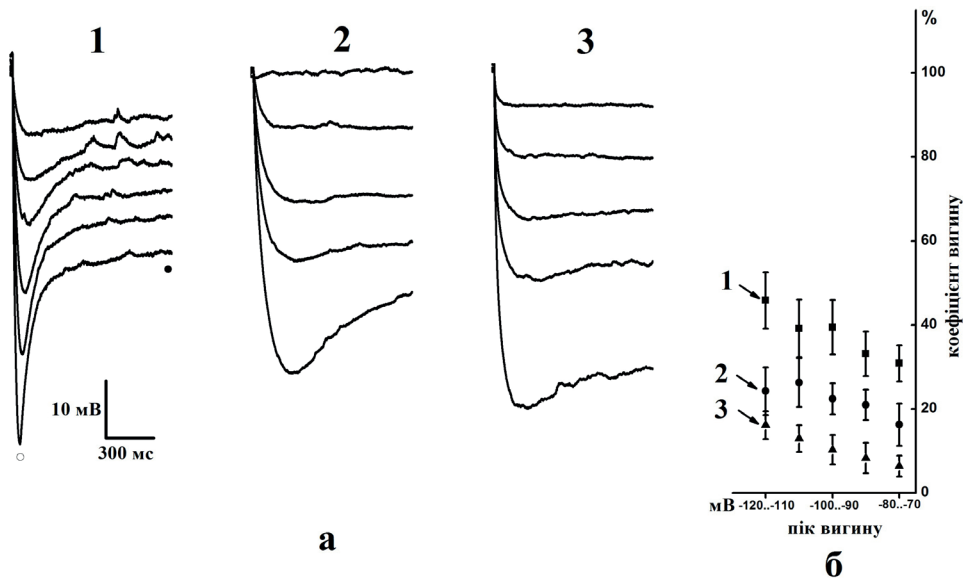


Рис.2. Зміни мембранного потенціалу у відповідь на гіперполяризувальні поштовхи струму: а - нейрони тонічні(1), адаптивні(2) та затриманої генерації(3) по різному відповідали на гіперполяризацію мембрани. Головною особливістю цих відповідей є «вигин» (○), який поступово переходить у стаціонарний стан (●); б – значення коефіцієнтів аномального випрямлення, що залежить від часу при різних рівнях гіперполяризації для 11 тонічних, 7 адаптивних та 3 нейронів затриманої генерації потенціалів дії

каналів експресуються в нейронах ГТН [18, 19]. Наявність або відсутність різних типів цих каналів спричинює відмінності у кінетиці відповідей. Відомо також, що ці канали відіграють важливу роль у генерації імпульсної активності нейронів сенсорних гангліїв [17, 18].

Більша частина нейронів генерувала ПД з «горбом» на фазі реполяризації. Це доводить наявність додаткової від'ємної компоненти у кривій похідної по часу від ПД (рис.3, а). Для нейронів кожної групи тривалість ПД (час між точками коли потенціал становив 10 % від максимального значення)

варіювалася від двох до десяти мілісекунд. При зазначеному рівні значущості такий показник розподілений не за нормальним законом. Гістограма розподілу цієї величини для адаптивних нейронів містить два піки, що свідчить про негомогенність цієї популяції (див. рис.3, б). Для тонічних нейронів спостерігалася аналогічна неоднорідність (гістограми розподілу не представлені). Вибірки показників окремого ПД клітин з різною електричною активністю означених груп достовірно описувалися законом Гаусса і середні значення відрізнялися (див. табл. 2). У тонічних нейронів зареєстровано

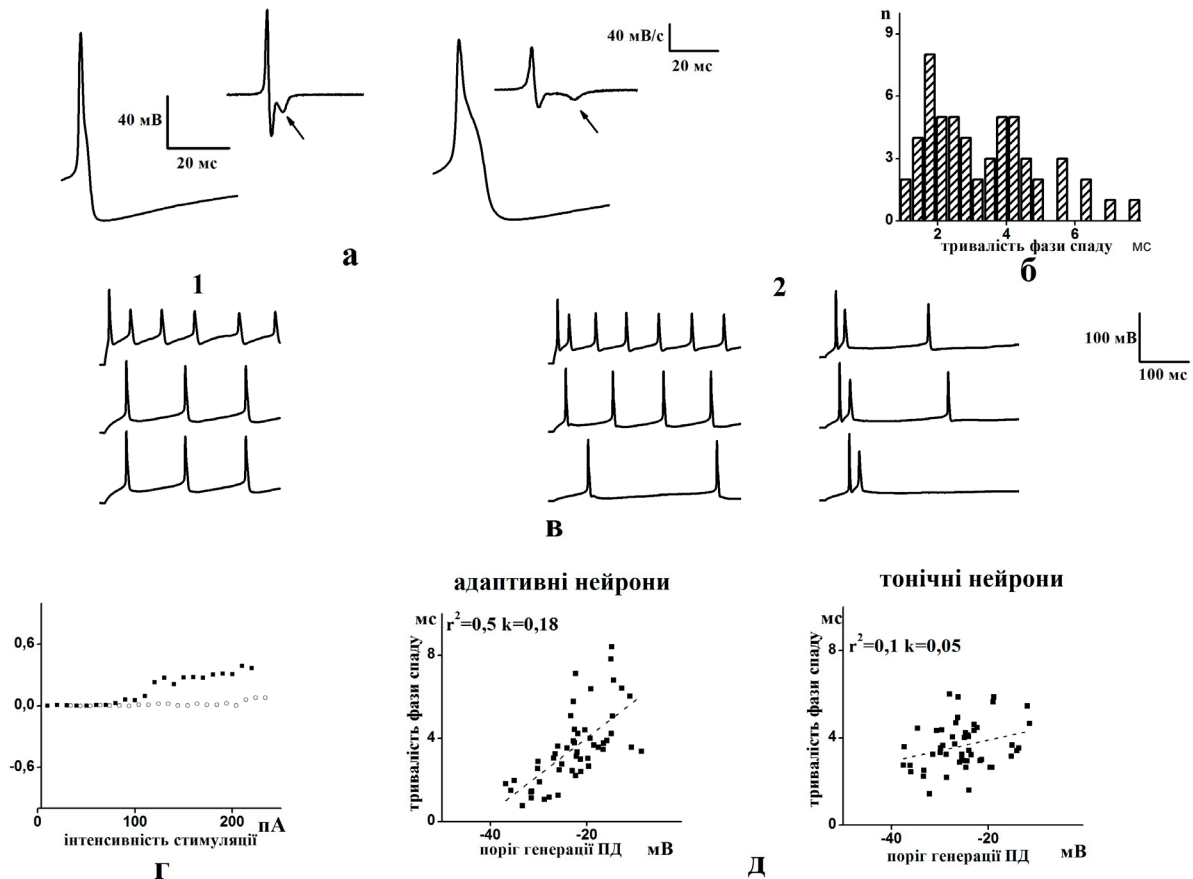


Рис.3. Особливості активних параметрів нейронів ганглія трійчастого нерва (ГТН): а – приклади форм потенціалів дії (ПД) для адаптивних нейронів ГТН. Для кожного прикладу ПД наведено швидкість зміни потенціалу. Стрілка вказує додаткову від'ємну компоненту, яка доводить наявність «горба» на фазі спаду; б – розподіл стаціонарних значень тривалостей ПД для адаптивних нейронів (n=55); в – приклади початку реєстрації відповіді тонічних нейронів на деполяризацію, за якими їх поділено на дві підгрупи 1 та 2; г – залежності коефіцієнта β від інтенсивності деполяризації мембрани для тонічних нейронів двох підгруп; д – взаємозв'язок тривалості фази спаду та порогом генерації ПД для адаптивних та тонічних нейронів . Для вищевказаних результатів наведено графіки лінійної регресії та значення квадрата коефіцієнта регресії (r^2). Нахил для адаптивних нейронів був значно крутіший ніж для тонічних ($P = 0,05$)

два типи відповідей на деполяризацію, які мали відмінності на початку реєстрації. Тому цю групу поділено на дві підгрупи. Нейрони першої підгрупи замість першого ПД генерували патерн, який продовжувався серією однакових ПД (див. рис. 3, в). Якщо «на око» цей патерн неможливо було виділити, тоді використовували залежність

$$\beta = \frac{AP_2(I) - \langle AP \rangle (I)}{AP(I)} \cdot 100\%$$

де AP_2 , $\langle AP \rangle$ - амплітуда другого та усередненого ПД в середині реєстрації, I - сила імпульсу струму, що пропускалася через мембрану нейрона. Для першої групи ця залежність залишалася незмінною, на відмінну від другої, де спостерігалася зміна зі збільшенням струму (див. рис.3, г).

У літературних джерелах форму ПД пов'язують з типом сенсорного сигналу, а «горб» на фазі спаду слугує основною ознакою ноцицептивності. За результатами наших досліджень використання згаданої ознаки для ідентифікації типу модальності притаманного таким нейронам недостатньо. Тому в своєму аналізі ми використали іншу властивість ноцицепторів: нейронам С-волокон характерний найнижчий поріг генерації і триваліший ПД [10, 11]. Саме тому було проаналізовано залежність тривалості

фази спаду від порогу генерації ПД: нейрони з найнижчим порогом мають триваліший ПД. Ця тенденція спостерігається для всіх типів нейронів. Однак у адаптивних нейронів коефіцієнт нахилу відрізнявся від тонічних на порядок і діапазон значень тривалостей ПД був значно ширший (див. рис.3, д).

Отримані результати вказують на те, що адаптивні нейрони складаються з одиниць, які залучені до проведення різного виду сенсорного сигналу. Отже, аналіз активних показників показав гетерогенність за формою ПД в межах однієї групи або підгрупи нейронів. Ця різноманітність може бути пояснена різною модальністю сенсорного сигналу, яка властива нейронам ГТН *in vivo* або з місцем знаходження рецептивного поля. Наприклад, сомат сенсорних С- та А δ - волокон з відмінними параметрами ПД від рогівки ока характерна адаптивна відповідь на тривалу деполяризацію [4].

Важливою характеристикою для сигнальної функції нейрона є залежність «вхід-вихід», у наших експериментах – це властивості генерації ПД від сили струму. При зазначених умовах тонічних нейронів незалежно від підтипу, середня частота генерації ПД лінійно зростала до максимального стаціонарного значення, подальша деполяризація призводила до зриву генерації (рис. 4, а). Значення

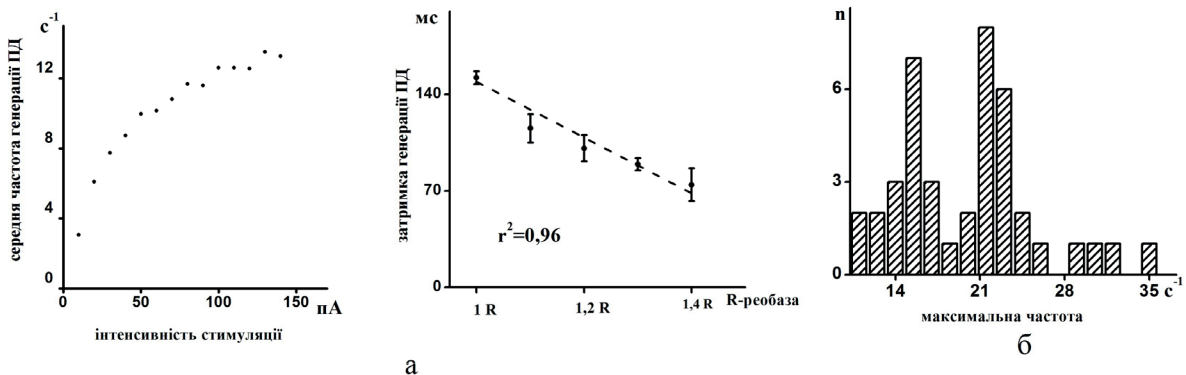


Рис.4. Властивості електричної активності тонічних та нейронів з затриманою генерацією потенціалів дії (ПД): а – залежність «вхід – вихід» для середньої частоти тонічних нейронів (1) та затримки генерації ПД для нейронів з затриманою генерацією ПД (2) від інтенсивності деполяризації. Для нейронів з затриманою генерацією ПД наведено середні значення затримки генерації ПД залежно від різних значень реобазы (n=4); б – розподіл максимальних частот генерації ПД у тонічних нейронів (n = 42)

максимальної частоти для різних клітин становили від 8 до 21 Гц. Гістограма розподілу цього показника містить два піки, що доводить наявність декількох популяцій у множині тонічних нейронів (див. рис.4, б). Більшість адаптивних нейронів на деполяризацію генерували поодинокі ПД. У нейронів затриманої генерації ПД зменшувалася затримка на початку відповіді за лінійним законом при деполяризації мембрани (див. рис.4, в).

Перевірено дію безкальцієвого розчину на імпульсну активність 19 нейронів ГТН. Зменшення концентрації кальцію в зовнішньоклітинному розчині помітно змінювало показники імпульсної активності. Незалежно від типу електричної активності спостерігалися комплексні зміни в показниках ПД: пригнічення «горба» на фазі спаду, зменшення амплітуди ПД, помітне пригнічення амплітуди слідової гіперполяризації (рис.5, а). Достовірні від-

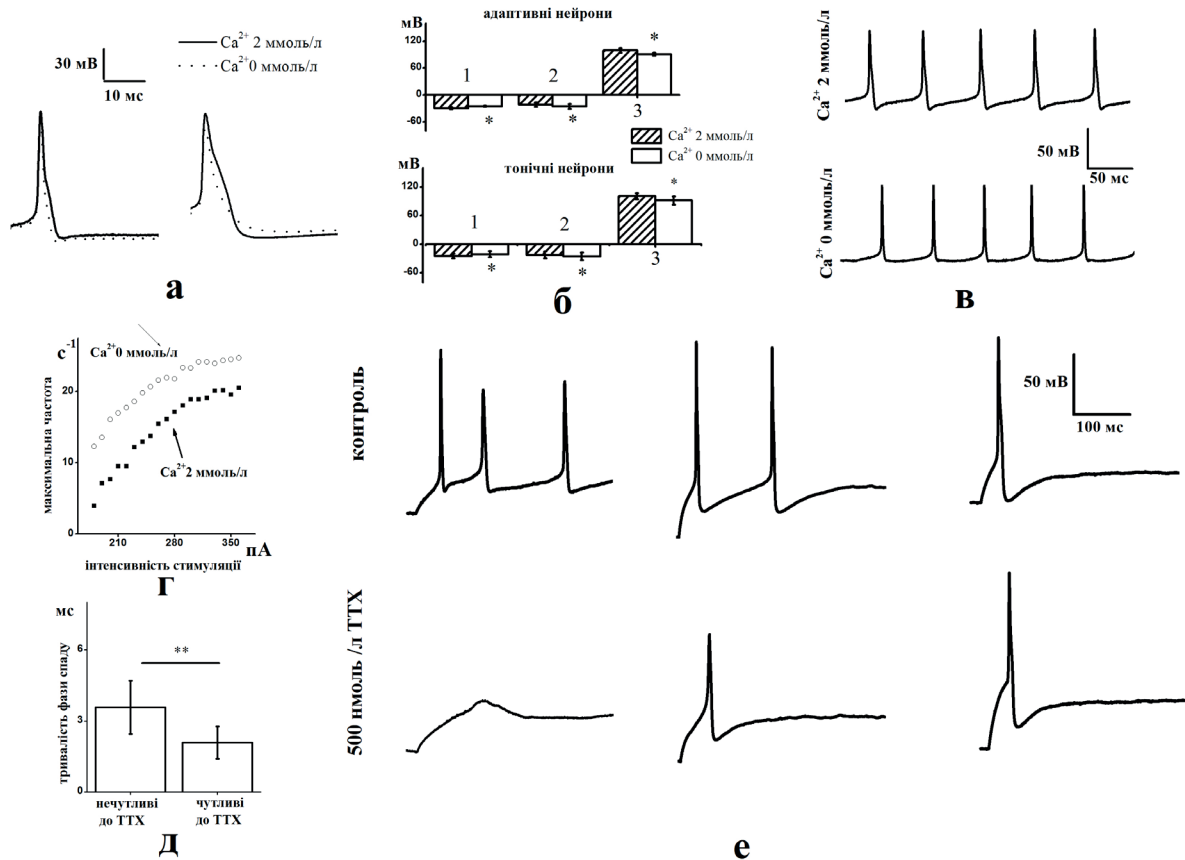


Рис.5. Дія безкальцієвого розчину та тетродотоксину (ТТХ) на електричну активність нейронів ганглія трійчастого нерва: а – зміни форми потенціалів дії (ПД), які спостерігалися при зменшенні концентрації кальцію в зовнішньоклітинному розчині; б – порівняння деяких показників ПД адаптивних та тонічних нейронів при концентрації кальцію в зовнішньоклітинному розчині 2 ммоль/л та 0 ммоль/л: 1 – амплітуда слідової гіперполяризації (5 адаптивних та 5 тонічних нейронів), 2 – поріг генерації ПД (7 адаптивних та 10 тонічних нейронів), 3 – амплітуда ПД (4 адаптивних та 7 тонічних нейронів); в – характерні відповіді тонічних нейронів на деполяризацію при концентрації кальцію в зовнішньоклітинному розчині 2 ммоль/л та 0 ммоль/л; г – залежність середньої частоти від амплітуди деполяризуючого поштовху струму при концентрації кальцію в зовнішньоклітинному розчині 2 ммоль/л та 0 ммоль/л; д – порівняння тривалостей фаз спаду ПД нейронів, у яких аплікація ТТХ не призводило до змін електричної активності або пригнічення було частковим (n=10) з тими, у яких спостерігалася повна нівеляція електричної активності (n=7); е – дія ТТХ на електричну активність нейронів ГТН. * P = 0,05 порівняно з відповідними показниками при концентрації кальцію в зовнішньоклітинному розчині 2 ммоль/л; ** P < 0,05 між тривалостями фаз спаду (U тест Манна-Уїтні)

мінності визначено у зміщенні до більш негативних значень порога генерації ПД, пригнічення амплітуди слідової гіперполяризації та зменшення амплітуди ПД (див. рис.5, б). Для чотирьох з семи тонічних нейронів вплив безкальцієвого розчину проявлявся збільшенням частотних характеристик (див. рис. 5 в, г). Таким чином, зменшення концентрації кальцію в зовнішньоклітинному розчині призводить до модуляції електричної активності нейронів ГТН. Пригнічення горба на фазі реполяризації та зниження порогу генерації свідчить про наявність низькопорогових та високопорогових кальцієвих каналів [20]. Зміни у слідовій гіперполяризації та частотних характеристиках вказують на активність кальційзалежних калієвих каналів [21].

Перевірено дію ТТХ в концентрації 500 нмоль/л на імпульсну активність 20 нейронів ГТН. Показано, що у тонічних нейронах (n=7) спостерігається повне пригнічення імпульсної активності. При дії цього токсину у таких нейронах залишається ледь помітний потенціал (див. рис.5, е). У адаптивних (n=1) та тонічних нейронах (n=5) аплікація ТТХ частково пригнічувала імпульсну активність (див. рис. 4, г). Аплікація цього токсину не змінювала електричну активність адаптивних (n=4) та нейронів затриманої генерації (n=3) (див. рис. 5, г). Помічена відмінність між нейронами з різною чутливістю до ТТХ: клітини, що повністю або частково нечутливі до цього токсину, генерували триваліший ПД, ніж ті, у яких імпульсна активність пригнічувалася його дією (див. рис.5, д). Така різниця додатково доводить, що імпульсній активності ноцицепторів властива нечутливість до ТТХ [11]. Експресія в мембрані потенціалзалежних кальцієвих та ТТХ-резистивних натрієвих каналів може бути причиною генерації відповідей за наявності ТТХ [11, 20]. Отримані результати збігаються з даними експериментів *in vivo* на нейронах ГТН миші, у яких спостерігалось повне або часткове пригнічення імпульсної активності за наявності ТТХ у сомах Аδ-

волокон. Зміни були відсутні у одиниць, що формують С-волокна [4]. Таким чином, нейрони з адаптивною, резистивною до ТТХ відповіддю, належать до групи ноцицепторів, нейрити яких формують С-волокна. Нечутливими до ТТХ виявилися також нейрони з затриманою генерацією ПД, проте дослідження на свіжодисоційованих нейронах показали, що значна частина цих клітин є нечутливими до капсаїцину, агента, який є маркером ноцицепторів [5].

Отже, маленькі нейрони – гетерогенні за електрофізіологічними властивостями та чутливістю до ТТХ. Всі типи зареєстрованої електричної активності є ідентичними тим, які зареєстровані в сомах С- та Аδ-волокон. Нейрони з одним типом імпульсної активності мають відмінні показники, що може вказувати на належність клітин до різних видів проведення сенсорного сигналу. Це підтверджується неоднаковою чутливістю до блокатора натрієвих каналів ТТХ. Наші дослідження доводять, що частина нечутливих до ТТХ адаптивних нейронів в нативних умовах формують С-волокна.

M.V. Telka, O.V. Rikhalsky, N. S.Veselovsky

EXCITABILITY PROPERTIES OF TRIGEMINAL GANGLION NEURONS

The firing properties of small neurons (with diameters of soma less than 25 μm) were investigated using patch-clamp technique in whole-cell configuration in primary culture of trigeminal ganglia (TG) of postnatal rats. TG neurons were divided into three groups according to their firing responses to long-lasting depolarizing pulses: adaptive neurons (AN) characterized by a strongly adaptive responses; tonic neurons (TN) characterized by a multiple tonic firing; neurons with a delay before initiation of AP generation, namely, NDG. AN, TN and NDG also differed in AP electrophysiological and pharmacological characteristics. TN was distinguished by responses to hyperpolarization and the greatest value of input resistance. TN, AN and NDG were characterized by different active properties (amplitude of action potential and afterhyperpolarization, rebase, threshold). Each group of neurons was characterized by heterogeneity of AP duration and of frequency properties for TN. The application of tetrodotoxin (TTX) (250 nM) resulted in full or partial inhibition of AP generation and some neurons had TTX – insensitive firing responses. Neurons that were not affected by TTX had markedly longer AP. TTX

had no effect on electrical activity of some AN and NDG. Based on sensitivity to TTX and their electrophysiological properties, AN and NDG seem to be C-fiber nociceptors.

Key words: trigeminal ganglion neurons; primary culture; types of firing response; parameters action potentials; sensitivity to tetrodotoxin (TTX).

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine.

**М.В. Телька, О.В. Рихальский,
Н.С. Веселовский**

ХАРАКТЕРИСТИКИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ГАНГЛИЯ ТРОЙНИЧНОГО НЕРВА

Исследованы свойства электрической активности маленьких нейронов (диаметром меньше чем 25 мкм) ганглия тройничного нерва (ГТН) в первичной культуре. В зависимости от ответа на длительную внутриклеточную деполяризацию прямоугольными толчками тока нейроны были разделены на группы: адаптивные, тонические и задержанной генерации потенциалов действия (ПД). Адаптивные нейроны в большинстве случаев генерировали несколько ПД в начале стимула. Основная характеристика тонических нейронов - это частотная генерация ПД. Нейроны задержанной генерации отвечали одиночными или серией ПД с задержкой в начале стимула. Эта задержка линейно уменьшалась с увеличением силы стимула. Нейроны с разной импульсной активностью отличались электрическими и фармакологическими характеристиками. Пассивными параметрами выделялись тонические нейроны. Эти клетки имели отличные от других ответы на гиперполяризацию мембраны и наибольшее значение входного сопротивления (1104 ± 300 МОм, $n = 16$) по сравнению с нейронами задержанной генерации (716 ± 82 МОм, $n = 6$) и адаптивными нейронами (746 ± 200 МОм, $n = 200$). Нейроны с разной электрической активностью достоверно отличались по некоторым параметрам ПД (амплитуда ПД и следовой гиперполяризации, реобазы и порог генерации ПД). У нейронов каждой группы наблюдалась гетерогенность за длительностью ПД, что подтверждалось наличием нескольких пиков в гистограмме распределения этой величины. Также замечена неоднородность в частотных характеристиках, это доказывается гистограммой распределения максимальных частот, которая содержала два пика. Апликация тетродотоксина (ТТХ) в концентрации 500 нмоль/л приводила к полному или частичному угнетению электрической активности, в некоторой части нейронов не наблюдалось изменений. Нейроны с резистивной к ТТХ импульсной активностью, генерировали более длительный ПД ($3,6 \pm 1,1$, $n = 10$), чем те у которых наблюдалось полное угнетение ответа ($2,1 \pm 0,7$, $n = 7$). ТТХ не влиял на электрическую активность в большей части адаптивных нейронов (4 из 5) и во всех

нейронах задержанной генерации (3). Таким образом наши эксперименты указывают на то, что единицы, которые генерируют адаптивный резистивный к ТТХ ответ, в нативных условиях формируют немиелинизированные волокна С-типа.

Ключевые слова: нейроны ганглия тройничного нерва; первичная культура; электрическая активность; параметры потенциала действия; чувствительность к тетродотоксину.

REFERENCES

1. Darian-Smith I, The trigeminal system. In: Iggo A, editor. Handbook of sensory physiology, somatosensory system. Berlin: Springer; 1973. P. 271 – 314
2. Kruger L, Young R. F. Specialized features of the trigeminal nerve and its central connection. In Samii M, Janeta PT editors. The cranial nerves. Berlin: Springer; 1981. P. 273 – 301.
3. Boada MD. Relation between electrophysiology signature and defined sensory modality of trigeminal ganglion neurons in vivo. J Neurophysiol. 2013; 109: 749-57.
4. Lopez de Armentia M, Cabanes C, Belmonte C. Electrophysiological properties of identified trigeminal ganglion neurons innervating the cornea of the mouse. Neuroscience. 2000; 101(4): 1109-15.
5. Catacuzzeno L, Fioretti B, Pietrobon D, Franciolini F. The differential expression of low-threshold K^+ currents generates distinct firing patterns in different subtypes of adult mouse trigeminal ganglion neurons. J Physiol. 2008; 21(586): 5101 –18.
6. Fang X, McMullan S, Lawson SN, Djouhri L. Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurons in the rat in vivo. J Physiol. 2005; 3 (565): 927 – 943.
7. Abdulla FA, Smith PA. Ectopic α_2 -adrenoceptors couple to N-type Ca^{2+} channels in axotomized rat sensory neurons. J Neurosci. 1997; 17(5): 1633-41.
8. Takeda H, Tsuboi Y, Kitagawa J, Nakagawa K, Iwata K, Matsumoto S. Potassium channels as a potential therapeutic target for trigeminal neuropathic and inflammatory pain. Molecular pain. 2011; 7(5) : 2013-20.
9. Haper AA, Lawson SN. Conduction velocity is related to morphological cell type in dorsal root ganglion neurons. J Physiol. 1985; 359: 31-46.
10. Fitzgerald M, Fulton BP. The physiological properties of developing sensory neurons. In: Scott SA editor. Sensory neurons : diversity, development and plasticity New York: Oxford; 1992. P. 287-306.
11. Strassman AM, Raymond SA. Electrophysiological evidence for tetrodotoxin-resistance sodium channels in slowly conducting dural sensory fibers. J Neurophysiol. 1999; 81: 416-24.
12. Cabanes C, Lopez de Armentia M, Viana F, Belmonte C. Postnatal changes in membrane properties of mice trigeminal ganglion neurons. J Neurophysiol. 2002; 87: 2398-407.

13. Kitamura N, Konno A, Kuwahara T, Komagiri Y. Nerve growth factor-induced hyperexcitability of rat sensory neurons in culture. *Biomedical research* 2005; 26(3):123-30.
14. Passmore GM. Dorsal root ganglion neurons in culture: a model system for identifying novel analgesic targets. *J Pharmacol and Toxicol Methods* 2005; 51:201-8.
15. Veselosky NS, Engert F, Lux HD. Fast local superfusion technique. *Pfluger Arch.* 1996; 432(2): 351-4.
16. Puil E, Spigelman I. Electrical physiological responses of trigeminal root ganglion neurons in vitro. *Neurosci.* 1988; 24(2):635-46.
17. Kaupp UB, Seifert R. Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu Rev Physiol.* 2002;63: 235-57.
18. Cho HJ, Staikopoulos VS, Ivanusic JJ, Jennings EA. Hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide gated 4(HCN4) protein is expressed in subset of rat dorsal root and trigeminal ganglion neurons. *Cell tissue Res.* 2009; 338: 171-7.
19. Robinson RB, Siegelbaum SA. Hyperpolarization-activated cation current: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol.* 2007; 579:1-14.
20. Kim HC, Chung MK. Voltage-dependent sodium and calcium current in acutely isolated adult rat trigeminal root ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 1999; 81:1123-34.
21. Louise Faber ES, Sah P. Calcium-activated potassium channels: multiple contribution to neuronal function. *Neuroscientist* 2003; 9:181-194.

*Матеріал надійшов
до редакції 09.11.2015*