

УДК 519.21

К.А. Казмірчук, А.О. Москалюк, Є.В. Кузьмінський

**ДОСЛІДЖЕННЯ ЕЛЕКТРИЧНОЇ АКТИВНОСТІ НЕЙРОНІВ КУЛЬТУРИ ГІПОКАМПА**

It is shown in this paper that the presynaptic cell directly causes postsynaptic current in the postsynaptic neuron determines its amplitude. Combination of the electrophysiological techniques, mathematical tools, and cytochemical research allow deeper analysis and understanding of the differences in the mechanisms of generation series of action potentials and excitatory inhibitory neurons in the hippocampus. For electrophysiological studies of synaptic interactions involving pairs of cultured hippocampal neurons at different types of pulsed electrical activity of the presynaptic cell the following methodological approaches were used: cooking culture dissociated hippocampal neurons in low density, the method of fixing the intracellular potential on the postsynaptic neuron configuration "whole-cell"; method of pair registration, the method of local extracellular perfusion program for blocking brake and exciting synaptic transmission and selective potassium channel blockers; cytochemical analysis, mathematical methods and processing results. It was also shown that there are two groups of GABA-ergic interneurons in hippocampal culture, which differ by the type of electrical activity: AP is able to generate high-frequency and unable to generate high-frequency capable of generating action potential in response to prolonged stimulation of depolarizing current pulses. These groups significantly differ also by the kinetic properties of AP.

**Keywords:** hippocampus, electrical activity, action potential, synaptic transmission, GABA-ergic interneurons, cultivation, parvalbumin, cytochemical painting.

**Вступ**

Однією з властивостей нервових клітин, що забезпечує їх здатність до передачі інформації, є електричне збудження. Згідно з мембранною теорією збудження, сформульованою Ю. Бернштейном і розвинутою П. Бойлем, Е. Конуєєм і А. Ходжкіним, Б. Кацем, А. Хакслі [1, 2], при подразненні збудливої клітини в її поверхневій мембрані відбувається молекулярна перебудова, яка призводить до зміни проникності мембрани і появи трансмембранних іонних струмів. Інтернейрони центральної нервової системи здатні генерувати серії потенціалів дії з різною частотою протягом тривалого (0,5–1 с) прикладання деполяризуючого струму. На підставі цих електрофізіологічних властивостей інтернейрони поділяються на ті, для яких характерна високочастотна генерація потенціалів дії, на ті, які ритмічно генерують потенціали дії з низькою частотою, і ті, які проявляють зв'язану активність. Одним із основних факторів, який формує відмінності в параметрах потенціалів дії, є наявність різних комбінацій потенціалзалежних  $K^+$ -каналів [1].

У більшості робіт з дослідження імпульсної електричної активності гальмівних ГАМК-ергічних інтернейронів вивчаються характеристики високочастотних серій потенціалів дії [3]. Останні літературні дані дають змогу вважати, що серед гальмівних інтернейронів гіпокампа існують клітини, здатні генерувати ритмічні серії потенціалів дії з низькою частотою. Проте

наявні роботи не розглядають питання, якими саме типами потенціалзалежних калієвих каналів обумовлена генерація низькочастотних серій потенціалів дії гальмівними ГАМК-ергічними інтернейронами і які типи каналів обумовлюють відмінності в низькочастотній генерації потенціалів дії збудливими і гальмівними нейронами [4].

Велика увага в сучасній біофізиці приділяється вивченню механізмів електричного збудження нервової клітини, оскільки електрична активність нейронів є тим ініціюючим чинником, який зумовлює викид нейромедіатора в синаптичну щілину. Виникаючі при цьому постсинаптичні струми впливають на поляризацію мембрани і, як наслідок, спричиняють або подальше поширення нервового імпульсу, або його блокування. Сума поступаючих збудливих і гальмівних сигналів обумовлює низку функціональних особливостей нейрона, в тому числі його інтегративні властивості.

Таким чином, дослідження характеристик імпульсної електричної активності і наявності певних типів потенціалзалежних калієвих каналів у гальмівних і збудливих нейронів, властивостей постсинаптичних струмів, безумовно, становить науковий інтерес і має практичне значення щодо розуміння ролі різних типів потенціалзалежних калієвих каналів у визначенні властивостей нервової клітини й особливості передачі сигналів. Особливий інтерес для розуміння визначення цих процесів становить порівняння імпульсної електричної активності

гальмівних і збудливих нейронів, чому і була присвячена ця робота.

### Постановка задачі

Метою роботи є аналіз генеруючих потенціалів дії і постсинаптичних струмів у синаптично зв'язаних парах нейронів культури гіпокампа щура.

Для досягнення цієї мети поставлені такі завдання:

- порівняти характеристики високочастотних і низькочастотних серій потенціалів дії, що генеруються гальмівними інтернейронами, низькочастотних серій потенціалів дії, що генеруються збудливими і гальмівними нейронами;
- з'ясувати, який модулюючий білок (соматостатин чи парвальбумін) містять досліджувані нейрони;
- визначити, чи співвідноситься здатність клітини низькочастотно генерувати потенціали дії з наявністю одного визначеного або кількох різних типів потенціалозалежних калієвих каналів.

### Матеріали і методи дослідження

Для приготування культури використовувались новонароджені щури лінії Wistar. Одразу ж після декапітування головний мозок поміщали в середовище Ігла ("Sigma", США) з додаванням 20 мМ NERES, 25 од/мл натрієвої солі бензилпеніциліну та 25 мкг/мл стрептоміцину сульфату. Важливим було якомога швидше дістати мозок. Скальпелем виділяли гіпокамп і нарізали його на частинки товщиною 1-2 мм. Ферментативна обробка здійснювалась 0,05%-ним розчином трипсину (тип XII-S, "Sigma", США) за кімнатної температури. Після цього тканину промивали чотири рази в культуральному середовищі. Склад культурального середовища: мінімальне середовище Ігла, 10 % кінської сироватки, 6 мкг/мл інсуліну, бікарбонатний буфер (2,3 г/л  $\text{NaHCO}_3$ ), натрієва сіль бензилпеніциліну – 25 од/мл, стрептоміцину сульфат – 25 мкг/мл. Суспензію клітин отримували за допомогою механічної дисоціації пастерівськими піпетками, які послідовно змінювали на менший діаметр. У камері Горяєва підраховувалась кількість клітин на одиницю об'єму в первинній суспензії. Для отримання необхідної кількості клітин у суспензії (густина клітин при посадці 30 тис. на 1  $\text{cm}^2$ ) додавали культуральне середовище. Після цього клітини поміщали в

чашки Петрі, що попередньо були оброблені полі-L-орнітином. Наливалось по 250 мкл суспензії в скляне кільце діаметром 9 мм. Чашку Петрі із суспензією поміщали в інкубатор ("Jouan", Франція). Середовище в інкубаторі – повітряно-газове з молекулами  $\text{CO}_2$  (5 %), температура 37 °C [5].

На третій день культивування в середовище додавали 5 мкМ цитозин-A-D-арабіно-фуранозиду ("Sigma", США) для пригнічення проліферації гліальних клітин, а через 15–20 год повністю змінювали середовище. На рис. 1 зображена культура нейронів на 10-й день культивування.

Для одночасної реєстрації потенціалу дії на пресинаптичній клітині і викликаних постсинаптичних струмів використовувалася методика фіксації струму і потенціалу в конфігурації "ціла клітина" відповідно.

Пресинаптичний нейрон ідентифікувався візуально, а після встановлення електричного контакту – за наявністю викликаних моносинаптичних струмів на постсинаптичній клітині при стимуляції пресинаптичної.

Після такої ідентифікації пресинаптичного нейрона в культурі подальші дані з пресинаптичної клітини знімалися в режимі фіксації струму, з постсинаптичної – фіксації потенціалу. Застосовувалася компенсація ємності піпетки. Ефективна вхідна ємність підсилювача і піпетки разом становила не більше 4 пФ.

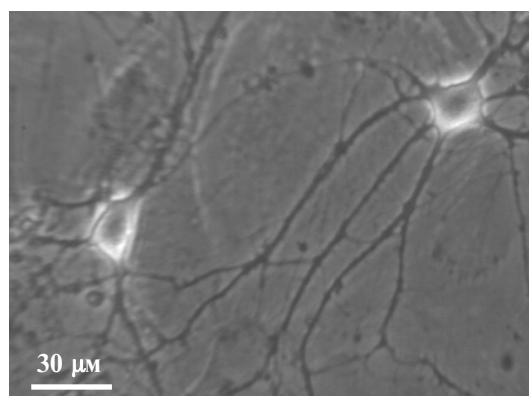


Рис. 1. Культура нейронів гіпокампа на 10-й день культивування

Для дослідів бралися клітини, які мали потенціал спокою не нижче  $-45$  мВ. За допомогою підтримуваного струму клітину гіперполяризували приблизно до  $-70$  мВ, щоб уникнути інактивації різних потенціалактивованих каналів. Підтримуваний потенціал у всіх випад-

ках становив  $-75$  мВ. Після цього до пресинаптичної клітини прикладалися струми тривалістю  $0,5$  с. Спочатку клітина стимулювалася невеликими струмами позитивної і негативної полярності для оцінки опору і ємності мембрани. Потім подавався мінімальний надпороговий деполяризуючий струм. Це спричиняло виникнення тільки одного потенціалу дії протягом усього стимулу, кінетичні характеристики якого потім розраховувалися.

Для ідентифікації рецепторів, що беруть участь у синаптичній передачі, і додавання селективних блокаторів потенціалзалежних калієвих каналів здійснювалася швидка локальна суперфузія. Також аплікація інших речовин робилася на одну або обидві вибрані клітини за допомогою системи локальної суперфузії.

Ця система являє собою дві скляні піпетки з діаметром отвору  $10-30$  мкм (діаметр відсмоктуючої піпетки зазвичай трохи більший за діаметр аплікуючої). Усередині аплікуючої піпетки розміщені підвідна і відвідна трубки, що дають змогу видаляти розчин із простору всередині піпетки. Підвідна трубка з'єднана з чотирма шприцами, в які можуть заливатися розчини. До відвідної трубки приєднаний електромагнітний клапан, який дає можливість швидко змінювати негативний тиск на тиск значно менший.

Цей клапан забезпечує швидке локальне додавання аплікуючої речовини на досліджувані клітини. На пристосуванні розміщена відсмоктуюча піпетка, яка забезпечує відтік аплікуючого розчину з камери.

У першому неробочому положенні гідростатичні тиски підібрані так, що розчин з аплікуючої піпетки потрапляє безпосередньо у відвідну. У другому робочому положенні відбуваються спрацювання клапана і внаслідок цього швидка зміна величини негативного тиску у відвідній трубці.

У третьому робочому положенні негативний тиск відвідної трубки малий і тестуючий розчин вилучається з піпетки через вхідний отвір, покриваючи повністю площу аплікації. Гідростатичний позитивний тиск, що прикладається до розчину, і негативний тиск відсмоктуючої піпетки підібрані таким чином, щоб ламінарні лінії струму тестуючого розчину обмежували опуклу витягнуту стаціонарну область з чіткою межею (товщина перехідного шару від тестуючого до внутрішньокамерного розчинів становить близько  $10$  мкм).

Вихідні отвори піпеток розміщені на однаковій висоті – близько  $5$  мкм над дном, і в робочому стані тестуючий розчин повністю омивав клітини. Відстань між піпетками по горизонталі становила  $50-150$  мкм.

### Результати і їх обговорення

Нейрони, здатні генерувати високочастотні серії потенціалу дії, дещо різнилися за своєю морфологією від клітин, які генерують низькочастотні серії потенціалу дії. Для вибраних нейронів вимірювався середній розмір клітини (під середнім розміром клітини мається на увазі середнє арифметичне значення великого і малого діаметрів соми) і підраховувалася кількість відростків. Так, середній розмір соми становив  $34,23 \pm 0,62$  мкм і середня кількість відростків –  $5,17 \pm 0,40$ .

Потенціалзалежні калієві ( $K_v$ ) канали відіграють основну роль у регуляції збудливості нейронів гіпокампа ссавців. У цих нейронах  $K_v$ -канали контролюють постсинаптичну дію у відповідь на збудливий вхід, модулюють амплітуду обернено розповсюджуючих потенціалів дії, контролюють властивості потенціалів дії в нейроні і частоту генерації потенціалу дії.

Використовуючи методику локальної суперфузії, ми застосували аплікацію 4-амінопіридину для того, щоб визначити, чи задіяні  $K_v3$ -канали в досліджуваному типі електричної активності нейронів. Вважається, що саме наявність  $K_v3.1/K_v3.2$ -каналів визначає здатність нейрона до високочастотної генерації потенціалу дії [6]. А 4AP селективно блокує швидкі  $K_v$ -канали затриманого випрямлення, істотно зменшуючи частоту генерації потенціалу дії [7].

4-амінопіридин у концентрації  $400$  мкМ зумовлював обернені зміни кінетичних характеристик і частоти потенціалу дії при максимальному стимулі ( $n = 3$ ). 4-амінопіридин збільшує тривалість потенціалу дії (для першого потенціалу дії у серії з  $1,38 \pm 0,14$  до  $1,60 \pm 0,18$  мс, для останнього – з  $2,63 \pm 0,40$  до  $4,10 \pm 0,54$  мс), зменшує миттєву частоту генерації потенціалу дії (для першого потенціалу дії у серії з  $64,23 \pm 2,97$  до  $49,53 \pm 3,77$  Гц, для останнього – з  $55,32 \pm 5,40$  до  $42,33 \pm 5,12$  Гц), зменшує максимальну швидкість реполяризації (для першого потенціалу дії у серії з  $-64,49 \pm 4,55$  до  $-54,12 \pm 3,19$  мВ/мс, для останнього – з  $-29,91 \pm 5,48$  до  $-9,77 \pm 4,41$  мВ/мс), зменшує максимальну швидкість деполяризації (для

**Таблиця 1.** Порівняння характеристик потенціалів дії гальмівних інтернейронів, здатних генерувати потенціали дії (ПД) високо- і низькочастотно

Параметри	ГАМК-ергічні з високочастотними серіями ПД	ГАМК-ергічні з низькочастотними серіями ПД
Амплітуда ПД, мВ	78,11 ± 2,78	80,63 ± 1,58
Амплітуда гіперполяризації після ПД, мВ	-8,73 ± 1,31	-3,93 ± 0,95
Максимальна швидкість деполяризації, мВ/мс	205,54 ± 14,57	169,35 ± 6,88
Максимальна швидкість реполяризації, мВ/мс	-78,95 ± 4,08	-58,58 ± 2,41
Максимальна швидкість реполяризації 2-го ПД, мВ/мс	-48,76 ± 4,14	-36,55 ± 1,79
Тривалість 1-го ПД, мс	1,11 ± 0,04	1,76 ± 0,05
Тривалість 2-го ПД, мс	1,33 ± 0,06	2,27 ± 0,09
Стационарна частота генерації ПД, Гц	50,82 ± 3,13	22,68 ± 1,05

першого потенціалу дії у серії з  $163,37 \pm 12,55$  до  $129,60 \pm 9,75$  мВ/мс, для останнього – з  $27,06 \pm 10,71$  до  $7,94 \pm 3,76$  мВ/мс).

Таким чином, ми можемо зробити висновок, що оскільки при дії 4-амінопіридину в концентрації, яка блокує зазначені типи каналів, збільшується тривалість одиничного потенціалу дії, а частота генерації серії потенціалів дії значно сповільнюється, то механізм генерації з високою частотою, ймовірно, опосередкований Kv3.1- і Kv3.2-типом калієвих каналів у культивованих нейронах.

Наші дані, отримані на нейронах, які генерували потенціал дії з високою частотою, практично у всіх аспектах узгоджуються з літературними [8]. У всіх досліджених випадках високочастотно генеруючі потенціал дії нейрони були гальмівними, експресували парвальбумін і демонстрували чітке забарвлення, специфічне до Kv3.1  $\alpha$ -субодиниці калієвих каналів.

На основі аналізу морфологічних ознак нейронів, генеруючих високочастотні серії потенціалу дії, і зважаючи на те, що характеристики потенціалу дії всередині зазначеної групи мали незначну дисперсію, ми можемо припустити, що досліджували одну з численних груп гальмівних інтернейронів.

Беручи до уваги класифікацію інтернейронів гіпокампа, запропоновану раніше [8], група вчених [9] дослідила, що генерувати потенціал дії з високою частотою можуть аксональні, а також деякі типи інтернейронів, іменовані за назвами гіпокампальних шарів.

Ще одним типом нейронів, який був вивчений у нашій роботі, є інтернейрони, які генерують серії потенціалів дії не з високою частотою (50–70 Гц), а з більш низькою – від 20 до 40 Гц. Такий тип електричної активності в літературі названий низькочастотним [9].

Низькочастотна активність більшою мірою властива збудливим клітинам гіпокампа, зокрема пірамідним.

За результатами наших електрофізіологічних експериментів можна припустити, що серед гальмівних інтернейронів гіпокампа існує не менше двох популяцій клітин, що демонструють низькочастотну електричну активність. Нейрони, що належать цим популяціям, різняться за морфологією та експресією модулюючих нейропептидів. Однак статистичний аналіз параметрів низькочастотної активності нейронів показав, що характеристики потенціалів дії між групами статистично не різнилися (табл. 1).

### Імуноцитохімічне фарбування

Електрони в молекулах при поглинанні світла, механічному або хімічному впливі можуть переходити у збуджений стан. При переході електронів зі збудженого стану в основний або зі збудженого стану з більшою енергією в збуджений стан з меншою енергією деякі чутливі молекули можуть випромінювати світло. Це явище називається люмінесценцією. Явище випромінювання молекулою або атомом світла при збудженні фотоном ультрафіолету або видимого світла називається фотолюмінесценцією, яку залежно від електронної конфігурації збудженого стану та процесу випромінювання формально поділяють на флуоресценцію та фосфоресценцію. Флуоресценція – це властивість деяких атомів або молекул поглинати світло визначеної довжини хвилі та випромінювати світло з більшою довжиною хвилі через короткий інтервал часу, що називається тривалістю флуоресценції.

На сьогодні флуоресцентна мікроскопія широко застосовується в медичних та біологіч-

них дослідженнях. Це зумовлено тим, що вона відкриває нові можливості для досліджень, не досяжні при використанні світлової мікроскопії. Тому широке застосування флуоресцентної мікроскопії спричинило появу більш складних мікроскопів і приладів, що дають змогу застосовувати флуоресцентні методи досліджень.

Флуоресцентна мікроскопія, на відміну від інших видів світлової мікроскопії, дає змогу відображати розподіл окремих молекул завдяки лише використанню властивостей флуоресцентного випромінювання. Завдяки флуоресцентній мікроскопії з'явилася змога відстежувати розміщення окремих компонент клітини, зв'язаних специфічними флуорофорами, а також їх коефіцієнти дифузії, транспортні характеристики та взаємодію з біомолекулами. Значна залежність флуоресценції від зміни зовнішніх факторів дає змогу досліджувати рН, в'язкість, коефіцієнт заломлення, полярність розчину, йонні концентрації та мембранні потенціали в живих клітинах і культурах клітин.

Нейрони, які в електрофізіологічних експериментах були визначені як високочастотно генеруючі потенціал дії, піддавалися імуноцитохімічному фарбуванню з метою отримання додаткових даних про їх морфологічні властивості та розміщення різних типів калієвих каналів на їх мембранах.

Отримані на зрізах гіпокампа парвальбумін-позитивні гальмівні інтернейрони здатні генерувати потенціал дії з високою частотою і при цьому мають набір іонних каналів ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ -залежних,  $\text{K}^+$  тощо) й утворюють певні типи синаптичних закінчень, властивих тільки цьому типу клітин. Тому перша частина імуноцитохімічних експериментів була присвячена фарбуванню культивованих нейронів антитілами специфічними до  $\text{Ca}^{2+}$  зв'язуючого пептиду – парвальбуміну (PV).

На препаратах пофарбованих парвальбумін-специфічними антитілами всі нейрони ( $n = 4$ ), визначені електрофізіологічно як високочастотно генеруючі потенціал дії, демонстрували високий рівень імунореактивності до цього типу антитіл. Флуоресцентні мітки чітко визначалися як на нейронних сомах, так і на всіх відростках (рис. 2).

Поліпептид соматостатин був визначений як гормон у гіпоталамусі, який регулює секрецію гормону росту. Пізніше соматостатин був описаний як нейромедіатор і нейромодулятор [9]. Соматостатин синтезується багатьма нейронами в різних ділянках мозку, і його викид є

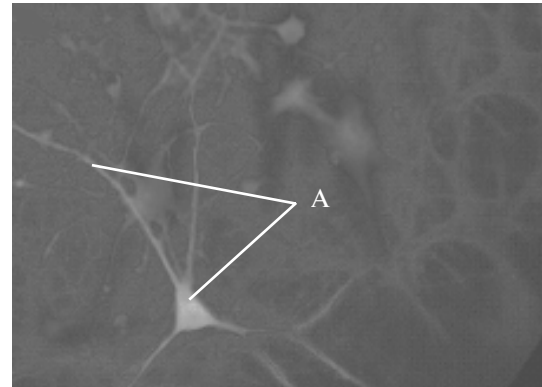


Рис. 2. Нейрони, пофарбовані антитілами, специфічними до парвальбуміну: А – флуоресцентні мітки

$\text{Ca}^{2+}$ -залежним процесом. Вважається, що цей білок залучений у регуляцію безлічі найскладніших функцій центральної нервової системи, зокрема больової чутливості та формування пам'яті [10]. Крім того, рівень соматостатину змінюється при деяких дисфункціях мозку, наприклад таких, як старече недоумство або скронева епілепсія.

Неокортекс і гіпокамп належать до тих ділянок мозку, в яких зосереджена особливо велика кількість соматостатинвмісних нейронів. У гальмівних інтернейронах гіпокампа соматостатин є котрансмітером. Іони кальцію здатні регулювати викид соматостатину цими ГАМК-ергічними нейронами *in vitro* та *in vivo*. Однак питання про те, є соматостатин у гіпокампі гальмівним медіатором (як ГАМК) чи збудливим, залишається спірним.

Наступний етап імуноцитохімічних експериментів полягав у виявленні  $\alpha$ -субодиниці  $\text{Kv3.1}$ -типу калієвих каналів у нейронів, які високочастотно генерують потенціал дії.

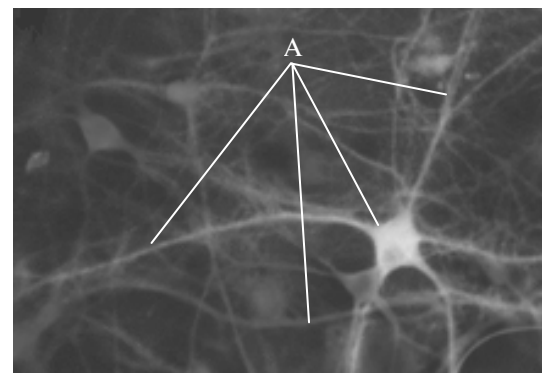


Рис. 3. Нейрони, що демонструють високочастотний характер генерації потенціалу дії, пофарбовані антитілами, специфічними до  $\text{Kv3.1}$  калієвих каналів: А – флуоресцентні мітки

Було показано, що гальмівні високочастотно генеруючі потенціал дії інтернейрони фарбувалися Kv3.1-специфічними антитілами з досить високою інтенсивністю. Імунні мітки виявлені у всіх досліджених клітинах ( $n = 5$ ). Як і у випадку фарбувань з парвальбумін-специфічними антитілами, мітки чітко спостерігалися як на тілах нейронів, так і на відростках (рис. 3).

Таким чином, в імуноцитохімічних дослідженнях показано, що нейрони, ідентифіковані в електрофізіологічних експериментах як високочастотно генеруючі потенціал дії, демонстрували високу парвальбумін-імунореактивність (були PV-позитивні) і експресували Kv3.1 калієві канали з високою щільністю, що добре узгоджується з електрофізіологічними експериментами.

Kv3 калієві канали мають низку властивостей, які забезпечують генерацію потенціалу дії з високою частотою. Високий поріг активації (приблизно  $-20$  мВ) і швидка кінетика деактивації ( $< 1$  мс при потенціалі спокою) цих каналів роблять їх ідеальними для зменшення тривалості потенціалу дії та інтервалів між потенціалами дії без впливу на амплітуду і поріг потенціалу дії. Зменшення тривалості потенціалу дії у серії зменшує інактивацію  $\text{Na}^+$ -каналів. Усі ці ефекти приводять до високочастотної генерації потенціалів дії.

Гальмівні інтернейрони, які в електрофізіологічних експериментах були визначені як такі, що генерують низькочастотний потенціал дії, вибірково піддавалися імуноцитохімічному фарбуванню. В табл. 2 наведено порівняння результатів імуноцитохімічного фарбування.

Враховуючи відсутність достатньої кількості літературних даних з питання про наявність модулюючих пептидів у гальмівних інтернейронах, здатних генерувати низькочастотний потенціал дії, нами були проведені імуноцитохімічні фарбування з метою з'ясування цього питання. При цьому використовувалися антитіла, специфічні до парвальбуміну (PV) і соматостатину (SS).

Жоден нейрон ( $n = 6$ ), як з великим розміром соми, так і з малим, який проявив себе в електрофізіологічних експериментах як гальмівний, що низькочастотно генерує потенціал дії, не демонстрував імунореактивності до PV-специфічних антитіл.

На препаратах, мічених антитілами до SS, високий рівень імунореактивності демонстрували тільки клітини, що мають більший розмір соми (в середньому  $27,9$  мкм) ( $n = 7$ ). Флюорес-

центні мітки чітко визначалися як на їх сомах, так і на всіх найближчих відростках.

На нейронах, що мають діаметр соми в середньому  $17,3$  мкм, соматостатинові позначки не визначалися.

Для того щоб визначити типи потенціал-залежних калієвих каналів, які містяться на мембранах сом, і їх розміщення на відростках досліджуваних нейронів, нами проводилося фарбування клітин з використанням антитіл проти внутрішньоклітинної N-термінальної ділянки  $\alpha$ -субодиниці Kv1.2-, Kv3.1- і Kv4.2-типу калієвих каналів.

Це дослідження показало, що обидва підтипи гальмівних низькочастотно генеруючих потенціал дії інтернейронів зафарбовувалися Kv1.2-специфічними антитілами (рис. 4). Імунні мітки розміщувалися на сомах і нейронних відростках, найбільш близьких до клітинних тіл. На їх дистальних відростках позначки не виявлялись.

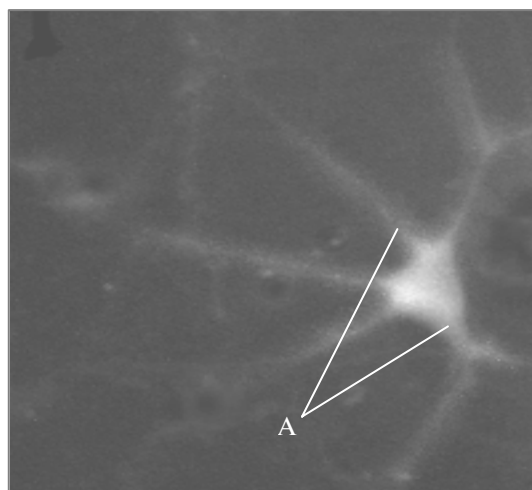


Рис. 4. Нейрони, що демонструють низькочастотний характер генерації потенціалу дії, зафарбовані антитілами, специфічними до Kv1.2 калієвих каналів: А – флюоресцентні мітки

Kv3.1- і Kv4.2-специфічне забарвлення не було виявлене на досліджуваних нейронах.

Таким чином, імуноцитохімічне дослідження показало, що гальмівні ГАМК-ергічні нейрони, ідентифіковані в електрофізіологічних експериментах як низькочастотно генеруючі потенціал дії, були імунопозитивними до соматостатину залежно від морфології та експресували калієві канали Kv1.2-типу.

Внутрішньоклітинне розподілення Kv1.2 білків складне і неоднорідне в межах головного мозку. У деяких нейронах, наприклад пірамід-

Таблиця 2. Узагальнюючі дані результатів імуноцитохімічних фарбувань

Тип клітин		PV	SS	Kv1.2	Kv3.1	Kv4.2
ГАМК-ергічні з високочастотними серіями ПД		+	-	-	+	-
ГАМК-ергічні з низькочастотними серіями ПД	сома ~27,9 мкм	-	+	++	--	--
	сома ~17,3 мкм		-			

них клітинах гіпокампа і кори, клітинах Пуркінє, Kv1.2 концентруються на дендритах, у той час як в інших нейронах Kv1.2 переважно, якщо не виключно, локалізовані на синаптичних закінченнях. Більше того, Kv1.2-імунореактивність була помічена на аксонах. Припускають, що такий просторовий розподіл Kv1.2 є наслідком того, що Kv1.2 може входити до складу гетеромультимімерних K<sup>+</sup>-каналів у різних внутрішньоклітинних органелах. Kv1.2, що містять K<sup>+</sup>-канали, можуть грати різні функціональні ролі в декількох ділянках клітини, регулюючи пресинаптичну або постсинаптичну збудливість мембрани, що залежить від типу клітини.

### Гранулярні клітини зубчастої борозни

В експериментах ми також вибрали гранулярні клітини як приклад збудливих інтернейронів. В умовах культури гранулярні клітини ідентифікувалися на основі їх морфологічних та електрофізіологічних властивостей. Так, культивовані гранулярні клітини мали чітко виражену краплеподібну форму і розмір у середньому  $13,37 \pm 0,62$  мкм. Апікальні відростки гранулярних клітин роздвоювалися, в той час як каудальні були поодинокими і практично не гілкувалися.

Таблиця 3. Електрофізіологічні параметри потенціалів дії (ПД) гранулярних клітин

Параметри ПД	Значення
Амплітуда ПД, мВ	$71,11 \pm 3,02$
Амплітуда гіперполяризації після ПД, мВ	$-10,03 \pm 1,18$
Максимальна швидкість деполяризації, мВ/мс	$117,11 \pm 12,39$
Максимальна швидкість реполяризації, мВ/мс	$-42,85 \pm 3,66$
Максимальна швидкість реполяризації 2-го ПД, мВ/мс	$-27,51 \pm 2,01$
Тривалість 1-го ПД, мс	$1,93 \pm 0,15$
Тривалість 2-го ПД, мс	$2,53 \pm 0,22$
Стационарна частота генерації ПД, Гц	$27,67 \pm 2,29$

Середній потенціал спокою дорівнював  $-52,13 \pm 1,71$  мВ, середній вхідний опір –  $748,56 \pm 91,61$  МОм.

П'ятнадцять гранулярних клітин були вибрані для аналізу їх електрофізіологічної активності (табл. 3). Клітини бралися в експеримент з 14 по 23-й день культивування.

Подвійне імуноцитохімічне фарбування для клітин з відомими електрофізіологічними характеристиками проводилося для визначення експресії калієвих каналів і наявності модулюючих пептидів, соматостатину і парвальбуміну.

На препаратах, забарвлених SS-специфічними антитілами, всі досліджені гранулярні клітини ( $n = 9$ ) демонстрували високий рівень імунореактивності до цього типу антитіл. Флуоресцентні мітки чітко визначалися як на нейронних сомах, так і на всіх відростках (рис. 5).

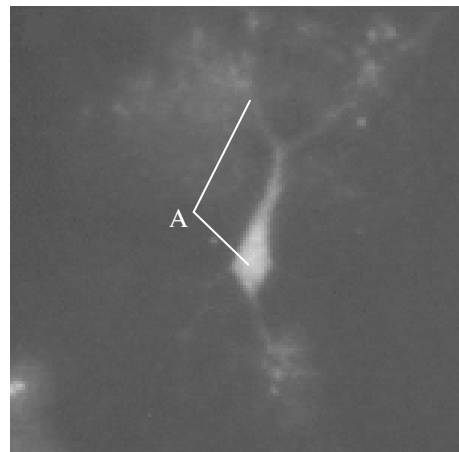


Рис. 5. Мікрофотографія культивованих гранулярних клітин, зафарбованих антитілами, специфічними до соматостатину: А – флуоресцентні мітки

Гранулярні клітини не були імунореактивними до парвальбумін-специфічних антитіл.

Для вивчення розміщення потенціалзалежних калієвих каналів проводилося фарбування гранулярних клітин з використанням антитіл проти Kv1.2-, Kv3.1- і Kv4.2-типу калієвих каналів.

Дослідження показало, що гранулярні клітини фарбуються як на Kv4.2, так і на Kv1.2.

Проте інтенсивність флюоресцентного світіння і переважне розміщення різнилися. Мітки на Kv4.2 локалізувалися як на нейронних сомах, так і на нейритах. Kv1.2-імунореактивність чітко визначалася на сомах і з віддаленням від соми слабшала.

Таким чином, імуноцитохімічні дослідження показали, що гранулярні клітини в умовах культури демонстрували високу SS-імунореактивність та експресували калієві канали Kv1.2 і Kv4.2 з високою щільністю, що добре узгоджується з електрофізіологічними експериментами, проведеними на цих же клітинах.

Низькочастотна електрична активність більшою мірою характерна для збудливих, ніж для гальмівних нейронів. У нашій роботі гранулярні клітини зубчастої борозни гіпокампа були досліджені як збудливі нейрони. Однак, як свідчать літературні дані [11], цей тип інтернейронів в умовах *in vivo* завжди експресує незначну кількість ферменту глутаматдекарбоксилази, необхідного для синтезу ГАМК. Тому було важливо визначити тип електричної активності гранулярних клітин і побічно оцінити, чи можемо ми вважати умови культивування близькими до фізіологічних.

За літературними даними, гранулярні клітини являють собою однорідну групу короткоаксональних нейронів, що посилають потужні глутаматергічні проєкції, моховиті волокна до пірамідних нейронів зони гіпокампа. Гранулярні клітини утворюють синаптичні контакти також із сусідніми гальмівними інтернейронами [11].

У наших електрофізіологічних експериментах гранулярні клітини демонстрували тільки серії потенціалів дії з низькою частотою. Більше того, ці клітини показали добру імунореактивність до Kv4.2-специфічних антитіл, що пояснює здатність клітин генерувати низькочастотний потенціал дії. При порівнянні таких характеристик потенціалів дії, як амплітуда потенціалу дії, амплітуда гіперполяризації після потенціалу дії, максимальна швидкість деполаризації, максимальна швидкість реполяризації і

2-го потенціалів дії, гальмівних і збудливих інтернейронів, здатних генерувати серії потенціалів дії з низькою частотою, ми встановили, що відмінності є статистично значущими. Це може бути пов'язано з тим фактом, що обидва типи клітин експресують Kv1.2-тип калієвих каналів, у той час як гальмівні інтернейрони (на відміну від гранулярних клітин) не містять Kv4.2-типу калієвих каналів.

### Висновки

Методами парної реєстрації електричної активності синаптично пов'язаних нейронів та імуноцитохімічного аналізу досліджені електрофізіологічні властивості гальмівних інтернейронів.

Досліджені дві групи ГАМК-ергічних інтернейронів у культурі гіпокампа, що різняться за типом електричної активності.

Група ГАМК-ергічних інтернейронів, генеруючих потенціал дії високочастотно, характеризується наявністю великої кількості калієвих каналів Kv3.1-типу і вмістом парвальбуміну.

Гальмівні інтернейрони, які генерують серії потенціалу дії з низькою частотою, містять калієві канали Kv1.2-типу, наявність Kv4.2-типу не виявлено. Ця група інтернейронів неоднорідна за морфологічними ознаками та наявністю модулюючих пептидів і була розділена на дві підгрупи. Кінетичні параметри постсинаптичних струмів, викликаних низькочастотною серією потенціалів дії гальмівних інтернейронів, корелюють з морфологічними параметрами пресинаптичних клітин.

Збудливі нейрони (гранулярні клітини) генерують низькочастотний потенціал дії, містять соматостатин і експресують калієві канали Kv1.2- і Kv4.2-типу.

У майбутньому планується продовжити визначення нових характеристик імпульсної електричної активності та досліджувати культуру нервових клітин гіпокампа в цілому.

### Список літератури

1. I.M. Mintz and B.P. Bean, "GABAB receptor inhibition of P-type Ca<sup>2+</sup> channels in central neurons", *Neuron*, no. 10, pp. 889–898, 1993.
2. Кузьмінський Є.В., Голуб Н.Б. Біофізика. – К.: Комп'ютерпрес, 2007. – 421 с.
3. Семьянов А.В. ГАМК-эргическое торможение в ЦНС: типы ГАМК-рецепторов и механизмы тонического ГАМК-опосредованного тормозного действия // *Нейрофизиология*. – 2002. – 34, № 1. – С. 82–92.
4. Веселовський М.С., Федулова С.А., Костюк П.Г. Біофізика одиночного синапса. – К.: Наук. думка, 2004. – С. 54–83.
5. P. Anderson et al., "Lamellar organization of hippocampal pathways", *Exp. Brain Res.*, no. 13, pp. 222–238, 1971.



6. *Костюк П.Г., Гродзинський Д.М., Шуба М.Ф.* Біофізика. – К.: Наук. думка, 1988. – С. 25–36.
7. *Ніколс Дж.Г., Мартін А.Р., Фукс П.А.* Від нейрона до мозку. – М.: Едиториал УРСС, 2003. – С. 54–63.
8. *Виноградова О.С.* Гіпокамп і пам'ять. – М.: Наука, 1975. – С. 78–90.
9. *H. Mohler and J.M. Fritschy*, “GABAB receptors make it to the top – as dimers”, *Trends Pharmacol. Sci.*, no. 20, pp. 87–89, 1999.
10. *Антонов В.Ф.* Біофізика. – М.: ВЛАДОС, 2000. – С. 35–100.
11. *Биофизика* / В.Г. Артюхов, Т.А. Ковалева, М.А. Наквашина и др. – М.: Академический Проект, 2010. – С. 58–73.

Рекомендована Радою  
факультету біотехнології і біотехніки  
НТУУ “КПІ”

Надійшла до редакції  
25 жовтня 2013 року