



MEDYCINA DYDAKTYKA WYCHOWANIE

ISSN 0137-6543

ROK XL

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

SUPLEMENT I

Spis treści:

SESJA 1.

Kanały jonowe błon biologicznych

<i>I. Koszela-Piotrowska, K. Dołowy, W. Jarmuszkiewicz, A. Szewczyk</i> Rekonstrukcje mitochondrialnych kanałów jonowych do sztucznych błon lipidowych.....	5
<i>K. Choma, A. Szewczyk, K. Dołowy</i> Elektrofizjologiczne właściwości mitochondrialnych kanałów jonowych z serca.....	8
<i>P. Bednarczyk, J.E. Kowalczyk, K. Dołowy, A. Szewczyk, B. Zabłocka</i> Kanał potasowy regulowany napięciem w mitochondriach hipokampa.....	11
<i>B. Szulczyk, P. Szulczyk</i> Metoda rejestracji potencjałozależnych prądów Na ⁺ w konfiguracji „cell-attached” w skrawkach kory mózgowej.....	15
<i>A. Teisseyre, K. Michalak</i> Inhibicja aktywności kanałów potasowych typu Kv1.3 przez wybrane modulatory oporności wielolekowej.....	19
<i>R. Rola, G. Witkowski, P. Szulczyk</i> Właściwości kinetyczne prądów jonowych K ⁺ w neuronach współczulnych mięśniowych i skórnych.....	24

SESJA 2.

Badania funkcji receptorów metodami elektrofizjologicznymi

<i>M. Stankiewicz, J. Ciołek, A. Zienkiewicz, M.E. De Lima</i> Co można wykryć w jadzie pająka, posługując się metodami elektrofizjologicznymi?.....	29
<i>J.W. Mozrzyk, T. Wójtowicz, K. Mercik, P. Wyrembek, K. Lebida</i> Mechanizmy modulacji prądów synaptycznych GABAergicznych przez agonistów receptora benzodiazepiny.....	34
<i>G. Witkowski, R. Rola, P. Szulczyk</i> Niezależne od potencjału kanały jonowe K ⁺ w neuronach piramidowych kory przedczołowej.....	38
<i>T. Wójtowicz, K. Lebida, J.W. Mozrzyk</i> Długotrwała ekspozycja na erytropoetynę lub estradiol moduluje kinetykę GABAergicznych prądów synaptycznych.....	42
<i>J. Wabno, K. Tokarski, B. Bobula, G. Hess</i> Wielokrotne podania imipraminy osłabiają transmisję glutaminianergiczną w korze mózgu szczura.....	48

Wydawca:

Warszawski Uniwersytet Medyczny,
Senacka Komisja
ds. Informacji Naukowej i Wydawnictw

Skład i druk:

Oficyna Wydawnicza WUM
tel. 022 57 20 327, fax 022 57 20 328
e-mail: oficynawydawnicza@wum.edu.pl
www.wum.edu.pl/oficynawydawnicza

SESJA 3.
Elektrofizjologia układu ruchowego

E. Nurowska, B. Dworakowska, K. Dołowy
Prądy potasowe w komórkach mięśniowych w chorobie Steinerta.....53
J. Kopeć
„Functional-QEMG”, nowa metoda standardowych badań EMG57

SESJA 4.
Elektrofizjologia rytmów biologicznych

R. Bocian, A. Połuszny, T. Kowalczyk, H. Gołębiwski, J. Konopacki
Modulująca rola synaps elektrycznych w generowaniu hipokampalnego rytmu theta
u anestetyzowanego szczura.....60
T. Kowalczyk, H. Gołębiwski, P. Nockowski, R. Bocian, A. Połuszny, J. Konopacki
Udział zakrętu zębatego formacji hipokampa w generowaniu rytmu theta *in vitro*66
D. Pękala, T. Błasiak, M. H. Lewandowski
Wpływ projekcji oreksynowej na aktywność listka ciała kolankowatego bocznego72
A. Sobolewski
Wysokoamplitudowe oscylacje 7-12 Hz w korze mózgowej szczurów
– objaw padaczki czy zjawisko fizjologiczne?.....76
M. Gola, J. Kamiński, A. Brzezicka, A. Wróbel
Długość oraz częstotliwość występowania paczek beta jako neuronalny korelat
zmian mechanizmu uwagi związanych z procesami starzenia.....80
K. Werhun, M.H. Lewandowski
Analiza okołodobowej aktywności neuronów
serotonergicznych przyśrodkowych jąder szwu szczura85
A. Maciejewski, M. Łątka, W. Jernajczyk
Zastosowanie metody empirycznej dekompozycji modalnej i złożoności Lempel'a-Ziv'a
do analizy EEG chorych na schizofrenię.....90

SESJA 5.
Elektrofizjologia wyższych czynności nerwowych

Y. Garkun, M. Bekisz, G. Hess, M. Kossut
Modyfikacja częstości generacji potencjałów czynnościowych przez neurony kory mózgowej
wywołana uczeniem asocjacyjnym – badania *ex vivo*94
J. Spyrka, G. Hess
Wpływ stresu unieruchomienia na długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP)
w zakręcie zębatym myszy98
G. Mochol, D.K. Wójcik, M. Wypych, A. Wróbel, W.J. Waleszczyk
Modele niejednorodnych procesów punktowych a kodowanie informacji w układzie wzrokowym103
M. Wypych, G. Mochol, A. Ghazaryan, A. Wróbel, W.J. Waleszczyk
W poszukiwaniu mechanizmów preferencji kierunku ruchu bodźca
przez neurony wzrokowe górnych warstw wzgórków górnych.....107
J. Kamiński
Dwa strumienie uwagi aktywnej beta w pętłach korowo-wzgórzowych112



TECHNIKI ELEKTROFIZJOLOGICZNE W BADANIU UKŁADU NERWOWEGO: Od Kanałów Jonowych po Sieci Neuronowe

Tegoroczny Suplement I do wydawnictwa Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego *Medycyna Dydaktyka Wychowanie* zawiera 26 artykułów monograficznych, odpowiadających referatom wygłoszonym na konferencji zatytułowanej „Techniki Elektrofizjologiczne w Badaniu Układu Nerwowego: Od Kanałów Jonowych po Sieci Neuronowe”. Konferencja została zorganizowana przez Zakład Fizjologii Człowieka Wydziału Farmaceutycznego, Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego w dniach 6 i 7 czerwca 2008 roku. Jej celem była integracja środowiska neurofizjologów, działających w obszarze nauk podstawowych biologicznych i w neurofizjologii klinicznej.

Konferencja była VI z kolei spotkaniem neurofizjologów. Pierwsze zostało zorganizowane przez naszą nieodżałowaną koleżankę Marysię Bijak – wybitnego polskiego fizjologa i farmakologa, kierownika Zakładu Fizjologii Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie w 2001 roku.

Wykład inauguracyjny wygłosił podczas tegorocznej konferencji Profesor Hubert Kwieciński. Został on w całości poświęcony kanałopatiom, czyli genetycznie uwarunkowanym dysfunkcjom kanałów jonowych. Patologia ta coraz częściej jest diagnozowana przez lekarzy.

Konferencja została podzielona na 5 sesji.

Pierwsza, zatytułowana „Kanały jonowe błon biologicznych”, została poświęcona analizie funkcji kanałów jonowych przy pomocy różnych metod neurofizjologicznych, ze szczególnym uwzględnieniem nowej metody polegającej na rejestracji kanałów jonowych z błon wyizolowanych mitochondriów.

Sesja druga, zatytułowana „Badania funkcji receptorów metodami elektrofizjologicznymi”, została poświęcona metodom elektrofizjologicznym służącym analizie funkcji receptorów jonotropowych, metabotropowych i funkcji kanałów jonowych zlokalizowanych w błonach receptorów czuciowych.

Referaty wygłoszone w czasie sesji „Elektrofizjologia układu ruchowego” dotyczyły elektrofizjologii błon komórkowych mięśni poprzecznie prążkowanych oraz elektrofizjologicznej diagnostyki funkcji mięśni poprzecznie prążkowanych i układu ruchowego.

Sesja zatytułowana „Elektrofizjologia rytmów biologicznych” została poświęcona w całości mechanizmom powstawania rytmów biologicznych i udziałowi w ich powstawaniu neurotransmiterów. Uwypuklona została rola synaps elektrycznych w synchronizacji aktywności neuronów ośrodkowego układu nerwowego.

Ostatnia sesja – „Elektrofizjologia wyższych czynności nerwowych” – dotyczyła kluczowych zagadnień współczesnych badań ośrodkowego układu nerwowego, była więc próbą odpowiedzi na pytanie, jakie jest podłoże funkcjonalne zachowania – podstawowej funkcji ośrodkowego układu nerwowego.

Konferencja mogła się odbyć dzięki wsparciu finansowemu udzielonemu przez Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Farmaceutyczny Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, firmę Precoptic Co. – mikroskopy Nikon oraz firmę Hamamatsu.

prof. dr hab. Paweł Szulczyk

Rekonstrukcja mitochondrialnych kanałów jonowych do sztucznych błon lipidowych

Reconstitution of mitochondrial ion channels to planar lipid bilayers

Izabela Koszela-Piotrowska¹, Krzysztof Dołowy³, Wiesława Jarmuszkiewicz², Adam Szewczyk¹

¹ Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Warszawa

² Pracownia Bioenergetyki, Uniwersytet Adama Mickiewicza, Poznań

³ Katedra Biofizyki, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego SGGW, Warszawa

Streszczenie

Kanały jonowe selektywne dla jonów potasowych i chlorkowych obecne są w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Do ich funkcji można zaliczyć: utrzymanie homeostazy jonowej, reagowanie na zmiany objętości wnętrza mitochondriów, tworzenie gradientu pH pomiędzy macierzą mitochondrialną a cytoplazmą komórki oraz wpływanie na ilość produkowanych reaktywnych form tlenu. Przy użyciu techniki czarnych błon lipidowych mierzyliśmy aktywności pojedynczych kanałów potasowych i chlorkowych pochodzących z wewnętrznej błony mitochondrialnej mięśni szkieletowych szczura, z ziemniaka *Solanum tuberosum* i z eukariotycznego mikroorganizmu *Acanthamoeba castellanii*. Stwierdziliśmy obecność jednego kanału chlorkowego i dwóch różnych kanałów potasowych we wszystkich typach badanych mitochondriów.

Słowa kluczowe: mitochondria, mitochondrialne kanały jonowe, technika sztucznych błon lipidowych

Abstract

Chloride and potassium selective ion channels are present in the inner mitochondrial membrane. Potassium uptake upon mitochondrial energization may partly compensate the electric charge transfer produced by proton pumping and thus enable the formation of a pH gradient along with the transmembrane electric potential. Chloride channels may be involved in several crucial processes such as regulation of mitochondrial volume or membrane potential. Single channel activity was measured after reconstitution of the inner mitochondrial membranes from rat skeletal muscle, the eukaryotic microorganism *Acanthamoeba castellanii*, and the potato *Solanum tuberosum* into a planar lipid bilayer. Two potassium channels types and one chloride channel were observed in all three types of investigated mitochondria.

Key Words: mitochondria, mitochondrial ion channels, planar lipid bilayers technique

Wstęp

Mitochondria to dobrze poznane organelle, które występują we wszystkich komórkach roślinnych i zwierzęcych. Macierz mitochondrialną, stanowiącą wnętrze mitochondrium, otaczają dwie błony – wewnętrzna i zewnętrzna. Energia uwalniana w mitochondriach w wyniku utleniania substratów łańcucha oddechowego może być utrzymywana w formie elektrochemicznego gradientu protonów, który wykorzystywany jest do syntezy ATP (przez F_0F_1 syntazę ATP).

Wewnętrzna błona mitochondrialna jest barierą zabezpieczającą przez swobodnym przepływem jonów. Znajdują się w niej białka transportujące dla anionów, odpowiedzialne za przenoszenie substratów metabolicznych pomiędzy macierzą i cytozolem [1, 2]. Obecne są tam również białka transportujące jedno- i dwuwartościowe kationy, np.: kanały jonowe, które regulują istotne funkcje fizjologiczne komórki i samego mitochondrium [3, 4]. Głównymi kanałami jonowymi występującymi w wewnętrznej błonie mitochondrialnej, opisanymi w literaturze są: kanał potasowy regulowany przez ATP (mitoK_{ATP}) [5], kanał potasowy aktywowany jonami wapniowymi (mitoBK_{Ca}) [6], kanał Kv1.3 [7], kanał magnezowy Mrs2p [8], kanał anionowy mtCLIC [9], kanał anionowy IMAC (ang. *mitochondrial inner membrane anion channel*) [10], białko rozprzegające UCP (ang. *uncoupling protein*) [11] oraz uniporter wapniowy mCU (ang. *mitochondrial calcium uniporter*) [12]. Funkcje, jakie mogą pełnić kanały jonowe, to: utrzymanie homeostazy jonowej, reagowanie na zmiany objętości wnętrza mitochondriów, tworzenie gradientu pH pomiędzy macierzą mitochondrialną a cytoplazmą komórki oraz wpływanie na ilość produkowanych reaktywnych form tlenu [13].

Materiały i metody

Jednym ze sposobów pomiaru przepływu jonów przez błony biologiczne jest technika sztucznej dwuwarstwy lipidowej, zwana też techniką czarnych błon lipidowych (z ang. *black lipid membrane*, BLM) opisana po raz pierwszy w latach 60-tych XX wieku przez Muellera i współpracowników [14, 15]. Technika ta pozwala określić właściwości elektrofizjologiczne i farmakologiczne pojedynczych białek błonowych [16]. Miejszem eksperymentu jest sztuczna dwuwarstwa lipidowa. Tworzy się ją poprzez nałożenie roztworu lipidów (rozpuszczonych w niepolarnym rozpuszczalniku, np.: n-dekanie) na niewielki otwór o średnicy 250 μm , znajdujący się pomiędzy dwoma naczynkami zawierającymi roztwory wodne. Lipidy, ulegając samoorganizacji, tworzą błonę. Schemat poniżej przedstawia ważniejsze elementy układu stosowanego do pomiarów aktywności kanałów jonowych (Rycina 1).

Do badań kanałów techniką czarnych błon lipidowych konieczne jest oczyszczenie frakcji błonowej lub uzyskanie czystego, funkcjonalnego białka kanałowego. Warunkiem powodzenia tego typu eksperymentów jest przede wszystkim duża czystość otrzymywanych frakcji subkomórkowych oraz znalezienie warunków wydajnej rekonstytucji badanego białka do czarnych błon lipidowych [16].

Wyniki

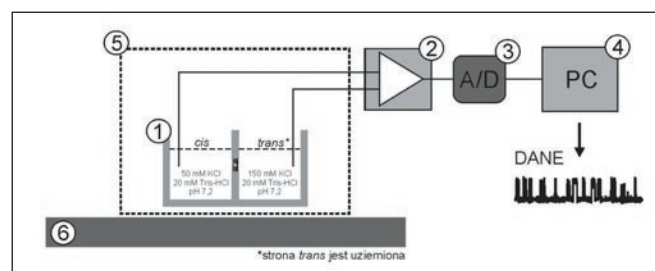
Pochodzące z różnych tkanek mitochondria różnią się wielkością oraz kształtem. Dowiedziono jednak, że zarówno w mitochondriach zwierzęcych, jak i u roślin wyższych oraz w mikroorganizmach, takich jak *A. castellanii* wewnętrzna błona mitochondrialna może zawierać podobny zestaw kanałów jonowych [17, 18]. Eksperymenty z użyciem techniki sztucznych błon lipidowych pozwoliły nam porównać właściwości kanałów chlorkowych i potasowych obecnych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej wybranych organizmów. Obserwowaliśmy różne aktywności kanału chlorkowego, dla którego amplituda płynącego prądu przy 30 mV w gradiencie roztworów 50/450 mM KCl (cis/trans) wahała się od 2,83 pA (dla kanałów z mitochondriów mięśni szkieletowych) do 5,6 pA oraz 5,8 pA (odpowiednio: dla kanałów z mitochondriów ameby *A. castellanii* i ziemniaka *Solanum tuberosum*) (Rycina 2). Sprawdzaliśmy również wpływ niespecyficznego inhibitora kanałów chlorkowych – DIDS (kwasu diizotiocyanosulfonowego) na aktywność badanych kanałów. Jak wiadomo pochodne stilbenu, takie jak DIDS,

mogą zmieniać aktywność kanałów i przenośników dla anionów. Związki te posiadają przynajmniej jedną grupę izotiocyanową, dzięki której mogą oddziaływać z grupami aminowymi reszt lizynowych na przenośniku lub kanale anionowym [19]. Stwierdziliśmy, że odpowiedzi kanałów chlorkowych na działanie DIDS nie były jednakowe. Tylko w przypadku kanałów anionowych z mitochondriów z ameby *A. castellanii* DIDS nie wpływał na aktywność kanałową. W mitochondriach z mięśni szkieletowych i mitochondriach z ziemniaka *Solanum tuberosum* DIDS (w stężeniu odpowiednio: 1 mM i 200 μM) hamował aktywność kanałów chlorkowych [18]. Oprócz kanałów anionowych w badanych mitochondriach obserwowaliśmy również aktywności potasowe, najczęściej o dwóch różnych amplitudach (Rycina 3). Wartości amplitud zostały zebrane w Tabeli 1. W przypadku kanału o dużej amplitudzie płynącego prądu z mitochondriów ameby *A. castellanii* udało nam się określić jego profil farmakologiczny i zakwalifikować go jako białko wykazujące podobne właściwości do kanału potasowego regulowanego przez ATP [17].

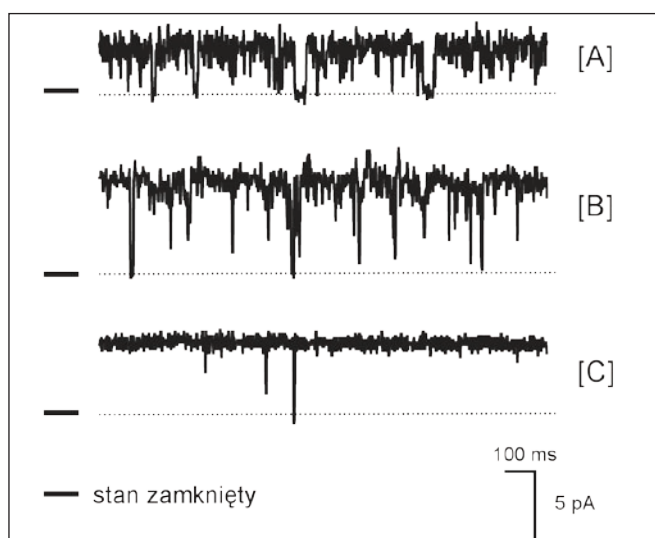
W ciągu ostatnich lat poziom wiedzy na temat elektrofizjologicznych właściwości kanałów jonowych z wewnętrznej błony mitochondrialnej znacznie się podniósł. I chociaż udało się zbadać wiele ich cech biofizycznych i farmakologicznych, to z pewnością dalsze poszukiwania i charakteryzowanie kanałów jonowych stanowią duże wyzwanie.

Podziękowania

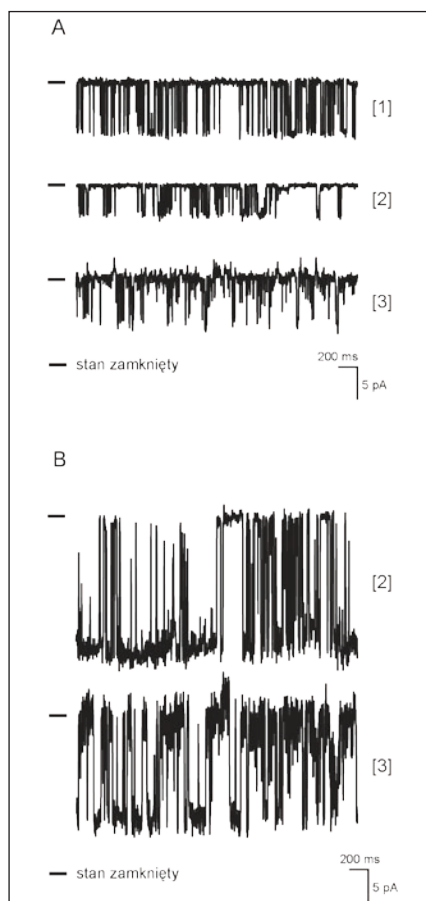
Opisane prace były finansowane przez Polską Sieć Mitochondrialną MitoNet.pl oraz projekty badawcze – Grant N 301 053 311676.



Rycina 1. Technika sztucznych błon lipidowych – schemat układu pomiarowego. Naczynko z elektrodami (1), wzmacniacz (2), konwerter analogowo-cyfrowy (3), komputer z programem do zbierania danych pomiarowych i ich analizy (4), klatka Faradaya (5), stół antywibracyjny (6).



Rycina 2. Charakterystyka prądowo-napięciowa pojedynczych kanałów chlorkowych pochodzących z wewnętrznej błony mitochondrialnej mięśni szkieletowych [A], ziemniaka *Solanum tuberosum* [B] i ameby *Acanthamoeba castellanii* [C], wbudowanych do sztucznej dwuwarstwy lipidowej. Zapis wykonano przy +30 mV. Warunki eksperymentalne: 50/450 mM KCl (cis/trans), 20 mM Tris, pH 7,2.



Rycina 3. Charakterystyka prądowo-napięciowa pojedynczych kanałów potasowych pochodzących z wewnętrznej błony mitochondrialnej mięśni

szkieletowych [1], ziemniaka *Solanum tuberosum* [2] i ameby *Acanthamoeba castellanii* [3] wbudowanych do sztucznej dwuwarstwy lipidowej. **A.** kanały potasowe o małej i **B.** kanały potasowe o dużej amplitudzie płynącego prądu. Zapis wykonano przy 0 mV. Warunki eksperymentalne: 50/450 mM KCl (cis/trans), 20 mM Tris, pH 7,2.

Badane organizmy	Mięsień szkieletowy szczura	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
Kanały potasowe o małej amplitudzie	4 – 7 pA	3 – 5 pA	4 – 5 pA
Kanały potasowe o dużej amplitudzie	13 – 29 pA	11 – 18 pA	13 – 19 pA

Tabela 1. Porównanie wartości amplitud prądu płynącego przez kanały potasowe z wewnętrznej błony mitochondrialnej mięśni szkieletowych szczura, *Solanum tuberosum* i *Acanthamoeba castellanii*. Warunki eksperymentalne: 50/450 mM KCl (cis/trans), 20 mM Tris, pH 7,2. Zapisy wykonano przy potencjale 0 mV.

Piśmiennictwo

- Laloi M. Plant mitochondrial carriers: an overview. *Cell Mol Life Sci* 1999; 56, 918-944.
- Palmieri F., Bisaccia F., Capobianco L., Dolce G., Fiermonte V., Iacobazzi V., Indiveri C. and Palmieri L. Mitochondrial metabolite transporters. *Biochim. Biophys Acta* 1996; 1275, 127-132.
- Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V. and Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 1999 264, 687-701.
- Garlid K.D., Sun X., Paucek P. and Woldegiorgis G. Mitochondrial cation transport systems. *Methods Enzymol* 1995; 260, 331-348.
- Inoue I., Nagase H., Kishi K., Higuti T. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondria inner membrane, *Nature* 1991; 352, 244-247.
- Siemen D., Loupatatzis C., Borecky J., Gulbins E., Lang F. Ca²⁺-activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line, *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257, 549-554.
- Szabo I., Jekle A., Soddemann M., Adams C., Lang F., Zoratti M., Gulbins E. A novel potassium channel in lymphocyte mitochondria, *J Biol Chem* 2005; 280, 12790-12798.
- Kolisek M., Zsurka G., Samaj J., Weghuber J., Schweyen R., Schweigel M. Mrs2p is an essential

- component of the major electrophoretic Mg^{2+} influx system in mitochondria, *EMBO J* 2003; 22, 1235-1244.
9. Fernandez-Salas E., Sagar M., Cheng C., Yuspa S.H., Weinberg W.C. p56 and tumor necrosis factor alpha regulate the expression of a mitochondrial chloride channel protein, *J Biol Chem* 1999; 274, 36488-36497.
10. Borecky J., Jezek P. and Siemen D. 108-pS channel in brown fat mitochondria might be identical to the inner membrane anion channel. *J Biol Chem* 1997; 272, 19282-19289.
11. Ardehali H. Cytoprotective channels in mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2005; 37, 171-177.
12. Kirichok Y., Krapivinsky G., Clapham D.E. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel, *Nature* 2004; 427, 360-364.
13. Skalska J., Dębska-Vielhaber G., Głąb M., Kula-wiak B., Malińska D., Koszela-Piotrowska I., Bednarczyk P., Dołowy K., Szewczyk A. Mitochondrialne kanały jonowe, *Postępy Biochemii* 2006 52, 137-144.
14. Mueller P., Rudin D.O. Action potentials induced in biomolecular lipid membranes. *Nature* 1968; 217, 713-719.
15. Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. Reconstitution of cell membrane structure *in vitro* and its transformation into an excitable system, *Nature* 1962; 194, 979-980.
16. Koszela-Piotrowska I., Choma K., Szewczyk A., Dołowy K., Bednarczyk P. Rekonstrukcja mitochondrialnych kanałów jonowych do sztucznych błon lipidowych. *Na pograniczu chemii i biologii*, 2006; XV, str. 101-116.
17. Kicinska A., Swida A., Bednarczyk P., Koszela-Piotrowska I., Choma K., Dołowy K., Szewczyk A., Jarmuszkiewicz W. ATP-sensitive potassium channel in mitochondria of the eukaryotic microorganism *Acanthamoeba castellanii*. *J Biol Chem* 2007; 282, 17433-41.
19. Koszela-Piotrowska I., Choma K., Bednarczyk P., Dołowy K., Szewczyk A., Kunz W.S., Malekova L., Kominkova V., Ondrias K. Stilbene derivatives inhibit the activity of the inner mitochondrial membrane chloride channels. *Cell Mol Biol Lett* 2007; 12 (4), 493-508.
20. Cabantchik Z.I. and Greger R. Chemical probes for anion transporters of mammalian cell membranes. *Am J Physiol* 1992; 262, 803-827.

Adres korespondencyjny:

Izabela Koszela-Piotrowska,
Pracownia Wewnątrzkomórkowych
Kanałów Jonowych,
Instytut Biologii Doświadczalnej,
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa,
tel.: (022) 589 23 43,
e-mail: i.piotrowska@nencki.gov.pl

Elektrofizjologiczne właściwości mitochondrialnych kanałów jonowych z serca

Electrophysiological properties of mitochondrial ion channels from the heart

Katarzyna Choma^{1,2}, Adam Szewczyk², Krzysztof Dołowy¹

¹Katedra Fizyki, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

²Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

Streszczenie

Wiele typów kanałów jonowych jest obecnych w błonach mitochondriów serca. W ciągu ostatnich dziesięciu lat wzrosło zainteresowanie ich biochemicznymi i farmakologicznymi właściwościami. Dowiedziono, że mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP – $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ i mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany jonami Ca^{2+} – $\text{mitoBK}_{\text{Ca}}$ biorą

udział w kardioprotekcji, lecz nie poznano jeszcze mechanizmu tego zjawiska. Wykazano, że wzrost poziomu ekspresji mitochondrialnych kanałów chlorkowych prowadzi do apoptozy.

Metodą patch-clamp zidentyfikowano kanał anionowy w wewnętrznej błonie mitochondrialnej z serca szczura i krowy. Przewodność tego kanału z serca krowy wynosi 107 pS, a z serca szczura 120 pS w symetrycznym roztworze 150/150 mM KCl. Zbadano wpływ aktywatorów i inhibitorów

kanałów anionowych (DIDS, SITS, DCEBIO) na nasz kanał.

Słowa kluczowe: mitochondria, kanał anionowy, patch-clamp, serce

Abstract

Various types of ion channels are present in membranes of cardiac mitochondria. During the last ten years, these ion channels became the object of many studies focused on their biochemical and pharmacological characterization. It was proven that mitochondrial ATP-regulated potassium channel (mitoK_{ATP}) and mitochondrial Ca²⁺-activated large conductance potassium channel (mitoBK_{Ca}) are involved in cardioprotection, but the mechanism contributing to this process is still unclear. It was also shown that increases in the level of chloride channel expression leads to apoptosis.

By means of the patch-clamp technique, which allows the monitoring of a single ion channel's activity, we have found an anion channel in the inner mitochondrial membrane from rat and bovine heart. In symmetrical 150/150 mM KCl solutions, the anion channel had a mean conductance of 107 pS from bovine and 120 pS from rat heart. The effects of different channel inhibitors and activators (DIDS, SITS, and DCEBIO) on anion channel activity were also studied.

Key Words: mitochondria, anion channel, patch-clamp, heart

Wstęp

Mitochondria są organellami komórkowymi, których głównym zadaniem jest produkcja ATP. Biorą również udział w procesach metabolicznych utleniania i redukcji, oddychaniu komórkowym, procesie apoptozy, wytwarzaniu ciepła, magazynowaniu wapnia. Uczestniczą też w procesach przekazywania sygnałów w komórce. Wszystkie te procesy wymagają przepływu jonów przez błonę, który jest możliwy dzięki kanałom jonowym. Zaobserwowano udział mitochondrialnych kanałów jonowych w procesach śmierci komórkowej.

Kanały jonowe obecne są zarówno w zewnętrznej, jak i wewnętrznej błonie mitochondriów. Potwierdzono istnienie w zewnętrznej błonie mitochondriów kanału anionowego zależnego od napięcia (ang. *Voltage Dependent Anion Channel*, VDAC), zapewniającego przepływ jonów pomiędzy cytoplazmą i mitochondrialną przestrzenią międzybłonową [1] oraz megakanalu PTP (ang.

Permeability Transition Pore), którego białka obecne są zarówno w zewnętrznej i wewnętrznej błonie mitochondriów. W wewnętrznej błonie mitochondrialnej wykazano istnienie kanałów anionowych – IMAC – (ang. *Inner Membrane Anion Channel*) [2], uniporterów wapniowych, potasowego kanału regulowanego napięciem – mitoKv1.3 [3], potasowego kanału o dużym przewodnictwie regulowanego jonami Ca²⁺ – mitoBK_{Ca} [4], potasowego kanału regulowanego przez ATP – mitoK_{ATP} [5]. Aktywność potasowych kanałów mitochondrialnych mitoBK_{Ca} i mitoK_{ATP} jest związana z ochroną tkanek przed skutkami niedotlenienia, jednak mechanizm cytoprotekcji nie jest jeszcze poznany [6]. Z kolei hamowanie aktywności kanałów chlorkowych zapobiega apoptotycznej śmierci komórki w zjawisku reperfuzji [7].

Materiały i metody

Do badania własności elektrofizjologicznych kanałów jonowych wykorzystuje się metodę patch-clamp. W metodzie patch-clamp pomiary wykonuje się za pomocą dwóch elektrod. Jedna z nich umieszczona jest w szklanej pipecie wypełnionej roztworem i przyssanej do wewnętrznej błony mitochondrialnej. Druga elektroda umieszczona jest w roztworze zewnętrznym. Po uzyskaniu połączenia gigaomowego między pipetą i błoną można badać aktywność pojedynczych kanałów jonowych.

Do naszych badań używaliśmy mitochondriów z mięśnia sercowego szczura lub krowy. Mitochondria umieszczano w hipotonicznym roztworze. Na skutek napływu wody mitochondria pęczniały, a ich zewnętrzna błona ulegała rozerwaniu. Otrzymane w ten sposób mitoplasty umieszczano w roztworze izotonicznym (150 mM KCl i 200 μM CaCl₂). Do pomiaru prądów jonowych wykorzystane były elektrody chlorosrebrne wypełnione tym samym roztworem. Po przyssaniu swobodnie dryfującego mitoplastu do pipety i utworzeniu połączenia gigaomowego dokonywano pomiarów.

Wyniki

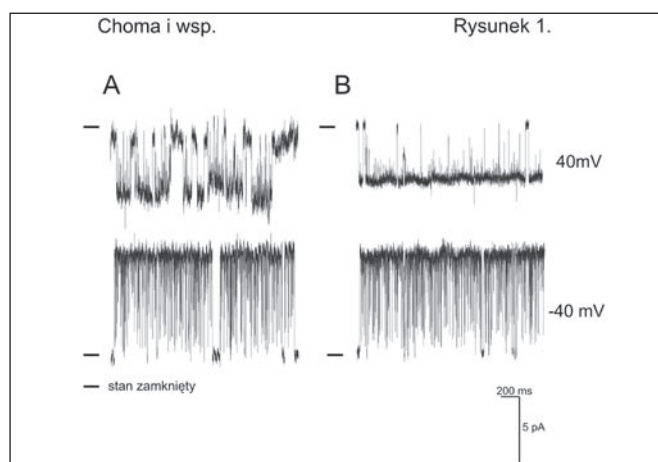
Zarówno w tkance z serca szczura, jak i serca krowy zaobserwowaliśmy istnienie kanału chlorkowego (Rycina 1). Przewodnictwo kanału chlorkowego z serca krowy wynosi 107,4 pS, a z serca szczura 120,8 pS w symetrycznym roztworze 150/150 mM KCl (Rycina 2). Zbadano wpływ pochodnych stilbenu – DIDS, SITS znanych blokerów kanałów chlorkowych [7].

Piśmiennictwo

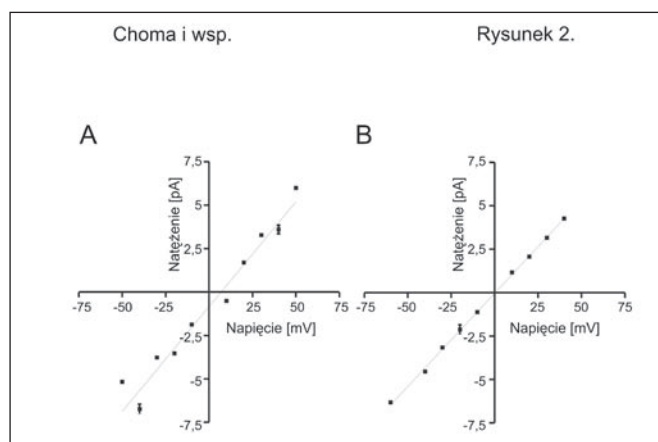
Wykazano zablokowanie badanych kanałów, podobnie jak analogicznych kanałów badanych techniką BLM – czarnych błon lipidowych [8]. Badaliśmy też efekt pochodnej benzimidazolu – DCEBIO, która zwiększa aktywność błonowego kanału chlorkowego CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) [9]. W kilku przypadkach zaobserwowano wzrost aktywności badanego kanału po podaniu DCEBIO.

Podziękowania

Praca była finansowana przez Polską Sieć Mitochondrialną.



Rycina 1. Przykładowe rejestracje aktywności kanału anionowego w roztworze symetrycznym 150/150 mM KCl przy 40 mV i -40 mV. **A.** Aktywność kanału chlorkowego obserwowana w mitochondriach izolowanych z serca szczura. **B.** Aktywność kanału chlorkowego obserwowana w mitochondriach izolowanych z serca krowy. „-” oznacza stan zamknięty kanału jonowego.



Rycina 2. Krzywe prądowo-napięciowe dla kanału chlorkowego w roztworze symetrycznym 150/150 mM KCl. **A.** W mitochondriach serca szczura. **B.** W mitochondriach serca krowy.

1. Lamasters JJ, Holmuhamedov E. (2006) Voltage-dependent anion channel (VDAC) as mitochondria governor – thinking outsider the box. *Biochim Biophys Acta* 1762: 181-190.
2. Beavis AD, Garlid KD. The mitochondrial inner membrane anion channel. Regulation by divalent cations and protons. *J Biol Chem* 262 (1987) 15085–15093.
3. Szabo I, Bock J, Jekle A, Soddemann M, Adams C, Lang F, Zoratti M, Gulbins E. (2005) A novel potassium channel in lymphocyte mitochondria. *J Biol Chem* 280: 12790–12798.
4. Siemen D, Loupatatzis C, Borecky J, Gulbins E, Lang F. (1999) Ca^{2+} – activated K channel of the BK – type in the inner mitochondrial membrane of human glioma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 257: 549–554.
5. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. (1991) ATP – sensitive K^+ channel in the inner mitochondrial membrane. *Nature* 352: 244–247.
6. Szewczyk A, Skalska J, Głąb M, Kulawiak B, Małińska D, Koszela-Piotrowska I, Kunz WS. (2006) Mitochondria potassium channels: From Pharmacology to function. *Biochim Biophys Acta* 1757: 715–720.
7. Wang X, Takahashi N, Uramoto H, Okada Y. (2005) Chloride channel inhibition prevents ROS – dependent apoptosis induced by ischemia – reperfusion in mouse cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem* 16: 147–154.
8. Koszela-Piotrowska I, Choma K, Bednarczyk P, Dolowy K, Szewczyk A. Stilbene derivatives inhibit activity of inner mitochondrial membrane chloride channels. *Cell & Molec Biol Lett* 12 (2007) 493–508.
9. Singh S, Syme CA, Singh AK, Devor DC, Bridges RJ. (2001) Benzimidazolone activators of chloride secretion: potential therapeutics for cystic fibrosis and chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther* 296 (2): 600–11.

Adres korespondencyjny:

Katarzyna Choma,
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego,
Polska Akademia Nauk,
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa,
tel.: (022) 589 22 39,
e-mail: k.choma@nencki.gov.pl

Kanał potasowy regulowany napięciem w mitochondriach hipokampa

Voltage-gated potassium channels in hippocampal mitochondria

Piotr Bednarczyk^{1,2}, J. E. Kowalczyk³, Krzysztof Dołowy², Adam Szewczyk¹, Beata Zabłocka³

¹Pracownia Wewnątrzkomórkowych Kanałów Jonowych, Instytut Biologii Doświadczalnej PAN, Warszawa

²Zakład Biofizyki, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

³Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, Warszawa

Streszczenie

Kanały potasowe regulowane przez ATP oraz aktywowane jonami Ca^{2+} (kanały o dużym przewodnictwie) biorą udział w ochronie neuronów przed śmiercią wywołaną np. niedotlenieniem i reperfuzją. W pracy wykorzystano technikę patch-clamp do pomiaru aktywności kanałów jonowych obecnych w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Mitoplasty otrzymywano z mitochondriów izolowanych z hipokampa chomika mongolskiego. W 70% wszystkich obserwacji mierzony był prąd potasowy kanału o przewodnictwie 109 ± 6 pS w układzie symetrycznych stężeń 150 mM KCl. Otrzymane wyniki wskazują, że jest to kanał potasowy regulowany napięciem (kanał Kv). Wykazano, że kompleks ATP/Mg²⁺ i jony Ca^{2+} nie mają wpływu na zmiany aktywności obserwowanego kanału. Aktywność tego kanału była blokowana przez napięcie oraz margatoksynę (MgTx), specyficzny inhibitor kanału Kv1.3 występującego w błonie plazmatycznej. Hamowanie przez MgTx było nieodwracalne. Przedstawione wyniki świadczą o obecności w wewnętrznej błonie mitochondrialnej izolowanej z hipokampa mózgu chomika mongolskiego nowego kanału potasowego regulowanego przez napięcie (kanału mitoKv), który może pełnić ważną funkcję w prawidłowym funkcjonowaniu komórek nerwowych oraz w poischemicznej neurodegeneracji lub neuroprotekcji.

Słowa kluczowe: kanał potasowy, mitochondria, patch-clamp

Abstract

Transient cerebral ischemia is known to induce adaptive mechanisms to prevent or delay neuronal injury such as the activation of mitochondrial ATP-regulated potassium channels or Ca^{2+} -regulated large conductance potassium channels. In this study, a single channel activity was measured with patch-clamp method from gerbil hippocampus mitoplasts. In 70% of all patches, a potassium selective current was recorded with a mean conductance 109 ± 6 pS in a symmetrical 150 mM KCl solution. Single channel

patch-clamp studies showed the properties of the voltage-gated potassium channel (Kv channel). We showed that an ATP/Mg²⁺ complex and Ca^{2+} ions had no effect on the observed activity of the ion channel. The observed channel was blocked by negative voltage and margatoxin (MgTx), a specific Kv1.3 channel inhibitor. Furthermore, the inhibition by MgTx was irreversible. We conclude that gerbil hippocampus mitochondria contain voltage-gated potassium channels (mitoKv) with properties similar to the surface membrane Kv1.3 channel. These mitoKv may play a role in controlling the function of mitochondria, as well as in ischemia-reperfusion related phenomenon.

Key Words: potassium channel, mitochondria, patch-clamp

Wstęp

Mitochondria to wewnątrzkomórkowe organelle wytwarzające ATP w komórce. Badania ostatnich lat wskazują, że mitochondria uczestniczą również w procesach przekazywania sygnałów w komórce. Dodatkowo pełnią ważną funkcję w procesie apoptozy. Istnieją doniesienia sugerujące, że dysfunkcje mitochondriów są przyczyną licznych procesów neurodegeneracyjnych, np. choroby Parkinsona czy też choroby Alzheimer'a. W błonie mitochondrialnej znajduje się wiele kanałów jonowych przepuszczających selektywnie kationy lub aniony (Rycina 1). Kanały te utrzymują homeostazę jonową w mitochondriach, odpowiedzialne są za zmiany objętości mitochondriów, a także biorą udział w tworzeniu gradientu pH między macierzą mitochondrialną a cytoplazmą komórki. Badania z ostatnich lat wskazują, że pełnią one istotną funkcję w indukowaniu procesów zmniejszających uszkodzenie tkanek spowodowane niedokrwieniem i reperfuzją. Istnieje wiele hipotez wskazujących na udział mitochondrialnych kanałów potasowych w cytoprotekcji [1].

Jednym z najlepiej scharakteryzowanych białek kanałowych jest mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP (kanał mitoK_{ATP}). Po raz pierwszy został on opisany w wewnętrznej błonie mitochondrialnej wątroby szczura [2]. Kanały o podobnych

właściwościach zostały zidentyfikowane w mitochondriach: serca [3], mózgu [4], mięśni szkieletowych [5] oraz ludzkich limfocytów T [6]. Mitochondrialne kanały są otwierane przez aktywatory kanałów potasowych, np. diazoksyd i hamowane przez kwas 5-hydroksydekanowy (5-HD) oraz pochodne sulfonocmocznika, np. glibenklamid (Rycina 1) [7]. Diazoksyd (aktywator kanału K_{ATP}) wykazuje około 1000 razy większe powinowactwo do kanału $mitoK_{ATP}$, niż do podobnego kanału w błonie plazmatycznej komórek mięśnia sercowego [8]. Inny aktywator kanałów potasowych BMS 191095 oddziałuje specyficznie z kanałem $mitoK_{ATP}$, a nie wykazuje powinowactwa do kanału K_{ATP} w błonie plazmatycznej [9]. Wykazano, że inhibitory kanału $mitoK_{ATP}$, takie jak glibenklamid oraz 5-HD obniżają ochronną rolę diazoksydu w zjawisku kardioprotekcji [10]. Stąd też poszukiwanie specyficznych aktywatorów mitochondrialnego kanału K_{ATP} stało się ważnym celem wielu grup badawczych.

Budowa kanału $mitoK_{ATP}$ nie została dotychczas poznana, ale wydaje się, że kanał ma strukturę podjednostkową. Podobnie jak kanał z błony plazmatycznej, mitochondrialny kanał K_{ATP} składa się z dwóch podjednostek: Kir6.x (podjednostka tworząca por kanału) i SUR (część regulatorowa będąca receptorem dla pochodnych sulfonocmoczników) [11].

Mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie, aktywowany jonami wapniowymi (kanał $mitoBK_{Ca}$) zidentyfikowano po raz pierwszy w mitoplastach oczyszczonych z komórek linii ludzkiego glejaka. Prawdopodobieństwo otwarcia tego kanału wzrasta wraz ze wzrostem stężenia Ca^{2+} w cytosolu oraz spadkiem potencjału mitochondrialnego. Podobnie jak w przypadku kanałów BK_{Ca} błony plazmatycznej, aktywność kanału hamowana jest przez charydotoksynę [12]. Rola kanałów BK_{Ca} w mitochondriach nie jest znana, wykazano jednak, że wzrost aktywności $mitoBK_{Ca}$ chroni komórki mięśnia sercowego przed skutkami niedotlenienia. Budowa kanału $mitoBK_{Ca}$ wydaje się podobna do kanału BK_{Ca} błony plazmatycznej, o którym wiadomo, że składa się z czterech podjednostek α (tworzących por kanału) oraz czterech podjednostek regulatorowych β [11].

Niedawno, stosując technikę patch-clamp odkryto kanał Kv1.3 w wewnętrznej błonie mitochondrialnej limfocytów T [13]. Jest on selektywny dla jonów potasowych, regulowany napięciem oraz wrażliwy na specyficzny inhibitor kanałów Kv1.3 – margatoksynę [14]. Doświadczenia z użyciem specyficznych przeciwciał anti-Kv1.3 potwierdziły obecność kanału Kv1.3 w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Masę cząsteczkową białka kanałowego oszacowano na ok. 65 kDa [13]. Budowa oraz rola fizjologiczna mitochondrialnego kanału Kv1.3 są ciągle słabo poznane. Ostatnio zaobserwowano terapeutyczny efekt hamowania aktywno-

ści kanałów Kv1.3 limfocytów T w układzie doświadczalnym imitującym stwardnienie rozsiane [15]. Doświadczenia z użyciem genetycznie zmodyfikowanych limfocytów T wskazują na jego udział w apoptozie komórek [15]. Mitochondrialny kanał Kv1.3 jest trzecim kanałem, któremu przypisuje się aktywny udział w transporcie jonów potasowych przez wewnętrzną błonę mitochondrialną oraz ochronny wpływ na komórki poddane działaniu czynników szkodliwych.

Materiały i metody

W przedstawionej pracy wykorzystano technikę elektrofizjologiczną, pozwalającą na rejestrację prądów jonowych płynących przez pojedyncze białka kanałowe – metodę patch-clamp w konfiguracji oderwanej łątki (Rycina 2). Mitochondria były otrzymywane z hipokampa mózgu chomika mongolskiego z wykorzystaniem wirowań różnicowych. Osad otrzymany w wyniku wirowania przez 12% Ficoll w buforze izotonicznym zawierał czyste i aktywne biologicznie mitochondria. Następnie indukowano pęcznienie mitochondriów (szok osmotyczny) tak, aby usunąć zewnętrzną błonę mitochondrialną, a jednocześnie wewnętrzna błona tworzyła pęcherzyk, tzw. mitoplast. Tak przygotowany pęcherzyk poddany lekkiemu zassaniu przez szklaną kapilarę tworzył ścisłe połączenie między błoną mitoplastu a kapilarą. Wszystkie przedstawione wyniki były wykonane w systemie oderwanej łątki (złącze miało oporność około 1,2 G Ω).

Wyniki

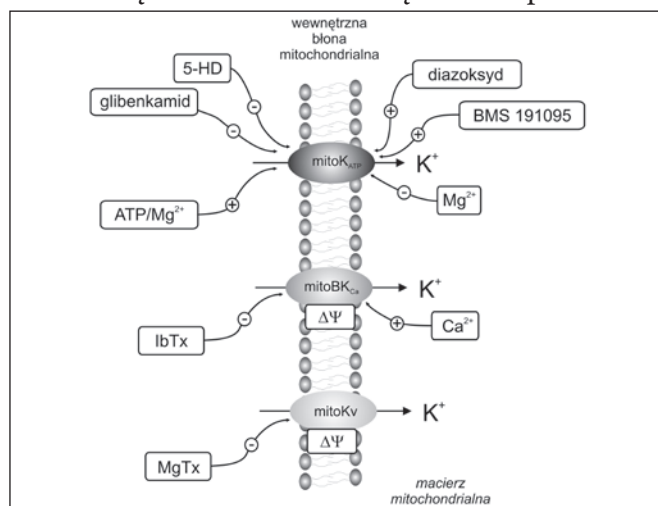
W tym opracowaniu przedstawiono wybrane wyniki aktywności kanału jonowego obecnego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej hipokampa chomika mongolskiego (nazwy potoczne: myszokoczek, gerbil). Rycina 3 przedstawia zapis otwarć kanału jonowego przy skokowej zmianie napięcia od -60 mV do 60 mV w symetrycznym układzie stężeń. Otrzymane rejestracje świadczą o hamowaniu aktywności kanału przy potencjale błonowym mniejszym niż napięciach niższych niż -25 mV. Z analizy zależności napięciowo-prądowej wynika, że przewodnictwo kanału wynosi 109 ± 6 pS ($n=4$). Dodatkowo, na podstawie charakterystyki prądowo-napięciowej w układzie różnicy stężeń 50/150 mM KCl, 20 mM Hepes, 100 mM $CaCl_2$, pH 7,2 wyznaczono potencjał odwrócenia -24 mV, co świadczy o wysokiej specyficzności kanału dla jonów potasowych (wyniki nie zostały przedstawione graficznie w pracy). W takich warunkach teoretyczna wartość potencjału odwrócenia dla kanału całkowicie specyficznego dla kationów wynosi -28,8 mV. W warunkach kontrolnych kanał jest aktywny, specyficzny

dla kationów oraz regulowany napięciem (Rycina 3). W celu scharakteryzowania wykrytego kanału potasowego regulowanego napięciem przeprowadzono badania wpływu kompleksu adenozyntrifosforanu i jonów magnezu (ATP/Mg^{2+}) oraz wapnia. W obu przypadkach nie obserwowano zmiany aktywności kanału mitoKv (wyniki nie zostały przedstawione graficznie w pracy). Przeprowadzone eksperymenty wykluczyły możliwość regulacji kanału przez ATP czy też jony wapnia, co jest charakterystyczne w przypadku kanałów mitoK_{ATP} i mitoBK_{Ca}, odpowiednio. Na Rycinie 4 przedstawiono rejestracje zmian przepływu prądu jonowego w czasie przez kanał w warunkach kontrolnych oraz po dodaniu 10 nM MgTx. Nanomolowe stężenie MgTx blokuje przepływ jonów przez kanał. Efekt ten nie jest odwracalny. Istnieją badania pokazujące, że w błonie plazmatycznej występują kanały o podobnej charakterystyce, które są hamowane przez margatoksynę (MgTx) – specyficzny inhibitor kanałów potasowych regulowanych napięciem (kanał Kv1.3) [14]. Ostatnio zaobserwowano również efekt hamowania przez MgTx aktywności kanału Kv1.3 w mitochondriach limfocytów T [13].

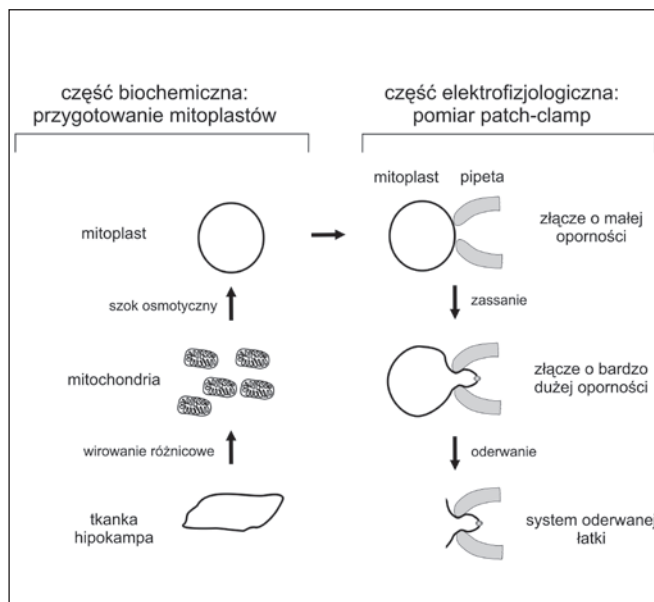
Wyniki przedstawione w pracy świadczą o obecności w wewnętrznej błonie mitochondrialnej hipokampa chomika mongolskiego nowego kanału potasowego regulowanego przez napięcie (kanału mitoKv). Mitochondrialne kanały mitoKv są białkami, którym przypisuje się aktywny udział w transporcie jonów potasowych przez wewnętrzną błonę mitochondrialną, co może mieć znaczenie w prawidłowym funkcjonowaniu komórek mózgu oraz uczestniczyć w ochronie komórek poddanych działaniu czynników uszkodzających.

Podziękowania

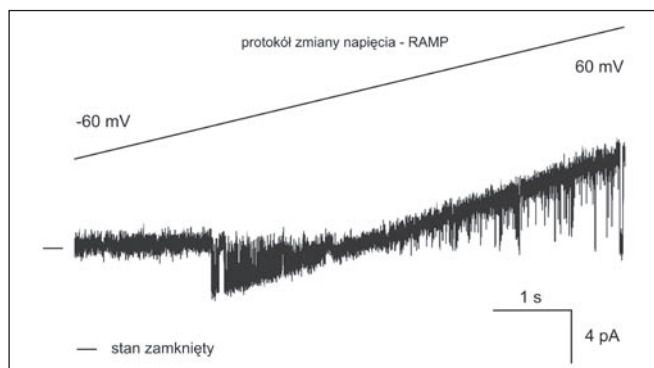
Praca jest finansowana przez projekt P-N/031/2006 oraz Polską Sieć Mitochondrialną MitoNet.pl



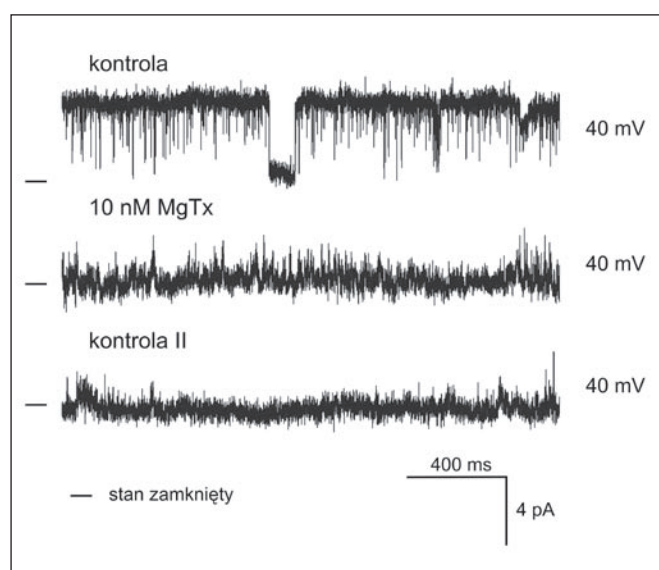
Rycina 1. Kanały potasowe wewnętrznej błony mitochondrialnej. Na rysunku skrótem IbTx oznaczono iberiotoksynę, 5-HD – kwas 5-hydroksydekanowy, MgTx – margatoksynę, mitoBK_{Ca} – mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie aktywowany jonami wapniowymi, mitoK_{ATP} – mitochondrialny kanał potasowy regulowany przez ATP, mitoKv – mitochondrialny kanał potasowy regulowany napięciem, $\Delta\psi$ – potencjał mitochondrialny.



Rycina 2. Technika przygotowania mitoplastów oraz pomiaru aktywności kanałów jonowych w wewnętrznej błonie mitochondrium.



Rycina 3. Rejestracje zmian przepływu prądu jonowego w czasie przez kanał mitoKv przy potencjałach od -60 mV do +60 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM, 20 mM Hepes-KOH, 100 μ M CaCl₂, pH = 7,2. „-” oznacza stan zamknięty kanału.



Rycina 4. Wpływ margatoksyny (MgTx) na aktywność kanału mitoKv. Rejestracje zmian przepływu prądu jonowego przez kanał w czasie przy potencjale 40 mV w układzie symetrycznych stężeń 150/150 mM, 20 mM Hepes-KOH, 100 μ M CaCl₂, pH = 7,2 w warunkach kontrolnych, po dodaniu 10 nM MgTx oraz po perfuzji buforem pozbawionym margatoksyny (kontrola II). „—” oznacza stan zamknięty kanału.

Piśmiennictwo

1. Skalska J, Dębska-Vielhaber G, Głęb M, Kula-wiak B, Malińska D, Koszela-Piotrowska I, Bednarczyk P, Dołowy K, Szewczyk A. Mitochondrialne kanały jonowe. *Postępy Biochem.* 2006; 52: 137-144.
2. Inoue I, Nagase H, Kishi K, Higuti T. ATP-sensitive K⁺ channel in the mitochondrial inner membrane. *Nature* 1991; 352: 244-247.
3. Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K⁺ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem* 1992; 267: 26062-26069.
4. Dębska G, May R, Kicińska A, Szewczyk A, Elger CE, Kunz WS. Potassium channel openers depolarize hippocampal mitochondria. *Brain Res* 2001; 892: 42-50.
5. Dębska G, Kicińska A, Skalska J, Szewczyk A, May R, Elger CE, Kunz WS. Opening of potassium channels modulates mitochondrial function in rat skeletal muscle. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1556: 97-105.
6. Dahlem YA, Horn TF, Buntinas L, Goni T, Wolf G, Siemen D. The human mitochondrial K_{ATP} channel is modulated by calcium and nitric

oxide: a patch-clamp approach. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1656: 46-56.

7. Bednarczyk P, Kicińska A, Kominkova V, Ondrias K, Dołowy K, Szewczyk A. Quinine inhibits mitochondria ATP-regulated potassium channel from bovine heart. *J Membr Biol* 2004; 199: 63-72.
8. Grover GJ, Garlid KD. ATP-Sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 677-695.
9. Neckar J, Szarszoi O, Koten L, Papousek F, Ost'adal B, Grover GJ, Kolar F. Effects of mitochondrial K_{ATP} modulators on cardioprotection induced by chronic high altitude hypoxia in rats. *Cardiovasc Res.* 2002; 55: 567-575.
10. Kicińska A, Szewczyk A. Protective effects of the potassium channel opener – diazoxide against injury in neonatal rat ventricular myocytes. *Gen Physiol Biophys* 2003; 22: 383-395.
11. Ardehali H. Cytoprotective Channels in Mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2005; 37: 171-177.
12. Siemen D, Loupatatzis C, Borecky J, Gulbins E, Lang F. Ca²⁺-activated K channel of the BK-type in the inner mitochondrial membrane of a human glioma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 257: 549-554.
13. Szabo I, Bock J, Jekle A, Soddemann M, Adams C, Lang F, Zoratti M, Gulbins E. A novel potassium channel in lymphocyte mitochondria. *J Biol Chem* 2005; 280: 12790-12798.
14. Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novicki J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, Garcia ML. Purification, characterisation and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectivity inhibits voltage-dependent potassium channels. *J Biol Chem* 1993; 268: 18866-18874.
15. Beeton C, Barbara J, Giraud P, Devaux F, Benoliel AM, Gola M, Sabatier JM, Bernard D, Crest M, Beraud E. Selective blocking of voltage-gated K⁺ channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *J Immunol* 2001; 166: 936-944.
16. Bock J, Szabo I, Jekle A, Gulbins E. Actinomycin D-induced apoptosis involves the potassium channel Kv1.3. *Biochem. Biophys Res Commun* 2002; 295: 526-531.

Adres korespondencyjny:

Piotr Bednarczyk,
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego,
Zakład Biofizyki,
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa,
tel.: (022) 589 22 39,
e-mail: p.bednarczyk@nencki.gov.pl

Metoda rejestracji potencjałozależnych prądów Na⁺ w konfiguracji „cell-attached” w skrawkach kory mózgowej

Sodium channel recordings in a cell-attached configuration from cortical slices

Bartłomiej Szulczyk, Paweł Szulczyk

Zakład Fizjologii Człowieka, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Rejestrowano potencjałozależne prądy Na⁺ w konfiguracji „cell-attached” (macropatches) z neuronów piramidowych w skrawkach kory mózgowej. Neurony uwidacziano w optyce DIC w świetle podczerwonym. Średnia amplituda prądów wynosiła $36,8 \pm 4,4$ pA (n=28). Stała $V_{0,5}$ aktywacji oraz k miały wartość odpowiednio $-18,3 \pm 1,5$ mV (n=8) i $6,3 \pm 0,3$ (n=8). Stała $V_{0,5}$ oraz k inaktywacji wynosiły odpowiednio $-57,2 \pm 3,2$ mV (n=5) i $-6,5 \pm 1,4$ (n=5). Stała czasu reaktywacji miała wartość $9,3 \pm 1,4$ ms (n=4). Po zakończonej rejestracji w konfiguracji cell-attached przebijano błonę komórkową i mierzono potencjał błonowy ($-68,5 \pm 0,1$ mV, n=36). Przedstawiona metoda jest szczególnie przydatna do badania przekazywania sygnału od receptorów metabotropowych do kanałów jonowych, ponieważ w zastosowanym układzie doświadczalnym wtórne przekąźniki cytoplazmatyczne neuronu pozostają nienaruszone.

Słowa kluczowe: prądy sodowe, cell-attached, skrawki

Abstract

Voltage-gated Na⁺ channel currents were recorded in a cell-attached configuration from pyramidal neurons of the medial prefrontal cortex in slices. Neurons were visualized with IR-DIC optics. Capacitance transients were eliminated by subtracting traces with steady-state inactivated Na⁺ currents from traces which contained Na⁺ currents. The average Na⁺ current amplitude was 36.8 ± 4.4 pA (n=28). $V_{0,5}$ and k coefficients of activation were -18.3 ± 1.5 mV (n=8) and 6.3 ± 0.3 (n=8), respectively. Moreover, $V_{0,5}$ and k coefficients of inactivation equaled -57.2 ± 3.2 mV (n=5) and -6.5 ± 1.4 (n=5), respectively. The reactivation time constant was 9.3 ± 1.4 ms (n=4). After completion of the Na⁺ current recordings in the cell-attached configuration, the patch membrane was disrupted and the membrane potential was measured in current clamp mode (-68.5 ± 0.1 mV, n=36). We conclude that the

described method may be used to elucidate signal transduction pathways ranging from metabotropic receptors to voltage-gated Na⁺ channels.

Key Words: sodium currents, cell attached, slices

Wstęp

Konfiguracja „cell-attached” to wariant metody patch-clamp polegający na rejestracji prądów z fragmentu błony komórkowej nienaruszonego neuronu. W związku z tym metoda ta pozwala na badanie mechanizmów przekazywania sygnału wewnątrzkomórkowego za pośrednictwem wtórnych przekąźników cytoplazmatycznych od receptorów metabotropowych do kanałów jonowych. Konfiguracja „cell-attached” może być stosowana w celu rejestracji prądów jonowych z neuronów rozproszonych i z neuronów zlokalizowanych w skrawkach. W wypadku badań na skrawkach możliwe jest uzyskanie rejestracji prądów jonowych z ciała komórkowego, aksonów lub dendrytów [1, 2].

Prądy jonowe Na⁺ rejestrowano uprzednio w konfiguracji „cell-attached” z neuronów zlokalizowanych w skrawkach hipokampa [3, 4, 5] oraz w skrawkach wzgórza [2]. Celem niniejszej pracy jest przedstawienie metody rejestracji prądów Na⁺ w konfiguracji „cell-attached” w neuronach piramidowych zlokalizowanych w skrawkach uzyskanych z kory przedczołowej.

Materiały i metody

Badania przeprowadzono na szczurach rasy Wistar, za zgodą Lokalnej Komisji Etycznej. Po wykonaniu dekapitacji i usunięciu kości czaszki wyjmowano mózgowie i umieszczano je w sztucznym płynie zewnątrzkomórkowym nasyconym tlenem, w temperaturze 0-4°C. Korę przedczołową cięto na skrawki o grubości 300 μm [6]. Skrawki inkubowano w sztucznym płynie zewnątrzkomórkowym przez okres około 40 min w temperaturze 34°C, a następnie w temperaturze pokojowej przez okres 1-8 godzin.

Skrawki umieszczano na stoliku mikroskopu Nikon Eclipse E600FN. Rejestracje prowadzono z komórek piramidowych kory przedczołowej zlokalizowanych w warstwie V pola „prelimbic” i „infralimbic”. Neurony identyfikowano w świetle podczerwonym przy udziale kamery na podczerwień i DIC (*differential interference contrast*, powiększenie 400x). Neurony wraz z ich aksonem, apikalnym dendrytem i dendrytami bazalnymi były dobrze widoczne do kilkudziesięciu mikrometrów poniżej górnej powierzchni skrawka. Temperaturę komory rejestracyjnej utrzymywano na stałym poziomie około 32°C lub w temperaturze pokojowej.

Używano pipet wykonanych ze szkła borosilikatowego (1,5/0,86 mm) o oporności 7-12 MΩ. Przy pomocy mikromanipulatora zbliżano pipetę do wybranego neuronu. Po dotknięciu czubkiem pipety do błony komórkowej tworzone złącze gigaomowe. Następnie kompensowano częściowo prądy pojemnościowe przy pomocy układów wzmacniacza.

Sztuczne płyny

Sztuczny płyn zewnątrzkomórkowy w pipecie rejestrującej zawierał (w mM): 130 NaCl, 5 KCl, Hepes-Cl 10, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, 4-AP 5 oraz TEA-Cl 30. Sztuczny płyn zewnątrzkomórkowy (na zewnątrz pipety rejestrującej) zawierał w mM: NaCl 130, KCl 2,5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, glukoza 10, NaHCO₃ 25, NaH₂PO₄ 1,25, pH 7,4. W celu wyzerowania potencjału błonowego można stosować płyn zewnątrzkomórkowy zawierający wysoki poziom K⁺ (stabilizacja potencjału błonowego na poziomie około 0 mV). Płyn ten zawiera (w mM): NaCl 5, K-asparat 150, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, glukoza 10, Hepes-Cl 10, pH 7,4. W celu wyeliminowania transmisji synaptycznej w skrawku można podać blokery kanałów jonowych Ca⁺⁺ lub blokery transmisji glutaminergicznej i GABAergicznej.

Rejestrowano jednocześnie aktywność kilkunastu lub kilkudziesięciu kanałów jonowych metodą „cell attached” (macropatch). Na wszystkich rycinach wartości potencjału oznaczają potencjał przez łątkę, czyli różnicę pomiędzy potencjałem błonowym spoczynkowym a potencjałem w pipecie. Potencjał spoczynkowy neuronu rejestrowany po zakończeniu rejestracji prądów jonowych Na⁺ i przebiciu błony komórkowej wynosił -68,5±0,1 mV (n=36). Potencjałozależne prądy jonowe Na⁺ wywoływano przez depolaryzację błony komórkowej łątki do -10 mV trwającą 7 ms (Rycina 1A). Nie jest możliwe całkowite wyeliminowanie prądu pojemnościowego pomimo pokrycia pipet Sylguardem i zastosowania kompensacji prądów pojemnościowych przy pomocy układów wzmacniacza. W związku z tym każdorazowo wykonywano rejestracje dwukrotnie.

Najpierw rejestrowano prądy Na⁺ z artefaktem prądu pojemnościowego przy zastosowaniu prepulsu o wartości -95 mV trwającego 500 ms (Rycina 1Ba). Następnie w celu wyeliminowania potencjałozależnych prądów Na⁺ depolaryzację wywołującą prąd Na⁺ poprzedzono depolaryzacją do -10 mV trwającą 500 ms. Zastosowanie 500 milisekundowej depolaryzacji powodowało całkowitą inaktywację prądów Na⁺, pozostawiając niezmienny artefakt – prąd pojemnościowy (Rycina 1Bb). Między depolaryzacją wstępną i depolaryzacją wywołującą prądy Na⁺ stosowaliśmy 3 milisekundowy odstęp czasowy w celu zmniejszenia artefaktu wynikającego z szybkiej zmiany potencjału błonowego. Następnie prądy Na⁺ izolowano, odejmując od rejestracji przedstawionej na Rycinie 1Ba rejestrację przedstawioną na Rycinie 1Bb. Wyizolowane prądy Na⁺ są przedstawione na Rycinie 1Ba-b. Taka izolacja prądu Na⁺ pozwala na „skonstruowanie” krzywej aktywacji oraz reaktywacji i inaktywacji prądów Na⁺ (patrz niżej).

Średnia amplituda prądów jonowych Na⁺ wynosiła 36,8±4,4 pA (n=28). Maksymalna szybkość aktywacji wynosiła 75,6±15,9 pA/ms (n=28), natomiast stała inaktywacji zależnej od czasu miała wartość 0,7±0,1 ms (n=28). Na Rycinie 2A przedstawiono protokół zmian potencjału błonowego łątki, wywołujący prądy Na⁺ w celu analizy aktywacji tych prądów. Prostokątne impulsy depolaryzujące błonę komórkową trwały 7 ms i były zmieniane skokowo co 10 mV od -70 mV do +20 mV. Bódźce depolaryzujące poprzedzono polaryzacją błony komórkowej o wartości -90 mV trwającą 500 ms. W celu wyizolowania artefaktu bódźce depolaryzujące poprzedzono polaryzacją błony komórkowej do poziomu -10 mV. W tych warunkach prąd jonowy Na⁺ był całkowicie zinaktywowany. Następnie odejmowano od siebie rejestracje otrzymane w wyniku powyższych protokołów, co pozwalało na wyizolowanie prądu jonowego Na⁺ bez artefaktu prądu pojemnościowego (Rycina 2B). Typową krzywą napięciowo-prądową przedstawiono na Rycinie 2C. Znormalizowaną krzywą aktywacji prądów Na⁺ pokazano na Rycinie 2D. Stałe V_{0,5} aktywacji oraz k wynosiły odpowiednio -18,3±1,5 (n=8) i 6,3±0,3 (n=8).

Następujące argumenty przemawiały za tym, że prawidłowo izolowano prąd jonowy Na⁺. Po pierwsze do płynu zawartego w pipecie dodawano 4-AP i TEA, co powodowało zablokowanie potencjałozależnych prądów K⁺ Prąd Ca⁺⁺ nie mógł być rejestrowany, ponieważ przy koncentracji jonów Ca⁺⁺ w pipecie wynoszącej 2 mM amplituda tego prądu była niezauważalna. Po drugie doświadczalnie wyznaczony potencjał odwrócenia prądów Na⁺ wynosił około -54 mV (Rycina 2C, linia przedłużająca wykres) i zgadzał się

z wyliczeniem teoretycznym wykonanym w oparciu o równanie Nernsta. Ponadto właściwości kinetyczne badanych prądów Na^+ są zbliżone do opisanych przez innych autorów [2]. Podanie lidokainy (1000 μM), przechodzącego przez błonę blokera kanałów jonowych Na^+ , zmniejszało amplitudę prądów Na^+ do około 60% wartości maksymalnej.

Na Rycinie 3A pokazano protokół rejestracyjny stosowany do badania inaktywacji zależnej od potencjału prądów Na^+ . Impuls testowy trwający 7 ms o wartości -5 mV poprzedzono depolaryzacjami wstępnymi o wartościach od -90 mV do 10 mV i trwającymi 500 ms (zmiany potencjału co 10 mV). Depolaryzacja wstępna o wartości -10 mV powodowała całkowitą inaktywację prądu Na^+ i zarejestrowanie wyizolowanego artefaktu bodźca. Artefakt ten odejmowano od rejestracji uzyskanych przy użyciu pozostałych prepulsów i otrzymywano inaktywujący się prąd sodowy (Rycina 3B). Znormalizowaną krzywą inaktywacji przedstawiono na Rycinie 3C. Stałe $V_{0,5}$ oraz k inaktywacji wynoszą odpowiednio $-57,2 \pm 3,2$ mV ($n=5$) i $-6,5 \pm 1,4$ ($n=5$).

Na Rycinie 4A pokazano protokół rejestracyjny służący do badania reaktywacji prądów Na^+ . Stosowano depolaryzacje wstępną i testową do poziomu -5 mV. Odstęp pomiędzy depolaryzacjami zmieniano w postępie geometrycznym od 0,5 ms do 640 ms. Depolaryzacja wstępna inaktywowała prąd jonowy Na^+ . Stosując depolaryzację testową rejestrowano prąd Na^+ , którego amplituda narastała w miarę wydłużania się odstępu pomiędzy impulsem wstępnym i testowym. Przy najkrótszym odstępie rejestrowano wyłącznie artefakt bodźca, ponieważ prąd Na^+ był całkowicie zinaktywowany. Artefakt ten odejmowano od rejestracji otrzymanych przy dłuższych odstępach i uzyskiwano reaktywujący się prąd Na^+ (Rycina 4B). Znormalizowaną krzywą reaktywacji ilustruje Rycina 4C. Stała czasu reaktywacji wynosi $9,3 \pm 1,4$ ms ($n=4$).

Ważnym problemem związanym z rejestracjami metodą „cell attached” jest brak kontroli wartości potencjału błonowego, co ma istotne znaczenie dla oceny działania potencjałozależnych kanałów jonowych. Stosujemy różne metody mające na celu ocenę i kontrolę potencjału błonowego. Po pierwsze na końcu każdej rejestracji przebijamy błonę komórkową i dokonujemy bezpośredniego pomiaru potencjału błonowego przy zastosowaniu metody „current clamp”. Wada tej metody polega na braku możliwości oceny zmian potencjału błonowego w czasie długotrwałej rejestracji prądów, np. przed, w czasie i po podawaniu związków biologicznie czynnych. Częściowo ten problem eliminujemy dzięki obniżeniu potencjału łątki o 25 mV poniżej potencjału błonowego (tj. do około -95 mV). W tej sytuacji niewielkie zmiany potencjału błonowego

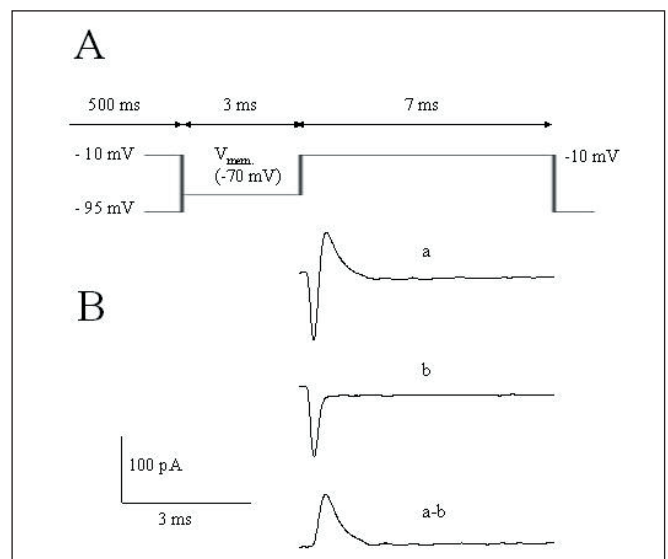
w kierunku depolaryzacji są poniżej progu inaktywacji kanałów jonowych Na^+ i nie mają znaczenia dla oceny właściwości kinetycznych tych kanałów (np. podanie dopaminy, aktywatora receptora metabotropowego, depolaryzuje błonę komórkową o około 1-2 mV). W celu całkowitej kontroli potencjału łątki można podnieść poziom jonów K^+ w płynie zewnątrzkomórkowym w takim stopniu, aby potencjał błonowy wynosił 0 mV. W tej sytuacji potencjał błonowy łątki może być ściśle kontrolowany [7]. Wadą tej metody jest jednak mniejsza stabilność rejestracji i krótszy czas ich trwania, co jest spowodowane gorszą jakością skrawków.

Podsumowanie

Rejestrowano potencjałozależne prądy jonowe Na^+ z neuronów piramidowych zlokalizowanych w skrawkach kory przedczołowej metodą „cell-attached” przez kilkanaście do kilkudziesięciu minut. W tej konfiguracji wtórne przekaźniki cytoplazmatyczne neuronu są zachowane, ponieważ cytoplazma pozostaje nienaruszona (nie dochodzi do przebicia błony komórkowej). W związku z tym metoda ta pozwala na badanie procesów przekazywania sygnału od receptorów metabotropowych do kanałów jonowych, ponieważ wtórne przekaźniki neuronu pozostają nienaruszone. Występują różnice pomiędzy właściwościami prądów Na^+ rejestrowanych w konfiguracji „whole cell” [6] i „cell attached” (przedstawiona praca).

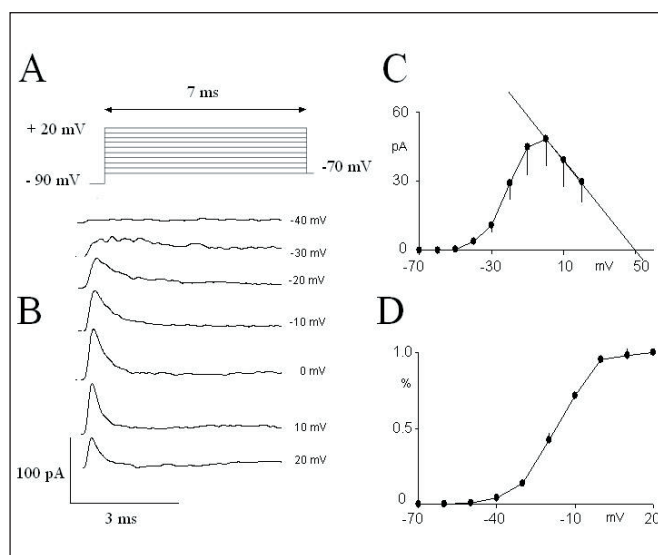
Podziękowania

Praca sfinansowana z budżetu projektu No KBN/0575/Pp05/2005/28 i AM FW5/N/2007.

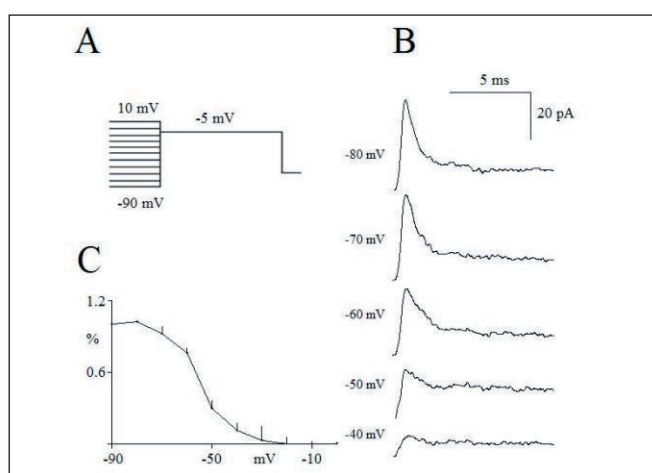


Rycina 1. Metoda rejestracji prądów jonowych Na^+ w konfiguracji „cell attached” z neuronów

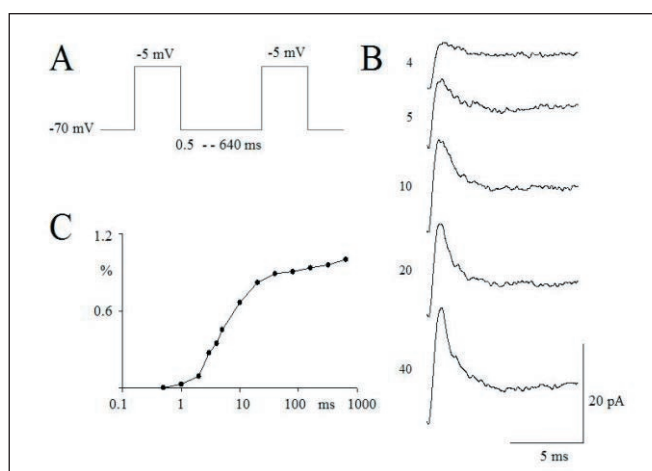
piramidowych kory przedczołowej zlokalizowanych w skrawkach. **A.** Protokół zmian potencjału błonowego zastosowany w celu izolacji prądów jonowych Na^+ . **Ba.** Prądy jonowe rejestrowane z łątki w odpowiedzi na impuls depolaryzujący błonę komórkową (widoczne prądy jonowe Na^+ i prądy pojemnościowe). **Bb.** Prądy pojemnościowe rejestrowane w odpowiedzi na 7 ms depolaryzację błony komórkowej. Prądy Na^+ zostały zainaktywowane dzięki zastosowaniu 500 milisekundowej depolaryzacji wstępnej do -10 mV. Pozostał widoczny artefakt związany z występowaniem prądu pojemnościowego. **Ba-b.** Wyizolowany prąd jonowy Na^+ uzyskany na skutek odjęcia rejestracji Bb od rejestracji Ba. Konwencja przedstawiania prądów jonowych – prąd dokomórkowy jest skierowany „do góry”.



Rycina 2. Aktywacja prądów Na^+ . **A.** Zmiany potencjału błonowego łątki zastosowane w celu zbadania zależności napięciowo-prądowej prądów jonowych Na^+ w neuronach piramidowych kory przedczołowej. Potencjał błonowy spoczynkowy zmierzono już po wykonaniu rejestracji aktywności kanałów jonowych po przebiciu błony komórkowej. **B.** Oryginalne zapisy prądów jonowych Na^+ wywołane przez depolaryzacje błony komórkowej o różnej amplitudzie. Amplituda depolaryzacji błony komórkowej łątki jest wskazana po prawej stronie zapisów. **C.** Zależność napięciowo-prądowa prądów jonowych Na^+ . **D.** Krzywa aktywacji prądów jonowych Na^+ .



Rycina 3. Inaktywacja zależna od potencjału błonowego. **A.** Protokół rejestracyjny używany do badania inaktywacji prądów Na^+ . **B.** Rejestracje inaktywacji prądów Na^+ . **C.** Znormalizowana krzywa inaktywacji.



Rycina 4. Reaktywacja prądów sodowych. **A.** Protokół rejestracyjny używany do badania reaktywacji prądów Na^+ . **B.** Rejestracje reaktywacji. Cyfry po lewej stronie zapisów prądów oznaczają odstępy pomiędzy impulsami wstępnym a testowym. **C.** Znormalizowana krzywa reaktywacji (skala logarytmiczna).

Piśmiennictwo

1. Stuart GJ, Dodt HU, Sakmann B. Patch-clamp recordings from the soma and dendrites of neurons in brain slices using infrared video microscopy. *Pflügers Arch.* 1993; 423, 511-518.
2. Williams SR, Stuart GJ. Action Potential Backpropagation and Somato-dendritic Distribution of Ion Channels in Thalamocortical Neurons. *J. Neurosci.* 2000; 20, 1307-1317.
3. Colbert CM, Magee JC, Hoffman DA, Johnston D. Slow Recovery from Inactivation of Na^+ Channels Underlies the Activity-Dependent Attenuation of

Dendritic Action Potentials in Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *J. Neurosci.* 1997; 17, 6512-6521.

4. Rosenkranz JA, Johnston D. State-Dependent Modulation of Amygdala Inputs by Dopamine-Induced Enhancement of Sodium Currents in Layer V Entorhinal Cortex. *J. Neurosci.* 2007; 27, 7054-7069.

5. Mickus T, Jung H, Spruston N. Properties of Slow, Cumulative Sodium Channel Inactivation in Rat Hippocampal CA1 Pyramidal Neurons. *Biophys. J.* 1999; 76, 846-860.

6. Witkowski G, Szulczyk P. Opioid mu receptor activation inhibits sodium currents in prefrontal cortical neurons via a protein kinase A- and C-depend-

ent mechanism. *Brain Res.* 2006; 1094, 92-106.

7. Alzheimer C, Schwandt PC, Crill WE. Modal gating of Na⁺ channels as a mechanism of persistent Na⁺ current in pyramidal neurons from rat and cat sensorimotor cortex. *J. Neurosci.* 1993; 13, 660-673.

Adres korespondencyjny:

Zakład Fizjologii Człowieka,
Warszawski Uniwersytet Medyczny,
Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa,
tel.: (022) 826 42 75,
e-mail: bartlomiej.szulczyk@wum.edu.pl

Inhibicja aktywności kanałów potasowych typu Kv1.3 przez wybrane modulatory oporności wielolekowej

Inhibition of the activity of Kv1.3 type potassium channels by selected multidrug resistance modulators

Andrzej Teisseyre, Krystyna Michalak

Katedra i Zakład Biofizyki, Akademia Medyczna we Wrocławiu

Streszczenie

Przy użyciu techniki elektrofizjologicznej patch-clamp w konfiguracji „whole-cell” badano wpływ wybranych inhibitorów transporterów wielolekowych (P-glikoproteiny, P-gp oraz *multidrug resistance-associated protein*, MRP1) na aktywność napięciowo-zależnych kanałów potasowych typu Kv1.3. Użyto następujących modulatorów aktywności P-gp: pochodne fenotiazyny – trifluoperazyina (TFP) i tioridazyina (TDZ) oraz lek przeciwnowotworowy tamoksyfen (TMX), jak również związków pochodzenia roślinnego: genisteina, sylibina oraz rezweratrol, zidentyfikowanych we wcześniejszych badaniach jako inhibitory MRP1. Badania wykonano na układzie modelowym, jakim były kanały typu Kv1.3 występujące endogennie w ludzkich limfocytach T. Stwierdzono, że wszystkie badane związki poza sylibiną są inhibitorami kanałów potasowych typu Kv1.3. Efekt inhibicji, obserwowany przy stężeniach rzędu 1-100 μM, był odwracalny i zależny od stężenia związku oraz od czasu aplikacji. Efekt ten był w każdym przypadku związany ze specyficznym oddziaływaniem z białkiem kanałowym. Zaobserwowano również istotne różnice pomiędzy efektami wywieranymi przez TFP, TDZ oraz TMX a efektami aplikacji genisteiny oraz rezweratrolu. Otrzymane wyniki wskazują, że niektóre modulatory oporności wielolekowej są jednocześnie inhibi-

torami kanałów typu Kv1.3. Inhibicja kanałów typu Kv1.3 może wiązać się z antyproliferacyjnym działaniem tych substancji, co, w połączeniu z modulacją oporności wielolekowej, może mieć znaczenie dla ich potencjalnego wykorzystania w chemioterapii nowotworów. Badania nad wpływem kolejnych modulatorów oporności wielolekowej na aktywność kanałów typu Kv1.3 są kontynuowane.

Słowa kluczowe: kanały potasowe, oporność wielolekowa, patch-clamp, fenotiazyny, genisteina, rezweratrol

Abstract

Using the whole-cell patch-clamp technique, the influence of inhibitors of multidrug transporters, P-glycoprotein (P-gp) and MRP1 on the activity of Kv1.3 voltage-gated potassium channels was investigated. The chosen compounds were P-gp modulators such as phenothiazine derivatives, including trifluoperazine (TFP), thioridazine (TDZ), and the anticancer drug tamoxifen (TMX). Also tested were several natural compounds extracted from plants such as genistein, sylibin, and resveratrol, identified during previous investigations as inhibitors of MRP1. The experiments were performed using a cell-culture model system with Kv1.3 channels expressed endogenously in human T lymphocytes.

The results demonstrated that all the compounds, except for sylibin, were effective inhibitors of Kv1.3 channels. Inhibitory effects were observed at concentrations of 1-100 μM and were reversible, concentration- and time-dependent. In all the cases, inhibitory effects were due to specific interactions of the substances with the channel protein. Significant differences were observed between the inhibitory effects of TFP, TDZ, and TMX with the effects exerted by genistein and resveratrol. Altogether, these results indicate that some multidrug resistance modulators are also Kv1.3 channel inhibitors. Inhibition of Kv1.3 channels may be related to the antiproliferative action of these compounds, which in combination with their multidrug resistance modulation, may provide further therapeutic potential for their application in cancer chemotherapy. We are continuing investigations on the influence of other multidrug resistance modulators on Kv1.3 channel activity.

Key Words: *potassium channel, multidrug resistance, patch-clamp, phenothiazine, genistein, resveratrol*

Wstęp

Jak wykazały badania, aktywność kanałów potasowych różnych typów jest konieczna dla procesu proliferacji komórek, zarówno zdrowych, jak i nowotworowych [1-3]. Wykazano, że zablokowanie kanałów potasowych powoduje również zahamowanie procesu proliferacji komórek w różnej fazie tego procesu [1-3]. Wiadomo też, że ekspresja kanałów potasowych jest odmienna w wielu typach komórek nowotworowych w stosunku do odpowiadających im komórek zdrowych [4]. Możliwe jest zatem selektywne zablokowanie kanałów potasowych w komórkach nowotworowych z użyciem specyficznych blokerów tych kanałów, bez jednoczesnego blokowania kanałów potasowych w komórkach zdrowych. Może to prowadzić do selektywnego zahamowania proliferacji komórek nowotworowych bez równoczesnego hamowania proliferacji komórek zdrowych [4]. Kanały potasowe występujące w komórkach nowotworowych są zatem potencjalnie ważnym celem działania związków antynowotworowych, których działanie może prowadzić do skutecznej terapii bez występowania niepożądanych efektów ubocznych [4]. Ważne jest również to, że większość blokerów kanałów potasowych oddziałuje na kanały od strony zewnątrzkomórkowej. Nie ma zatem potrzeby transportowania tych substancji do wnętrza atakowanych komórek. Nie istnieje również niebezpieczeństwo, że substancje te, po wprowadzeniu do

wnętrza komórek, zostaną z nich usunięte przez białka odpowiedzialne za tzw. oporność wielolekową, której istnienie jest jedną z głównych przyczyn niepowodzeń chemoterapii [4].

Jednym z typów kanałów potasowych, którego aktywność może regulować proces proliferacji komórek nowotworowych, są napięciowo-zależne kanały potasowe Kv1.3, należące do rodziny *Shaker*. Kanały te, odkryte w 1984 roku w limfocytach T, występują w wielu typach komórek, zarówno zdrowych [5], jak i nowotworowych [6-10]. Kanały typu Kv1.3 aktywują się wraz z depolaryzacją błony komórki. Ich cechą charakterystyczną jest szybka aktywacja, której kinetyka silnie rośnie ze wzrostem wartości potencjału błonowego, oraz stosunkowo powolna inaktywacja tzw. typu C, która słabo zależy od potencjału błonowego [11]. Charakterystyczną cechą kanałów Kv1.3 jest również tzw. skumulowana inaktywacja, która nie występuje w przypadku innych kanałów z rodziny *Shaker* [12]. Polega ona na postępującym spadku natężenia prądu płynącego przez kanały w trakcie aplikacji serii krótkotrwałych impulsów depolaryzujących stosowanych w krótkich odstępach czasu jeden po drugim [12]. Na podkreślenie zasługuje również fakt, że kanały typu Kv1.3 cechuje stosunkowo powolna deaktywacja (zamykanie się) przy wartościach potencjału błonowego zbliżonych do wartości potencjału spoczynkowego. Prawdopodobnie ten fakt jest przyczyną stabilizującego wpływu aktywności kanałów Kv1.3 na częstotliwość generowania potencjałów czynnościowych w neuronach hipokampa, w których ekspresjonowane były rekombinowane kanały typu Kv1.3 [13].

Wykazano, że ekspresja kanałów typu Kv1.3 jest zmieniona w komórkach raka prostaty, okrężnicy oraz piersi [8-10]. Badania kanałów typu Kv1.3 występujących w limfocytach T wykazały, że zablokowanie tych kanałów prowadzi do zahamowania proliferacji we wczesnej fazie tego procesu [11, 14]. Wiadomo też, że kanały typu Kv1.3 są blokowane przez wiele związków o bardzo zróżnicowanej strukturze chemicznej – od kationów metali ciężkich, poprzez proste związki organiczne, aż po oligopeptydy wyizolowane z jadu skorpionów [11]. Kanały typu Kv1.3 są więc potencjalnie ważnym celem działania związków antynowotworowych, zarówno występujących naturalnie, jak i otrzymanych w wyniku syntezy.

Niniejszy referat zawiera zestawione wyniki naszych badań nad inhibicją aktywności kanałów typu Kv1.3 przez wybrane związki mające zdolność hamowania transporterów oporności wielolekowej. Potencjalna możliwość wykorzystania tych związków wiązać się może zarówno z ich zdolnością do

modulacji oporności wielolekowej, co uwrażliwia komórki nowotworowe na działanie leków, jak również z inhibicją kanałów Kv1.3, co hamuje proliferację tych komórek. Do związków tych należą: pochodne fenotiazyny: trifluoperazyna (TFP) i tio-ridazyna (TDZ) [15], lek antynowotworowy stosowany w leczeniu raka piersi – tamoksyfen (TMX) wykazujący też hamujący wpływ na P-gp [15], jak również występujące naturalnie związki, takie jak: izoflawon – genisteina [16], flawonolignan – sylibina [17] oraz hydroksystilben – rezweratrol [18]. Do tej pory brak było danych o wpływie tych substancji na aktywność kanałów typu Kv1.3. Ze względu na to, że kanały typu Kv1.3 występują endogennie w dużej liczbie w limfocytach T (LT) izolowanych z krwi obwodowej, komórki te stosowane były w naszych badaniach jako układ modelowy. Badania prowadzono z zastosowaniem techniki patch-clamp w konfiguracji „whole-cell” [19] w Pracowni Bioelektryczności Katedry Biofizyki AM we Wrocławiu.

Wyniki i dyskusja

Wyniki badań zestawione zostały w Tabeli 1. Jak widać, wszystkie badane związki z wyjątkiem sylibiny, podawane od strony zewnątrzkomórkowej, są efektywnymi inhibitorami aktywności kanałów potasowych typu Kv1.3. Efekt inhibicji obserwowany był przy stężeniach rzędu 1-200 μM i był zależny od stężenia związku, jak również od czasu jego aplikacji [15, 16, 18]. Najdokładniejszą zależność pomiędzy stężeniem substancji a efektem inhibicji kanałów Kv1.3 otrzymano w przypadku rezweratrolu – jest to jedyna substancja, dla której udało się obliczyć dokładnie wartość IC_{50} (równą 40,9 μM) oraz wartość współczynnika Hilla równą 1,05 [18]. Pozwala to przypuszczać, że inhibicja kanałów Kv1.3 przez rezweratrol zachodziła w stechiometrii 1:1 [18]. Efekt inhibicji był w każdym przypadku odwracalny [15, 16, 18]. Wykazano, że efekt inhibicji kanałów Kv1.3 przez badane związki był związany ze specyficznym oddziaływaniem z białkiem kanałowym: w przypadku TFP, TDZ oraz TMX nie był wynikiem inhibicji białka kalmoduliny [15], w przypadku genisteiny nie był wynikiem inhibicji kinazy tyrozynowej [16], zaś w przypadku rezweratrolu nie wynikał z aktywacji kinazy białkowej typu C [18]. Zaobserwowano także istotne różnice pomiędzy efektami wywieranymi przez TFP, TDZ oraz TMX a efektami aplikacji genisteiny oraz rezweratrolu. W przypadku TFP, TDZ oraz TMX efekt inhibicji wiązał się z istotnym zwiększeniem szybkości inaktywacji rejestrowanych prądów, natomiast szybkość ich aktywacji pozostawała bez

zmian [15]. Natomiast w przypadku genisteiny oraz rezweratrolu obserwowano znaczne zmniejszenie szybkości aktywacji rejestrowanych prądów, za to szybkość ich inaktywacji nie ulegała istotnej zmianie [16, 18]. Inhibicja kanałów Kv1.3 przez TFP była prawie całkowita przy stężeniu równym 100 μM (dla TDZ oraz TMX brak danych), natomiast w przypadku aplikacji genisteiny oraz rezweratrolu nie uzyskano całkowitej blokady kanałów [15, 16, 18]. Ponadto efekt inhibicji w przypadku TFP, TDZ oraz TMX był wyraźnie zależny od wartości potencjału błonowego i znacznie większy przy +60 mV niż przy -20 mV [15]. Zależności stopnia inhibicji od potencjału błonowego nie obserwowano natomiast w przypadku genisteiny ani rezweratrolu [16, 18]. Interesujące jest również to, że aplikacja TFP, pomimo zwiększenia szybkości inaktywacji rejestrowanych prądów, nie zmieniała napięciowej zależności ich inaktywacji [15]. Natomiast w przypadku genisteiny oraz rezweratrolu nie obserwowano zmiany napięciowej zależności aktywacji rejestrowanych prądów, pomimo znacznego zmniejszenia jej szybkości [16, 18]. Pozwala to przypuszczać, że aplikacja TFP, genisteiny oraz rezweratrolu nie wpływała na sam mechanizm inaktywacji bądź aktywacji badanych kanałów, lecz jedynie na szybkość tych procesów.

Podobieństwo efektów inhibicji aktywności badanych kanałów przez genisteinę i rezweratrol pozwalało sądzić, że być może obydwie substancje oddziałują na te same miejsca wiążące kanałów potasowych lub działają w oparciu o ten sam mechanizm. Gdyby powyższe przypuszczenie było prawdziwe, efekt inhibicji kanałów Kv1.3 przez rezweratrol byłby znacznie zmniejszony w obecności genisteiny. Badania z jednoczesną aplikacją genisteiny i rezweratrolu (każda z substancji podawana była w stężeniu 50 μM) wykazały jednak, że efekty inhibicji kanałów Kv1.3 przez obydwie substancje były addytywne [18]. Przemawia to za tym, że obydwie substancje wpływają na aktywność kanałów Kv1.3 poprzez różne miejsca wiążące i w oparciu o odmienne mechanizmy.

Badania wykazały, że inhibicja kanałów Kv1.3 przez genisteinę zachodzi w tym samym zakresie stężeń, co efekt modulacji oporności wielolekowej przez tę substancję [20]. Wiadomo również, że aplikacja genisteiny w stężeniach, przy których zachodzi inhibicja kanałów typu Kv1.3, prowadzi do inhibicji proliferacji komórek nowotworowych linii HT-29 raka okrężnicy [16]. Ponieważ badania wykazały, że w komórkach raka okrężnicy występuje nadekspresja kanałów typu Kv1.3, jest możliwe, że inhibicja proliferacji tych komórek przez genisteinę wiąże się z inhibicją kanałów typu Kv1.3 [16].

Jest również możliwe, że inhibicja kanałów Kv1.3 przez rezweratrol ma miejsce podczas aplikacji rezweratrolu *in vivo* i jest związana z antynowotworowym działaniem tej substancji [18].

Badania wykazały, że sylibina użyta w stężeniu 30 μM nie jest inhibitorem aktywności kanałów Kv1.3 [17]. Z drugiej strony wiadomo, że substancja ta jest efektywnym modulatorem oporności wielolekowej związanej z nadekspresją transportera wielolekowego MRP1 przy znacznie mniejszych stężeniach [20]. Pozwala to sądzić, że zdolność do inhibicji aktywności kanałów Kv1.3 nie jest właściwością wszystkich modulatorów oporności wielolekowej. Potwierdzają to wyniki najnowszych badań, które pokazały, że również inne związki będące inhibitorami oporności wielolekowej nie są inhibitorami kanałów Kv1.3 [Teisseyre i Michalak, wyniki niepublikowane]. Tym samym zdolność inhibicji kanałów Kv1.3 wykazują tylko niektóre modulatory oporności wielolekowej.

Wyniki dotychczas przeprowadzonych badań pozwalają wysunąć przypuszczenie, że zdolność niektórych modulatorów oporności wielolekowej do inhibicji kanałów typu Kv1.3 wynika z ich specyficznego oddziaływania z badanymi kanałami. W opornych komórkach nowotworowych, w których mogą występować zarówno kanały typu Kv1.3, jak i transportery wielolekowe, badane substancje mogą oddziaływać z obydwoma rodzajami białek błonowych. Dla pełnego wyjaśnienia mechanizmu tych oddziaływań konieczne są dalsze badania. Na podkreślenie zasługuje fakt, że TFP, genisteina oraz rezweratrol użyte w stężeniach mikromolar-

nych są efektywnymi modulatorami (inhibitorami lub aktywatorami) wielu innych typów kanałów jonowych, włącznie z napięciowo-zależnymi kanałami potasowymi innych typów niż Kv1.3 [15, 16, 18]. Tym samym, zablokowanie proliferacji komórek nowotworowych przez te substancje może być zjawiskiem kompleksowym i wiązać się z inhibicją nie tylko kanałów typu Kv1.3, lecz również innych typów kanałów potasowych uczestniczących w tym procesie.

Obecnie prowadzone są w Pracowni Bioelektryczności Katedry Biofizyki AM we Wrocławiu dalsze badania nad inhibicją kanałów Kv1.3 przez modulatory oporności wielolekowej. Do badań wykorzystywane są zarówno związki naturalne pochodzenia roślinnego, jak również związki otrzymane w wyniku syntezy. Celem tych badań jest stwierdzenie: 1) które testowane związki są efektywnymi inhibitorami kanałów Kv1.3; 2) czy istnieje korelacja pomiędzy strukturą testowanych związków a ich zdolnością do inhibicji kanałów Kv1.3; 3) jakie mechanizmy mogą być odpowiedzialne za inhibicję kanałów; 4) czy efekty inhibicji kanałów Kv1.3 wywierane przez poszczególne inhibitory są addytywne; 5) czy inhibicja kanałów Kv1.3 zachodzi przy podobnych stężeniach, co efekt modulacji oporności wielolekowej.

Podziękowania

Autorzy pragną złożyć serdeczne podziękowania dr Andrzejowi Poła z Katedry Biofizyki AM we Wrocławiu za owocną pomoc w pobieraniu krwi do

Tabela 1. Charakterystyka efektów inhibicji aktywności kanałów Kv1.3 przez wybrane substancje będące modulatorami oporności wielolekowej.

L.p.	Nazwa związku (zwyczajowa)	Szacunkowa wartość IC_{50} [μM]	Wielkość inhibicji przy maksymalnym stężeniu	Dodatkowe efekty towarzyszące inhibicji kanałów Kv1.3 i inne spostrzeżenia
1.	Trifluoperazyna (TFP)	10-20	>95% przy stężeniu 100 μM	Istotne przyśpieszenie inaktywacji. Wielkość efektu inhibicji zależy od czasu i rośnie ze wzrostem potencjału błonowego
2.	Tioridazyna (TDZ)	Brak danych	Ca. 74% przy stężeniu 20 μM	Istotne przyśpieszenie inaktywacji. Wielkość efektu inhibicji zależy od czasu i rośnie ze wzrostem potencjału błonowego
3.	Tamoksyfen (TMX)	Brak danych	Ca. 40% przy stężeniu 20 μM	Istotne przyśpieszenie inaktywacji. Wielkość efektu inhibicji rośnie ze wzrostem potencjału błonowego
4.	Genisteina	10-40	Ca. 77% przy stężeniu 80 μM	Istotne spowolnienie aktywacji skorelowane w czasie z efektem inhibicji. Wielkość efektu inhibicji zależy od czasu.
5.	Sylibina	—	—	Brak inhibicji przy stężeniu 30 μM .
6.	Rezweratrol	40.9	Ca. 82% przy stężeniu 200 μM	Istotne spowolnienie aktywacji skorelowane w czasie z efektem inhibicji. Wielkość efektu inhibicji zależy od czasu.

izolowania limfocytów T. Badania naukowe, których wyniki prezentowane są w niniejszym referacie, finansowane były przez Komitet Badań Naukowych w ramach Grantów Uczelnianych nr 562, 453 oraz z funduszy przeznaczonych na działalność statutową Katedry Biofizyki AM we Wrocławiu. Obecnie prowadzone badania są finansowane z funduszy Grantu nr N 301 2549 33.

Piśmiennictwo

1. Pardo L., Voltage-gated potassium channels in cell proliferation. *Physiology* 2004; 19: 285-292.
2. Wang Z., Roles of K⁺ channels in regulating tumor cell proliferation and apoptosis. *Pflügers Arch* 2004; 448: 274-286.
3. Pardo L., Contreras-Jurado C, Zientkowska M, Alves F, Stühmer W. Role of voltage-gated potassium channels in cancer. *J Membrane Biol* 2005; 205: 115-124.
4. Felipe A., Vincente R., Villalonga N., Roura-Ferrer M., Martinez-Marmol R., Sole L., Ferreres J., Condom E., Potassium channels: new targets in cancer therapy. *Cancer Detection and Prevention* 2006; 30: 375-385.
5. Shieh Ch., Coghlan M., Sullivan J., Gopalakrishnan M., Potassium channels: molecular defects, diseases and therapeutic opportunities. *Pharmacol Rev* 2000; 52: 557-593.
6. Preußat K., Beetz Ch., Schrey M., Kraft R., Wölfl S., Kalff R., Patt S., Expression of voltage gated potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 in human gliomas. *Neurosci Lett* 2003; 346: 33-36.
7. Fraser S., Grimes J., Diss J., Stewart D., Dolly J., Djamgoz M., Predominant expression of Kv1.3 voltage-gated K⁺ channel subunit in rat prostate cancer cell lines: electrophysiological, pharmacological and molecular characterisation. *Pflügers Arch* 2003; 446: 559-571.
8. Abdul M., Hoosein N., Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer. *Cancer Lett* 2002; 186: 99-105.
9. Abdul M., Santo A., Hoosein N., Activity of potassium channel-blockers in breast cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 3347-3351.
10. Abdul M., Hoosein N., Voltage-gated potassium ion channels in colon cancer. *Oncology Reports* 2002; 9: 961-964.
11. Teisseyre A., Voltage-gated potassium channels in T lymphocytes – physiological role and changes in channel properties in diseases. *Cell Mol Biol Lett* 1996; 1: 337-351.
12. Grissmer S., Nguyen A., Aiyar J., Hanson D., Mathier R., Gutman G., Karmilowicz M., Auperin D., Chandy G., Pharmacological characterisation of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, Kv1.2, Kv1.3, Kv1.5 and Kv3.1 stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 1994; 45: 1227-1234.
13. Kupper J., Prinz A., Fromherz P., Recombinant Kv1.3 potassium channels stabilise tonic firing of cultured rat hippocampal neurons. *Pflügers Arch* 2002; 443: 541-547.
14. Wonderlin W., Strobl J., Potassium channels, proliferation and G₁ progression. *J. Membrane Biol* 1996; 154: 91-107.
15. Teisseyre A., Michalak K., The voltage- and time-dependent blocking effect of trifluoperazine on T lymphocyte Kv1.3 channels. *Biochem Pharmacol* 2003; 65: 551-561.
16. Teisseyre A., Michalak K., Genistein inhibits the activity of Kv1.3 potassium channels in human T lymphocytes. *J. Membrane Biol* 2005; 205: 71-79.
17. Michalak K., Teisseyre A., Łania-Pietrzak B., Inhibition of multidrug resistance-associated protein MRP1 and Kv channels by natural polyphenols. Abstracts of 15-th IUPAB and 5-th EBSA International Biophysics Congress, Montpellier, France. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters* 2005; 34 (6): 805, Abs P-875.
18. Teisseyre A., Michalak K., Inhibition of the activity of human lymphocyte Kv1.3 potassium channels by resveratrol. *J. Membrane Biol* 2006; 214: 123-129.
19. Hamill O., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F., Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch* 1981; 391: 85-100.
20. Michalak M., Hendrich A., Wesołowska O., Łania-Pietrzak B., Teisseyre A., Poła A., Kołaczowski M., Molnar J., MDR reversing activity of the new synthetic and plant-derived compounds in different cells with P-gp and MRP1 expression. Molecular mechanism of MDR modulators' action in cell and lipid membranes. European Conference on the reversal of multidrug resistance from bacteria to cancer cells and parasites. Closing conference of the COST action B16, Budapest, Hungary, 2006. *Conference Proceedings* pp68-76.

Adres korespondencyjny:

Andrzej Teisseyre,
Akademia Medyczna we Wrocławiu,
Katedra i Zakład Biofizyki,
ul. Chałubińskiego 10, 50-368 Wrocław,
e-mail: ateiss@biofiz.am.wroc.pl

Właściwości potencjałozależnych prądów jonowych K^+ w naczyniozwiązujących pozazwojowych neuronach współczulnych, unerwiających naczynia krwionośne skóry i mięśni

Kinetic properties of potassium currents in postganglionic sympathetic vasoconstrictors innervating blood vessels of the skin and muscle

Rola Rafał, Witkowski Grzegorz, Paweł Szulczyk

Zakład Fizjologii Człowieka, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Zbadano właściwości kinetyczne potencjałozależnych prądów jonowych K^+ w anatomicznie zidentyfikowanych neuronach współczulnych pozazwojowych unerwiających naczynia krwionośne skóry i mięśni. Neurony współczulne unerwiające naczynia krwionośne mięśni były większe w porównaniu z neuronami unerwiającymi naczynia krwionośne skóry. W obu typach neuronów na podstawie właściwości inaktywacji zależnej od potencjału można było wyizolować trzy komponenty prądów jonowych K^+ . W neuronach unerwiających naczynia krwionośne mięśni gęstość prądów jonowych K^+ typu I_{A1} , I_{A2} oraz I_K była znacząco wyższa w porównaniu z neuronami współczulnymi unerwiającymi naczynia skóry. Uzyskane wyniki wskazują, że różnice w aktywności dwóch badanych grup neuronów pozazwojowych mogą być spowodowane różnymi właściwościami prądów jonowych K^+ .

Słowa kluczowe: potencjałozależne kanały jonowe K^+ , pozazwojowe neurony współczulne, Fast Blue, IK, IA, neurony naczyniozwiązujące

Abstract

The kinetic properties of voltage-gated potassium currents were investigated in two anatomically defined types of postganglionic autonomic vasoconstrictors which innervate blood vessels of the skin and muscle. There were significant differences in cell size as expressed in the cell membrane capacitance between skin and muscle postganglionic vasoconstrictors. In both types of neurons, three components of the potassium current can be distinguished according to the properties of the steady-state current inactivation. There were significant differences in the current densities in all three com-

ponents of the K^+ currents (IA1, IA2, and IK) between skin and muscle vasoconstrictors. Presented data show that the different kinetic properties of K^+ currents in the two types of postganglionic vasoconstrictors may contribute to different patterns of action potential generation.

Key Words: voltage gated K^+ ion channels, postganglionic autonomic neurons, Fast-Blue, IK, IA, vasoconstrictors

Wstęp

Łożyiska naczyniowe mięśniowe i skórne pełnią odrębną funkcję w utrzymaniu homeostazy organizmu. Łożyisko naczyniowe mięśniowe odpowiedzialne jest m.in. za utrzymanie i regulację systemowego ciśnienia krwi, podczas gdy łożysko naczyniowe skórne odpowiedzialne jest przede wszystkim za wymianę ciepła z otoczeniem [1]. Ta odmiennosc funkcji znajduje odzwierciedlenie w różnych wzorcach odpowiedzi odruchowych neuronów unerwiających naczynia krwionośne skóry i mięśni. Np.: w odruchu z baroreceptorów tętnicznych aktywność neuronów naczyniozwiązujących skórnych nieznacznie się zmniejsza, podczas gdy aktywność neuronów naczyniozwiązujących mięśniowych jest zahamowana całkowicie. Z kolei w odruchu z receptorów bólowych skóry i chemoreceptorów kłębków szyjnych neurony naczyniozwiązujące skórne są hamowane, podczas gdy neurony naczyniozwiązujące mięśniowe są pobudzone [2, 3, 4]. Aktywność neuronów współczulnych pozazwojowych zależy nie tylko od ich kontroli odruchowej, ale również od właściwości kanałów jonowych występujących w ich błonach komórkowych. Potencjałozależne kanały jonowe K^+ są odpowiedzialne, między innymi, za fazę repolaryzacji i fazę hyperpolaryzacji popobudzeniowej potencjału czynnościowego. W związku z tym od właści-

wości statycznych i kinetycznych prądów jonowych K^+ wzorzec aktywności neuronów. Dotychczas wykazaliśmy, że właściwości potencjałozależnych kanałów jonowych Na^+ [5] i Ca^{++} [5] są odmienne w neuronach skórnych i mięśniowych. Celem niniejszej pracy było zbadanie, czy neurony współczulne pozazwojowe unerwiające mięśniówkę gładką naczyń krwionośnych mięśni i skóry wykazują różnice we właściwościach prądów jonowych K^+ .

Materiały i metody

Materiał doświadczalny, znieczulenie

Badania przeprowadzono na samcach szczurów szczepu Wistar o wadze 150-200 gram zgodnie z wytycznymi dotyczącymi wykonywania doświadczeń na zwierzętach UE. U wszystkich zwierząt przeprowadzono dwa zabiegi operacyjne – pierwszy, mający na celu podanie znacznika fluorescencyjnego i drugi w celu izolacji zwojów nerwowych, w których występowały neurony zawierające znacznik. W celu podania znacznika fluorescencyjnego zwierzęta usypiano przy użyciu chlorku etylu, następnie podawano dootrzewnowo ketaminę (Ketanyl, 75 mg/kg, Richter) i midazolam (Dormicum 0,5 mg/kg, Roche). Po 30 minutach od podania znacznika zwierzęta budziły się i wykazywały typową aktywność bez oznak dyskomfortu. Po około 3 tygodniach od podania znacznika zwierzęta były ponownie usypiane przy użyciu chlorku etylu i podaniu dootrzewnowo uretanu (Urethane 1 g/kg m.c., Sigma-Aldrich Chemie USA) w celu izolacji neuronów. Po uzyskaniu znieczulenia ogólnego zwierzęta były intubowane dotchawiczo pod kontrolą mikroskopu operacyjnego i sztucznie wentylowane przy użyciu respiratora (Harvard Rodent Ventilator model 683).

Znakowanie neuronów

W celu identyfikacji neuronów współczulnych unerwiających mięśnie gładkie naczyń krwionośnych skóry znacznik fluorescencyjny Fast Blue podawany był do skóry wolnego płata lewego ucha szczura. W tkankę podskórną ucha szczura podawany był znacznik fluorescencyjny w ilości 20 μ l 2% roztworu. Znacznik podawano pod kontrolą mikroskopu operacyjnego w kilka miejsc (5-10) w okolicy naczyń krwionośnych, tak aby nie uszkodzić naczyń krwionośnych i nie podać znacznika do naczynia krwionośnego. Po podaniu znacznika fluorescencyjnego do lewego ucha komórki zawierające znacznik występowały w lewym zwoju szyjnym górnym i były nieobecne w prawym zwoju szyjnym górnym. Schemat unerwienia współczulnego naczyń skóry i mięśni przedstawiono na Rycinie 1.

W celu identyfikacji neuronów współczulnych unerwiających mięśnie gładkie naczyń krwionośnych mięśnia żwacza, znacznik fluorescencyjny Fast Blue podawany był strzykawką typu Hamiltona do mięśnia żwacza w ilości 20 μ l 2% roztworu w znieczuleniu ogólnym. Dostęp do mięśnia uzyskiwano po przecięciu skóry pod kontrolą mikroskopu operacyjnego. W trakcie podawania znacznika nie obserwowano wpływu znacznika poza obręb mięśnia żwacza. Po podaniu znacznika skóra była zaszywana.

Izolacja i rozpraszanie neuronów

Lewy zwoj szyjny górny szczura był wypreparowywany po 20.6 \pm 2.5 dniach po podaniu znacznika fluorescencyjnego do mięśnia żwacza lub ucha szczura. Wypreparowany, oczyszczony z tkanki łącznej i pocięty zwoj szyjny górny przenoszono do 1 ml płynu DMEM (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*) następnie umieszczano w łaźni wodnej o temperaturze 36°C umieszczonej na wstrząsarce pracującej z częstotliwością 2,5 Hz. Do płynu ze zwojem dodawane były enzymy wg następującego protokołu: kolagenaza typ IA (2 mg/ml) przez cały okres inkubacji (75 min), trypsyna typ III (1 mg/ml) przez ostatnie 55 min inkubacji i DNA-aza (0,1 mg/ml) przez ostatnie 20 min inkubacji. Po zakończonej inkubacji płyn z nad zwoju był trzykrotnie wymieniany na świeży płyn DMEM. Następnie, przy użyciu pipet Pasteura (o średnicy czubka 900 μ m, 300 μ m i 100 μ m) pipetowano około 10-15 razy płyn wraz ze zwojem każdą z pipet aż do uzyskania jednorodnej zawiesiny pojedynczych neuronów. Zawieszony w płynie DMEM komórki przechowywano w lodówce w temp 2-4°C aż do czasu przeprowadzenia rejestracji prądów jonowych (od 0 do 6 godzin).

Identyfikacja naczyńzwojających pozazwojowych neuronów współczulnych skórnych i mięśniowych

Zawiesina komórek w płynie DMEM była nakraplana do komory perfuzyjnej (Warner Co.) umieszczonej na stoliku odwróconego mikroskopu (Nikon Diaphot 300). Po nakropleniu neurony osiadały na dnie komory. Po 20 minutach od nakroplenienia włączany był przepływ sztucznego płynu zewnątrzkomórkowego typu A o szybkości przepływu 1 ml/min. Komórki zawierające znacznik były identyfikowane przy użyciu światła ultrafioletowego (Nikon Epifluorescent Illumination Attachment) przy użyciu filtrów (UV2A, przy długości fali pobudzającej 330-380 nm) i obiektywu fluorescencyjnego (CF Fluor LWD 40x, N.A. 070 – powiększenie całkowite mikroskopu 400x). Do badań kwalifikowane były jedynie komórki zawierające wyraźne ziarnistości znacznika fluorescencyjnego w cytoplazmie.

Rejestracje elektrofizjologiczne

Rejestracje prądów jonowych K^+ były wykonywane przy użyciu techniki stabilizowania potencjału błonowego w obrębie całej błony komórkowej (*whole-cell patch-clamp*) z neuronów zawierających znacznik fluorescencyjny. Prądy jonowe K^+ były rejestrowane przy użyciu następujących płynów. Sztuczny płyn wewnątrzkomórkowy zawierał w mmol: KF 40, NMG (N-metyld-glukamina) 115, HEPES 10, EGTA 11, pH ustalone na poziomie 7,2 z HCl, osmolarność płynu wynosiła 280 mOsm. Płyn zewnątrzkomórkowy, w którym wykonywano rejestracje zawierał w mmol: chlorek cholicy 130, KOH 5, HEPES 10, glukoza 12, $MgCl_2$ 2, $CaCl_2$ 2, pH ustalone na poziomie 7,4, osmolarność wynosiła 310 mOsm. Uzyskane wyniki porównywano statystycznie przy użyciu testu t-Studenta i/lub jednoczynnikową analizą wariancji z następczym testem Tukeya.

Wyniki

Średnia pojemność błony komórkowej neuronów unerwiających naczynia krwionośne skóry ($12,2 \pm 0,3$ pF, $n=27$) była znamiennej mniejsza od pojemności błony komórkowej neuronów unerwiających naczynia krwionośne mięśnia żwacza wyrażona ($21 \pm 0,9$ pF, $n=10$, $p < 0,05$).

Zbadano proces inaktywacji zależnej od potencjału błonowego w neuronach współczulnych. W tym celu impuls testowy był poprzedzony zmianami potencjału błony komórkowej trwającymi 1 sekundę w zakresie od -160 do +20 mV. Na Rycinie 2 przedstawiono znormalizowaną zależność pomiędzy wielkością prądu K^+ rejestrowaną w odpowiedzi na impuls testowy (oś Y) i potencjałem błonowym poprzedzającym impuls testowy (oś X). Stwierdzono, że prądy potasowe zaczynają inaktywować przy potencjale błonowym -148 mV, a maksymalną inaktywację osiągają przy potencjale błonowym -40 mV. Krzywa inaktywacji zależnej od potencjału błonowego wykazywała, że występuje zahamowanie inaktywacji przy potencjałach poprzedzających impuls testowy od -100 do -90 mV. Uzyskane wyniki wskazywały na obecność 3 typów prądów potasowych. Prąd, który inaktywował w zakresie potencjału błonowego od -150 do -90 mV nazwano prądem I_{A1} . Prąd, który inaktywował w zakresie potencjałów błonowych od -90 do -40 mV nazwano prądem I_{A2} . Prąd nieinaktywujący pod wpływem potencjału błonowego nazwano prądem I_K .

W oparciu o właściwości inaktywacji zależnej od potencjału błonowego wyizolowano poszczególne komponenty prądów potasowych. W tym celu zastosowano różne amplitudy bodźców poprzedzających impuls testowy (-150, -90 i -40 mV). Przy potencjale błonowym -150 mV utrzymywanym przez

1,5 sekundy depolaryzacja testowa wywoływała wszystkie komponenty prądu jonowego K^+ . Przy potencjale błonowym -90 mV poprzedzającym impuls testowy komponenta I_{A1} ulegała inaktywacji (rejestrowano sumę prądów K^+ typu I_{A2} oraz I_K). Przy potencjale błonowym -40 mV poprzedzającym impuls testowy inaktywacji ulegała komponenta I_{A1} oraz I_{A2} i w odpowiedzi na bodziec testowy rejestrowano prąd I_K . Na drodze odejmowania prądów jonowych K^+ otrzymywano wyizolowane komponenty I_{A1} , I_{A2} i I_K . Krzywe inaktywacji prądów były dobrze opisywane równaniem Boltzmann. Nie obserwowano istotnych statystycznie różnic w wielkości parametrów inaktywacji zależnej od potencjału błonowego. Współczynnik $V_{1/2}$ prądu I_{A1} dla neuronów skórnych wynosił ($-109,7 \pm 2,1$ mV) dla neuronów mięśniowych ($-107,6 \pm 1,4$ mV, $p > 0,05$). Współczynniki k prądu I_{A1} wynosiły dla neuronów skórnych i mięśniowych odpowiednio: $-7,8 \pm 1,4$ i $-7,9 \pm 2,0$ $p > 0,05$. Współczynnik $V_{1/2}$ prądu I_{A2} dla neuronów skórnych wynosił ($-60,7 \pm 1,1$ mV) dla neuronów mięśniowych ($-61,6 \pm 1,1$ mV, $p > 0,05$). Współczynniki k dla komponenty I_{A2} wynosiły dla neuronów skórnych i mięśniowych odpowiednio: $-5,8 \pm 0,4$ i $-5,9 \pm 2,3$ ($p > 0,05$). Próg dla inaktywacji, potencjał przy którym obserwowano maksymalną inaktywację nie były różne w neuronach skórnych i mięśniowych.

W celu zbadania aktywacji prądów jonowych w neuronach współczulnych błonę komórkową depolaryzowano bodźcami od -80 mV do +40 mV, które trwały 500 ms. Depolaryzacja ta była poprzedzona hiperpolaryzacją błony komórkowej na poziomach -150, -90 i -40 mV, utrzymującą się przez 1,5 sekundy. Poszczególne typy prądów potasowych I_{A1} , I_{A2} oraz I_K izolowane były w sposób opisany powyżej. Zbadano następujące parametry: próg aktywacji i gęstość prądu wywołanego przez depolaryzację do +30 mV. Progi dla komponent I_{A2} i I_K nie były różne w obu populacjach neuronów. Próg aktywacji komponenty I_{A1} w neuronach współczulnych unerwiających mięsień żwacz ($-44,0 \pm 1,63$ mV) był znamiennej niższy niż w przypadku neuronów unerwiających skórę ($-37,5 \pm 1,46$ mV, $p < 0,05$). Gęstość prądów jonowych wszystkich komponent prądu jonowego K^+ była znacząco wyższa w neuronach mięśniowych w porównaniu z neuronami skórnymi. Gęstość prądu typu I_{A1} w neuronach skórnych i mięśniowych wynosiła odpowiednio $48,06 \pm 6,3$ pA/pF i $164,7 \pm 25,6$ pA/pF ($p < 0,05$). Gęstość prądu typu I_{A2} w neuronach skórnych i mięśniowych wynosi odpowiednio $31,4 \pm 4,5$ pA/pF i $55,1 \pm 7,8$ pA/pF ($p < 0,05$). Gęstość prądu typu I_K w neuronach skórnych i mięśniowych wynosiła odpowiednio $21,5 \pm 2,8$ pA/pF i $34,3 \pm 5,4$ pA/pF ($p < 0,05$).

Dyskusja

Przedstawione wyniki badań wskazują, że ciała komórkowe neuronów mięśniowych były znacznie większe niż neuronów skórnych. Ponadto w neuronach mięśniowych występowała większa gęstość wszystkich podtypów kanałów jonowych K^+ niż w neuronach współczulnych skórnych. Również próg pobudzenia prądów K^+ typu I_{A1} był niższy w neuronach mięśniowych.

Obserwowane przez nas różnice w wielkości neuronów unerwiających naczynia krwionośne skóry i mięśni były zgodne z badaniami przeprowadzonymi na myszach i świnkach morskich [7, 8, 9, 10]. Znaczenie różnic wielkości neuronów jest intrygujące i nie w pełni wyjaśnione. Wydaje się, że większe neurony mają aksony o większej średnicy, kontrolują synaptycznie większy obszar efektorów oraz posiadają większe drzewo dendrytyczne. W związku z tym można przypuszczać, że neurony naczyniowe mięśniowe posiadają bardziej złożone wejścia synaptyczne oraz kontrolują większy obszar efektorów.

Podstawową funkcją kanałów jonowych, które występują w ciałach komórkowych neuronów, jest wzmacnianie lub hamowanie postsynaptycznych potencjałów pobudzeniowych oraz generacja potencjałów czynnościowych szerzących się antydromowo od wzgórka aksonu w kierunku dendrytów. Ta pierwsza funkcja wpływa na modyfikację przekazywanej informacji od dendrytów do ciała komórki i aksonu. W poprzednich naszych badaniach [5, 6] wykazano, że próg pobudzenia potencjałozależnych prądów jonowych Na^+ w neuronach mięśniowych był niższy niż w neuronach skórnych. Ponadto szybkość aktywacji prądów jonowych Na^+ i ich amplituda była większa w neuronach mięśniowych niż w neuronach skórnych [5]. W związku z tym prądy Na^+ w neuronach mięśniowych są bardziej „efektywne” w generacji potencjałów czynnościowych niż w neuronach skórnych. Biorąc pod uwagę, że neurony unerwiające naczynia krwionośne mięśni mają dwukrotnie większą wielkość niż neurony unerwiające naczynia krwionośne skórne, można przypuszczać, że wymagają one również bardziej efektywnych mechanizmów wzmacniających postsynaptyczne potencjały pobudzeniowe.

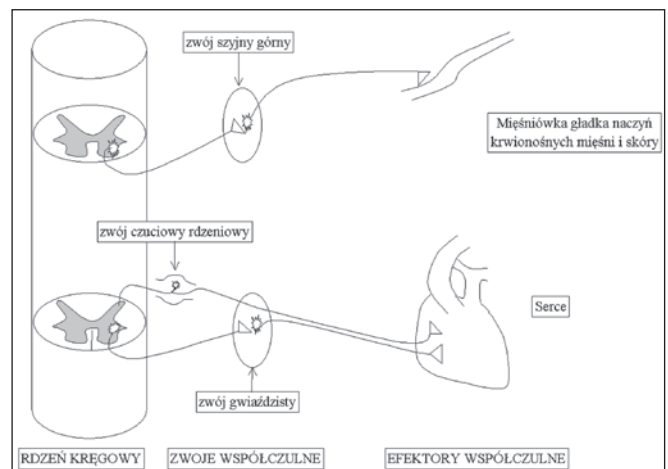
Podobna sytuacja występowała w odniesieniu do kanałów jonowych potasowych obecnych w neuronach mięśniowych i skórnych. Ekspresja kanałów jonowych potasowych typu I_{A1} , I_{A2} oraz I_K była większa w neuronach mięśniowych w porównaniu z neuronami skórnymi. Również próg pobudzenia prądów jonowych typu I_{A1} był znacznie niższy w neuronach mięśniowych niż w neuronach skórnych. W związku z tym można przypuszczać, że prądy jonowe potasowe są w stanie efektywniej

„tłumić” postsynaptyczne potencjały pobudzeniowe w neuronach mięśniowych. Również repolaryzacja i hiperpolaryzacja popobudzeniowa są bardziej efektywne w neuronach mięśniowych niż w neuronach skórnych. Obserwowane różnice w ekspresji poszczególnych podtypów potencjałozależnych prądów jonowych potasowych mogą być odpowiedzialne za różny wzorec generowania potencjałów czynnościowych oraz różną maksymalną częstotliwość wyładowań w badanych neuronach [11, 12, 13].

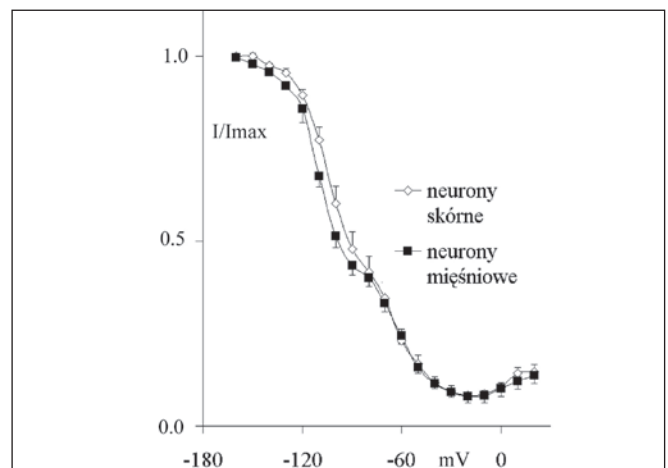
Przedstawione powyżej dane wskazują, że różnice w aktywności neuronów współczulnych naczyniowych mięśniowych i skórnych zależą zarówno od ich morfologii [8, 9], kontroli odruchowej [2, 14] jak również od ekspresji i właściwości kinetycznych potencjałozależnych kanałów jonowych.

Podziękowania

Praca sfinansowana z budżetu projektu No KBN/0575/Pp05/2005/28 i WUM FW5/N/2007.

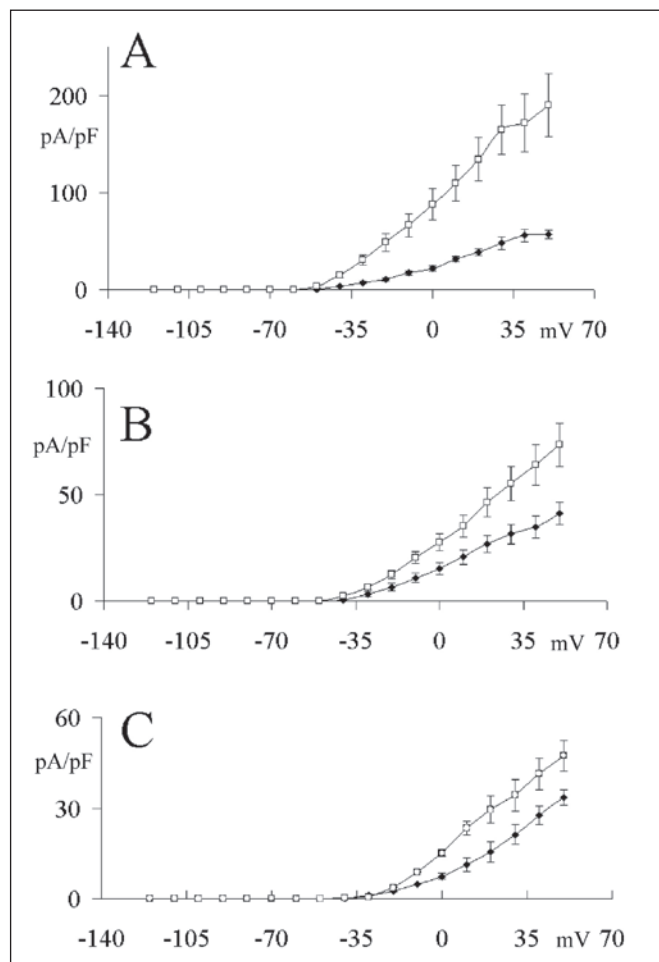


Rycina 1. Schemat organizacji unerwienia współczulnego naczyń krwionośnych mięśni i skóry.



Rycina 2. Inaktywacja zależna od potencjału błonowego prądów jonowych K^+ w neuronach skórnych

i mięśniowych (na osi X potencjał błonowy, na osi Y względna amplituda wywołanego prądu jonowego K^+).



Rycina 3. Zależności napięciowo-prądowe poszczególnych komponent prądu jonowego potasowego w neuronach mięśniowych i skórnych (A – prąd I_{A1} , B – prąd I_{A2} , C – prąd I_K). Na osi X depolaryzacja błony, na osi Y gęstość prądu jonowego K^+ wywołanego prostokątnym bodźcem depolaryzującym. Kwadraty – neurony mięśniowe, romby – neurony skórne.

Piśmiennictwo

1. Fokow B., Neil E., Circulation, Oxford University Press 1998.
2. Blumberg H., Janig W., Rieckman C., Szulczyk P., Baroreceptor and chemoreceptor reflexes in postganglionic neurons supplying skeletal muscle and hairy skin, *J. Autonom. Nerv. Syst.* 2 (1980) 223-240.
3. Habler H.J., Janig W., Krummel H., Peter O.A., Reflex patterns in postganglionic neurons supplying skeletal muscle of the rat hindlimb, *J. Neurophysiol.* 72 (1994) 2222-2236.
4. Wallin B.G., Fagius J., Peripheral sympathetic

neural activity in conscious human., *Ann. Rev. Physiol.* 50 (1998) 565-576.

5. Rola R., Szulczyk P., Quantitative differences between kinetic properties of sodium currents in postganglionic sympathetic neurones projecting to muscular and skin effectors, *Brain Research*, 857 (2000) 327-336.

6. Kukwa W., Macioch T., Rola R., Szulczyk P., Kinetic and pharmacological properties of Ca^{++} currents in postganglionic sympathetic neurones projecting to muscular and skin effectors, *Brain Research* 873 (2000) 173-180.

7. Gibbins I.L., Morris J.L., Sympathetic noradrenergic neurons containing dynorphin but not neuropeptide Y innervate small vessels of guinea pig. *J. Autonom. Nerv. Syst.* 29 (1990) 137-149.

8. Gibbins I.L., Matthew S.E., Bridgman N., Morris J.L., Sympathetic vasoconstrictor neurones projecting from the guinea pig superior cervical ganglion to cutaneous or skeletal muscle vascular beds can be distinguished by soma size, *Neurosci. Lett.* 213 (1996) 197-200.

9. Gibbins I.L., Vasomotor, pilomotor and secretomotor neurons distinguished by size and neuropeptides content in superior cervical ganglion of mice, *J. Autonom. Nerv. Syst.* 34 (1991) 171-183.

10. Yoshimura N., White G., Weight F.F., DeGroat W.C., Different types of Na and A type K currents in dorsal root ganglion neurons innervating the rat urinary bladder, *J. Physiol.* 494 (1) (1996) 1-16.

11. Malin S.A., Nerbonne J.M. (2000) Elimination of the fast transient K^+ in superior cervical ganglion neurones with expression of $Kv4.2W362F$: molecular dissection of IA. *Journal of Neuroscience* 20: 5191-5199.

12. Malin S.A., Nerbonne JM (2001) Molecular heterogeneity of the voltage gated fast transient outward K^+ current, IAf in mammalian neurones. *The Journal of Neuroscience* 21 (20): 8004-8014.

13. Pongs O., (1999) Voltage-gated potassium channels: from hyperexcitability to excitement. *FEBS Letters* 452: 31-35.

14. Wallin B.G., Fagius J., Peripheral sympathetic neural activity in conscious human., *Ann. Rev. Physiol.* 50 (1998) 565-576.

Adres korespondencyjny:

Rafał Rola,
Zakład Fizjologii Człowieka,
Warszawski Uniwersytet Medyczny,
ul. Krakowskie Przedmieście 26/28,
00-325 Warszawa,
tel.: (0 22) 826 42 75,
e-mail: rafal.rola@wum.edu.pl, rafal.rola@wp.pl

Co można wykryć w jadzie pająka, posługując się metodami elektrofizjologicznymi?

What we can find in spider venom using electrophysiological methods?

Maria Stankiewicz¹, Justyna Ciołek¹, Andrzej Zienkiewicz¹, Maria Elena De Lima²

¹Zakład Biofizyki, Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

²Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Streszczenie

Z jadu pająka *Phoneutria nigriventer* zostały wyizolowane 4 frakcje, z których każda zawiera szereg neurotoksyn. Aktywność tych substancji została określona z wykorzystaniem metod elektrofizjologicznych. Toksyny należące do jednej frakcji wykazują zbliżone działanie – z frakcji PhTx1 głównie blokują prąd sodowy, z frakcji PhTx2 wydłużają czas trwania prądu sodowego i zmniejszają jego amplitudę, z frakcji PhTx3 hamują prądy wapniowe, z frakcji PhTx4 również wydłużają czas trwania prądu sodowego, natomiast nie obniżają jego amplitudy. Toksyny z frakcji PhTx4 tym różnią się od wszystkich pozostałych, że wykazują wysoką selektywność w stosunku do owadów. Istnieje potencjalna możliwość praktycznego wykorzystania opisanych toksyn.

Słowa kluczowe: neurotoksyny, jad pająka, elektrofizjologia, kanały jonowe

Abstract

Key Words: neurotoxins, spider venom, electrophysiology, ion channels

Wstęp

Badania nad składnikami jadów produkowanych przez zwierzęta jadowite angażują zespoły biochemików, biologów molekularnych i elektrofizjologów. Szczególnie interesujące w jadach są neurotoksyny, ponieważ: (1) to one głównie decydują o szybkim działaniu jadu, (2) od dawna wykorzystywane są jako precyzyjne narzędzia farmakologiczne w badaniu błonowych kanałów jonowych i receptorów oraz do definiowania procesów komórkowych, (3) coraz szerzej zaczynają być wykorzystywane jako bioinsektocydy, (4) coraz częściej znajdują zastosowanie w terapii medycznej. W badaniach nad neurotoksynami decydujące znaczenie ma elektrofizjologia, gdyż pozwala ona na wyjaśnianie mechanizmów działania badanych substancji, pozwala określać

siłę ich działania i specyficzność oraz ewentualne interakcje z innymi substancjami.

Elektrofizjologiczne testy przeprowadzane nad neurotoksynami działającymi na błonowe kanały jonowe obejmują ocenę: (1) amplitudy prądu, (2) kinetyki procesu aktywacji i inaktywacji, (3) zależności wielkości prądu od potencjału błony (krzywa I-V) lub zależności aktywacji kanałów jonowych od potencjału błony, (4) zależności procesu inaktywacji od potencjału błony (jeśli dany kanał ulega inaktywacji), (5) czasu reaktywacji, (6) pojawiania się nowych składowych prądu, etc. Jeśli możliwa jest obserwacja aktywności toksyny na poziomie pojedynczych kanałów jonowych, wtedy uzyskujemy jeszcze pełniejszy obraz mechanizmu jej działania. Jednak nie udało się jak dotąd np. zarejestrować, na poziomie pojedynczego kanału, efektów toksyn selektywnych w stosunku do napięciowo-zależnych kanałów sodowych (Nav) u dorosłych owadów. Obserwacje prowadzone w konfiguracji „voltage-clamp” pozwalają dobrze określać mechanizm działania danej substancji. Jednak jej efekty fizjologiczne znacznie lepiej zostaną ocenione, gdy będziemy mieć możliwość obserwacji wpływu toksyny na potencjał spoczynkowy komórki pobudliwej i jej zdolność do generowania potencjałów czynnościowych. W praktyce znacznie więcej znanych jest preparatów, z których możemy rejestrować prądy jonowe, niż takich, które generują potencjały czynnościowe.

Prezentacja obiektu

Phoneutria nigriventer to agresywny pająk zamieszkujący tereny Południowej i Środkowej Ameryki, uważany za najczęstszą przyczynę niebezpiecznych ukąszeń. Jad jego zawiera, tak jak inne jady, wiele polipeptydów działających neurotoksycznie. Substancje te są od ponad 50 lat przedmiotem badań prowadzonych głównie przez naukowców z Brazylii.

Pierwszy podział na frakcje jadu *Phoneutria* został dokonany w 1963 roku [1]. Białka działające na błonowe kanały jonowe lub uwalnianie neurotransmiterów zostały zidentyfikowane we frakcjach

oznaczonych jako PhTx1, PhTx2, PhTx3, PhTx4 (wg [2]). Działanie peptydów z każdej z tych frakcji wydaje się być skierowane na określone białko błonowe, np. kanał sodowy.

Wyniki

Toksyny frakcji PhTx1

We frakcji PhTx1 znaleziona została neurotoksyna (Tx1) zbudowana z 78 aminokwasów. Doświadczenia przeprowadzono z wykorzystaniem techniki whole-cell patch-clamp na komórkach jajnika chomika, w których uzyskano ekspresję kanałów sodowych typu Nav1.2. Wykazano, że Tx1 blokuje odwracalnie prąd sodowy, nie zmieniając jego kinetyki ani napięciowej zależności procesu aktywacji i inaktywacji (Rycina 1A). Depolaryzacja błony zwiększa efektywność toksyny, a jej wbudowywanie do kanału sodowego zależne jest od stanu, w jakim kanał się znajduje. Istnieje więc daleko idące podobieństwo w działaniu Tx1 i tetrodotoksyny (TTX), klasycznego blokera kanałów sodowych. Interesujące jest jednak, że Tx1 wiąże się z innym miejscem receptorowym w kanale Nav niż TTX, ponieważ powinowactwo Tx1 nie jest obniżane przez obecność TTX. Dobrze jest więc, kiedy badaniom elektrofizjologicznym towarzyszą prace nad powinowactwem danej substancji do określonego miejsca receptorowego. Takie same efekty zaobserwowane elektrofizjologicznie niekoniecznie dowodzą takich samych zmian konformacyjnych powodowanych przez wbudowanie się neurotoksyny do kanału jonowego [3].

Toksyny frakcji PhTx2

Toksyny wyizolowane z frakcji PhTx2 okazały się być aktywatorami kanałów sodowych, tzn. substancjami zwiększającymi stan otwarcia kanałów, głównie w sensie wydłużenia stałej czasowej ich otwarcia. Toksyna Tx2-6 przetestowana została na mięśniu szkieletowym żaby przy użyciu techniki patch-clamp. Stwierdzono, że powoduje ona hamowanie procesu inaktywacji prądu sodowego, zmniejszenie jego amplitudy (Rycina 1B) oraz przesunięcie krzywej I-V w kierunku bardziej ujemnych wartości potencjału błony komórkowej [4]. Podobne efekty uzyskano w wyniku działania całej frakcji PhTx2 [5]. Hamowanie inaktywacji prądu sodowego może sugerować wbudowywanie się toksyny do miejsca receptorowego 3 w kanale sodowym. Jest to miejsce, w które wbudowują się alfa toksyny z jadu skorpiona. Jednakże zmniejszenie się amplitudy prądu sodowego, jak i wyraźne przesunięcie aktywacji kanałów do bardziej

ujemnych potencjałów błony nie są zjawiskami typowymi dla alfa toksyn. Przez analogię z toksynami z jadu pająków australijskich [6] można przypuszczać, że toksyny z frakcji PhTx2 być może wbudowują się do miejsca receptorowego 4 w kanale sodowym – miejsca, do którego przyłączają się beta toksyny z jadu skorpionów.

Wzrost przewodności sodowej prowadzi do depolaryzacji błony, czego skutkiem często jest wzrost wydzielania neurotransmiterów. Wykazano, że frakcja PhTx2 zwiększa uwalnianie kwasu glutaminowego i acetylocholinę w synaptosomach z mózgu szczura [7, 8]. Zarejestrowane elektrofizjologicznie i biochemicznie modyfikacje wywołane toksyną Tx2-6 lub frakcją zawierającą toksyny typu Tx2-6 dobrze korespondują z efektami toksyn obserwowanymi na poziomie całego zwierzęcia. Wywołują one pobudzenie, konwulsje i paraliż skurczowy [9].

Toksyny frakcji PhTx3

W przeciwieństwie do frakcji PhTx2, frakcja następną, PhTx3, wywołuje paraliż zwiotczeniowy u myszy. Z frakcji tej wyizolowanych zostało szereg toksyn (Tx3-2, Tx3-3, Tx3-4, Tx3-5, Tx3-6) [10], wykazujących zbliżone działanie. Wszystkie te toksyny hamują funkcjonowanie synaps, objawiające się m.in. zmniejszaniem postsynaptycznych potencjałów pobudzających w synapsie nerwowomięśniowej myszy lub redukowaniem presynaptycznych sygnałów wapniowych [11]. Doświadczenia z użyciem techniki whole-cell patch-clamp przeprowadzone na neuronach czuciowych [12], na neuronach ziarnistych mózdzku [13], na linii komórkowej GH3 z przysadki szczura [14] wykazały, że toksyny wyizolowane z frakcji PhTx3 hamują prąd wapniowy typu HVA, pozostając bez wpływu na prąd LVA. Ponadto stwierdzono, że jedna z toksyn (Tx3-4) (określana też jako „ ω -Phonetoxin-IIA”) wykazuje znacznie wyższe powinowactwo do kanałów Cav2.1 i Cav2.2 (odpowiedzialnych za przepływ prądu typu P/Q i N) niż do Cav2.3 (prąd R), które blokuje tylko częściowo i odwracalnie [15]. Pozostałe toksyny również wykazują zróżnicowaną aktywność na różnych rodzajach prądu wapniowego.

Badania elektrofizjologiczne pozwalają na określenie specyficzności danej substancji do danego typu/podtypu kanału jonowego. Z drugiej strony naturalne neurotoksyny pozwoliły na zidentyfikowanie nowych podtypów kanałów wapniowych. W terapii medycznej selektywne blokery określonego rodzaju kanałów wapniowych znajdują coraz szersze zastosowanie. Wzrost liczby selektywnych blokerów zwiększa możliwości stosowania terapeutycznych kombinacji różnych środków. Sub-

telna różnorodność toksyn, zawartych w jadzie *Phoneutria*, aktywnych na kanałach wapniowych może więc znaleźć zastosowanie praktyczne.

Toksyny frakcji PhTx4

Wszystkie toksyny z opisanych powyżej frakcji wykazywały dużą toksyczność w stosunku do ssaków, co potwierdziło się w testach elektrofizjologicznych. Modyfikowały one działanie preparatów pochodzących z kręgowców. Inna w tym zakresie okazała się frakcja PhTx4. Niektóre toksyny z niej wyizolowane działają toksycznie na owady i nie wywołują toksycznych efektów np. u myszy. Szczegółowe badania przeprowadzono m.in. na toksynie Tx4 (6-1). LD₅₀ dla tego składnika jadu wynosi 3, 8 ng na jedną muchę domową. Jest to toksyczność odpowiadająca działaniu toksyny AaHIT z jadu skorpiona, która uważana jest za jedną z najbardziej efektywnych i selektywnych neurotoksyn w stosunku do owadów [16]. Tx4 (6-1) wywołuje hyperaktywność i paraliż skurczowy u owadów, co sugeruje, że toksyna albo zwiększa przewodność sodową albo zmniejsza przewodność potasową. Należało to sprawdzić elektrofizjologicznie.

W przypadku substancji selektywnych do owadów są znacznie mniejsze możliwości w zakresie wyboru preparatów do testów elektrofizjologicznych niż w przypadku kręgowców. Najwięcej preparatów pochodzi z karaczana amerykańskiego – są to m.in. izolowany akson olbrzymi, spontanicznie aktywne neurony DUM, cholinergiczna synapsa nerwowo-nerwowa w ostatnim zwoju odwłokowym łańcuszka nerwowego, sensoryczny nerw cerkalny. Od kilku lat uzyskuje się ekspresję np. owadzich kanałów sodowych w oocytach *Xenopus leavis*, ale kanały takie nie zawsze zachowują się tak samo jak kanały jonowe funkcjonujące w swoim „naturalnym środowisku” (własne obserwacje), a poza tym preparat taki nie pozwala na prowadzenie rejestracji w konfiguracji „current-clamp”.

Toksyna Tx4 (6-1) została przetestowana na aksonie olbrzymim izolowanym z karaczana, z wykorzystaniem techniki podwójnej przegrody olejowej. Modyfikuje ona tylko prąd sodowy. Prąd w obecności toksyny ulegał stopniowemu wydłużeniu, zwłaszcza w końcowej fazie procesu inaktywacji (Rycina 2A), co jest odzwierciedleniem hamowania inaktywacji kanałów sodowych. Efekt był zależny od dawki – przy stężeniu 5×10^{-6} M, po 15 min opóźniony prąd rejestrowany pod koniec 5 ms impulsu depolaryzującego z poziomu -60 do -10 mV stanowił 10% prądu szczytowego. Wygasanie prądu końcowego, ocenione przy długim impulsie depolaryzującym, trwało nie dłużej niż 10 ms. Prąd opóźniony wywołany obecnością

toksyny LqhaIT z jadu skorpiona, uważanej za klasyczną antyowadzią toksynę alfa, ma zupełnie inne parametry. Stanowi on co najmniej 50% prądu szczytowego, w takich samych warunkach eksperymentalnych, i wygasa w czasie sięgającym do 500 ms (Rycina 2A). Toksyna Tx4 (6-1) nie zmieniała napięciowej zależności aktywacji ani inaktywacji prądu sodowego. Powodowała natomiast niewielki wzrost prądu szczytowego, tak jak LqhaIT.

Jakie skutki pociąga za sobą wydłużenie czasu trwania prądu sodowego? Obrazuje to Rycina 2B, C. Podanie Tx4 (6-1) powoduje wydłużenie czasu trwania potencjału czynnościowego; zostaje spowodowana faza repolaryzacji, zwłaszcza w końcowej jej części. Efekt widoczny na Rycinie 3C jest efektem maksymalnym. Odpowiada on delikatnemu przyhamowaniu inaktywacji prądu sodowego. Zahamowanie przewodności potasowej (przy użyciu 4amino-pirydyny) prowadzi do uzyskania potencjału czynnościowego typu *plateau*, charakterystycznego dla działania toksyn alfa, wbudowujących się w miejscu receptorowym 3 w kanale sodowym. Tx4 (6-1) nie ograniczała działania toksyny LqhaIT, która podana jako druga, powodowała znaczne wydłużenie czasu trwania potencjału czynnościowego, niezależnie od tego, czy była aplikowana w obecności, czy przy braku blokera przewodności potasowej (Rycina 2C). Bardzo podobne działanie zostało zarejestrowane dla kolejnej toksyny Tx4 (5-5) [17]. Obie toksyny testowane były też z zastosowaniem techniki mikroelektrodowej na kanałach sodowych kręgowców, których ekspresję uzyskano w oocytach *Xenopus*. Nawet przy dużych stężeniach (10^{-4} M) żaden efekt nie został zaobserwowany [18].

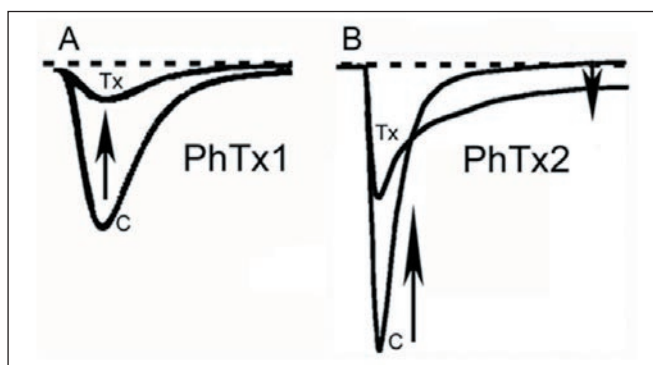
Sposób działania toksyn frakcji PhTx4 jest więc podobny do alfa toksyn z jadu skorpionów ale zdecydowanie słabszy. Ma on też trochę wspólnego z działaniem toksyn z frakcji PhTx2 oraz toksyn izolowanych z jadu australijskich pajaków [19]. W tej sytuacji toksyny z jadu *Phoneutria*, z frakcji PhTx4 wydają się stanowić nową grupę toksyn selektywnych do owadów o nieco odmiennym sposobie działania od opisanych dotąd „alfa-podobnych” toksyn z jadu pajaków.

Aktualnie prowadzi się szeroko zakrojone prace nad wykorzystaniem toksyn selektywnych do owadów jako bioinsektycydów. Jeśli prace te zakończą się rzeczywistym sukcesem, wtedy bardzo istotne będzie posiadanie bogatego arsenału toksyn o różnicowanej strukturze i sposobie działania. Wykorzystanie ich naprzemiennie lub tworzenie różnych ich kombinacji pozwoli opóźnić procesy nabywania przez owady oporności na stosowane insektycydy.

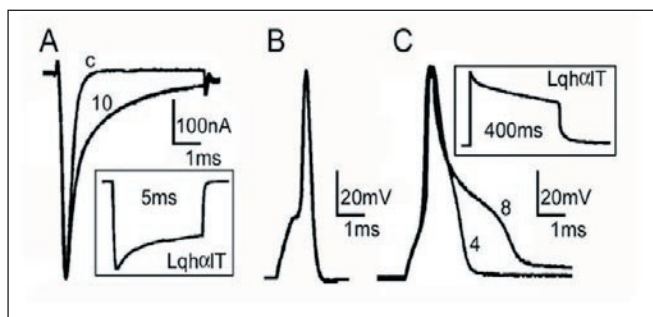
Podsumowanie

Rycina 3 stanowi podsumowanie zagadnień omawianych w tekście. Pokazuje ona schematycznie miejsca i sposoby działania toksyn z poszczególnych frakcji jadu *Phoneutria*.

W zakończeniu należy zwrócić uwagę na (1) ogromne zróżnicowanie aktywności polipeptydów występujących w jadzie jednego gatunku pająka; (2) niezbędność badań elektrofizjologicznych w pracach nad określeniem sposobu działania danej substancji; (3) konieczność przeprowadzania równoległe do badań elektrofizjologicznych również badań nad powinowactwem danej substancji do określonego miejsca receptorowego. Wejście badań nawet na poziom inżynierii genetycznej powoduje konieczność powrotu do badań elektrofizjologicznych, bo tylko one są w stanie ostatecznie określić wpływ, np. mutacji, na funkcjonowanie danej substancji. Badania nad toksynami mają nie tylko aspekty poznawcze. Również szerokie praktyczne ich wykorzystanie staje się coraz bardziej realne.

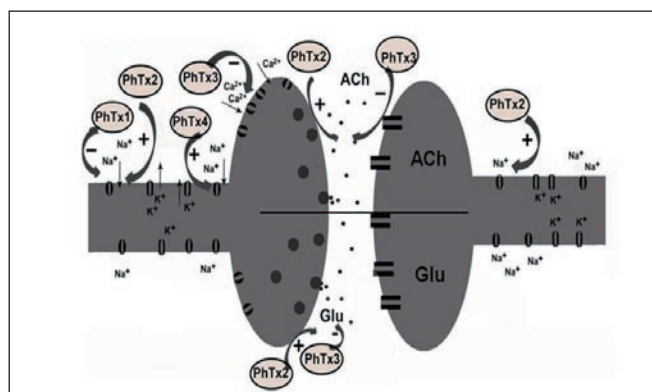


Rycina 1. Schematycznie pokazany mechanizm działania toksyn z frakcji jadu *Phoneutria nigriventer*. **A.** Blokowanie prądu sodowego toksynami z frakcji PhTx1 (schemat przygotowany wg danych z [3]). **B.** Spadek amplitudy prądu sodowego i pojawienie się prądu opóźnionego w obecności toksyn z frakcji PhTx2 (schemat przygotowany wg danych z [4]).



Rycina 2. Zapisy (oryginalne) czynności bioelektrycznej izolowanego aksonu olbrzymiego karakacha

czana, zmodyfikowanej podaniem toksyny Tx4 (6-1) z jadu pająka *Phoneutria nigriventer*. **A.** Prąd sodowy zarejestrowany w wyniku zadziałania impulsu depolaryzującego z poziomu -60 do -10 mV; c – prąd kontrolny, 10 – prąd obserwowany po 10 min od podania Tx4 (6-1) w stężeniu 5×10^{-6} M. Widoczny efekt jest efektem maksymalnym. W ramce, dla porównania, podano schematycznie prąd sodowy zarejestrowany z tego samego preparatu po toksynie Lqh ϵ IT (10^{-7} M). **B.** Kontrolny potencjał czynnościowy wywołany 0,5 ms prądem depolaryzującym. **C.** Wydłużony potencjał czynnościowy zarejestrowany po 4 i 8 min od podania toksyny Tx4 (6-1) w stężeniu 5×10^{-6} M. Efekt obserwowany po 8 min jest efektem maksymalnym. W ramce podano, dla porównania, schematyczny zapis potencjału czynnościowego plateau z aksonu olbrzymiego uzyskany po antyowadziej toksynie typu alfa z jadu skorpiona, LqhaIT.



Rycina 3. Schematycznie przedstawione połączenia synaptyczne (cholinergiczne, ACh, i glutaminergiczne, Glu) z zaznaczonymi „punktami” działania toksyn wyizolowanych z poszczególnych frakcji (zaznaczonych na schemacie jako PhTx1, etc) z jadu *Phoneutria*. (+) oznacza podniesienie aktywności kanałów jonowych lub uwalniania neurotransmitera, (-) oznacza blokiowanie kanałów jonowych lub ograniczenie uwalniania neurotransmitera.

Piśmiennictwo

- Diniz C.R. Separation of proteins and characterization of active substances in the venom of the Brazilian spiders. Anais Acad. Bras. Cien., 1963, 35: 283-291
- Gomez M.V., Kalapothakis E., Guatimosim C., Prado M.A. *Phoneutria nigriventer* venom: a cocktail of toxins that affect ion channels. Cell. Mol. Neurobiol. 2002, 22: 579-588
- Martin-Moutot N., Mansuelle P., Alcaraz G., Dos Santos R.G., Cordeiro M.N., De Lima M.E.,

- Seagar M., Van Renterghem C. *Phoneutria nigriventer* Toxin I: A novel, state-dependent inhibitor of neuronal sodium channels that interacts with μ conotoxin binding sites. *Mol. Pharmacol.* 2006, 69: 1931-1937
4. Matavel A., Cruz J.S., Penaforte C.L., Araujo D.A., Kalapothakis E., Prado V.F. Diniz, C.R., Cordeiro, M.N., Beirão, P.S. Electrophysiological characterization and molecular identification of the *Phoneutria nigriventer* peptide toxin PnTx2-6. *FEBS Lett.* 2002, 523: 219-223
5. Araújo D.A., Cordeiro M.N., Diniz C.R., Beirão P.S. Effects of a toxic fraction, PhTx2, from the spider *Phoneutria nigriventer* on the sodium current. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1993, 347: 205-208
6. Corzo, G., Escoubas, P., Villegas, E., Karbat, I., Gordon, D., Gurevitz, M., Nakajima, T., Gilles, N. A spider toxin that induces a typical effect of scorpion α -toxins but competes with β -toxins on binding to insect sodium channels. *Biochemistry*, 2005, 44: 1542-1549
7. Romano-Silva M.A., Ribeiro-Santos R., Ribeiro A.M., Gomez M.V., Diniz C.R., Cordeiro M.N., Brammer M.J. Rat cortical synaptosomes have more than one mechanism for Ca^{2+} entry linked to rapid glutamate release: studies using the *Phoneutria nigriventer* toxin PhTx2 and potassium depolarization. *Biochem. J.*, 1993, 296: 313-319
8. Moura J.R., Prado M.A.M., Gomez M.V., Kalapothakis E., Diniz C.R., Cordeiro M.N., Romano-Silva M.A. Investigation of the effect of PhTx2, from the venom of the spider *Phoneutria nigriventer*, on the release of [3H]-acetylcholine from rat cerebrocortical synaptosomes. *Toxicon*, 1998, 36: 1189-1192
9. Rezende L. Jr, Cordeiro M.N., Oliveira E.B., Diniz C.R. Isolation of neurotoxic peptides from the venom of the "armed" spider *Phoneutria nigriventer*. *Toxicon*. 1991, 29: 1225-1233
10. Cordeiro M.N, Figueiredo S.G., Valentim A.C., Diniz C.R., Eickstedt V.R., Gilroy J., Richardson M. Purification and amino acid sequences of six Tx3 type neurotoxins from the venom of the Brazilian 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon*, 1993, 31: 35-42
11. Troncione L.R., Georgiou J., Hua S.Y., Elrick D., Lebrun I., Magnoli F., Charlton M.P. Promiscuous and reversible blocker of presynaptic calcium channels in frog and crayfish neuromuscular junctions from *Phoneutria nigriventer* spider venom. *J Neurophysiol.*, 2003, 90: 3529-3537
12. Cassola A.C., Jaffe H., Fales H.M., Castro Afeche S., Magnoli F., Cipolla-Neto J. Omega-pho-netoxin-IIA: a calcium channel blocker from the spider *Phoneutria nigriventer*. *Pflugers Arch.*, 1998, 436: 545-552
13. Leão R.M., Cruz J.S., Diniz C.R., Cordeiro M.N., Beirão P.S. Inhibition of neuronal high-voltage activated calcium channels by the omega-*Phoneutria nigriventer* Tx3-3 peptide toxin. *Neuropharmacology*, 2000, 39: 1756-1767
14. Kalapothakis E., Penaforte C.L., Leão R.M., Cruz J.S., Prado V.F., Cordeiro M.N., Diniz C.R., Romano-Silva M.A., Prado M.A., Gomez M.V., Beirão P.S. Cloning, cDNA sequence analysis and patch clamp studies of a toxin from the venom of the armed spider (*Phoneutria nigriventer*). *Toxicon*, 1998, 36: 1971-1980
15. Dos Santos R.G., Van Renterghem C., Martin-Moutot N., Mansuelle P., Cordeiro M.N., Diniz C.R., Mori Y., De Lima M.E., Seagar M. *Phoneutria nigriventer* omega-pho-netoxin IIA blocks the Cav2 family of calcium channels and interacts with omega-conotoxin-binding sites. *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 13856-13862
16. Figueiredo S.G., Garcia M.E., Valentim A.C., Cordeiro M.N., Diniz C.R., Richardson M. Purification and amino acid sequence of the insecticidal neurotoxin Tx4 (6-1) from the venom of the 'armed' spider *Phoneutria nigriventer* (Keys). *Toxicon*, 1995, 33: 83-93
17. Stankiewicz M., De Lima M.E., Grolleau F., Pelhate M. L'electrophysiologie révèle que les toxines d'araignées ralentissant l'inactivation du courant sodium axonal chez l'insecte agissent de façon différente des toxines alpha de scorpions. *W « Envenimations, intoxications » Collection Rencontres en Toxinologie SFET, Lavoisier, 2004, pp. 175-177*
18. De Lima M. E., Stankiewicz M., Hamon A., Figueiredo S. G., Cordeiro M. N., Diniz C. R., Martin-Eauclaire M., Pelhate M. The toxin Tx4 (6-1) from the spider *Phoneutria nigriventer* slows down Na^+ current inactivation in insect CNS via binding to receptor site 3. *J. Insect Physiol.* 2002, 48: 53-61
19. Nicholson G.M. Insect-selective spider toxins targeting voltage-gated sodium channels. *Toxicon*, 2007, 49: 490-512

Adres korespondencyjny:

Maria Stankiewicz,
Instytut Biologii Ogólnej i Molekularnej UMK,
ul. Gagarina 9, 87-100 Toruń,
tel. (056) 611 42 96,
e-mail: stankiew@biol.uni.torun.pl

Mechanizmy modulacji prądów synaptycznych GABAergicznych przez agonistów receptora benzodiazepiny

Mechanisms of the synaptic GABA currents by the agonists of the benzodiazepin receptor

Jerzy W. Mozrzyk, Tomasz Wójtowicz, Katarzyna Mercik, Paulina Wyrembek, Katarzyna Lebida
Samodzielna Pracownia Biofizyki Układu Nerwowego, Katedra Biofizyki, Akademia Medyczna, Wrocław

Streszczenie

Benzodiazepiny (BDZ) są silnymi modulatorami receptorów GABAA, które powszechnie stosuje się w praktyce klinicznej. Uważa się, że głównym mechanizmem oddziaływania tych substancji na receptor GABAA jest zwiększanie jego powinowactwa, podczas gdy ich wpływ na kinetykę zmian konformacyjnych związanego receptora pozostaje niejasny. W niniejszej pracy opisujemy wyniki analizy farmakokinetycznej oddziaływania benzodiazepiny flurazepamu oraz agonisty receptora benzodiazepinowego – zolpidemu na neuronalne receptory GABAA i na GABAergiczne miniatury hamujące prądy synaptyczne (mIPSCs). Wykazano, że flurazepam i zolpidem efektywnie wzmacniają prądy GABAergiczne tylko przy bardzo niskich stężeniach GABA (ok. rząd wielkości niższych niż EC_{50}), natomiast odpowiedzi na wysokie stężenia GABA (porównywalne do EC_{50} lub wyższe) są przez te czynniki istotnie inhibowane. Podobne zjawisko zaobserwowano dla kinetyki deaktywacji (przebieg prądowy po usunięciu neurotransmitera). W odniesieniu do prądów synaptycznych stwierdzono, że silnie nierównowagowe warunki aktywacji receptorów postsynaptycznych, wynikające z bardzo krótkotrwałej obecności neuroprzekaźnika w synapsie, czynią prądy synaptyczne szczególnie podatnymi na modulację przez benzodiazepiny.

Wstęp

Kwas gamma-aminomasłowy (GABA) jest podstawowym neuroprzekaźnikiem hamującym w ośrodkowym układzie nerwowym dorosłych osobników. Receptory GABAA są to anionoselektywne kanały aktywowane chemicznie (przez GABA), których aktywacja (u dorosłych osobników) prowadzi do hiperpolaryzacji błony. Funkcjonalne receptory GABAA są pentamerami, przy czym dotychczas sklonowano aż 20 różnych podjednostek tego receptora, co wska-

zuje na ich potencjalnie ogromną heterogenność [1]. Najczęściej występujące w mózgu receptory GABAA składają się z dwóch podjednostek α , dwóch β i jednej γ lub δ [2].

Benzodiazepiny (BDZ) znane są jako modulatory receptorów GABAA wzmacniające ich działanie [2, 3]. Zolpidem nie jest co prawda benzodiazepiną, ale jego wpływ na receptory GABAA jest bardzo podobny do działania tych substancji i dlatego zolpidem klasyfikuje się często jako agonistę receptora benzodiazepinowego. Dotychczasowe badania wskazują na to, że BDZ zwiększają amplitudę i czas trwania GABAergicznych prądów synaptycznych (IPSCs, [4, 5]). Uważa się, że głównym mechanizmem działania BDZ jest zwiększenie powinowactwa receptora GABAA do jego agonisty. Wpływ tych czynników na zmiany konformacyjne między stanami związanymi pozostaje jednak niejasny. W naszych niedawno przeprowadzonych badaniach [6] na rekombinowanych receptorach GABAA typu $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ stwierdziliśmy, że BDZ flurazepam i zolpidem, oprócz wzmocnienia powinowactwa, wpływają na kinetykę zmian konformacyjnych związanego receptora (wpływ ten dotyczy głównie procesu desensytyzacji). Bardzo ważnym pytaniem jest, na ile opisany wyżej wpływ BDZ na rekombinowane receptory $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ dotyczy również neuronalnych receptorów GABAA. Zagadnienie to zostało przez nas zbadane na neuronach pochodzących z hodowli neuronów hipokampalnych przy zastosowaniu techniki patch-clamp i ultraszybkiej perfuzji. Niniejsze opracowanie zostało sporządzone z wykorzystaniem opublikowanych wyników [7, 6] jako materiały zjazdowe VI Konferencji „Techniki Elektrofizjologiczne w Badaniu Układu Nerwowego: Od Kanałów Jonowych po Sieci Neuronowe”.

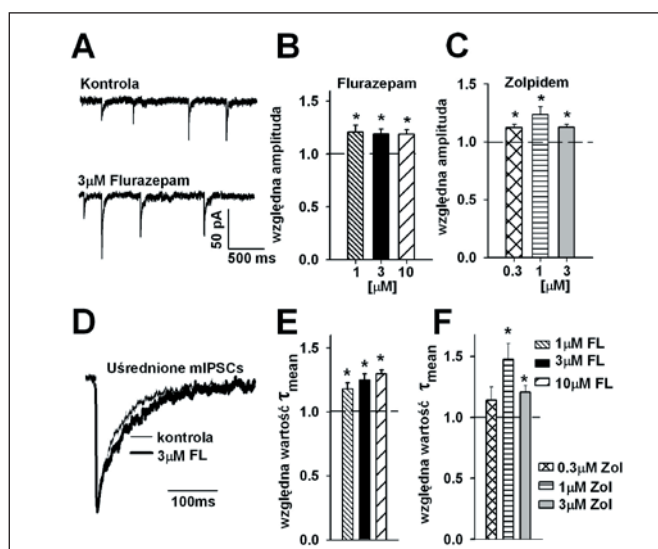
Materiały i metody

Hodowle neuronalne zostały sporządzone zgodnie z procedurą opisaną w szczegółach w [8].

Komórki neuronalne z hipokampa zwierząt w wieku P2-4 rozproszono enzymatycznie i mechanicznie, wysiano na szalki Petriego i hodowano przez 10-14 dni. Do pomiarów elektrofizjologicznych zastosowano technikę patch-clamp w konfiguracji „excised-patch” lub „whole-cell” przy napięciu błonowym -70 mV (szczegóły dotyczące zastosowanych roztworów i aparatury podane są w [8]). W celu przeprowadzenia badań farmakokinetycznych zastosowano system ultraszybkiej perfuzji pozwalający na wymianę roztworu wokół łątki błonowej (excised-patch) w czasach krótszych niż 100 μ s [9].

Wyniki badań i dyskusja

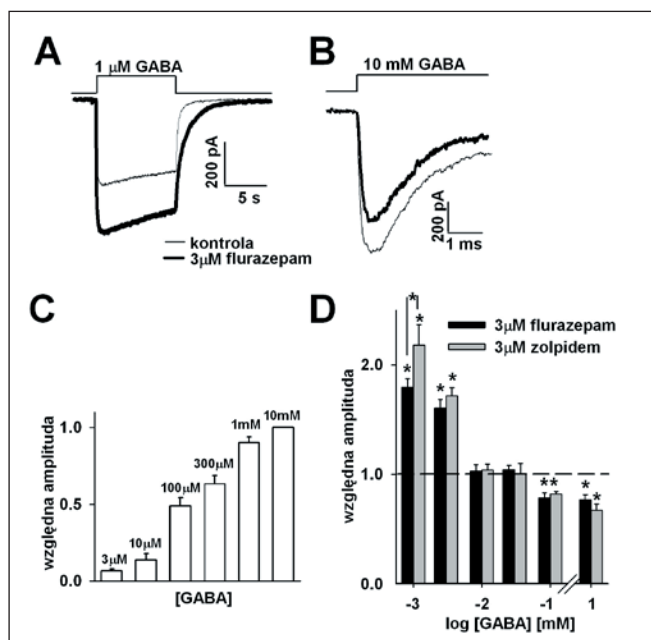
Pomiaru GABAergicznych miniaturowych prądów synaptycznych (mIPSCs) dokonano w konfiguracji whole-cell techniki patch-clamp w obecności blokera kanałów sodowych napięciowo-zależnych (TTX, 1 μ M). Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy stwierdzono, że zarówno flurazepam, jak i zolpidem wpłynął na zwiększenie średniej amplitudy prądów synaptycznych (względna zmiana amplitudy $1,20 \pm 0,06$; $n=11$ dla 1 μ M flurazepamu; $1,23 \pm 0,07$; $n=6$ dla 1 μ M zolpidemu, Rycina 1). Ponadto stwierdzono, że czynniki te wydłużają czas trwania mIPSCs (mierzony jako średnia stała czasowa fazy zaniku mIPSC, Rycina 1).



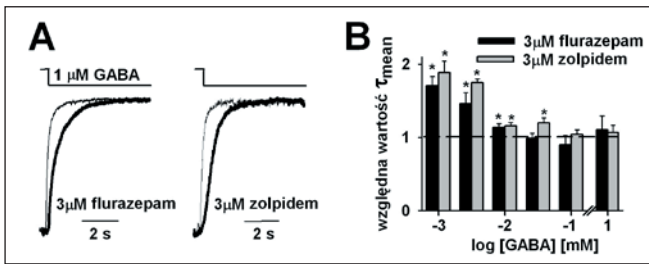
Rycina 1. Flurazepam i zolpidem zwiększają amplitudę prądów synaptycznych mIPSCs (A-C) i wydłużają kinetykę zaniku mIPSCs (D-F). Parametr τ_{mean} oznacza średnią stałą czasową zaniku mIPSC.

Aby pełniej opisać wpływ flurazepamu i zolpidemu na mIPSCs, dokonano pomiaru odpowiedzi prądowych na egzogenne aplikacje GABA w szerokim przedziale stężeń tego neuroprzekaźnika. W warunkach kontrolnych zależność odpowiedzi od stę-

żenia GABA wykazała, że wysycenie tych odpowiedzi następuje przy stężeniach milimolarnych GABA, zaś stężenie aktywujące około 50% receptorów (Ec_{50}) to ok. 100 μ M (Rycina 2). Zarówno flurazepam, jak i zolpidem silnie wzmacniały odpowiedzi prądowe wywołane niskimi stężeniami GABA (1-3 μ M), natomiast przy stężeniach nieco niższych niż Ec_{50} wpływu tych czynników na amplitudę odpowiedzi prądowych nie stwierdzono (Rycina 1). Podobnie jak zaobserwowaliśmy poprzednio dla rekombinowanych receptorów $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ [6], dla wyższych stężeń GABA (porównywalne i wyższe niż Ec_{50}) zarówno flurazepam, jak i zolpidem zmniejszały amplitudę odpowiedzi prądowych (Rycina 2). Kinetyka deaktywacji (przebieg czasowy odpowiedzi prądowej po usunięciu agonisty) jest również bardzo silnie modulowana przez flurazepam i zolpidem, przy czym ponownie silny efekt obserwuje się dla niskich stężeń GABA (1-3 μ M), dla wyższych zaś stężeń efekt ten zanika (Rycina 1). W celu dokonania oceny wpływu flurazepamu i zolpidemu na kinetykę zmian konformacyjnych receptora GABA w stanie związanym wykonano pomiary odpowiedzi prądowych na nasycające (10 mM) stężenie GABA.



Rycina 2. Flurazepam i zolpidem silnie wzmacniają odpowiedzi prądowe na egzogenne aplikacje GABA tylko w zakresie niskich stężeń GABA. Typowe odpowiedzi prądowe na 1 μ M GABA (A) i na nasycające stężenie (10 mM) GABA (B). Cienką linią zaznaczone są odpowiedzi kontrolne, grubą zaś – odpowiedzi w obecności flurazepamu. C. Znormalizowana zależność amplitudy odpowiedzi prądowej od stężenia GABA. D. Statystyka względnego wzrostu amplitudy odpowiedzi prądowej na egzogenne aplikacje GABA.



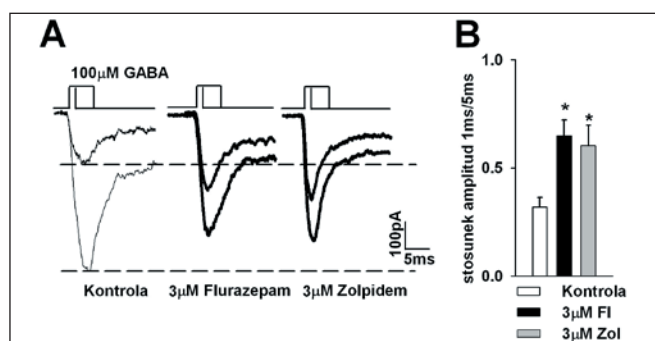
Rycina 3. Flurazepam i zolpidem wydłużają proces deaktywacji odpowiedzi prądowych tylko przy niskich stężeniach GABA. **A.** Typowe przebiegi prądów deaktywacji dla odpowiedzi wywołanych aplikacją 1 μM GABA w warunkach kontrolnych (linia cienka) i w obecności modulatorów (linie grube).

W tym zakresie stężeń szybkość wiązania jest tak duża, że czynnikiem kształtującym przebieg czasowy odpowiedzi prądowej jest kinetyka zmian konformacyjnych między receptorami związanymi. Stosując długie aplikacje neuroprzekaźnika (100 ms), stwierdzono, że kinetyka procesu desensytyzacji ulega przyspieszeniu w obecności zolpidemu flurazepam zaś nie ma wpływu na to zjawisko. Zolpidem również istotnie przyspieszał fazę narastania odpowiedzi prądowej w obecności nasycającego stężenia GABA, co wskazuje na przyspieszenie procesu aktywacji tych receptorów. Istotny wpływ zolpidemu na kinetykę narastania odpowiedzi prądowych oraz na desensytyzację wskazują na to, że oprócz dominującego wpływu flurazepamu i zolpidemu na powinowactwo receptora GABA, mamy również do czynienia z modulacją kinetyki zmian konformacyjnych receptora w stanie związanym.

Poprzednie badania [10, 11, 7] wskazują na to, że podczas transmisji synaptycznej GABA osiąga stężenia milimolarne. Jest w związku z tym zastanawiające, dlaczego mIPSCs są istotnie wzmacniane zarówno przez flurazepam i zolpidem (Rycina 1), podczas gdy już przy stężeniach rzędu setek mikromoli GABA, czynniki te istotnie zmniejszają amplitudę odpowiedzi prądowych (Rycina 2). Należy zwrócić jednak uwagę, że o amplitudzie odpowiedzi prądowych decyduje nie tylko stężenie podawanego neuroprzekaźnika, ale również czas jego aplikacji. W szczególności, gdy czas aplikacji jest bardzo krótki, ekspozycja receptorów na agonistę może być niewystarczająca, aby związały one neuroprzekaźnik i uległy aktywacji. Należy pamiętać również o tym, że czas przebywania GABA w synapsie GABAergicznej jest bardzo krótki i wynosi co najwyżej setki mikrosekund [10, 11, 12]. Można zatem przypuszczać, że przy tak krótkiej ekspozycji receptorów postsynaptycznych na neuroprzekaźnik, aktywacji ulega tylko część receptorów synaptycznych, gdyż czas oddziaływania agonisty

z receptorami jest zbyt krótki, by proces wiązania GABA osiągnął nasycenie. Można przypuszczać, że zwiększenie przez BDZ powinowactwa receptorów GABA, a co za tym idzie i szybkości wiązania do tego receptora, powinno sprawić, iż podczas krótkotrwałej ekspozycji receptorów na synaptycznie wydzielony neuroprzekaźnik, zwiększy się ilość związanych i zaktywowanych receptorów. A zatem zgodnie z tą hipotezą, zwiększenie amplitudy mIPSCs przez BDZ i zolpidem jest konsekwencją braku wysycenia miejsc wiążących GABA przez synaptycznie wydzielonego agonistę oraz zwiększenia szybkości wiązania tego neuroprzekaźnika w obecności flurazepamu lub zolpidemu. Aby zweryfikować eksperymentalnie tę hipotezę, wykorzystaliśmy system ultraszybkiej perfuzji do bardzo krótkich aplikacji GABA (1 ms). Czas 1 ms jest minimalnym czasem aplikacji wynikającym z ograniczeń technologicznych naszego systemu aplikacji. Jest to czas przynajmniej kilkakrotnie dłuższy niż szacowany czas przebywania GABA w synapsie. Z racji tego, że w przypadku krótkich aplikacji efektywność działania neuroprzekaźnika jest proporcjonalna do iloczynu stężenia i czasu aplikacji agonisty [13], dokonaliśmy przeskalowania stężenia GABA do 100 μM , tak by przy aplikacji trwającej 1 ms jej efektywność była porównywalna do synaptycznej (1 mM, 100 μs). Na Rycinie 4 przedstawione są przebiegi odpowiedzi prądowych na krótkie (1 ms) i „długie” (5 ms) aplikacje 100 μM GABA. W przypadku pomiarów kontrolnych (Rycina 4A) odpowiedź na aplikację 1 ms jest znacznie mniejsza niż odpowiedź wywołana ekspozycją trwającą 5 ms. Obserwacja ta potwierdza przypuszczenie, że krótkotrwała ekspozycja sprzyja niepełnej aktywacji receptorów. Na Rycinie 4A przedstawione są również wyniki analogicznego eksperymentu w obecności flurazepamu lub zolpidemu. Odpowiedź na trwającą 1 ms aplikację 100 μM GABA w obecności tych czynników charakteryzuje istotnie większa odpowiedź niż w przypadku pomiarów kontrolnych. Potwierdza to naszą hipotezę, że w warunkach krótkiej aplikacji, benzodiazepiny zwiększając szybkość wiązania agonisty, umożliwiają pełniejsze wysycenie miejsc wiążących niż ma to miejsce w analogicznych pomiarach kontrolnych. Należy zwrócić uwagę, że amplitudy odpowiedzi prądowych na „długie” (5 ms) aplikacje 100 μM GABA zmierzone w obecności flurazepamu lub zolpidemu są mniejsze niż w warunkach kontrolnych (Rycina 4B). Nie ma zatem sprzeczności pomiędzy wynikami otrzymanymi dla prądów synaptycznych (Rycina 1) i odpowiedziami prądowymi, albowiem zasadnicza różnica między warunkami tych pomiarów wiąże się z bardzo krótkim czasem aplikacji w przypadku prądów synap-

tycznych, podczas gdy amplitudy odpowiedzi prądowych (Rycina 2) zmierzone były w warunkach aplikacji, których czas trwania był wystarczający do tego, by proces wiązania agonisty był kompletny.



Rycina 4. Flurazepam i zolpidem zwiększają stopień wysycenia odpowiedzi prądowych wywołanych krótkimi („synaptycznymi”) aplikacjami GABA. **A.** Przykładowe odpowiedzi prądowe wywołane krótką (1 ms) i „długą” (5 ms) aplikacją 100 μM GABA w warunkach kontrolnych (cienkie linie) oraz w obecności flurazepamu lub zolpidemu (pogrubione linie). **B.** Statystyka ilorazu amplitud wywołanych przez krótkie i długie aplikacje GABA.

Podsumowując, wyniki nasze wskazują na to, że BDZ i zolpidem wzmacniają prądy GABAergiczne tylko wtedy, gdy stężenie GABA jest niskie (około jeden rząd wielkości niższe niż EC_{50}) oraz że czynniki te istotnie wpływają na kinetykę zmian konformacyjnych związanych receptorów. Szczególnie ważną wydaje się obserwacja, że podatność prądów GABAergicznych (w szczególności mIPSCs) na modulację przez BDZ bardzo silnie zależy od warunków aplikacji neuroprzekaźnika. Odpowiedzi na bardzo krótkie aplikacje synaptycznego agonisty okazują się być niezwykle wrażliwe na modulatory wpływające na powinowactwo agonisty (i przez to na szybkość wiązania).

Podziękowania

Badania zostały wykonane dzięki finansowaniu w ramach Wellcome Trust International Senior Research Fellowship in Biomedical Science (grant no. 070231/Z/03/Z).

Piśmiennictwo

- Cherubini E, Conti F (2001). Generating diversity at GABAergic synapses. *Trends Neurosci* 24, 155–162.
- Wafford KA (2005). GABA_A receptor subtypes: any clues to the mechanism of benzodiazepine dependence? *Curr Opin Pharmacol* 5, 47–52.

- Rudolph U, Mohler H (2006). GABA-based therapeutic approaches: GABA_A receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol* 6, 18–23.
- Nusser Z, Cull-Candy S, Farrant M (1997). Differences in synaptic GABA_A receptor number underlie variation in GABA mini amplitude. *Neuron* 19, 697–709.
- Perrais D, Ropert N (1999). Effect of zolpidem on miniature IPSCs and occupancy of postsynaptic GABA_A receptors in central synapses. *J Neurosci* 19, 578–588.
- Mercik K, Piast M, Mozrzymas JW (2007). The benzodiazepine receptor agonists affect both binding and gating of recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ GABA_A receptors. *Neuroreport* 18, 781–785.
- Jerzy W. Mozrzymas, Tomasz Wójtowicz, Michał Piast, Katarzyna Lebida, Paulina Wyrembek, and Katarzyna Mercik (2007) GABA transient sets the susceptibility of mIPSCs to modulation by benzodiazepine receptor agonists in rat hippocampal neurons *J. Physiol.*, 585: 29–46.
- Andjus PR, Stevic-Marinkovic Z, Cherubini E (1997). Immunoglobulins from motoneuron disease patients enhance glutamate release from rat hippocampal neurons in culture. *J Physiol* 504, 103–112.
- Jonas P (1995). Fast application of agonists to isolated membrane patches. In *Single-Channel Recording*, ed. Sakmann B Neher E, pp. 231–243. Plenum Press, New York and London.
- Clements JD (1996). Transmitter time course in the synaptic cleft: its role in the central synaptic function. *Trends Neurosci* 19, 163–171.
- Mozrzymas JW, Barberis A, Michalak K, Cherubini E (1999). Chlorpromazine inhibits miniature GABAergic currents by reducing the binding and by increasing the unbinding rate of GABA_A receptors. *J Neurosci* 19, 2474–2488.
- Mozrzymas JW, Zarnowska ED, Pytel M, Mercik K (2003). Modulation of GABA_A receptors by hydrogen ions reveals synaptic GABA transient and a crucial role of the desensitization process. *J Neurosci* 23, 7981–7992.
- Barberis A, Petrini EM, Cherubini E (2004). Presynaptic source of quantal size variability at GABAergic synapses in rat hippocampal neurons in culture. *Eur J Neurosci* 20, 1803–1810.

Adres korespondencyjny:

Jerzy W. Mozrzymas,
Katedra Biofizyki,
Akademia Medyczna,
ul. Chałubińskiego 3, 50-367 Wrocław,
tel.: (0 71) 784 14 00,
e-mail: mozrzy@biofiz.am.wroc.pl

Niezależne od potencjału kanały jonowe K⁺ w neuronach piramidowych kory przedczołowej

Voltage independent K⁺ channels in pyramidal neurons of the prefrontal cortex

Grzegorz Witkowski, Rafał Rola, Paweł Szulczyk

Zakład Fizjologii Człowieka, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Utrzymanie śladu pamięciowego w pamięci operacyjnej prawdopodobnie wiąże się z występowaniem stanów przetrwałej depolaryzacji błony komórkowej neuronów kory przedczołowej. Występowanie stanów przetrwałej depolaryzacji związane jest z aktywacją neuronów dopaminergicznych nakrywki brzusznej śródmózgowia, które kontrolują neurony kory przedczołowej. Kanały jonowe K⁺ dokomórkowe prostownicze (GIRK i IRK) i przeciekowe są odpowiedzialne za regulację potencjału błonowego. W niniejszej pracy zbadano właściwości kanałów dokomórkowych prostowniczych i przeciekowych w neuronach piramidowych kory przedczołowej. Wykazano, że kanały jonowe typu GIRK mogą być hamowane po aktywacji receptora dopaminergicznego D₁ w mechanizmie zależnym od kinazy białkowej C, co prowadzi do depolaryzacji błony komórkowej. Sugerujemy, że w opisanym mechanizmie dochodzi do przetrwałej depolaryzacji neuronów piramidowych kory i utrzymywaniem śladu pamięciowego pamięci operacyjnej.

Słowa kluczowe: kora przedczołowa, pamięć operacyjna, receptor dopaminergiczny, kanały jonowe dokomórkowe prostownicze, kanały jonowe K⁺ przeciekowe

Abstract

Prefrontal cortex (PFC) pyramidal neurons serve as a morphological substrate of working memory. Persistent membrane depolarizations called “up-states” and the accompanying persistent activity of the prefrontal cortex pyramidal neurons reflect working memory. Dopamine, the most important PFC modulator, is involved in the working memory process. Voltage independent K⁺ channels, like inward rectifier channels (GIRK and IRK) and leak channels, play a crucial role in determining the resting membrane potential. In the present work, we determined the properties of G-protein inward rectifier channels (GIRK) and leak channels in prefrontal cortex pyramidal neurons and mechanism

of their regulation by dopamine receptors. It was shown that GIRK channels are inhibited during activation dopamine D₁ receptors in a protein kinase C dependent fashion. We conclude that inhibition of GIRK channels during activation of dopamine receptors may lead to “up states” and persistent activity of the prefrontal cortex pyramidal neurons.

Key Words: prefrontal cortex, working memory, dopamine receptor, inward rectifier channels, leak channels

Wstęp

Kora przedczołowa jest morfologicznym substratem pamięci operacyjnej. Utrzymywanie śladu pamięciowego związanego z pamięcią operacyjną wiąże się z występowaniem w neuronach kory przedczołowej stanów przetrwałej depolaryzacji, w czasie których neurony te generują potencjały czynnościowe [1]. Kora przedczołowa otrzymuje liczne wejścia dopaminergiczne z nakrywki brzusznej śródmózgowia. Zarówno nadmiar, jak i niedobór dopaminy (w stanach hiper- i hipodopaminergicznych) w korze przedczołowej prowadzi do zaburzeń funkcjonowania pamięci operacyjnej [2, 3, 4, 5]. Nie zostało dotychczas wyjaśnione, w jakim mechanizmie aktywacja receptorów dopaminergicznych prowadzi do przetrwałej depolaryzacji neuronów piramidowych kory przedczołowej. Potencjał błonowy spoczynkowy zależy głównie od aktywności kanałów jonowych kationowych aktywowanych przez hiperpolaryzację typu I_h (HCN), kanałów jonowych K⁺ dokomórkowych prostowniczych, oraz kanałów jonowych K⁺ przeciekowych [6, 7]. Blokada tych kanałów prowadzi do depolaryzacji, a aktywacja do hiperpolaryzacji błony komórkowej. Wymienione kanały jonowe występują również w błonie komórkowej neuronów piramidowych. Ich funkcja może być modyfikowana przez neuroprzekaźniki, czynniki fizyczne i chemiczne. Celem naszej pracy było zbadanie właściwości oraz regulacji przez receptory dopaminergiczne typu D₁ kanałów jonowych K⁺ typu GIRK (*G-protein activated inward rectifier channels*) oraz kanałów przeciekowych (*leak channels*) w neu-

ronach piramidowych kory przedczołowej szczura. Hamowanie aktywności tych kanałów może potencjalnie prowadzić do, zależnej od dopaminy, przetrwałej aktywności neuronów piramidowych kory przedczołowej.

Materiały i metody

Zbadano prądy jonowe płynące przez pojedyncze kanały jonowe K^+ typu GIRK i kanały jonowe K^+ przeciekowe w neuronach piramidowych wyizolowanych ze skrawków kory przedczołowej szczurów szczepu Wistar w wieku 2-3 tygodni. Doświadczenia przeprowadzane były zgodnie z zasadami etycznymi wymienionymi w odpowiednich przepisach polskich i UE.

Izolacja neuronów piramidowych

Zwierzęta były usypiane wziewnie chlorkiem etylu, a następnie dekapitowane. Mózgowie usuwano i umieszczano na ok. 1 min w płynie preparacyjnym o temperaturze 2-3°C i składzie (mM): sacharoza (200), KCl (2,5), NaH_2PO_4 (1), glukoza (11), $MgSO_4$ (4), HEPES (15), kwas kinureninowy (1), N-nitro-l-arginina (1), glutation (0,1). Płaty czołowe cięte były na skrawki o grubości 400 μm przy użyciu wibratomu. Skrawki przenoszono do komory zawierającej płyn inkubacyjny o następującym składzie (mM): NaCl (126), KCl (2,5), $CaCl_2$ (2) $MgCl_2$ (2) $NaHCO_3$ (26) NaH_2PO_4 (1,5), kwas mlekowy (1), N-nitro-l-arginina (0,1), kwas kinureninowy (1), glukoza (10), kwas askorbinowy (0,2), nasycany 95% O_2 i 5% CO_2 . Przy użyciu binokularu ze skrawków wycinano fragmenty istoty szarej odpowiadające korze przedczołowej, które następnie poddane były trawieniu enzymatycznemu w płynie z dodatkiem proteazy XIV w czasie 18 minut i w temperaturze 32°C. Następnie komórki rozpraszano mechanicznie przy użyciu pipet Pasteura o zmniejszającej się średnicy końcówek w celu uzyskania pojedynczych neuronów. Zawiesina pojedynczych komórek umieszczona była na stoliku mikroskopu odwróconego, w komorze rejestracyjnej, w której neurony omywano sztucznym płynem zewnątrzkomórkowym.

Identyfikacja neuronów

Za neurony piramidowe uznawano komórki o piramidowym ciele i posiadające charakterystyczny apikalny dendryt [8].

Rejestracja prądów jonowych

Prądy jonowe płynące przez pojedyncze kanały jonowe były rejestrowane metodą stabilizacji potencjału w obrębie małego fragmentu błony komórkowej (cell-attached patch-clamp). Rejestracja prądów jonowych odbywała się przy użyciu wzmacniacza Axopatch 1D

i programu komputerowego Clampex 9.0. W trakcie rejestracji rozproszone komórki omywano płynem o następującym składzie (mM): KCl (145), $CaCl_2$ (2), $MgCl_2$ (2), glukoza (15), HEPES-Cl (10), TTX (0,001), $LaCl_3$ (0,003). pH płynu wynosiło 7,4, a osmolarność 330 mOsm/kg H_2O . W takim płynie zewnątrzkomórkowym potencjał błonowy wynosi 0 mV. Płyn wypełniający pipetę zawierał w mM: Kacetate (120), HEPES (10), $MgCl_2$ (2), bloker potencjałozależnych kanałów jonowych Na^+ – TTX (0,001), blokery potencjałozależnych kanałów jonowych K^+ – TEA-Cl (20) i 4-AP (5), bloker kanału kationowego typu I_h – ZD7288 (50 μM) oraz bloker kanałów jonowych Ca^{++} ($LaCl_3$ 3 μM). pH utrzymywano na poziomie 7,4 (z KOH), a osmolarność 320 mOsm/kg H_2O (z sacharozą). Zbadano właściwości kanałów jonowych typu GIRK i kanałów przeciekowych, takie jak zależność napięciowo-prądowa, przewodność, średni czas otwarcia i prawdopodobieństwo otwarcia pojedynczego kanału jonowego. W celu analizy zależności napięciowo-prądowej prąd płynący przez pojedyncze kanały jonowe rejestrowano przy różnych wartościach potencjału błonowego łatki w zakresie od -100 do +75 mV. Przewodność pojedynczego kanału obliczona była na podstawie nachylenia prostej dopasowanej do wykresu krzywej zależności napięciowo-prądowej, zgodnie z równaniem $Q=I/V$, gdzie Q – przewodność, I – maksymalna amplituda prądu płynącego przez kanał jonowy, V – potencjał błonowy. Prawdopodobieństwo otwarcia wyrażone zostało jako stosunek czasu, w którym kanały jonowe pozostają otwarte do całkowitego czasu rejestracji zgodnie z wzorem: $NPo=t_{open}/t_{total}$ gdzie t_{open} oznacza całkowity czas otwarcia kanału, a t_{total} całkowity czas rejestracji.

W celu zbadania wpływu substancji farmakologicznie czynnych na badane kanały jonowe, prąd płynący przez pojedyncze kanały jonowe rejestrowano w warunkach kontrolnych, w trakcie omywania badanej komórki płynem z dodatkiem substancji farmakologicznie czynnej oraz po wypłukaniu substancji z środowiska zewnątrzkomórkowego. Substancje farmakologicznie czynne dostarczane były przez pipetę znajdującą się w pobliżu badanej komórki.

Wyniki

Zbadano właściwości kanałów jonowych K^+ w 131 łatkach w 131 neuronach piramidowych kory przedczołowej.

Kanały jonowe dokomórkowe prostownicze typu GIRK

W 60 łatkach (45,8%) występowały kanały jonowe, których właściwości kinetyczne i farmakologiczne odpowiadały kanałom typu GIRK. Kanały te charakteryzowały się niską aktywnością podstawową ($NPo \sim 2, 5 \cdot 10^{-3}$, $n=60$) i średnim czasem

Dyskusja

otwarcia $0,53 \pm 0,05$ ms. Ich przewodność wynosiła $30,89 \pm 0,85$ pS, $29,90 \pm 1,60$ pS, $28,56 \pm 1,60$ pS and $29,43 \pm 2,77$ pS dla potencjałów błonowych łatki 100, -75, -50 i -25 mV (Rycina 1A). Przy wartości potencjału +50 mV przewodność wynosiła $2,03 \pm 0,71$ pS. Kanały te były blokowane przez tertiapinę (selektywny blocker kanałów typu GIRK) podaną do płynu wypełniającego pipetę ($NPo = 0,94 \cdot 10^{-3} \pm 0,26 \cdot 10^{-3}$, $n=11$) i aktywowane przez baklofen ($NPo = 20,7 \cdot 10^{-3} \pm 1,8 \cdot 10^{-3}$, $n=7$). Podanie selektywnego agonisty receptora D_1 (SKF 383939, lub SKF 98959, 10 μ M) do płynu zewnątrzkomórkowego powodowało istotną statystycznie odwracalną redukcję prawdopodobieństwa otwarcia kanałów jonowych typu GIRK (Rycina 1B). NPo wynosiło odpowiednio w warunkach kontrolnych, w trakcie podawania agonisty receptora D_1 i po 5 minutach po wypłukaniu agonisty: $3,1 \cdot 10^{-3} \pm 0,9 \cdot 10^{-3}$, $1,9 \cdot 10^{-3} \pm 0,4$ i $3,3 \cdot 10^{-3} \pm 0,9 \cdot 10^{-3}$ ($Fr=13$, 636, $p=0$, 0004, $n=25$). Obserwowany efekt hamowania aktywności kanałów jonowych typu GIRK był znoszony wówczas, gdy podanie agonisty receptora D_1 poprzedzone było preinkubacją neuronów z inhibitorami kinazy białkowej C (calphostin C lub chelerythrine chloride) (Rycina 1C).

Kanały jonowe dokomórkowe prostownicze typu IRK

W 7 łatkach (5,6%) stwierdzono obecność kanałów dokomórkowych prostowniczych, które posiadały odmienne właściwości kinetyczne niż kanały typu GIRK. Kanały te charakteryzowały się przewodnością w zakresie od 55 do 72 pS, czasem otwarcia od 1,1 do 1,5 ms i dużym prawdopodobieństwem otwarcia wynoszącym od $50 \cdot 10^{-3}$ do $80 \cdot 10^{-3}$ (Rycina 2C).

Kanały jonowe K^+ przeciekowe

W 64 łatkach (48,8%) stwierdzono obecność kanałów jonowych K^+ przeciekowych. Kanały zaliczone do grupy przeciekowych nie posiadały właściwości prostowniczych i wykazywały heterogenność pod względem przewodności, czasów otwarcia i prawdopodobieństwa otwarcia. Spośród kilku podtypów kanałów jonowych przeciekowych, obserwowanych podczas doświadczeń, wstępnie wyróżniono dwie grupy.

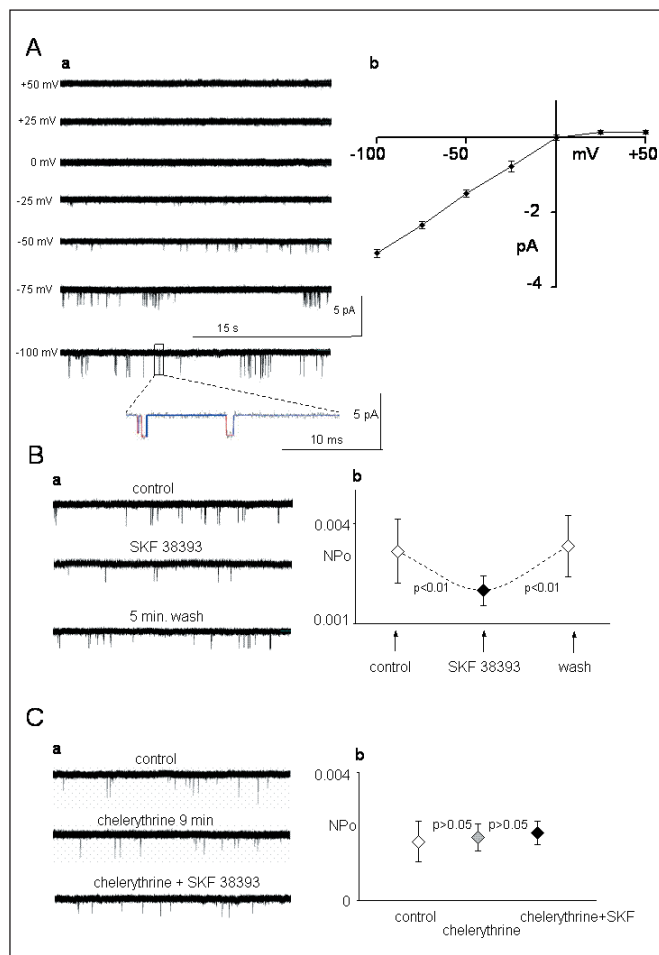
1) Kanały jonowe przeciekowe o krótkim czasie otwarcia i dużej przewodności (47 łatek). Średni czas otwarcia tych kanałów jonowych wynosił $0,34 \pm 0,06$ ms, przewodność $51,2 \pm 4,3$ pS a prawdopodobieństwo otwarcia $NPo = 9 \cdot 10^{-3} \pm 0,3 \cdot 10^{-3}$ (Rycina 2A).

2) Kanały jonowe przeciekowe o mniejszej przewodności ($39,0 \pm 0,76$ pS), ale o bardzo wysokim prawdopodobieństwie otwarcia ($NPo = 0,7 \pm 0,03$) i dłuższym średnim czasie otwarcia ($1,1 \pm 0,35$ ms, 17 łatek) (Rycina 2B).

Badania immunocytochemiczne wykazały obecność w neuronach kory nowej dwóch typów kanałów jonowych dokomórkowych prostowniczych Kir 2.0 (kanały typu IRK) oraz Kir 3.0 (kanały typu GIRK) oraz kilku podtypów kanałów jonowych przeciekowych [9, 10, 6]. Kanały jonowe typu GIRK odznaczały się właściwościami dokomórkowymi prostowniczymi, typową dla kanałów typu GIRK przewodnością i czasem otwarcia. Kanały te charakteryzowały się niską aktywnością podstawową, która ulegała znacznemu wzrostowi po aktywacji związanego z białkiem G receptora GABA typu B (baklofen). Dane literaturowe wskazują, że kanały jonowe typu GIRK mogą być modyfikowane przez receptory metabotropowe w sposób bezpośredni – w mechanizmie związanym z błoną za pośrednictwem podjednostki β białka G [11] oraz za pośrednictwem wtórnych przekazników cytoplazmatycznych. W transdukcji sygnału od receptora do kanału jonowego typu GIRK bierze udział fosfolipaza C, DAG, IP_3 i kinaza białkowa C. Znane są także miejsca fosforylacji cząsteczki kanału jonowego typu GIRK przez kinazę białkową typu C [12, 13, 14]. W badanych w niniejszej pracy komórkach aktywacja receptora dopaminergicznego typu D_1 prowadziła do odwracalnego hamowania aktywności kanałów jonowych K^+ typu GIRK. W procesie tym najprawdopodobniej zaangażowana była kinaza białkowa typu C, ponieważ inkubacja komórek ze specyficznymi blokerami kinazy białkowej typu C (chelerythrine chloride i calphostin C) usuwała zależne od aktywacji receptora D_1 hamowanie kanału jonowego typu GIRK. Wynik ten wskazuje, że hamowanie kanałów jonowych typu GIRK może być fizjologicznym podłożem zależnej od dopaminy długotrwałej depolaryzacji neuronów piramidowych kory przedczołowej. W rejestracjach wykonanych z 64 łatek obserwowano aktywność kanałów jonowych K^+ klasyfikowanych jako kanały przeciekowe. Badania immunohistochemiczne wykazują obecność w neuronach kory nowej, w tym kory przedczołowej, co najmniej 4 podtypów kanałów przeciekowych: TWIK-1, TREK-1, TASK-3 i TRAAK [6]. Dane literaturowe wskazują, że także te kanały mogą być modyfikowane przez receptory metabotropowe w mechanizmie zależnym od wtórnych przekazników cytoplazmatycznych. Stwierdzono między innymi hamowanie tych kanałów przez serotoninę, noradrenalinę, acetylocholinę, substancję P i TRH w różnych typach neuronów w mechanizmie zależnym od kinazy białkowej A, fosfolipazy C i kinazy białkowej C [6, 15, 16].

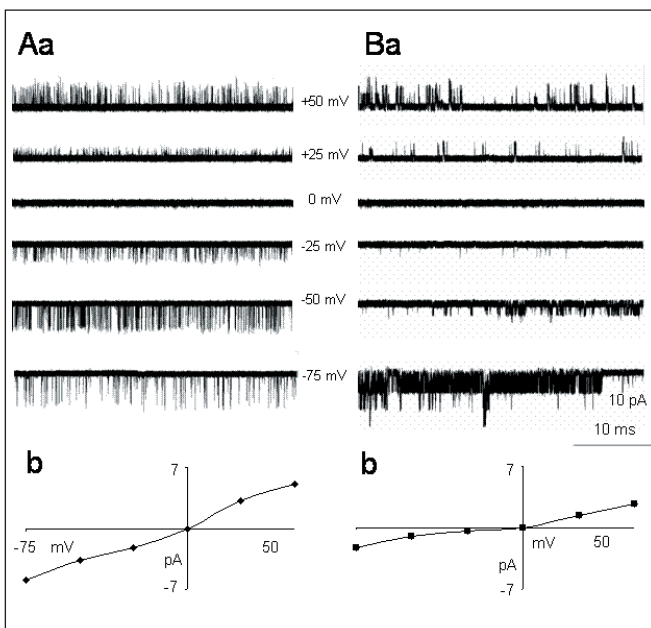
Podziękowania

Praca sfinansowana z budżetu projektu No KBN/0575/Pp05/2005/28 i WUM FW5/N/2007.



Rycina 1. A. Rejestracja prądów płynących przez kanały jonowe typu GIRK przy różnych wartościach potencjału błonowego (a, po lewej). Fragment zapisu z wydłużoną podstawą czasu uwidacznia przepływ prądu przez pojedynczy kanał jonowy. b. Zależność napięciowo-prądowa badanego kanału jonowego. B. Wpływ agonisty receptora D_1 (SK 38393) na prawdopodobieństwo otwarcia kanałów jonowych typu GIRK. a. Rejestracje prądów wynikających z otwarcia pojedynczych kanałów jonowych typu GIRK w warunkach kontrolnych, w trakcie podawania selektywnego agonisty receptora D_1 (SK 38393) i po wypłukaniu agonisty. b. Średnie prawdopodobieństwo otwarcia kanałów jonowych typu GIRK w warunkach kontrolnych, w trakcie podawania SKF 38393 i po wypłukaniu agonisty. C. Wpływ selektywnego inhibitora kinazy białkowej C – chelerytryny na prawdopodobieństwo otwarcia kanałów jonowych typu GIRK. a. Rejestracje prądów wynikających z otwarcia pojedynczych kanałów jonowych typu GIRK w warunkach kontrolnych, w trakcie podawania selektywnego inhibitora kinazy białkowej C – chelerytryny

oraz w trakcie podawania chelerytryny i SKF 38393. b. Średnie prawdopodobieństwo otwarcia kanałów jonowych typu GIRK w warunkach kontrolnych, w trakcie podawania chelerytryny i w trakcie podawania chelerytryny z SKF 38393.



Rycina 2. Przykłady rejestracji aktywności kanałów jonowych K^+ niezależnych od potencjału. A. Kanał jonowy przeciekowy o krótkim średnim czasie otwarcia i wysokiej aktywności. a. Rejestracje prądów wynikających z otwarcia pojedynczych kanałów jonowych. b. Zależność napięciowo-prądowa zarejestrowanego kanału jonowego. B. Kanał jonowy przeciekowy o długim czasie otwarcia. a. Rejestracje prądów wynikających z otwarcia pojedynczych kanałów jonowych typu GIRK b. Zależność napięciowo-prądowa zarejestrowanego kanału jonowego. C. Kanał jonowy K^+ o właściwościach dokomórkowych prostowniczych, o dłuższym czasie otwarcia i większej aktywności niż kanał jonowy typu GIRK.

Piśmiennictwo

1. O'Donnell, (2003) Dopamine gating of forebrain neural ensembles. *Eur J Neurosci*, 17: 429-435.

2. Castner AS & Goldman-Rakic P (2004) Enhancement of Working Memory in Aged Monkeys by a Sensitizing Regimen of Dopamine D₁ Receptor Stimulation. *J. Neurosci.*, 24, 1446.
3. Durstewitz D, Seamans, JK & Sejnowski TJ (2000) Dopamine-mediated stabilization of delay-period activity in a network model of prefrontal cortex. *J. Neurophysiol.*, 83, 1733-1750.
4. Goldman-Rakic P, Murphy B, Arnsten A & Roth, R. (1996) Increased dopamine turnover in the prefrontal cortex impairs spatial working memory. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93, 1325-1329.
5. Williams GV & Castner SA (2006) Under the curve: critical issues for elucidating D1 receptor function in working memory. *Neuroscience* 139, 263-276.
6. Talley E, Solórzano G, Lei Q, Kim D, Bayliss D (2001) CNS distribution of members of the two-pore-domain (KCNK) potassium channel family. *J Neurosci*, 21: 7491-7505.
7. Chen X, Johnston D (2005) Constitutively active G-protein-gated inwardly rectifying K⁺ channels in dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci*, 25: 3787-3792.
8. Witkowski G, Szulczyk P (2006) Opioid mu receptor activation inhibits sodium currents in prefrontal cortical neurons via a protein kinase A- and C-dependent mechanism. *Brain Res*, 1094 (1): 92-106.
9. Lüscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA (1997) G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron*, 19: 687-695.
10. Dascal N (1997) Signalling via the G protein activated K⁺ channels. *Cell Signal*, 9: 551-73.
11. Logothetis DE, Kurachi Y, Galper J, Neer EJ, Clapham DE (1987) The beta gamma subunits of GTP-binding proteins activate the muscarinic K⁺ channel in heart. *Nature* 325: 321-326.
12. Leaney JL, Dekker LV, Tinker A (2001) Regulation of G protein gated inward rectifying K⁺ channel by Ca²⁺ independent protein kinase. *J Physiol*. 534: 367-379.
13. Mao J, Wang X, Chen F, Wang R, Rojas A, Shi Y, Piao H, Jiang C (2004) Molecular basis for the inhibition of G-protein coupled inward rectifier K⁺ channels by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci*, 101: 1087-1092.
14. Nikolov EN, Ivanova-Nikolova TT (2004) Coordination of Membrane Excitability through a GIRK1 Signaling Complex in the Atria. *J Biol Chem*, 279: 23630-23636.
15. Perez M, White F and Xiu-Ti Hu (2006) Dopamine D2 Receptor Modulation of K_v Channel Activity Regulates Excitability of Nucleus Accumbens Neurons at Different Membrane Potentials. *J. Neurophysiol* 96: 2217.
16. Rekling JC, Funk GD, Bayliss DA, Dong XW, Feldman JL (2000). Synaptic control of motoneuronal excitability. *Physiol Rev* 80: 399-410.

Adres korespondencyjny:

Grzegorz Witkowski,
Zakład Fizjologii Człowieka WUM,
ul. Krakowskie Przedmieście 26/28, Warszawa,
tel: 022 826 42 75,
e-mail: 1978greg@wp.pl;
grzegorz.witkowski@wum.edu.pl

Długotrwała ekspozycja na erytropoetynę lub estradiol moduluje kinetykę GABAergicznych prądów synaptycznych

Long-term treatment with estradiol or erythropoietin modulates the kinetics of GABAergic synaptic currents

Tomasz Wójtowicz, Katarzyna Lebeda, Jerzy W. Mozrzymas

Samodzielna Pracownia Biofizyki Układu Nerwowego, Akademia Medyczna, Wrocław

Streszczenie

Odkrycie syntezy estradiolu i erytropoetyny w mózgu dało nowe spojrzenie na wpływ tych powszechnych modulatorów na komórki nerwowe. W szczególności obecność endogennej mózgo-

puli tych związków implikuje ich prawdopodobną rolę w funkcjonowaniu układu nerwowego. Dotychczasowe badania skupiały się na wpływie tych związków na dojrzały układ nerwowy. Ponieważ jednak estradiol i erytropoetyna oddziałują na układ nerwowy długoterminowo, a system

GABAergiczny przechodzi największe zmiany wraz z wiekiem, powstaje pytanie, czy związki te nie modulują pracy sieci nerwowej rozwijającego się mózgu. Dotychczas zagadnienie to nie zostało poznane i w tym celu w niniejszej pracy zbadano, czy długoterminowa ekspozycja na estradiol lub erytropoetynę ma wpływ na hamującą GABAergiczną transmisję synaptyczną w rozwijającym się mózgu. Prezentowane wyniki wskazują, że estradiol i erytropoetyna mogą być modulatorami GABAergicznej transmisji synaptycznej w tym okresie. W szczególności, uzyskane wyniki pozwalają wnioskować, że przechodząca głębokie przemiany z wiekiem GABAergiczna transmisja synaptyczna jest szczególnie podatna na modulację w początkowej fazie rozwoju. Najsilniejszy wpływ obu badanych związków dotyczył okresu, kiedy kinetyka GABAergicznych prądów synaptycznych wykazuje fenotyp niedojrzały (niska częstotliwość, wolna kinetyka).

Słowa kluczowe: receptory GABAA, 17 β -estradiol, erytropoetyna, patch-clamp, mIPSC

Abstract

The discovery of estradiol and erythropoietin synthesis in the brain gave a new perspective on the influence of those common modulators on neurons. In particular, the presence of an endogenous brain pool of those biochemicals supports their possible role in the functioning of the nervous system. To date, most of the research has been carried out in the nervous system of adult animals. However, both estradiol and erythropoietin interact with neurons in a long-term fashion. Since the GABAergic system undergoes profound changes during brain development, it is interesting to examine whether these compounds may affect such transmission during this unusual time period. This interesting issue has not been studied so far. For this purpose, we investigated whether long-term exposure to estradiol or erythropoietin affected GABAergic transmission in the developing brain. Our results clearly show that both compounds may be modulators of GABAergic transmission. In particular, we show that GABAergic transmission is susceptible to modulation at an early period of development when the GABAergic phenotype is immature (low frequency and slow kinetics of mIPSCs).

Key Words: GABAA receptors, 17 β -estradiol, erythropoietin, patch-clamp, mIPSC

Wstęp

Estrogeny to steroidowa grupa pochodnych cholesterolu, które łatwo dyfundują przez błonę i mogą być akumulowane w komórkach organizmu. Najpowszechniejszym hormonem z grupy estrogenów jest estradiol. Do niedawna uważano, że hormon ten tworzony w gonadach i krążący we krwi osiąga ośrodkowy układ nerwowy dopiero po przekroczeniu bariery krew-mózg. Odkrycie aromatazy, enzymu syntezującego estradiol, w neuronach [1], pozwoliło zidentyfikować mózgową, endogenną pulę tego hormonu, której rola w funkcjonowaniu sieci nerwowej jest dotychczas niepoznana. Wysokie stężenia estradiolu w mózgu i obecność receptorów estrogenowych w większości struktur mózgu wskazują na możliwość bezpośredniego oddziaływania estradiolu na funkcjonowanie neuronów.

Erytropoetyna (Epo) jest krwiopochodnym czynnikiem wzrostu i cytokiną, stymulującą erytropoezę [2]. Poza rolę w procesie różnicowania erytrocytów, jest zaangażowana w rozwój, ochronę i naprawę układu nerwowego. W szczególności Epo pojawia się w zagadnieniu neuroprotekcji. Podobnie jak estradiol, Epo może być syntezowana lokalnie w mózgu i oddziaływać na tkankę nerwową poprzez odpowiednie receptory (EpoR). Co więcej, poziom ekspresji Epo i EpoR wzrasta w okresie rozwoju mózgu, wskazując na jej potencjalną rolę w tym złożonym procesie [2].

W dorosłym mózgu kwas γ -aminomasłowy (GABA) aktywuje jonotropowy receptor GABAA, przepuszczalny dla jonów Cl⁻ i HCO₃⁻. W trakcie rozwoju mózgu, układ GABAergiczny, który odgrywa rolę hamującą, przechodzi głębokie zmiany, zaś stężenie estradiolu we krwi zmienia się. Istnieją doniesienia, że estradiol może być zaangażowany zarówno w procesy synaptogenezy i plastyczności synaptycznej [3], jak i, poprzez wpływ na ekspresję enzymu kluczowego dla syntezy GABA (dekarboksylazy kwasu glutaminowego, GAD), wpływać na pulę dostępnego GABA [4]. Co więcej, ostatnie doniesienia wskazują na bezpośrednie oddziaływanie estradiolu z komórkami nerwowymi w ciągu minut [5]. Estradiol jest jednak obecny przez cały czas i poza efektem bezpośrednim może w sposób długofalowy oddziaływać na układ nerwowy. Dotychczas wszystkie badania wykonywane były na zwierzętach dorosłych. Z kolei największe zmiany w układzie GABAergicznym zachodzą we wczesnych fazach rozwoju. Z tego powodu w niniejszej pracy zbadano, czy najpowszechniejsza forma estradiolu, 17 β -estradiol, wpływa na GABAergiczną transmisję synaptyczną w rozwijającym się mózgu w okresie

krytycznym dla formowania systemu GABAergicznego. Ponieważ wpływ Epo na transdukcję synaptyczną jest słabo poznany w niniejszej pracy postanowiono sprawdzić, czy Epo ma wpływ na transmisję GABAergiczną synaptyczną w modelu rozwijającej się sieci neuronalnej.

Materiały i metody

Model badań 17 β -estradiolu

W celu zbadania długoterminowego wpływu 17 β -estradiolu na GABAergiczną transmisję synaptyczną w rozwijającym się mózgu wykorzystano trzydniowe szczury rasy Wistar, które w obrębie miotu dzielono na dwie grupy. Grupa kontrolna otrzymywała dootrzewnowe zastrzyki roztworu soli fizjologicznej, grupa zaś badana 17 β -estradiol w stężeniu 900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ masy ciała w tym samym roztworze codziennie przez cały okres trwania badań. Stosowanie takiego reżimu farmakologicznego podnosi kilkakrotnie stężenie estradiolu we krwi (niepublikowane obserwacje własne). Następnie dokonywano pomiarów elektrofizjologicznych w skrawkach mózgowych zwierząt w trzech grupach wiekowych: 9-13 dni po urodzeniu (P9-13), 14-21 oraz powyżej 22 (P22+). Grupy wiekowe ustalono arbitralnie w oparciu o wiedzę literaturową w zakresie rozwojowych zmian systemu GABAergicznego, takich jak kinetyka prądów GABAergicznych i poziom ekspresji synaptycznych podjednostek receptora GABAA.

Pomiary elektrofizjologiczne dokonywane były w skrawkach mózgowych badanych zwierząt. Po dekapitacji, mózg zanurzano w lodowatym (2°C) roztworze o następującym składzie (w mM): 87 NaCl, 25 NaHCO₃, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 0,5 CaCl₂, 7 MgCl₂, 75 sacharozy, 25 glukozy, pH 7,4. Skrawki mózgowe o grubości 400 μm inkubowano w komorze zawierającej sztuczny płyn mózgowo rdzeniowy (ACSF) o następującym składzie (w mM): 125 NaCl, 25 NaHCO₃, 2,5 KCl, 1,25 NaH₂PO₄, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 25 glukozy, pH 7,4. Wszystkie roztwory w sposób ciągły natleniane były mieszaniną 95% CO₂ i 5% O₂. W warunkach symetrycznego rozkładu jonów Cl⁻, dokonywano pomiarów w komórkach piramidalnych struktury CA1 hipokampa, bogatej w synapsy GABAergiczne. Mikropipetę szklaną, wypełnioną roztworem (w mM): 140 KCl, 1 MgCl₂, 0,5 EGTA, 10 HEPES, 4 MgATP, pH=7, 3, o oporności 3-4, 5 M Ω wykorzystano do pomiarów w konfiguracji *whole-cell voltage-clamp* przy ustalonym napięciu (-70 mV). Komórki rozróżniano wizualnie w *stratum pyramidale* formacji hipokampa oraz badając wzorzec wyładowań w odpowiedzi na impuls depolaryzujący.

Model badań Epo

Aby zbadać wpływ Epo na rozwijającą się sieć neuronalną, wykorzystano hipokampalną hodowlę neuronalną *in vitro*, wykonaną jak opisano w [6]. Hodowle komórkowe podzielono arbitralnie na trzy grupy wiekowe: 6-8, 9-11 i 12+ dni *in vitro* (DIV). W wybranym okresie system GABAergiczny inkubowanych *in vitro* komórek nerwowych przechodził zmiany podobne do tych obecnych *in vivo* [7]. W tak skonstruowanym modelu rozwijającego się układu GABAergicznego zbadano wpływ Epo (20 U/ml) obecnej w medium hodowlanym przez 48 h i 72 h przed pomiarami elektrofizjologicznymi. Do badań użyto roztworów opisanych w [7].

Pomiary elektrofizjologiczne

W trakcie wszystkich pomiarów kontrolę środowiska zewnątrzkomórkowego zapewniono poprzez system perfuzji zakończony szklaną pipetą o przekroju 0,5 mm, umieszczoną w okolicy badanej komórki nerwowej. Badania transmisji synaptycznej GABAergicznej dokonywano poprzez analizę GABAergicznych prądów synaptycznych oraz tonicznych. Prądy synaptyczne izolowano farmakologicznie poprzez podanie do środowiska zewnątrzkomórkowego tetrodotoksyny (1 μM), DNQX (20 μM) i CGP (1 μM). Pomiarów prądu tonicznego generowanego przez pozasynaptyczną pulę receptorów GABAA dokonano po farmakologicznej izolacji wybranych kanałów jonowych. Prądy glutaminanergiczne oraz pochodzące z metabotropowych receptorów GABAB zablokowano poprzez zastosowanie odpowiednio DNQX (20 μM) i CGP (1 μM). Potencjały czynnościowe blokowano poprzez podanie do środowiska zewnątrzkomórkowego tetrodotoksyny (1 μM), następnie zaś blokowano synaptyczne receptory GABAA poprzez zastosowanie gabazyny w stężeniu 0,5 μM . Ostatecznie, po zastosowaniu powyższych czynników, stosowano nasycającą dawkę niekompetycyjnego i nieselektywnego dla różnych podtypów receptora GABAA blokera tychże receptorów – pikrotoksyny, w stężeniu 100 μM . Zmiana położenia linii bazowej jest proporcjonalna do przewodnictwa receptorów GABAA, które w danej chwili były aktywne. Miarą amplitudy prądu tonicznego generowanego przez pozasynaptyczne receptory GABAA są różnice położenia średniej linii bazowej w warunkach podawania GBZ i PTX. Wartości zmierzonego prądu tonicznego przedstawiono z uwzględnieniem pojemności błony badanej komórki nerwowej i przedstawiono w jednostkach arbitralnych. Sygnały po wzmocnieniu wzmacniaczem typu MultiClamp 700B rejestrowano przy użyciu karty akwizycyjnej (Axon Instruments Digidata 1322) współpracującej

z komputerem PC i analizowano przy użyciu dedykowanego oprogramowania pClamp 9.2 (Axon Instruments).

Wyniki

Elektrofizjologiczna charakterystyka miniaturowych hamujących prądów synaptycznych (mIPSCs)

Miniaturowe hamujące GABAergiczne prądy synaptyczne (mIPSCs) powstają w wyniku spontanicznej egzocytozy pęcherzyków synaptycznych zawierających kwas γ -aminomasłowy (GABA) do przestrzeni synaptycznej i aktywacji receptorów GABAA w błonie postsynaptycznej. Ze względu na fakt, iż posiadają wszystkie cechy typowego prądu synaptycznego, są powszechnie stosowanym modelem badań transmisji synaptycznej. W zakresie badań estradiolu w niniejszej pracy dokonano analizy porównawczej mIPSCs rejestrowanych w skrawkach mózgowych zwierząt kontrolnych i badanych w wieku 9-45 dni po urodzeniu w warunkach symetrycznego rozkładu jonów Cl^- . Jedną z cech rozwojowych układu GABAergicznego jest wzrost częstotliwości prądów synaptycznych wraz z wiekiem [8]. Taką zależność obserwowano w badanych grupach wiekowych (Rycina 1A). Mianowicie w warunkach kontrolnych częstotliwość mIPSCs w grupie 9-13 wyniosła $0,14 \pm 0,02$ Hz ($n=28$) i zwiększyła się czterokrotnie z wiekiem. W obecności podwyższonego stężenia 17β -estradiolu w najmłodszej grupie zwierząt (P9-13) zaobserwowano wzrost częstotliwości mIPSCs o około 60% (Rycina 1A). Bez względu na amplitudę mIPSCs rejestrowana w komórkach piramidalnych wyniosła w grupie P9-13 średnio $34 \pm 2,23$ pA ($n=27$) i wraz z wiekiem rosła (Rycina 1B). W grupach badanych P9-13 i P14-21 amplituda mIPSCs była większa o odpowiednio 22% i 18% względem grupy kontrolnej (Rycina 1B).

Analizę kinetyczną mIPSCs wykonano na uśrednionych przebiegach zarejestrowanych mIPSCs. Jednym z parametrów charakteryzujących mIPSCs jest czas narastania prądu, mierzony jako czas potrzebny do zmiany wartości natężenia prądu w zakresie 10-90% amplitudy mIPSC (10%-90% *rise-time*). Analiza czasu narastania wykazała istotne zmiany charakteru prądów synaptycznych z wiekiem. Mianowicie w grupie P9-13 maksymalna amplituda mIPSCs osiągnięta jest znacznie później niż w innych grupach wiekowych (Rycina 2A). Uważa się, że jest to jedna z cech „niedojrzałego” układu GABAergicznego. W grupie badanej zaobserwowano istotne 23% przyspieszenie czasu narastania mIPSCs względem grupy kontrolnej (Rycina 2A).

Po wydzieleniu agonisty (co jest procesem nie-

zwykle szybkim) czas przebywania GABA w synapsie jest bardzo krótki – około 100 μs [9]. Czas zaniku mIPSC jest znacznie dłuższy, co wskazuje na to, iż ta faza przebiegu mIPSC ściśle zależy od kinetyki receptorów postsynaptycznych. Kinetyka deaktywacji prądu synaptycznego ma charakter eksponencjalny i można ją opisać średnią stałą czasową deaktywacji. Analiza tego parametru wykazała, że prądy mIPSCs rejestrowane w komórkach piramidalnych w wieku P9-13 w grupie kontrolnej deaktywują w czasie $33,58 \pm 0,91$ ms ($n=28$). Wraz z wiekiem średni czas deaktywacji ulegał skróceniu, co jest znanym markerem zmian rozwojowych systemu GABAergicznego i wynika między innymi ze wzrostu udziału podjednostki $\alpha 1$ w postsynaptycznych receptorach GABAA (Rycina 2B) [8]. W grupie badanej zaobserwowano przyspieszenie stałej czasowej w grupie P9-13 o około 14%.

Badania wpływu Epo na układ GABAergiczny dokonano w modelu rozwijającej się hipokampalnej hodowli neuronalnej *in vitro*. Aby zbadać, czy Epo zmienia charakterystykę systemu GABAergicznego z wiekiem, dokonano analizy porównawczej najważniejszych parametrów mIPSCs rejestrowanych w hodowli kontrolnej i eksponowanej przez 48 h i 72 h przed pomiarami na Epo. Analiza mIPSCs w w/w hodowlach komórkowych *in vitro* pokazuje, że Epo w rozważanym modelu nie wpływa znacząco na częstotliwość czy amplitudę mIPSCs w badanych grupach wiekowych (6-8, 9-11 i 12+ DIV, dane nie pokazane). Analiza kinetyki mIPSCs wskazuje zaś, że ekspozycja na Epo powoduje skrócenie stałej czasowej deaktywacji mIPSCs. Efekt ten jest najsilniejszy w grupie 6-8 DIV (średnio około 20%) i maleje wraz z wiekiem (Rycina 3).

Elektrofizjologiczna charakterystyka prądu tonicznego w skrawkach mózgowych

Wiadomo, że przewodnictwo stacjonarne chlorkowe w dorosłym mózgu jest silnym regulatorem pobudliwości i im większe to przewodnictwo, tym większa inhibicja w sieci neuronalnej (mniejsze prawdopodobieństwo wywołania potencjałów czynnościowych). Obecnie uważa się, że prądy fazowe synaptyczne, choć liczne, niosą relatywnie mniej ładunku przez błonę. O stacjonarnym przewodnictwie chlorkowym zaś decyduje prąd toniczny, który może ulegać modulacji poprzez czynniki modulatorowe (np. hormony, stężenie GABA w płynach zewnątrzkomórkowych) i który odgrywa kluczową rolę w funkcjonowaniu hamowania w mózgu [10]. Powstaje on w wyniku aktywacji głównie pozasynaptycznych receptorów GABAA przez agonistę docierającego z synapsy (GABA osiąga stężenie około tysiąckrotnie mniejsze niż w synapsie). Aktywacja receptorów po-

zasynaptycznych przy tak niskich stężeniach agonisty jest możliwa, gdyż posiadają one inny niż w synapsie skład podjednostkowy, zapewniający im wyższe powinowactwo do agonisty.

Przykład rejestracji prądu tonicznego przedstawiony został na Rycinie 4A. Analiza prądu tonicznego generowanego przez pozasynaptyczne receptory GABAA w odpowiedzi na endogenne GABA zmienia się wraz z wiekiem, przy czym największa amplituda prądu tonicznego obserwowana jest u młodych zwierząt P9-13 i ulega zmniejszeniu wraz z wiekiem (Rycina 4B). W grupie badanej P9-13 rejestrowano prąd toniczny o amplitudzie średnio 60% większej niż w grupie kontrolnej. W pozostałych grupach wiekowych nie obserwowano zmian (Rycina 4B).

Dyskusja

Zaprezentowane wyniki wskazują, że w rozważanych modelach doświadczalnych estradiol i erythropoetyna mogą oddziaływać na układ GABAergiczny w trakcie jego formowania, przy czym ze względu na różnice w modelach wyniki przedyskutowane zostaną rozdzielnie.

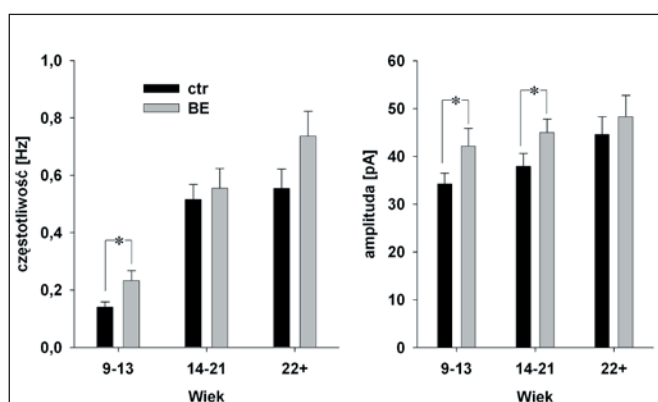
Działanie estradiolu jest ściśle związane z wiekiem badanych zwierząt, a zatem i ze stadium rozwoju systemu GABAergicznego. Jak pokazano na Rycinach 1 i 2, parametry transmisji synaptycznej GABAergicznej ulegają zmianie progresywnie z wiekiem, zgodnie z danymi literaturowymi [8]. Uzasadnia to wybór okien czasowych (wieku zwierząt) do badań. Największe zmiany wywołane obecnością podwyższonego stężenia hormonu widoczne są w najmłodszej grupie zwierząt (P9-13), w okresie, kiedy układ GABAergiczny jest daleki od fenotypu dojrzałego (niska częstotliwość i powolna kinetyka mIPSCs, Rycina 1 i 2). Fakt zmiany częstotliwości mIPSCs w grupie badanej P9-13 (Rycina 1A) może świadczyć o zmianie presynaptycznej, związanej prawdopodobnie z modyfikacją egzocytozy pęcherzyków synaptycznych, nie możemy jednak wykluczyć zwiększenia liczby synaps. Zwiększenie amplitudy mIPSCs w grupie badanej P9-13 może potwierdzać, że warunki panujące w synapsie w stosunku do grupy kontrolnej uległy zmianie (Rycina 1B). Zmiana amplitudy może również wynikać ze zmiany ilości aktywowanych przez porcję agonisty receptorów GABAA. Niewykluczone więc, że obecność podwyższonego stężenia estradiolu ma wpływ na część postsynaptyczną. Potwierdza to analiza kinetyczna mIPSCs w grupie badanej. Przyspieszenie kinetyki mIPSCs w grupie P9-13 w zakresie zarówno czasu narastania, jak i deaktywacji może świadczyć o zmianach w zakresie na

przykład składu podjednostkowego (Rycina 2). Warto podkreślić, że powyższe badania dotyczą długoterminowego wpływu estradiolu i zarówno scenariusz wpływu na strukturę synaptyczną, jak i ekspresję receptorów GABAA jest możliwy. Co więcej, zarówno badania prowadzone w naszym laboratorium [7], jak i analizy innych autorów wskazują, że zmiana ekspresji kluczowych dla transmisji synaptycznej podjednostek receptora GABAA w rejonie hipokampa nie jest oczywista i nie jest zapewne jedynym, jeżeli w ogóle, mechanizmem prowadzącym do obserwowanych zmian. Istotną obserwacją jest fakt, że zmiany wywołane obecnością estradiolu w grupie P9-13 są głębokie i sięgają poza synapsę. Zarejestrowano bowiem zmienioną amplitudę prądu tonicznego, generowanego przez pozasynaptyczne receptory GABAA (Rycina 4B). Ponieważ pojemność błony, która jest wprost proporcjonalna do powierzchni błony nie uległa zmianie (dane niepokazane), należy sądzić, że i w tym rejonie komórki piramidальной następują w wieku P9-13 zmiany na poziomie receptorów i/lub stężenia GABA.

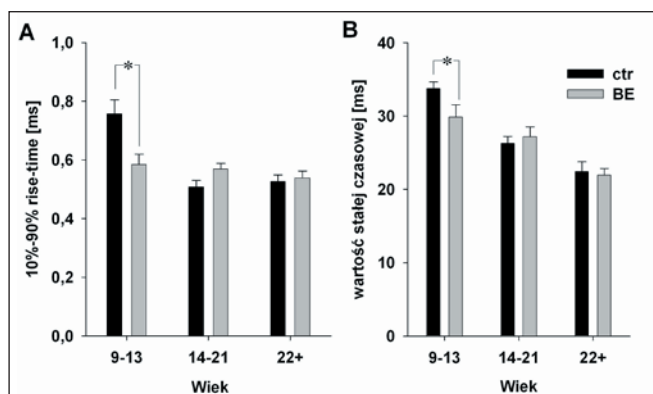
Warto podkreślić, że badania natywnych i rekombinowanych receptorów GABAA z zastosowaniem techniki ultraszybkiej perfuzji wskazują, że dynamiczne warunki, w jakich aktywowane są receptory GABAA w synapsie, są kluczowe dla działania agonistów receptora GABAA, takich jak leki z grupy benzodiazepin [11]. Badania z zastosowaniem tych leków pozwoliły pokazać, że ze względu na dynamiczne warunki panujące w synapsie, charakter prądów GABAergicznych jest nie tylko zależny od stężenia GABA, lecz także od czasu ekspozycji na agonistę [11]. Dlatego zmiana w strukturze synapsy może mieć również udział w generowaniu mierzalnych zmian w układzie GABAergicznym. Można sobie wyobrazić, że zwiększenie powierzchni egzocytozy pęcherzyków synaptycznych (powierzchni części presynaptycznej) mogłoby sprzyjać utrzymaniu tego samego, wysokiego stężenia GABA, ale na większej powierzchni, zmieniając czas ekspozycji grup receptorów. Zwiększenie powierzchni emisji GABA zwiększałoby ilość aktywowanych receptorów, wymagających wysokiego GABA do aktywacji, w wyniku czego obserwowano by wzrost amplitudy mIPSCs (Rycina 1B). Powiększenie pola dostępności GABA mogłoby sprzyjać aktywacji pozasynaptycznych receptorów GABAA, których więcej aktywowałoby się w tym samym czasie, co przejawiałoby się większą amplitudą prądu tonicznego (Rycina 4B). Wykonane badania jednak nie rozstrzygają, który ze scenariuszy jest prawdziwy i wszystko wskazuje na to, że oddziaływanie badanego hormonu na układ nerwowy w rozważanym modelu jest złożony.

Ponieważ zarówno parametry GABAergicznych prądów fazowych, jak i tonicznych uległy w badanym modelu modyfikacji w obrębie wąskiego okna czasowego (P9-13), należy sądzić, że estradiol może być zaangażowany w tym okresie w formowanie układu GABAergicznego. Co więcej, charakterystyka częstotliwości i kinetyki mIPSCs w najmłodszej grupie wiekowej w wyniku traktowania estradiolem bardziej przypomina tę z następnej grupy wiekowej. Może to wskazywać, że obecność wysokiego stężenia estradiolu sprzyja „dojrzeniu” układu GABAergicznego, jednak jedynie we wczesnym okresie rozwoju, gdyż jak pokazują niniejsze badania modelowe, z wiekiem wrażliwość na estradiol zmniejsza się. Niniejsze badania pozwalają także sądzić, że estradiol może modyfikować morfologię synaps GABAergicznych w rozwijającym się mózgu.

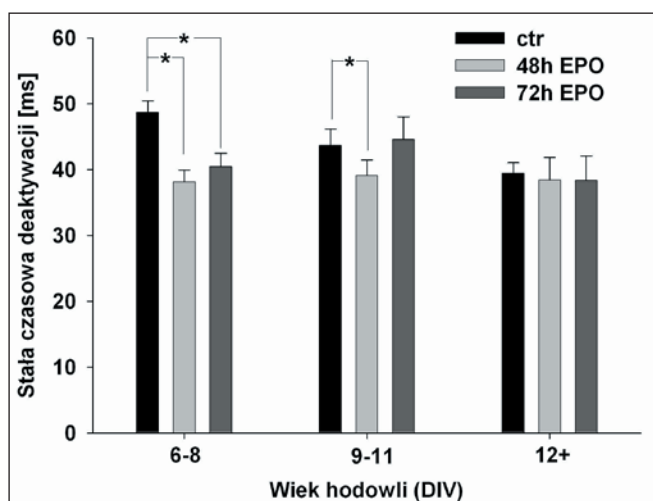
Uzyskane dla Epo wyniki (przyspieszenie stałej czasowej deaktywacji mIPSCs w najmłodszej badanej hodowli komórkowej) pozwalają sądzić, że podobnie jak w przypadku estradiolu, prawdopodobnie istnieje okno czasowe w trakcie rozwoju systemu GABAergicznego, kiedy jest on szczególnie podatny na modulację przez czynniki endogenne. Pozwalają też przypuszczać, że wpływ Epo na mIPSCs jest mniej rozległy niż estradiolu. Należy jednak pamiętać, że wyniki uzyskiwano w dwóch różnych modelach doświadczalnych. Niemniej jednak skoro o ładunku niesionym przez błonę decyduje głównie czas deaktywacji mIPSCs, a nie np. amplituda, można podejrzewać, że Epo może być równie istotnym modulatorem pobudliwości w sieci neuronalnej jak estradiol. Zwraca uwagę fakt, że podobnie jak estradiol Epo moduluje właściwości mIPSCs w okresie, kiedy fenotyp systemu GABAergicznego jest niedojrzały i przechodzący głębokie zmiany.



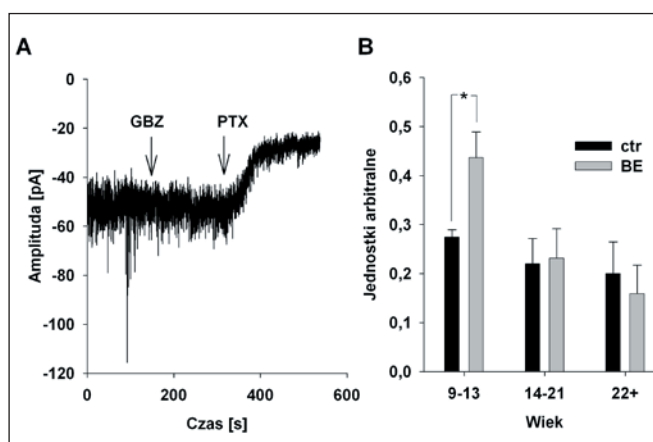
Rycina 1. Wpływ długoterminowego wpływu 17 β -estradiolu na mIPSCs rejestrowane w skrawkach mózgowych zwierząt w różnych grupach wiekowych. **A.** Statystyka częstotliwości mIPSCs. **B.** Statystyka amplitudy mIPSCs. Wyniki uzyskano z co najmniej n=14 komórek. BE-estradiol.



Rycina 2. Wpływ długoterminowego wpływu 17 β -estradiolu na kinetykę mIPSCs rejestrowanych w skrawkach mózgowych zwierząt w różnych grupach wiekowych. **A.** Statystyka 10%-90% rise-time. **B.** Statystyka średnich stałych czasowych deaktywacji mIPSCs. Wyniki uzyskano z co najmniej n=14 komórek. BE-estradiol.



Rycina 3. Wpływ Epo na kinetykę deaktywacji mIPSCs rejestrowanych w hipokampalnej hodowli neuronalnej *in vitro*. Wyniki uzyskano z co najmniej n=7 komórek.



Rycina 4. Wpływ długoterminowego wpływu 17 β -estradiolu na prąd toniczny rejestrowany w skraw-

kach mózgowych zwierząt w różnych grupach wiekowych. **A.** Przykładowa rejestracja prądu tonicznego generowanego przez pozasynaptyczne receptory GABAA w odpowiedzi na endogenne GABA. **B.** Statystyka własności prądu tonicznego. Objaśnienia wyliczenia wartości prądu tonicznego w tekście. Wyniki uzyskano z co najmniej n=4 komórek. BE-estradiol.

Piśmiennictwo

- Hutchison JB, Beyer C, Green S, Wozniak A. Brain formation of oestrogen in the mouse: sex dimorphism in aromatase development. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1994 49 (4-6): 407-15.
- Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res.* 2004 12; 1000 (1-2): 19-31.
- Woolley CS. Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47: 657-80.
- Murphy DD, Cole NB, Greenberger V, Segal M. Estradiol increases dendritic spine density by reducing GABA neurotransmission in hippocampal neurons. *J Neurosci.* 1998 1; 18 (7): 2550-9.
- McCarthy MM. Estradiol and the developing brain. *Physiol Rev.* 2008 88 (1): 91-124.
- Andjus PR, Stevic-Marinkovic Z, Cherubini E. Immunoglobulins from motoneurone disease patients enhance glutamate release from rat hippocampal neurones in culture. *Journal of Physiology.* 1997; 504: 103-112.
- Pytel M, Wójtowicz T, Mercik K, Sarto-Jackson I, Sieghart W, Ikonomidou C, Mozrzymas JW. 17 beta-estradol modulates GABAergic synaptic transmission and tonic currents during development *in vitro*. *Neuropharmacology.* 2007; 52 (6): 1342-53.
- Cohen AS, Lin DD, Coulter DA. Protracted postnatal development of inhibitory synaptic transmission in rat hippocampal area CA1 neurons. *J Neurophysiol.* 2000; 84 (5): 2465-76.
- Mozrzymas JW. Dynamism of GABA (A) receptor activation shapes the "personality" of inhibitory synapses. *Neuropharmacology.* 2004; 47 (7): 945-60.
- Farrant M, Nusser Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA (A) receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2005 6 (3): 215-29.
- Mozrzymas JW, Wójtowicz T, Piast M, Lebida K, Wyrembek P, Mercik K. GABA transient sets the susceptibility of mIPSCs to modulation by benzodiazepine receptor agonists in rat hippocampal neurons. *J Physiol.* 2007 15; 585 (Pt 1): 29-46.

Adres korespondencyjny:

Tomasz Wójtowicz,
Samodzielna Pracownia Biofizyki
Układu Nerwowego,
Akademia Medyczna im. Piastów Śląskich,
ul. Chałubińskiego 3, 50-368 Wrocław,
tel: (071) 784 15 78
e-mail: twojtow@biofiz.am.wroc.pl

Wielokrotne podania imipraminy osłabiają transmisję glutaminianergiczną w korze mózgowej szczura

Repeated administration of imipramine attenuates glutamatergic transmission in rat cerebral cortex

Joanna Wabno¹, Krzysztof Tokarski¹, Bartosz Bobula¹, Grzegorz Hess^{1,2}

¹ Instytut Farmakologii PAN, Kraków,

² Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

Streszczenie

Badania ostatnich lat wskazują, że zaburzenia przekazywania glutaminianergicznego mogą odgrywać istotną rolę w patofizjologii chorób afektywnych, a wspólny mechanizm terapii przeciwdepresyjnych może mieć związek ze zmianami funkcji układu glutaminianergicznego. Celem przeprowadzonych

eksperymentów było zbadanie wpływu wielokrotnego podawania trójcyklicznego leku przeciwdepresyjnego – imipraminy (w dawce 10 mg/kg masy ciała, 2 razy dziennie przez 14 dni) – na przekazywanie synaptyczne w skrawkach kory czołowej szczura *ex vivo*. Wielokrotne podania leku spowodowały obniżenie średniej częstotliwości oraz amplitudy, a także zmianę kształtu, spontanicznych postsy-

naptycznych prądów pobudzających (sEPSCs), rejestrowanych z neuronów piramidalnych warstwy II/III kory czołowej. Wyniki te wskazują, że w korze mózgowej imipramina wywołuje modyfikacje pre- oraz postsynaptyczne, polegające na zmniejszeniu wydajności procesu uwalniania pęcherzyków neuroprzekaźnika oraz zmianach reaktywności postsynaptycznych receptorów AMPA/kainowych.

Słowa kluczowe: trójcykliczne leki przeciwdepresyjne, kora nowa, skrawki mózgu, receptory AMPA/kainowe, receptor NMDA

Abstract

Recent work indicates that abnormalities in glutamatergic transmission may play an important role in the pathophysiology of mood disorders and that a common mechanism of antidepressant therapies may involve modifications in the function of the glutamatergic system. The present study was aimed at finding the effects of repeated administration of a tricyclic antidepressant, imipramine (dose: 10 mg/kg, twice daily), lasting 14 days, which were studied *ex vivo* in rat frontal cortex slices. Antidepressant treatment resulted in a decrease in the mean frequency of spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) recorded from layer II/III pyramidal neurons. The mean amplitude of sEPSCs was also reduced. These results indicate that treatment with imipramine results in pre- and/or postsynaptic effects such as an attenuation of glutamate release and an alteration in the postsynaptic reactivity of AMPA/kainate receptors in rat cerebral cortex.

Key Words: cortex, EPSC, imipramine, patch clamp, whole-cell

Wstęp

Neurobiologiczne podłoże depresji oraz mechanizmy działania leków przeciwdepresyjnych (LPD), pomimo intensywnych badań, wciąż nie są wyjaśnione. Szereg doniesień sugeruje, że terapie przeciwdepresyjne wywołują zmiany przekaźnictwa glutaminianergicznego [1, 2]. Lamotrygina i riluzol, stosowane w farmakoterapii depresji, hamują uwalnianie kwasu glutaminowego (Glu) [3]. Efekt terapeutyczny leków przeciwdepresyjnych obserwuje się przynajmniej po około 2-3-tygodniowym stosowaniu. Prawdopodobną przyczyną tego zjawiska są adaptacyjne zmiany w układach neurotransmisyjnych, jednak procesy te nie są do końca poznane [4]. Dodatkowo wiele LPD nie jest

tolerowanych przez duży odsetek pacjentów z powodu wywoływania szeregu uciążliwych efektów ubocznych (np. suchość w ustach, zaparcia, mdłości, bóle i zawroty głowy, zaburzenia masy ciała, problemy z libido) [5]. Dlatego, mimo prowadzonych od ponad 30 lat prac nad mechanizmem przeciwdepresyjnego działania leków, konieczne są dalsze badania.

Jedną ze struktur mózgu, w których zaobserwowano funkcjonalne i strukturalne zmiany w stanach depresyjnych u ludzi, jest kora czołowa [6]. Wielokrotne podawanie leków przeciwdepresyjnych, w tym imipraminy, obniżają poziom wiązania radioligandów do receptora NMDA w korze mózgowej gryzoni oraz wywołuje zmiany ilości mRNA kodującego podjednostki tego receptora [7, 8, 9]. Istnieją również doniesienia mówiące, że pod wpływem LPD wzrasta ekspresja receptora AMPA w hipokampie [10].

Badania przeprowadzone w Zakładzie Fizjologii Instytutu Farmakologii PAN w Krakowie dowodzą, że wielokrotne podawanie imipraminy oraz citalopramu obniża amplitudę potencjałów polowych, rejestrowanych *ex vivo* w warstwie II/III kory czołowej szczura. Innym efektem jest zmniejszenie względnej wielkości izolowanej farmakologicznie komponenty potencjału polowego opartego o aktywację receptora NMDA w stosunku do komponenty AMPA/kainowej potencjału [11].

W celu dokładniejszego zbadania mechanizmów modyfikacji transmisji glutaminianergiczej pod wpływem wielokrotnego podania imipraminy, zastosowano pomiar elektrofizjologicznej aktywności neuronów techniką whole-cell patch-clamp.

Materiały i metody

Zwierzęta doświadczalne

Eksperymenty przeprowadzono na samcach szczurów rasy Wistar o początkowej masie ciała około 100 g. Zwierzęta przetrzymywano w cyklu światło-ciemność L: D 12: 12, z nieograniczonym dostępem do pokarmu oraz wody.

Podawanie imipraminy i preparatyka skrawków mózgu

Imipraminę (Polfa, Polska) rozpuszczoną w wodzie podawano 2 razy dziennie sondą doprzętykową (*per os*), w dawce 10 mg/kg masy ciała, w objętości 2 ml/kg, przez okres 14 dni. Kontrolę stanowiły zwierzęta, które sondą otrzymywały wodę, w takim samym schemacie dawkowania.

Eksperymenty przeprowadzono w 48 godzin po ostatnim podaniu imipraminy lub wody. Zwierzęta poddawano narkozie przy użyciu Halotanu.

Po dekapitacji preparowano mózg i krojono go w płaszczyźnie czołowej na skrawki grubości 430 μm . Preparatykę prowadzono w schłodzonym sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym (ACSF) o składzie: NaCl (130 mM), NaHCO_3 (26 mM), KCl (5 mM), KH_2PO_4 (1,25 mM), MgSO_4 (1,3 mM), CaCl_2 (2,5 mM), glukoza (10 mM), nasyconym karbogenem. Skrawki umieszczano w komorze inkubacyjnej w temperaturze $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$.

Rejestracja elektrofizjologiczna

Po około 2-3 godzinach inkubacji skrawki umieszczano w komorze doświadczalnej w temperaturze $32 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Przepłukiwano je ACSF o składzie (NaCl (132 mM), NaHCO_3 (26 mM), KCl (3 mM), KH_2PO_4 (1,25 mM), MgSO_4 (1,3 mM), CaCl_2 (2,5 mM), glukoza (10 mM), nasyconym karbogenem. Rejestracje prowadzono z warstwy II/III kory czołowej. Neurony lokalizowano przy użyciu mikroskopu z obiektywem o powiększeniu 40x, w immersji wodnej, w kontraście interferencyjno-różnicowym (*differential interference contrast*, DIC) w świetle podczerwonym (Rycina 1). Elektrody rejestrujące wypełniano roztworem o składzie: K-gluconate (130 mM), NaCl (5 mM), CaCl_2 (0,3 mM), MgCl_2 (2 mM), HEPES (10 mM), $\text{Na}_2\text{-ATP}$ (5 mM), Na-GTP (0,4 mM), EGTA (1 mM), osmolarności 290 mOsm i pH wynoszącym 7,2 (oporność około 6 M Ω). Neurony piramidalne identyfikowano na podstawie kształtu perikarionu oraz charakterystyki elektrofizjologicznej.

Analiza spontanicznych postsynaptycznych prądów pobudzających (sEPSCs)

Charakterystyki elektrofizjologicznej komórek dokonywano w trybie stabilizacji prądu (*current clamp*). Następnie w trybie stabilizacji napięcia (*voltage clamp*) rejestrowano sEPSCs przez okres 8 minut. Potencjał błonowy komórki, z której prowadzono rejestrację, utrzymywany był na poziomie -76 mV. Mierzonymi parametrami były częstotliwość oraz amplituda pojedynczych sEPSC. Do rejestracji aktywności elektrofizjologicznej używano programu pClamp (wersja 10.0; Molecular Devices, USA), a do pomiaru i analizy mierzonych parametrów programu Mini Analysis (Synaptosoft, USA). Do analizy statystycznej zastosowano test *t*-studenta.

Wyniki

W skrawkach mózgow szczerów, którym podawano imipraminę, średnia częstotliwość sEPSCs, rejestrowanych z neuronów piramidalnych warstwy

II/III (Rycina 2), była w przybliżeniu dwukrotnie niższa ($n=25$; $1,43 \pm 0,18$ Hz) niż w skrawkach mózgow zwierząt kontrolnych ($n=22$; $3,18 \pm 0,29$ Hz; $P < 0,001$; Rycina 3A). Wielokrotnie podawana imipramina spowodowała również istotny spadek średniej amplitudy sEPSCs ($12,38 \pm 0,47$ pA), w porównaniu z grupą kontrolną ($16,72 \pm 0,71$ pA; $P < 0,001$; Rycina 3B).

Wielokrotne podanie imipraminy spowodowało wzrost czasu narastania sEPSCs (kontrola: $3,67 \pm 0,12$ ms; imipramina: $4,14 \pm 0,13$ ms, $P < 0,05$) i stałej czasowej zanikania (τ) (kontrola: $5,85 \pm 0,47$ ms; imipramina: $9,59 \pm 1,23$ ms, $P < 0,05$; Rycina 2).

W osobnej serii doświadczeń ($n=9$) rejestracje przeprowadzono również w obecności blokera napięciowo-zależnych kanałów sodowych – tetrodotoksyny (TTX). Dodanie 1 μM TTX do ACSF nie spowodowało istotnych zmian ani średniej częstotliwości sEPSCs (kontrola: $2,54 \pm 0,38$ Hz, w obecności TTX: $2,04 \pm 0,25$ Hz; $P > 0,05$) ani średniej amplitudy sEPSCs (kontrola: $13,31 \pm 0,61$ pA, w obecności TTX: $13,47 \pm 0,61$ pA; $P > 0,05$).

Dyskusja

W przeprowadzonych eksperymentach wykazano, że 14-dniowe podawanie imipraminy powoduje obniżenie średniej częstotliwości oraz amplitudy sEPSCs, rejestrowanych z neuronów piramidalnych warstwy II/III kory czołowej mózgu szczerów w 48 godzin po ostatnim podaniu leku. Zaobserwowany spadek częstotliwości sEPSCs może być, teoretycznie, obniżeniem spontanicznej aktywności neuronów, mających swoje zakończenia na komórkach, z których prowadzono rejestracje. Jednakże brak zmian średniej częstotliwości sEPSCs, rejestrowanych w obecności TTX, świadczy o tym, że rejestrowane sEPSCs nie zależały od potencjałów czynnościowych, lecz stanowiły prądy miniaturowe (mEPSCs) [12].

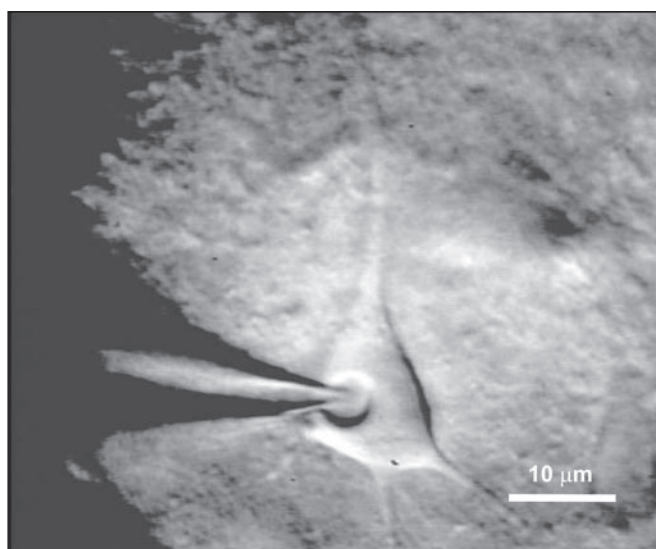
Miniaturowe EPSCs są efektem spontanicznego uwalniania kwasu glutaminowego. Podłożem tego procesu jest uwalnianie wewnątrzkomórkowego wapnia, dzięki otwarciu kanałów Ca^{2+} wrażliwych na rianodynę i IP_3 (inozytolo-1,4,5-trisfosforan), w obrębie zakończeń synaptycznych [13]. Uwalnianie jonów wapnia z wewnątrzkomórkowych magazynów może regulować uwalnianie neuroprzekaźnika zależne od potencjałów czynnościowych. Na przykład, w komórkach kory szczerów zablokowanie receptorów rianodynowych obniża prawdopodobieństwo stymulowanego uwalniania neuroprzekaźnika [14]. Dlatego obniżenie średniej częstotliwości

sEPSCs, zaobserwowane w niniejszej pracy po wielokrotnych podaniach imipraminy, można tłumaczyć osłabieniem mechanizmu uwalniania glutaminianu. Potwierdzają to doniesienia, mówiące że imipramina powoduje obniżenie zależnego od potasu wypływu kwasu glutaminowego z zakończeń synaptycznych w korze przedczołowej mózgu szczurów [15]. W hipokampie, wielokrotne podanie fluoksetyny, reboksetyny i desipraminy redukuje możliwość interakcji pomiędzy białkami – syntaksyną 1 a zależną od wapnia i kalmoduliny kinazą białkową II (kompleksu odpowiedzialnego za uwalnianie glutaminianu), jednocześnie wzmacniając interakcję między syntaksyną a Munc-18 (kompleksu obniżającego uwalnianie kwasu glutaminowego) [16]. Imipramina modyfikuje również modulatoryjne mechanizmy zaangażowane w uwalnianie neurotransmitera. Przykładem może być wpływ wielokrotnych podań tego leku na wzrost ekspresji metabotropowych receptorów glutaminianowych mGluR2/3 w hipokampie i korze mózgu szczurów [17]. Receptory te regulują uwalnianie glutaminianu [18].

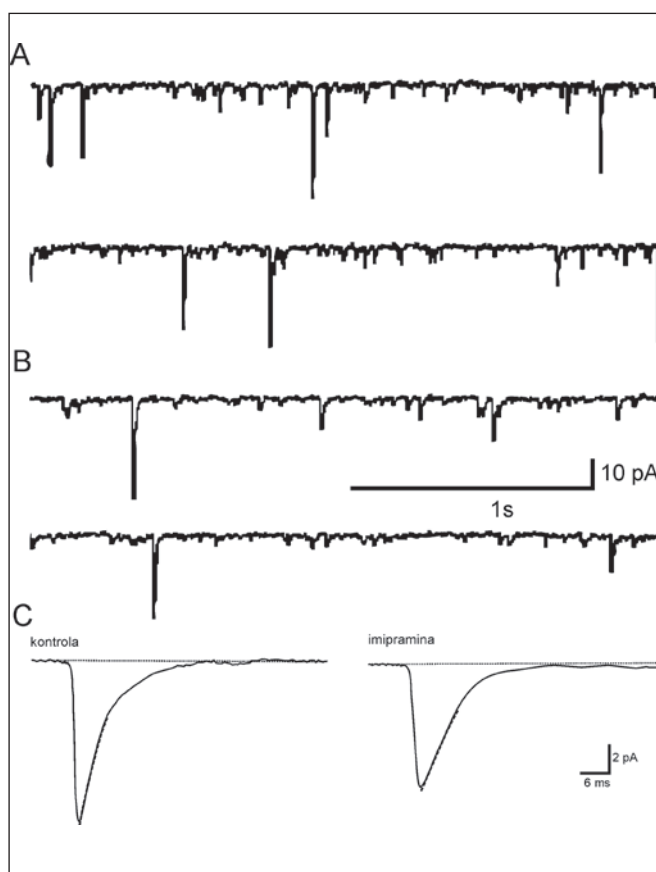
Podawanie imipraminy wydłużyło czas trwania pojedynczych sEPSCs. Wskazuje to, że w efekcie dochodzi do modyfikacji właściwości funkcjonalnych postsynaptycznych receptorów AMPA/kainowych.

Zaobserwowany spadek średniej amplitudy sEPSCs może być efektem presynaptycznym, związanym ze zmniejszeniem ilości neuroprzekaźnika w pęcherzykach synaptycznych. Wiadomo, że leki przeciwdepresyjne zwiększają ekspresję genu kodującego białko pęcherzykowego transportera glutaminianu – VGLUT1 w korze mózgu szczurów [19]. Powoduje to jednak zwiększenie ilości glutaminianu w pęcherzykach synaptycznych, co nie jest zgodne z wynikami prezentowanymi w niniejszej pracy. Różnice te mogą wynikać z tego, że w pracy Tordera (2005) nie zastosowano imipraminy lecz inne leki przeciwdepresyjne. Być może mechanizmy wpływające na ilość neurotransmitera w pęcherzykach zakończeń synaptycznych są różne, w zależności od zastosowanego leku. Z drugiej strony, zaobserwowany efekt może mieć charakter postsynaptyczny.

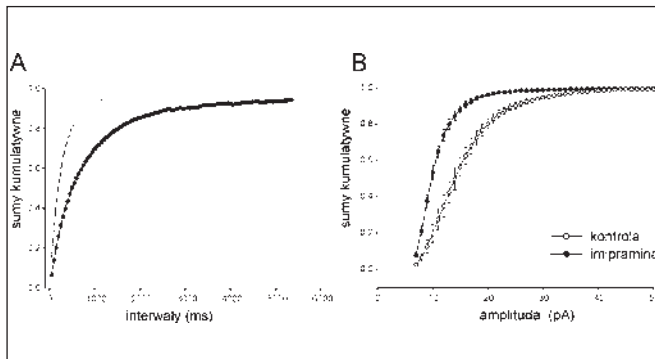
Uzyskane wyniki wskazują, że w korze mózgowej szczura imipramina wywołuje modyfikacje pre- oraz postsynaptyczne, polegające na zmniejszeniu wydajności procesu uwalniania pęcherzyków neuroprzekaźnika oraz zmianach reaktywności postsynaptycznych receptorów AMPA/kainowych.



Rycina 1. Obraz mikroskopowy przedstawiający neuron piramidalny warstwy II/III kory czołowej szczura oraz umieszczoną na jego powierzchni mikroelektrodę rejestrującą (skala – 10 μm).



Rycina 2. Przykładowa rejestracja spontanicznych pobudzających prądów synaptycznych (sEPSCs) z neuronów piramidalnych warstwy II/III kory badanego obszaru: **A.** kontrola, **B.** imipramina. **C.** Przykład uśrednionych sEPSCs wraz z dopasowanymi krzywymi wykładniczymi.



Rycina 3. Porównanie uśrednionych kumulatywnych histogramów interwałów pomiędzy kolejnymi sEPSCs (A) oraz amplitudy sEPSCs (B) rejestrowanych z neuronów piramidalnych warstwy II/III kory w skrawkach mózgu szczurów kontrolnych oraz traktowanych imipraminą. Słupki błędów: \pm SEM.

Piśmiennictwo

1. Paul IA, Skolnick P. Glutamate and depression: clinical and preclinical studies. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1003: 250-272.
2. Kugaya A, Sanacora G. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. *CNS Spectr* 2005; 10: 808-819.
3. Carlson PJ, Singh JB, Zarate Jr CA, Drevets WC, Manji HK. Neural circuitry and neuroplasticity in mood disorders: insights for novel therapeutic targets. *NeuroRx* 2006; 3: 22-41.
4. Holtzheimer PE 3rd, Nemeroff CB. Advances in the treatment of depression. *NeuroRx* 2006; 3: 42-56.
5. Górska T, Grabowska A, Zagrodzka J. *Mózg a zachowanie*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2005, s. 424-429
6. Drevets W. Neuroimaging and neuropathological studies of depression: implications for the cognitive-emotional features of mood disorders. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11: 240-249.
7. Nowak G, Li Y, Paul IA. Adaptation of cortical but not hippocampal NMDA receptors after chronic citalopram treatment. *Eur J Pharmacol* 1996; 295: 75-85.
8. Skolnick P, Layer RT, Popik P, Nowak G, Paul IA, Trullas R. Adaptation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors following antidepressant treatment: implications for the pharmacotherapy of depression. *Pharmacopsychiatry* 1996; 29: 23-26.
9. Boyer PA, Skolnick P, Fossom LH. Chronic administration of imipramine and citalopram alters the expression of NMDA receptor subunit mRNAs in mouse brain. *J Mol Neuroscience* 1998; 10: 219-233.

10. Martinez-Turrillas R, Frechilla D, Del Rio J. Chronic antidepressant treatment increases the membrane expression of AMPA receptors in rat hippocampus. *Neuropharmacology* 2002; 43: 1230-1237.
11. Bobula B, Tokarski K, Hess G. Repeated administration of antidepressants decreases field potentials in rat frontal cortex. *Neuroscience* 2003; 120: 765-769.
12. Simkus CR, Stricker C. Properties of mEPSCs recorded in layer II neurones of rat barrel cortex. *J Physiol* 2002; 545: 509-520.
13. Emptage NJ, Reid CA, Fine A. Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca^{2+} entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron* 2001; 29: 197-208.
14. Galante M, Marty A. Presynaptic ryanodine-sensitive calcium stores contribute to evoked neurotransmitter release at the basket cell-Purkinje cell synapse. *J Neurosci* 2003; 23: 11229-11234.
15. Michael-Titus AT, Bains S, Jeetle J, Whelpton R. Imipramine and phenelzine decrease glutamate overflow in the prefrontal cortex – a possible mechanism of neuroprotection in major depression? *Neuroscience* 2000; 100: 681-684.
16. Bonanno G, Giambelli R, Raiteri L, Tiraboschi E, Zappettini S, Musazzi L, Raiteri M, Racagni G, Popoli M. Chronic antidepressants reduce depolarization-evoked glutamate release and protein interactions favoring formation of SNARE complex in hippocampus. *J Neurosci* 2005; 25: 3270-3279.
17. Matrisciano F, Storto M, Ngomba RT, Cappuccio I, Caricasole A, Scaccianoce S, Rizzo B, Melchiorri D, Nicoletti F. Imipramine treatment up-regulates the expression and function of mGlu2/3 metabotropic glutamate receptors in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 2002; 42: 1008-1015.
18. Ferraguti F, Shigemoto R. Metabotropic glutamate receptors. *Cell Tissue Res* 2006; 326: 483-504.
19. Tordera RM, Pei Q, Sharp T. Evidence for increased expression of the vesicular glutamate transporter, VGLUT1, by a course of antidepressant treatment. *J Neurochem* 2005; 94: 875-883.

Adres korespondencyjny:

mgr Joanna Wabno,
Zakład Fizjologii,
Instytut Farmakologii
Polska Akademia Nauk,
ul. Smętna 12, 31-343 Kraków,
tel.: (012) 662 32 09
e-mail: awabno@op.pl

Prądy potasowe w komórkach mięśniowych w chorobie Steinerta

Potassium currents recorded from muscle cells in Steinert's disease

Ewa Nurowska, Beata Dworakowska, Krzysztof Dołowy

Zakład Biofizyki, Katedra Fizyki, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Streszczenie

Choroba Steinerta jest genetycznym schorzeniem upośledzającym mięśnie i inne narządy. Chorzy cierpią na opóźniony rozkurcz mięśni szkieletowych, zmniejszoną siłę mięśni oraz postępujący zanik mięśni. W komórkach mięśniowych pochodzących od dwóch 28-tygodniowych ludzkich płodów, zdrowego i z chorobą Steinerta, zbadaliśmy w drugim i trzecim dniu różnicowania prądy potasowe i potencjał spoczynkowy metodą *whole-cell patch-clamp*. W komórkach mięśniowych od chorego dawcy wykazaliśmy mniejszą gęstość oraz wyższy potencjał aktywacji prądu potasowego typu *outward-rectifier* i rzadsze występowanie kanałów typu *inward-rectifier*. Nasze wyniki sugerują, że mutacja DM1 zaburza aktywność kanałów potasowych mięśni szkieletowych w procesie różnicowania się.

Słowa kluczowe: kanały potasowe, choroba Steinerta, *patch-clamp*

Abstract

Myotonic dystrophy type-1 (DM1) is a genetic disorder affecting muscles and other tissues. DM1 patients suffer from myotonia, muscle weakness, and progressive muscle wasting. We used the whole-cell patch clamp technique to record voltage-gated K⁺ currents and the cell resting membrane potential during the *in vitro* differentiation of myoblasts isolated from DM1 and healthy human fetuses in the 2nd and 3rd day of differentiation. We found that dystrophic muscle cells expressed fewer outward-rectifier K⁺ currents and inward rectifier currents, than control cells. Based on our results, we suggest that the DM1 mutation affects the activity of K⁺ channels in skeletal muscle cells during differentiation.

Key Words: *potassium channels, Steinert's disease, patch-clamp*

Wstęp

Choroba Steinerta (miotonia zanikowa, dystrofia miotoniczna typu 1, DM1) została opisana po raz pierwszy jako oddzielna jednostka chorobowa w roku 1909. Chorzy z chorobą Steinerta cierpią na miotonię (opóźniony rozkurcz mięśni szkieletowych), zmniejszoną siłę mięśni oraz postępujący zanik mięśni, a także szereg objawów dotyczących wielu innych narządów. Badania genetyczne pozwoliły na zidentyfikowanie mutacji na chromosomie 19 jako przyczyny choroby [1, 2, 3]. Mutacja wywołująca miotonię polega na wydłużeniu genu kodującego kinazę białkową DMPK (*dystrophia myotonica protein kinase*) o kilka tysięcy trójek nukleotydów CTG. Pomimo iż zwielokrotnione nukleotydy występują w rejonie, który nie podlega translacji, mutacja prowadzi do obniżenia poziomu białka DMPK w cytoplazmie na skutek zatrzymania w jądrze DMPK mRNA, zawierających zwielokrotnioną sekwencję. Retencja wadliwego mRNA zachodzi głównie w komórkach mięśniowych. Proces, prowadzący od zatrzymania mRNA w jądrach do powstania objawów chorobowych, nie jest poznany. Wiele badań wskazuje na udział w tym mechanizmie kanałów jonowych. Wykazano zmniejszoną ekspresję kanałów chlorkowych i zmienioną kinetykę kanału sodowego w komórkach dystroficznych hodowanych *in vitro* [4, 5, 6, 7].

Nasze badania podjęliśmy ze względu na obniżoną zdolność komórek dystroficznych do różnicowania się [8]. Ponieważ proces różnicowania się komórek mięśniowych sterowany jest ekspresją specyficznych kanałów potasowych, chcieliśmy zbadać, czy ekspresja i kinetyka kanałów niezbędnych w procesie fuzji komórek nie jest w tej chorobie zmieniona. Dotychczasowe badania wskazują, że w procesie fuzji uczestniczą kanały potasowe nieinaktywujące się lub o bardzo wolnej inaktywacji. Są to kanały typu *delayed outward-rectifier* $I_{K(NI)}$ i *inward-rectifier* $I_{K(IR)}$. Komórki w fazie proliferacji nie wykazują ekspresji tych kanałów, a co za tym idzie charakteryzują się wysokim (średnio -8 mV) potencjałem spoczynkowym. Dopiero pojawienie

Wyniki

się kanałów potasowych nieinaktywujących umożliwia komórkom obniżenie potencjału do średnio -60 mV, co poprzedza ich fuzję [9, 10, 11, 12].

Do badań wykorzystaliśmy mioblasty wyhodowane z komórek satelitarnych pobranych od dawcy zdrowego, który stanowił kontrolę i dawcy z chorobą Steinerta. Komórki były następnie różnicowane *in vitro* i badane techniką *patch-clamp* pod kątem obecności i kinetyki prądów potasowych. Mierzono również potencjał spoczynkowy komórek. Uzyskane wyniki wskazują, że choroba Steinerta wiąże się z upośledzeniem funkcji prądów potasowych w komórkach mięśniowych.

Materiały i metody

Komórki satelitarne pozyskano w laboratorium UPMC, Institute of Myology w Paryżu dzięki uprzejmości Prof. Vincenta Molly'ego. Dawcami komórek satelitarnych były dwa 28-tygodniowe ludzkie płody, z których jeden posiadał 2000 powtórzeń CTG, a drugi nie wykazywał podobnej mutacji. Komórki pobrano z mięśnia czterogłowego.

Mioblasty hodowane były w pożywce składającej się z DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*) wzbogaconego 20% płodową surowicą cielęcą, 1 mM L-glutaminą, 100 jednostkami ml⁻¹ penicyliny i 100 µg ml⁻¹ streptomycyny. Komórki inkubowane były w 37°C. Różnicowanie komórek wymuszane było wymianą pożywki na pożywkę, w której surowicę płodową zastąpiono 4% surowicą końską i zwiększono zawartość L-glutaminy do 4 mM.

Pomiary prądów wykonywane były techniką *whole-cell patch-clamp* w drugim i trzecim dniu różnicowania się komórek, w temperaturze pokojowej. Roztwór zewnątrzkomórkowy zawierał w mM: NaCl 144, KCl 2,8, MgCl₂ 2, HEPES 10, glukozę 10, EGTA 2, pH 7,4. Roztwór w pipiecie zawierał w mM: KCl 141, MgCl₂ 2, HEPES 10, EGTA 11, pH 7,4.

Do pomiarów użyliśmy wzmacniacza Axopatch 200B i programu Clampex7. W trakcie pomiarów prąd filtrowany był filtrem dolnoprzepustowym o częstotliwości 2 kHz. Potencjał błony komórkowej pomiędzy pomiarami utrzymywany był na poziomie -60 mV, w trakcie pomiarów zmieniany był od -140 do +40 mV, skokowo co 10 mV. Każdy impuls potencjału trwał 600 ms. Stałą czasową inaktywacji szacowano z dopasowania funkcji $I(t) = A \exp(-t/\tau) + C$ do rejestrowanych przebiegów czasowych prądów.

Wyniki podano jako wartości średnie ± SEM i analizowano testem t-Studenta. Wartości istotne statystycznie przyjęto dla wartości $P < 0,05$.

Potencjał spoczynkowy

Pomiary potencjału spoczynkowego wykonano w drugim i trzecim dniu hodowli w pożywce różnicującej. Nie wystąpiły statystycznie istotne różnice w wartościach średnich, które wynosiły w komórkach od zdrowego dawcy i w komórkach od chorego dawcy odpowiednio: w drugim dniu różnicowania -35,0±3,5 mV i -38,5±3,0 mV, w trzecim dniu różnicowania -27,9±3,4 mV i -36,4±4,7 mV.

Prądy potasowe typu outward-rectifying (I_K)

Prądy potasowe pojawiały się na skutek zmiany potencjału błony komórkowej. Dla napięć większych niż około -30 mV obserwowano prąd o cechach charakterystycznych dla prądów potasowych typu *delayed outward-rectifier* [9]. Przykładowe rejestracje prądu aktywowanego depolaryzacją przedstawia Rycina 1A. Prądy te blokowane były przez TEACl (*tetraethylammonium chloride*) podany w roztworze zewnątrzkomórkowym (Rycina 1B). Średni potencjał aktywacji tego prądu dla obu badanych populacji komórek różnił się w sposób statystycznie istotny. W komórkach zdrowego dawcy wynosił -30,8±1,5 mV, a w komórkach chorego dawcy -26,1±1,4 mV.

W rejestrowanych prądach wyróżniliśmy dwie komponenty: prąd nieinaktywujący się (I_{K(NI)}) zdefiniowany jako prąd obecny po piętnastosekundowej depolaryzacji 10 mV (Rycina 2) oraz prąd o wolnej inaktywacji (I_{K(DR)}). Udział obu komponent w całkowitym prądzie znacznie się różnił w badanych grupach. W komórkach od zdrowego dawcy przeważał prąd inaktywujący się I_{K(DR)} (stanowił 75% prądu całkowitego w dniu drugim i 67% w dniu trzecim), natomiast w komórkach od dawcy chorego było odwrotnie, to nieinaktywujący prąd I_{K(NI)} stanowił główną komponentę (75% prądu całkowitego w dniu drugim i 50% w dniu trzecim). Stałe czasowe inaktywacji I_{K(DR)} w obu grupach komórek charakteryzował duży rozrzut wartości od 80 do 400 ms. Nie zaobserwowano jednakże istotnych statystycznie różnic wartości średnich szybkości inaktywacji, porównując komórki od dawcy zdrowego z komórkami od dawcy chorego. Różnice istotne statystycznie wystąpiły natomiast w gęstościach prądu całkowitego (Rycina 1C). W komórkach od zdrowego dawcy średnia gęstość prądu wynosiła w drugim i trzecim dniu różnicowania odpowiednio 15,3±1,5 pA/pF i 23,5±4,5 pA/pF. W komórkach od dawcy chorego wartości te były dużo niższe i wynosiły 6,2±1,8 pA/pF i 1,4±0,9 pA/pF.

Prądy potasowe typu inward-rectifying ($I_{K(IR)}$)

Prądy potasowe typu *inward-rectifier* aktywowane były potencjałami niższymi niż -90 mV (Rycina 3). Prąd blokowany był przez 0,5 mM BaCl₂. W komórkach pochodzących od zdrowego dawcy prądy te obserwowane były w 70% wszystkich badanych komórek w dniach 2 i 3. Natomiast w komórkach z dystrofią prąd ten obserwowany był rzadko, w dniu drugim tylko w 10% komórek, a w dniu trzecim żadna badana komórka nie posiadała prądu $I_{K(IR)}$.

Dyskusja

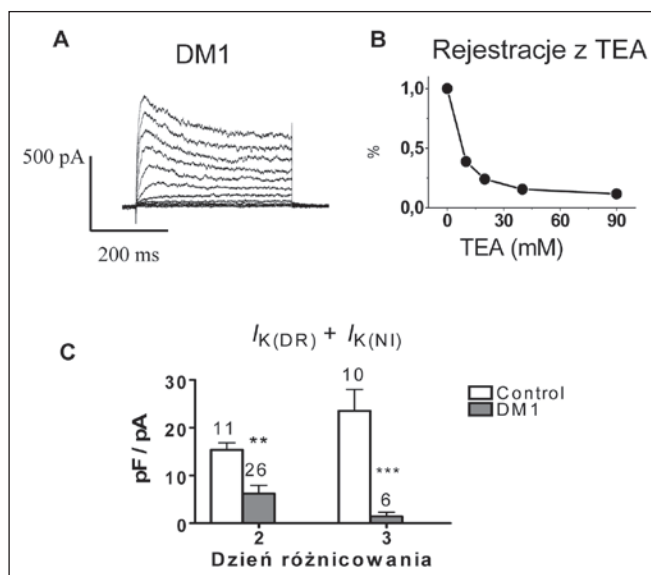
Eksperymenty, które przeprowadziliśmy, miały na celu sprawdzenie, czy w chorobie Steinerta funkcjonowanie kanałów potasowych w komórkach mięśniowych jest prawidłowe. Prądy potasowe zbadaliśmy w mioblastach poddanych procesom proliferacji i różnicowania się *in vitro*. Mioblasty pochodziły z pierwotnej hodowli komórek satelitarnych pobranych z 28-tygodniowego płodu, u którego zdiagnozowano dystrofię miotoniczną typu 1. Prądy te porównaliśmy z analogicznymi wynikami z komórek od zdrowego płodu. Nasze pomiary sugerują, że w chorobie Steinerta pewne właściwości prądów potasowych są zmienione. Mniejsza gęstość całkowitego prądu typu *outward-rectifier* i znacznie radsze występowanie prądu typu *inward-rectifier* wskazują, że w komórkach mięśniowych pochodzących od dawcy chorego na dystrofię, ekspresja kanałów potasowych jest zaburzona.

Rola kanałów potasowych nieinaktywujących się, tzw. *noninactivating delayed rectifiers* oraz *inward-rectifiers* w procesie różnicowania się komórek mięśniowych udokumentowana została w wielu pracach [10, 11, 13]. Wykazano w nich, że zahamowanie ekspresji kanału potasowego typu *inward-rectifier* lub zablokowanie kanałów typu *outward-rectifier* hamowało proces fuzji mioblastów. W komórkach dystroficznych mniejsza ekspresja kanałów potasowych może zatem prowadzić do obniżenia liczby komórek podlegających fuzji. Tłumaczyłoby to zanik mięśni u pacjentów z DM1, gdyż komórki mięśniowe nie byłyby efektywnie regenerowane.

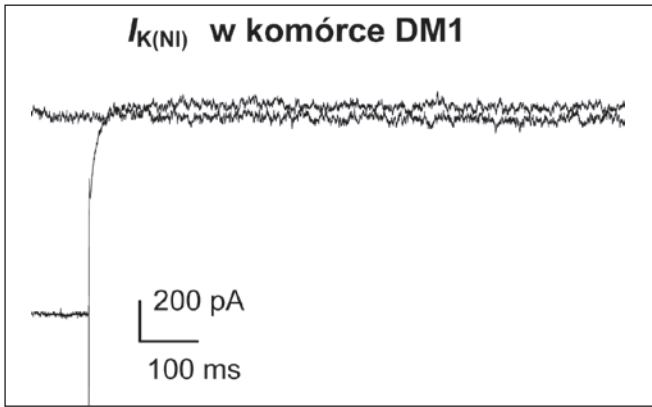
Kanały potasowe nieinaktywujące typu *outward-rectifier* i *inward-rectifier* wpływają na potencjał spoczynkowy komórki, gdyż, jak wiadomo, potencjał ten wynika w przeważającej części z potencjału równowagi dla jonów potasu. Stale otwarte kanały potasowe są zatem niezbędne, aby potencjał komórek mięśniowych osiągnął niską, tzn. silnie ujemną wartość. Mioblasty w trakcie proliferacji (a więc takie, które nie wytworzyły odpowiednich kanałów potasowych) mają zwykle wysoki potencjał, około -8 mV [9, 10]. Zmianę potencjału elek-

trycznego do około -30 mV umożliwia im dopiero pojawienie się nieinaktywujących kanałów typu *outward-rectifier*. Wynika to z tego, że kanały te aktywowane są napięciem bliskim -30 mV. Jeszcze niższy potencjał wytworzą te komórki, w których w błonie komórkowej pojawią się kanały typu *inward-rectifier*. Nawet niewielki wpływ jonów potasu przez te kanały wystarcza do obniżenia potencjału do około -60 mV.

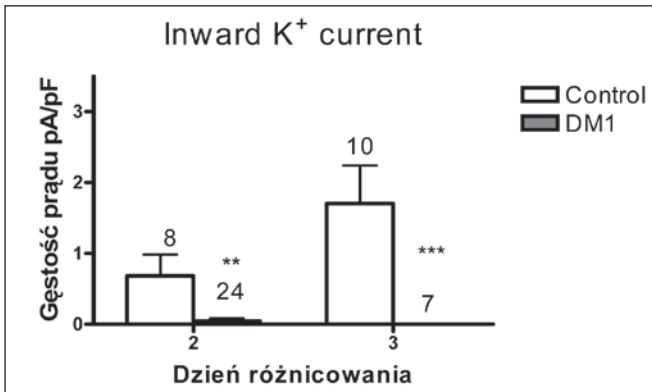
Porównując komórki dystroficzne z komórkami zdrowymi, zaobserwowaliśmy istotną różnicę w potencjale aktywacji kanałów potasowych typu *outward-rectifier*. Komórki od chorego dawcy wymagały wyższej depolaryzacji. Zaobserwowaliśmy też obniżoną ekspresję prądu potasowego typu *inward-rectifier*. Wszystko to powinno wpłynąć na podwyższenie potencjału spoczynkowego w komórkach dystroficznych. Zaskakująca jest zatem obserwacja, że potencjał spoczynkowy w tych komórkach nie odbiegał znacząco od potencjału zmierzonego w komórkach kontrolnych. Przypuszczamy, że niski potencjał spoczynkowy w komórkach dystroficznych może być wykształcony na skutek występowania tzw. leak channels, bliżej nieokreślonych, stale otwartych kanałów potasowych, których istnienie w zdrowych mioblastach zostało pokazane [14].



Rycina 1. A) Przykładowa rejestracja prądów wywołanych depolaryzacją błony (od -60 mV do +40 mV) w komórce DM1 w drugim dniu różnicowania. B) Na wykresie przedstawiono prąd rejestrowany w obecności TEA (wielkość prądu z TEA/wielkość prądu bez TEA) dla potencjału +40 mV. C) Gęstość prądu typu *outward rectifier* w komórkach kontrolnych i od dawcy z DM1 rejestrowana przy potencjale +40 mV. Na wykresie podano liczbę zbadanych komórek.



Rycina 2. Rejestracja prądu *outward rectifier* z komórki DM1 – nałożono zapis prądu rejestrowanego bezpośrednio po zmianie potencjału (z -60 mV do +10 mV) z prądem rejestrowanym po 15 sekundach trwania depolaryzacji (+10 mV). Zapis dokumentuje nieobecność prądu podlegającego inaktywacji.



Rycina 3. Gęstość prądu typu *inward rectifier* w komórkach kontrolnych i od dawcy z DM1 rejestrowana przy potencjale -140 mV. Na wykresie podano liczbę zbadanych komórek.

Piśmiennictwo

1. Brook JD, McCurrach ME, Harley HG et al. Molecular basis of myotonic dystrophy: expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Cell* 1992; 68: 799-808.
2. Fu YH, Pizzuti A, Fenwick RG, et al. An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* 1992; 255: 1256-1258.
3. Mahadevan M, Tsilfidis C, Sabourin L et al. Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3-prime untranslated region of the gene. *Science* 1992; 255: 1253-1255.
4. Bernareggi A, Furling D, Mouly V, Ruzzier F, Sciancalepore M. Myocytes from congenital myotonic dystrophy display abnormal Na⁺ channel activities. *Muscle Nerve* 2005; 31: 506-509.

5. Charlet-B N, Savkur RS, Singh G, Philips AV, Grice EA, Cooper TA. Loss of the muscle-specific chloride channel in type 1 myotonic dystrophy due to misregulated alternative splicing. *Mol Cell* 2002; 10: 45-53.
6. Mankodi A, Takahashi MP, Jiang H, Beck CL, Bowers WJ, Moxley RT, Cannon SC, Thornton CA. Expanded CUG repeats trigger aberrant splicing of ClC-1 chloride channel pre-mRNA and hyperexcitability of skeletal muscle in myotonic dystrophy. *Mol Cell* 2002; 10: 35-44.
7. Mounsey JP, Mistry DJ, A i CW, Reddy S, Moorman JR. Skeletal muscle sodium channel gating in mice deficient in myotonic dystrophy protein kinase. *Hum Mol Genet* 2000; 9: 2313-2320.
8. Furling D, Lemieux D, Taneja K, Puymirat J. Decreased levels of myotonic dystrophy protein kinase (DMPK) and delayed differentiation in human myotonic dystrophy myoblasts. *Neuromuscul Disord* 2001; 11: 728-735.
9. Bernheim L, Liu JH, Hamann M, Haenggeli CA, Fischer-Lougheed J, Bader CR. Contribution of a non-inactivating potassium current to the resting membrane potential of fusion-competent human myoblasts. *J Physiol* 1996; 493: 129-141.
10. Bijlenga P, Occhiodoro T, Liu JH, Bader CR, Bernheim L, Fischer-Lougheed J. An ether-a-go-go K⁺ current, Ih-eag, contributes to the hyperpolarization of human fusion-competent myoblasts. *J Physiol* 1998; 512: 317-323.
11. Fischer-Lougheed J, Liu JH, Espinos E, Mordasini D, Bader CR, Belin D, Bernheim L. Human myoblast fusion requires expression of functional inward rectifier Kir2.1 channels. *J Cell Biol* 2001; 153: 677-686.
12. Liu JH, Bijlenga P, Fischer-Lougheed J, Occhiodoro T, Kaelin A, Bader CR, Bernheim L. Role of an inward rectifier K⁺ current and of hyperpolarization in human myoblast fusion. *J Physiol* 1998; 510: 467-476.
13. Widmer H, Hamann M, Baroffio A. Expression of a voltage-dependent potassium current precedes fusion of human muscle satellite cells (myoblasts). *J Cell Physiol* 1995; 162: 52-63.
14. Nurowska E, Dworakowska B, Kloch M, Sobol M, Dołowy K, Wernig A, Ruzzier F. Potassium currents in human myogenic cells from donors of different ages. *Exp Gerontol* 2006; 41: 635-640.

Adres korespondencyjny:

Beata Dworakowska,
Zakład Biofizyki SGGW,
ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa,
tel.: (022) 593 86 21,
e-mail: beata_dworakowska@sggw.pl

„Functional-QEMG”, nowa metoda standardowych badań EMG

„Functional-QEMG”, a new method for EMG standard examination

Jerzy Kopeć

Klinika Neurologii, Warszawski Uniwersytet Medyczny

Streszczenie

Zasadniczym celem implementacji do używanych w kraju aparatów EMG „Keypoint”, naszej automatycznej metody („Functional-QEMG”) było podniesienie standardu badań i czułości diagnostycznej. Metoda opracowana w warszawskiej Klinice Neurologicznej jest wynikiem ponad 30-tu lat doświadczeń nad automatyzacją badań EMG. W przeciwieństwie do tradycyjnej metody ilościowej analizującej tylko parametry pojedynczej jednostki ruchowej (PJR), w naszej metodzie analizujemy dynamikę zmian wszystkich czynnych jednostek ruchowych (JR), rejestrowanych podczas słabego i maksymalnego wysiłku. Zasadniczym osiągnięciem opracowanej metody jest wprowadzenie po raz pierwszy ilościowej klasyfikacji mechanizmu kompensacyjnego dla oceny stopnia uszkodzenia mięśnia. Pełne i wiarygodne udokumentowanie naszych wyników było możliwe dzięki wykorzystaniu rozbudowanego systemu „EMG-Keypoint”, w którym rozszerzyliśmy nasz program o nową bazę danych pacjenta. Obecnie, w bazie danych są zapisywane wszystkie „żywe” sygnały EMG razem z ich wynikami, dokumentując sposób, w jaki sygnały EMG są mierzone, analizowane i klasyfikowane komputerowo. Monitorowanie przechowywanych sygnałów EMG i ich analiza potwierdzają, że najważniejsze zmiany miogenne lub neurogenne manifestują się najpierw jako nieprawidłowa rekrutacja czynnych JR, a następnie jako zmiana dynamiki kształtu w kolejnych wyładowaniach PJR.

Abstract

In order to improve the diagnostic reliability of EMG, we have implemented our fully automatic “Functional-QEMG” program into all Keypoint-EMG computer systems used in our country. The program was developed in our department from over 30 years of experience in EMG automation. In contrast to traditional quantitative analysis of individual motor unit action potentials (MUAPs), the strength of our program is in assessing changes related to the compensation of muscle and nerves in

reaction to injury. Our greatest achievement is that we first introduced the quantification of compensatory mechanisms in a given disease to determine its clinical stage and prognosis. Utilizing the Keypoint computer capacities, we developed new patient database where all the raw EMG signals together with their results are stored and easy retrievable in order to show how the computer analysis relates to actual EMG traces. Analysis of the trains of recorded MUAPs confirmed that the most essential features of neurogenic or myogenic changes manifest first as recruitment abnormalities, and then as changes in MUAP wave forms.

Opracowany w Warszawskiej Klinice Neurologicznej WUM program analizy EMG zwany „Functional-QEMG” jest uwieńczeniem ponad 30-tu lat pracy autora i całego zespołu pracowni EMG nad pełną automatyzacją badań klinicznych. Program reprezentuje całkowicie automatyczny sposób pomiaru i analizy sygnałów EMG, z równoczesną klasyfikacją rodzaju patologii oraz oceną stopnia uszkodzenia badanego mięśnia. Oparty na oryginalnej koncepcji, eliminuje dotychczasowe ograniczenia i braki tradycyjnej metody ilościowej wprowadzonej przez Buchthala [1]. Klasyczna metoda ilościowa opiera się na statystycznej analizie parametru lub parametrów wybranego (ręcznie lub automatycznie) potencjału jednostki ruchowej (PJR) z ciągu rejestrowanych sygnałów EMG. Obecnie automatyczne wydzielenie i identyfikowanie takiego PJR odbywa się bardzo złożonymi technikami dekompozycji, porównywania kształtu (*template matching*) i uśredniania, celem uzyskania powtarzalnego i stabilnego kształtu [2]. Wybór i analiza przynajmniej 20-tu różnych PJR daje tylko statystyczne prawdopodobieństwo, że zanik i osłabienie siły badanego mięśnia są spowodowane uszkodzeniem pierwotnie mięśniowym lub neurogennym. W przeciwieństwie do tej metody my rejestrujemy wszystkie dynamicznie zmieniające się kolejne wyładowania jednostki ruchowej (JR), zwane dla odmiany potencjałem czynnościowym jednostki ruchowej (PCJR). Rejestrowane PCJR są jednocześnie

różnicowane w specjalnym podprogramie „Mapping-MUAP” na potencjały o stabilnym lub zmiennym kształcie. Uzyskany w ten sposób nowy parametr „zmiennosc PCJR” ma ogromne znaczenie diagnostyczne dla oceny dynamiki zmian czynnej lub zakończonej reinerwacji. W praktyce klinicznej, w badaniach rutynowych są stosowane dwie różne metody analizy uważane za równoważne pod względem czułości diagnostycznej. Są to wspomniana wcześniej analiza pojedynczych PJR, oraz analiza zapisu interferencyjnego (ZI) maksymalnego wysiłku mięśnia, wyznaczająca liczbę zwrotów i amplitud pomiędzy zwrotami [3]. W naszym programie te dwa zapisy, które są wzajemnie zależne, traktujemy jako jeden integralny test. Nieliniowa analiza takiego testu dostarcza nowych informacji diagnostycznych o wzajemnych relacjach pomiędzy wielkością wszystkich czynnych JR a ich właściwościami funkcjonalnymi. Zmiany wielkości czynnych JR (strukturalne) są odbiciem pierwotnego procesu destrukcji, który jest podstawą dotychczasowej klasyfikacji patologii. Te zmiany wywołują funkcjonalną reorganizację czynnych JR dla skompensowania ubytku siły uszkodzonych JR (mechanizm kompensacyjny). Procesy kompensacyjne odgrywają zasadniczą rolę dla zachowania prawidłowej funkcji ruchowej mięśnia, a tym samym dla poprawy klinicznego stanu pacjenta. Dotychczasowe piśmiennictwo na temat mechanizmów kompensacji przedstawia prawie wyłącznie badania eksperymentalne na zwierzętach. Pojedyncze publikacje dotyczące badań u ludzi opisują ograniczone i wybrane przypadki a zastosowane techniki pozwalają jedynie na analizę wybranych jednostek ruchowych o niskim i średnim progu pobudzenia [4]. Prowadzony przez nas od szeregu lat projekt KBN dotyczący plastyczności jednostki ruchowej w chorobach nerwowo-mięśniowych u ludzi posiada wyjątkowe znaczenie, ponieważ nasze badania pozwoliły określić efektywność i ograniczenia mechanizmów kompensacji w różnych uszkodzeniach nerwowo-mięśniowych. W ocenie klinicznej o wielkości uszkodzenia i efektywności mechanizmów kompensacji wnioskujemy na podstawie stanu efektoru, oceniając jego siłę mechaniczną, która w naszej metodzie została zastąpiona pomiarem elektrycznym (wskaźnik MEF). Kombinacja tego wskaźnika siły wyjściowej mięśnia ze zmianami strukturalnymi i funkcjonalnymi czynnych JR pozwala dokładnie wyznaczyć poziom i wielkość uszkodzeń dolnego neuronu ruchowego. Przez ścisłą korelację ze stanem klinicznym badanego mięśnia możemy określić, jakie charakterystyczne zmiany elektrofizjologiczne są związane z ostrym lub przewlekłym procesem chorobowym. Specjalne procedury komputerowego wspomaga-

nia diagnozy dokonują automatycznej klasyfikacji wyników badania EMG na uszkodzenia pierwotnie mięśniowe lub neurogenne z oceną stopnia ciężkości schorzenia na poziomie czułości diagnostycznej 90-100%. Końcowy wynik badania jest wyświetlany na ekranie monitora w formie „Wynik końcowy”. Pomocnym we właściwej interpretacji wyników jest prezentowany algorytm, ilustrujący kryteria i sposób automatycznej klasyfikacji, który może być traktowany jako swego rodzaju „Ekspert EMG”, zwłaszcza dla lekarzy o mniejszym doświadczeniu. Nasze wieloletnie doświadczenie kliniczne potwierdza, że obecny program „Functional-QEMG” stanowi istotny postęp i wzbogaca w zasadniczy sposób możliwości diagnostyki klinicznej w chorobach nerwowo-mięśniowych, eliminując dotychczasowe ograniczenia i słabości stosowanych metod.

Opis zasadniczych parametrów i indeksów w obecnej metodzie:

1. Wielkość pojedynczych JR reprezentuje średnia wartość powierzchni PCJR (mean Area), parametr, który najlepiej określa zmiany strukturalne.
2. Stosunek liczby PCJR stabilnych prostych (S) i polifazowych (P) do liczby wszystkich rejestrowanych określa ilościowo zmiany funkcjonalne PCJR.
3. Wielkość populacji wszystkich czynnych JR określa indeks „Range”, który wyraża stosunek maksymalnej amplitudy PCJR zapisu wysiłkowego do minimalnej amplitudy PCJR w zapisie pojedynczych potencjałów.
4. Zmiany funkcjonalne wyrażają porządek lub zaburzenie rekrutacji całej populacji czynnych JR określa wskaźnik „FRO”, który jest stosunkiem średnich wartości amplitud zapisu wysiłkowego do średniej amplitudy pojedynczych PCJR.
5. Elektryczną moc wyjściową mięśnia „MEF” określa iloczyn średnich wartości amplitud (w mV) i średniej gęstości zapisu wysiłkowego (w Hz).
6. Dla praktycznej oceny stopnia uszkodzenia mięśnia, wprowadzono trzystopniową skalę siły mięśnia: zmiany skompensowane w pełni (Normal ≥ 80 mV/s), uszkodzenie średnie nieskompensowane (Evident 80-50 mV/s), i uszkodzenie ciężkie (Severe < 50 mV/s).
7. Zastosowanie nowych indeksów wyznaczających działanie populacji wszystkich czynnych JR dodatkowo do tradycyjnych parametrów PCJR, pozwala klasyfikować stopień patologii w stanach podklinicznych.

W rutynowym badaniu EMG, w mięśniu uszkodzonym miogennie skuteczność mechanizmu kompensacyjnego jest dokumentowana zdolnością do kompensacji zmniejszonej siły indywidualnych JR przez zwiększenie częstotliwości ich wyładowań. Natomiast ich rekrutacja od słabego do maksymalnego wysiłku odbywa się w uporządkowany sposób

(FRO>2). Jest to dowodem, że w tym uszkodzeniu zmiany strukturalne i funkcjonalne dotyczą wyłącznie włókien mięśniowych przy zachowaniu normalnych funkcji motoneuronu, jego aksonu i transmisji nerwowo-mięśniowej. W mięśni o zmianach podklinicznych przy zachowaniu prawidłowej siły mięśnia efekty skutecznego działania mechanizmu kompensacji oceniamy przez wzrost częstotliwości rekrutacji i globalnej gęstości zapisu maksymalnego wysiłku.

W uszkodzeniach neurogennych, podstawowe zmiany strukturalne wyrażają się ubytkiem liczby czynnych JR (Range<12), a mechanizm kompensacyjny jest dokumentowany jako czynny proces reinerwacji obocznej. W stanie ostrym przy zachowanej sile mięśnia proces dynamiczny czynnej reinerwacji wyraża się wzrostem pola pozostałych PCJR i ogromną zmiennością ich kształtu. Ta zmienność jest wynikiem zaburzeń transmisji w końcowych rozgałęzieniach nerwowych i nowo tworzonych płytkach ruchowych. W miarę dojrzewania tych struktur następuje proces stabilnej kompensacji, którego zakończenie jest udokumentowane widoczną stabilizacją PCJR, stabilnej i zmniejszonej częstotliwości rekrutowanych JR, oraz drastycznym spadkiem siły badanego mięśnia. W procesach neurogennych skuteczność mechanizmów kompensacji przy czynnej dynamicznie reinerwacji zawsze powoduje zachowanie prawidłowej funkcji ruchowej mięśnia (generacja normalnej siły). Natomiast po zakończeniu reinerwacji i dalszym ubytku liczby JR, występuje zmniejszenie aktywności pozostałych, nadmiernie przeciążonych JR oraz zmniejszenie generacji mocy wyjściowej mięśnia, charakterystyczne dla stanów przewlekłych. Nasze kliniczne doświadczenie z implementowanym programem sugeruje, aby przed wydaniem ostatecznej oceny i opisem interpretacji wyników badania EMG, dokonać szybkiego przeglądu rejestrowanych zapisów razem z ich automatyczną analizą. Przegląd i korelacja z innymi badaniami klinicznymi są również pomocne w określaniu specyficznych cech sygnałów EMG dla danego procesu chorobowego. Jednym z zasadniczych wniosków pozytywnego zakończenia tematu KBN, w którym podstawowym narzędziem była własna decyzja wprowadzenia metody w Polsce, jako nowego standardu badań diagnostycznych. Dlatego za zgodą firmy Medtronic implementowaliśmy nasz program do aparatów „Keypoint” powszechnie używanych w kraju. Wykorzystując właściwości nowoczesnego systemu komputerowego EMG-Keypoint oraz dostęp do automatycznej kontroli wzmacniaczy EMG, zostały opracowane odpowiednie zmiany meto-

dyczne i programowe. Unikalnym rozwiązaniem implementowanego programu jest rozbudowana baza danych pacjenta, gdzie są przechowywane „żywe” sygnały EMG razem z ich końcowymi wynikami. Szybki ich przegląd pozwala prześledzić wszystkie procedury, od pomiaru, sposobu przetwarzania, analizy, do wyświetlania i interpretacji końcowych wyników. Jest to niezwykle pomocne przy głębszym poznaniu mechanizmów kompensacyjnych, ich skuteczności i ograniczeń zależnie od rodzaju i wielkości uszkodzenia, odpowiedzialnych za kliniczny stan mięśnia.

Piśmiennictwo

1. Buchthal F. An introduction to Electromyography. Gyldendal, Copenhagen 1957.
2. Stalberg E, Falck B, Sonoo M and Astrom M.: Multi-MUP analysis a two year experiences in daily clinical work. *Electroencephalography and clinical Neurophysiology* 1995; 97: 145-154.
3. Fuglsang-Frederiksen A. Turns-amplitude analysis of the EMG interference pattern. *Methods in Clinical Neurophysiology*, 1993; 4-81-100.
4. Ming Chan K, Timothy J, Doherty TJ, and Brown WF. Contractile properties of human motor units in health, aging, and disease. *Muscle Nerve*. 2001; 24: 1113-1133.
5. Kopec J and Hausmanowa-Petrusewicz J. On-line computer application in clinical quantitative EMG. *Electromyogr.Clin.Neurophysiol*. 1976; 49-64.
6. Kopec J. EMG-LAB computer system for routine electromyography. *Electromyogr. Clin.Neurophysiol*. 1993; 33: 173-184.
7. Kopec J, Emeryk-Szajewska B. „Functional-QEMG” a new reliable method in daily routine investigation. *Electromyogr. Clin.Neurophysiol*. 2002; 42: 495-506.
8. Kopec J. Metoda “Functional-QEMG” –zasadniczy postęp w elektromiografii (EMG). *NEUROL. NEUROCHIR.POL.*2003 T.37 (LIII) Nr 3: 547-560.
9. Kopec J, Emeryk-Szajewska B. Tracking and measuring the compensatory response of neuromuscular system to disease in routine EMG in examination. Abstracts. 28 th International Congress of Clinical Neurophysiology, Edinburgh 2006.

Adres korespondencyjny:

Jerzy Kopec,
Klinika Neurologii,
Warszawski Uniwersytet Medyczny,
ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa,
tel.: (022) 833 78 24,
e-mail jkopec@wum.edu.pl

Modulująca rola synaps elektrycznych w generowaniu hipokampalnego rytmu theta u anestetyzowanego szczura

The modulatory role of gap junctions in the generation of hippocampal theta rhythms in the anesthetized rat

Renata Bocian, Anna Postuszny, Tomasz Kowalczyk, Henryk Gołębiowski, Jan Konopacki
Katedra Neurobiologii, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

W prezentowanej pracy badano rolę synaps elektrycznych formacji hipokampa (HPC) w generowaniu lokalnie rejestrowanego rytmu theta. W tym celu w dwóch niezależnych grupach doświadczalnych wykonywane zostały iniekcje blokera synaps elektrycznych (karbenoksolonu) oraz ich otwieracza (trimetyloaminy). Dohipokampalne iniekcje karbenoksolonu prowadziły do zaniku rytmu theta. Hamujący efekt iniekcji tego blokera pojawił się 30 min po podaniu, był długotrwały, lecz w pełni odwracalny. Natomiast dohipokampalne iniekcje trimetyloaminy wywoływały dobrze zsynchronizowany rytm o podwyższonej amplitudzie i mocy. Wpływ iniekcji tego związku był również odwracalny. Uzyskane w obecnej pracy wyniki dostarczają pierwszych dowodów wskazujących na udział synaps elektrycznych formacji hipokampa w mechanizmach synchronizacji leżących, u podstaw generowania spontanicznego rytmu theta u uretanizowanych szczurów.

Słowa kluczowe: rytm theta, synapsy elektryczne, *in vivo*

Abstract

The role of gap junction coupling in the generation of hippocampal (HPC) theta rhythms in urethanized rats was investigated in the present study. Specifically, we analyzed the effects of HPC infusions of a gap junction blocker, carbenoxolone, and a gap junction opener, trimethylamine, on theta rhythms. Injection of carbenoxolone abolished spontaneous HPC theta activity. This inhibitory effect developed approximately 30 min. after drug administration and was found to be long lasting, but fully reversible. However, intrahippocampal injection of trimethylamine evoked well synchronized theta rhythms with increased amplitude and power. This effect was also reversible.

The data obtained in the present study provides the first evidence for the contribution of HPC gap junctions to the mechanisms underlying neuronal synchrony allowing the production of spontaneous theta activity in urethanized rats.

Key Words: theta rhythm, gap junctions, *in vivo*

Wstęp

Rytm theta jest elektroencefalograficznym (EEG) wzorcem aktywności hipokampa, związanym z procesami tworzenia śladów pamięciowych, orientacją w przestrzeni oraz integracją czuciowo-ruchową [1, 2, 3, 4]. Obecnie wiadomo, że ekspresja różnych stanów funkcjonalnych mózgu wymaga działania, co najmniej dwóch, komplementarnych systemów komunikacji międzykomórkowej. Pierwszy to podlegające złożonej modulacji szlaki transmisji chemicznej. Drugi realizowany jest dzięki utrzymywaniu ciągłości cytoplazmy między komórkami za pośrednictwem struktur określanych jako synapsy elektryczne (połączenia szczelinowe, ang. *gap junctions*) [5]. Aktywność synaps elektrycznych sprawia, że w obszarze wielu komórek nerwowych odbywa się bezpośrednia i natychmiastowa wymiana jonów i innych małych molekuł zapewniających przekazywanie sygnałów metabolicznych. Realizowana w ten sposób koordynacja procesów fizjologicznych całych grup komórek tworzących sieć neuronalną stanowi prawdopodobne podłoże synchronizacji, która leży u podstaw powstawania zjawisk rytmicznych w polowym sygnale EEG [6, 7].

Wcześniejsze badania elektrofizjologiczne, prowadzone w warunkach *in vitro*, potwierdziły znaczenie synaps elektrycznych dla generowania dwóch rodzajów aktywności oscylacyjnej formacji hipokampa (HPC): rytmu gamma [7] oraz tzw. szybkich oscylacji [6]. Mocny argument przemawiający za tym, że główną rolą synaps elektrycznych jest warunkowanie procesów synchronizacji

per se, stanowi ich ścisły związek z powstawaniem hipokampalnych wyładowań epileptycznych [8].

Stwierdzenie obecności synaps elektrycznych w polach CA1, CA3 oraz w zakręcie zębatym hipokampa, uważanych za wewnątrzhipokampalne generatory rytmu theta, stało się kolejną ważną przesłanką zachęcającą do badań roli połączeń szczelinowych w powstawaniu tego rytmu [8, 9]. Przeprowadzone przez nasz zespół doświadczenia dostarczyły pierwszego bezpośredniego dowodu wskazującego na bezpośredni udział synaps elektrycznych w powstawaniu hipokampalnego rytmu theta. W badaniach *in vitro* prowadzonych na skrawkach hipokampa z wykorzystaniem naszego modelu indukowanej karbacholem aktywności theta, sprawdzany był wpływ oddziaływania karbenoksolonu i chininy, związków blokujących synapsy elektryczne [10]. Efektem podania obu blokerów było całkowite zniesienie wywołanego karbacholem rytmu theta. Uzyskane wyniki wskazały zatem, że aktywność synaps elektrycznych formacji hipokampa stanowi jeden z kluczowych mechanizmów niezbędnych dla powstawania rytmu theta w warunkach pozaustrojowych.

W doświadczeniach *in vivo*, przeprowadzonych na swobodnie poruszających się kotach, badano wpływ dwóch blokerów synaps elektrycznych, karbenoksolonu i chininy, na hipokampalny rytm theta [11]. Związki te podawano bezpośrednio do hipokampa lub obwodowo. W pierwszym przypadku odnotowano znaczące zmniejszenie amplitudy rytmu theta, w drugim jego całkowite zablokowanie. W każdym wariancie obserwowany efekt rozwijał się wolno i okazał się w pełni odwracalny. W ten sposób po raz pierwszy udokumentowano istotną rolę synaps elektrycznych w powstawaniu i utrzymywaniu rytmu theta w warunkach ustrojowych.

W celu rozszerzenia zakresu badań nad zagadnieniem roli synaps elektrycznych w mechanizmie ekspresji hipokampalnego rytmu theta, postanowiliśmy przeprowadzić serię doświadczeń, wykorzystując stosowany w wielu laboratoriach model uretanizowanego szczura. W niniejszej pracy sprawdzaliśmy wpływ dohipokampalnych iniekcji dwóch, przeciwstawnie działających na synapsy elektryczne, związków: karbenoksolonu – blokera synaps elektrycznych oraz trimetyloaminy – ich otwieracza. Oba zastosowane farmaceutyki w sposób spektakularny wpływały na spontanicznie generowany rytm theta. Konkretnie, karbenoksolon zmniejszał amplitudę i moc rytmu theta, natomiast trimetyloamina wywoływała wyraźne zwiększenie amplitudy i mocy ba-

danego rytmu. Oba obserwowane wpływy były odwracalne.

Materiały i metody

Doświadczenia przeprowadzone zostały na 20 szczurach, samcach linii Wistar, o masie ciała 120-150 g. Wszystkie zwierzęta przed przystąpieniem do doświadczeń poddane zostały dwuetapowej narkozie. W pierwszym etapie zwierzęta wprowadzane były w stan ogólnego znieczulenia przez zastosowanie anestetyku wziewnego – halotanu. Następnie, u uspijonych w ten sposób zwierząt, preparowano żyłę jarzmową, do której wprowadzano kateter wypełniony drugim anestetykiem – uretanem.

Tak przygotowane zwierzęta umieszczano w aparacie stereotaktycznym w celu implantacji elektrody rejestracyjnej w formacji hipokampa oraz kaniuli iniekcyjnej. Standardowo wszystkim zwierzętom elektrodę rejestracyjną implantowano prawostronnie zgodnie ze współrzędnymi ustalonymi na podstawie atlasu stereotaktycznego mózgu szczura (F = -3,2 mm; L = 2,2 mm; H = 2,6-2,8 mm) [12]. Kaniuła iniekcyjna znajdowała się zawsze po lewej stronie mózgu, a miejsce jej implantacji wyznaczane było zgodnie z następującymi współrzędnymi F = -3,2 mm; L = 2,2 mm; H = 3,1 mm (Rycina 1) [12].

Po wykonaniu powyższych czynności przystępowano do doświadczeń, które zawsze rozpoczynała kontrolna rejestracja spontanicznej aktywności EEG formacji hipokampalnej, przeprowadzana bezpośrednio przed iniekcją określonego związku farmakologicznego. Po zapisaniu sekwencji kontrolnej, w dwóch oddzielnych seriach doświadczalnych, zwierzęta poddawane były dohipokampalnym iniekcjom karbenoksolonu (blokera synaps elektrycznych) oraz trimetyloaminy (otwieracza synaps elektrycznych). Dodatkowo wykonana została grupa doświadczeń kontrolnych, których celem było określenie wpływu iniekcji 0,9% NaCl na aktywność połową theta.

W doświadczeniach, podczas których dokonywano dohipokampalnych iniekcji soli fizjologicznej i karbenoksolonu, kolejne poiniekcyjne rejestracje hipokampalnej aktywności elektroencefalograficznej prowadzone były co 30 minut przez pierwsze 2 godziny po iniekcji, a następnie co godzinę, aż do 10 godziny po podaniu każdego z wyżej wymienionych związków. W ostatniej serii doświadczalnej, w której podawano do formacji hipokampalnej trimetyloaminę, poiniekcyjne rejestracje wykonywane były, podobnie jak w dwóch wcześniejszych seriach doświadczalnych, najpierw

co 30 minut przez 2 godziny po iniekcji, a następnie co godzinę do 4 godziny po dohipokampalnym podaniu tego związku.

Po zakończeniu doświadczeń hipokampalna aktywność EEG analizowana była przy użyciu programu komputerowego *Spike 2* (Cambridge Electronic Design). Z trwających po 200 s fragmentów zapisu aktywności spontanicznej wybierano po trzy dwusekundowe epizody rytmu theta. Następnie, każdy z epizodów poddawany był analizie opartej na algorytmie szybkiej transformacji Fouriera (FFT). Analiza FFT umożliwiała dokładne określenie wartości dominującej częstotliwości rytmu theta, a także jej mocy. Amplituda rejestrowanego rytmu odczytywana była bezpośrednio z analogowego zapisu odtwarzanego sygnału na podstawie kalibracji z osi współrzędnych.

Otrzymane podczas doświadczeń wartości amplitudy oraz częstotliwości rytmu theta (w poszczególnych sekwencjach czasowych), przed iniekcją i po podaniu leku, poddawane były analizie statystycznej. Opracowanie statystyczne w całości wykonane zostało przy użyciu programu komputerowego *Statistica 6.0 PL*. W pierwszej kolejności obliczano wartość średnią (\bar{x}_{sr}) oraz błąd standardowy średniej (SE) dla wyżej wymienionych parametrów. Następnie, w celu zbadania różnic pomiędzy parametrami rytmu theta rejestrowanego w poszczególnych sekwencjach czasowych serii kontrolnej z odpowiednimi wartościami rejestrowanymi w poszczególnych sekwencjach czasowych serii doświadczalnych, podczas których podawano dohipokampalnie karbenoksolon i chininę, zastosowano test U Manna-Whitneya [13].

Wyniki

Wpływ dohipokampalnych iniekcji 0,9% NaCl na lokalnie rejestrowany rytm theta – seria doświadczalnych kontrolnych

U zwierząt grupy kontrolnej, u których do HPC podawano sól fizjologiczną (w objętości 1 μ l) przez pierwsze dwie godziny parametry rytmu theta pozostawały na poziomie wartości rejestrowanych przed iniekcją (Rycina 2). Od 3 godziny aż do ostatniej rejestracji, tj. 10 godzin po dohipokampalnej iniekcji 0,9% NaCl, obserwowano stopniowy spadek amplitudy i mocy hipokampalnego rytmu theta. Najprawdopodobniej stopniowe obniżanie się wartości tych parametrów spowodowane było postępującym odwodnieniem zwierzęcia, a nie wskutek iniekcji.

Godny uwagi jest fakt, że obniżeniu amplitudy i mocy towarzyszył brak zmian częstotliwości rytmu theta (Rycina 2).

Wpływ dohipokampalnych iniekcji karbenoksolonu (bloker synaps elektrycznych) na lokalnie rejestrowany rytm theta

Po dohipokampalnych iniekcjach karbenoksolonu w dawce 100 μ g/1 μ l w pierwszej poiniekcyjnej sekwencji czasowej, tj. 30 minut po iniekcji, nastąpił wyraźny i istotny statystycznie spadek średniej wartości amplitudy i mocy rytmu theta w porównaniu z wartościami obserwowanymi w tej samej sekwencji czasowej doświadczeń kontrolnych (Rycina 2, 4A). Podczas kolejnych dwóch rejestracji obserwowano dalszy spadek amplitudy i mocy, a 3 godziny po dohipokampalnych iniekcjach karbenoksolonu zaobserwowano zanik rytmu theta z zapisu aktywności EEG formacji hipokampa. W tym czasie rejestrowano wyłącznie aktywność zdesynchronizowaną (ang. *large irregular activity*, LIA). Pojedyncze epizody rytmu theta zaobserwowano ponownie po upływie 6. godzin od dokonanych mikroiniekcji. Jednak średnie wartości amplitudy i mocy badanego wzorca EEG były mniejsze od wartości obserwowanych w tym samym czasie w serii doświadczeń kontrolnych. Stopniowy wzrost wyżej wymienionych parametrów notowany był w kolejnych dwóch sekwencjach czasowych (w 7 i 8 godzin po iniekcji), jednak średnie wartości amplitudy i mocy w dalszym ciągu były niższe w porównaniu z wartościami tych parametrów rejestrowanymi w tym samym czasie w serii doświadczeń kontrolnych. Dopiero w 9. godzinie od chwili iniekcji karbenoksolonu do HPC, średnie wartości mocy rytmu theta były porównywalne z wartościami mocy rejestrowanymi w serii doświadczeń kontrolnych. Amplituda ostatecznie osiągnęła poziom porównywalny z wartościami rejestrowanymi w serii kontrolnej dopiero w ostatniej sekwencji rejestracyjnej, czyli 10 godzin po iniekcji (Rycina 2, 4A).

Należy podkreślić, że częstotliwość badanej aktywności EEG nie uległa zmianie w trakcie doświadczeń i utrzymywała się na poziomie zbliżonym do rejestrowanego w serii doświadczeń kontrolnych (Rycina 2, 4A).

Wpływ dohipokampalnych iniekcji trimetyloaminy (otwieracza synaps elektrycznych) na lokalnie rejestrowany rytm theta

Po iniekcjach trimetyloaminy w dawce 15 μ g/1 μ l do formacji hipokampa w pierwszej poiniekcyjnej sekwencji czasowej (30 minut po iniekcji) nastąpił istotny statystycznie wzrost średnich wartości amplitudy i mocy rytmu theta w porównaniu z wartościami obserwowanymi w tej samej sekwencji czasowej doświadczeń kontrolnych. W kolejnej sekwencji czasowej, czyli godzinę po iniekcji, amplituda i moc rytmu osiągnęły najwyższe wartości. Półtorej godzi-

ny po iniekcji trimetyloaminy do HPC obserwowano stopniowe obniżenie średnich wartości amplitudy i mocy aż do osiągnięcia, w 3. godzinie po iniekcji, wartości porównywalnych z tymi uzyskanymi w grupie kontrolnej (Rycina 3, 4B).

Podobnie jak w serii doświadczeń, podczas których do HPC podawano karbenoksolon, po iniekcjach trimetyloaminy nie zaobserwowano zmian w częstotliwości aktywności polowej theta (Rycina 3, 4B).

Dyskusja

Dohipokampalne iniekcje dwóch związków przeciwnie działających na aktywność synaps elektrycznych: karbenoksolonu i trimetyloaminy, ujawniły dwa, antagonistyczne względem siebie, wpływy na lokalnie generowany rytm theta. Karbenoksolon, bloker synaps elektrycznych, stopniowo tłumił hipokampalną aktywność theta, aż do całkowitego jej zniesienia. Trimetyloamina, otwieracz synaps elektrycznych, przeciwnie – powodowała wyraźny wzrost amplitudy i wzmocnienie synchronizacji fal w paśmie theta. Otrzymane rezultaty badań stanowią bezpośredni dowód na krytyczne znaczenie synaps elektrycznych w ekspresji rytmu theta w hipokampie uretanizowanych szczurów.

Działanie zastosowanych związków różniło się nie tylko kierunkiem wywoływanych zmian, lecz także dynamiką ich przebiegu. Skutki iniekcji karbenoksolonu ujawniały się stopniowo, powodując po 3 godzinach całkowite zahamowanie aktywności theta. Także ustępowanie działania tego związku było znacznie przedłużone. Pierwsze epizody rytmu theta, pojawiające się po indukowanej karbenoksolonem blokadzie, zarejestrowane zostały po około 6 godzinach od podania związku, lecz dopiero w 10. godzinie parametry rytmu osiągnęły wartości kontrolne (tj. porównywalne z grupą otrzymującą sól fizjologiczną). Efekt trimetyloaminy ujawniał się po 30 minutach, osiągając swoje maksimum w godzinę po podaniu związku. Po 3 godzinach od iniekcji parametry rytmu powracały do wartości kontrolnych. Zróznicowanie dynamiki procesów wywoływanych przez badane farmaceutyki może sugerować, że oba związki wykorzystują odmienne mechanizmy oddziaływania na synapsy elektryczne. Uzyskane w tej pracy wyniki nie upoważniają jednak do dokładnej analizy możliwego molekularnego substratu leżącego u podstaw działania obu związków na synapsy elektryczne.

Jak pokazały nasze badania, wpływ blokujący karbenoksolonu na rytm theta jest odwracalny, lecz jego zniesienie wymaga wielu godzin. Jednocześnie, amplituda i moc pojawiającego się ponownie rytmu nigdy nie osiągały wartości sprzed iniekcji związku. Z tego powodu także w doświadczeniach kontrol-

nych (z iniekcją soli fizjologicznej) należało rozszerzyć zakres rejestracji hipokampalnego EEG tak, aby zbadać, czy czas, a dokładniej kumulacja skutków wielogodzinnych doświadczeń *per se*, zmieniają parametry rytmu theta. Okazało się, że w warunkach kontrolnych tylko przez pierwsze 2 godziny po iniekcji rytm theta utrzymuje wyjściowe wartości amplitudy i mocy. Później obserwuje się stopniowe zmniejszanie tych parametrów. Wyniki długotrwałej rejestracji EEG ujawniły wyraźny wpływ dodatkowego czynnika, który oddziałuje na amplitudę i moc rytmu theta. Jest nim czas trwania doświadczenia. W celu wyeliminowania zmiennej czasu z obrazu zmian aktywności theta, dane uzyskane po iniekcji karbenoksolonu porównywane były z wynikami otrzymanymi w odpowiednich sekwencjach czasowych w doświadczeniach kontrolnych.

Interesującym zagadnieniem jest sam czas odroczenia wpływu działania karbenoksolonu. Co ciekawe, podobny czas odroczenia wpływu karbenoksolonu na rytm theta (około godziny), a później jego zniesienia został zaobserwowany w naszych poprzednich doświadczeniach przeprowadzonych na swobodnie poruszających się kotach [11]. Zestawienie rezultatów obu prac może wskazywać, że podłoże odroczonego i długotrwałego działania karbenoksolonu jest podobne u obu badanych gatunków i nie zależy od przyjętego modelu doświadczalnego (swobodnie poruszające się koty vs. uretanizowane szczury). Jak wcześniej sugerowano, proces odroczenia wpływu karbenoksolonu na synapsy elektryczne może być wynikiem potranslacyjnej fosforylacji podjednostek białkowych budujących konekson [14].

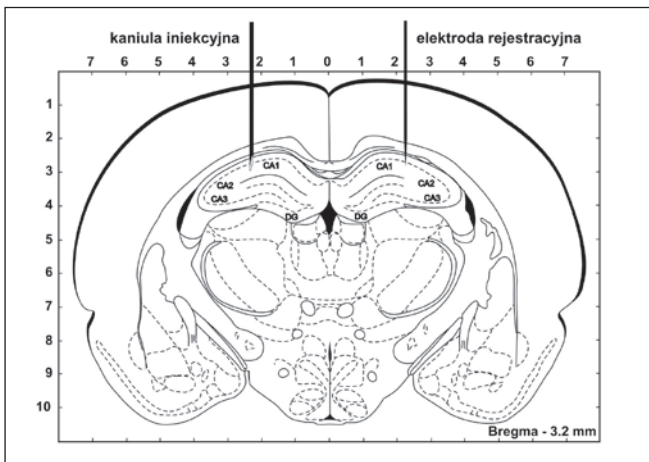
Dohipokampalne iniekcje zarówno karbenoksolonu, jak i trimetyloaminy, wywierały wpływ na amplitudę oraz moc sygnału w paśmie theta. Częstotliwość rytmu pozostawała jednak niezmienną. Fakt ten znajduje potwierdzenie we wcześniejszych badaniach dotyczących niezależnej regulacji amplitudy i mocy oraz częstotliwości rytmu theta. Dzięki nim wiadomo, że kontrola parametrów rytmu theta odbywa się na drodze wzajemnej współpracy szeregu struktur zlokalizowanych na różnych piętrach mózgowia [4, 15]. Substrat neuronalny środkowej przegrody i hipokampa programuje amplitudę rytmu theta [4, 16, 17], podczas gdy struktury niższych partii mózgowia regulują zarówno jego częstotliwość, jak i amplitudę lub tylko częstotliwość [4, 18]. W ten sposób wpływ eksperymentalnych manipulacji na poziomie hipokampa ogranicza się jedynie do zmian amplitudy i mocy hipokampalnego rytmu theta.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań na modelu uretanizowanego szczura wskazują, że aktywność synaps elektrycznych stanowi drugi, komplementarny względem układów przekąźnictwa

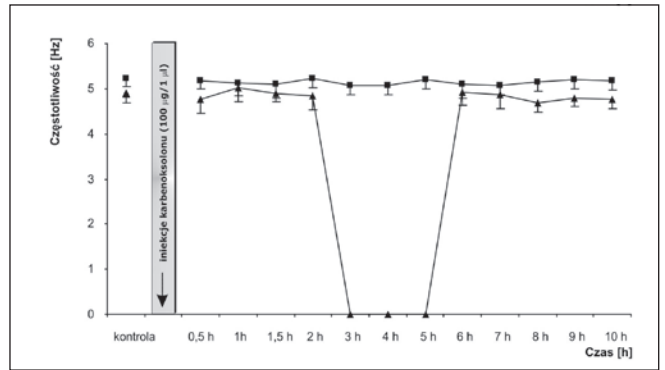
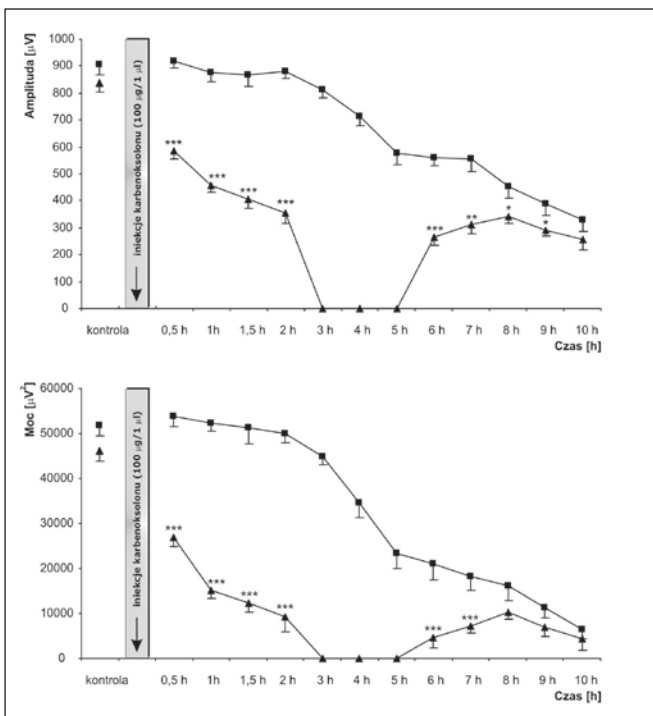
chemicznego, mechanizm generowania rytmu theta, równie niezbędny dla jego powstawania. O ile udział przewodnictwa elektrycznego w powstawaniu rytmu theta jest niewątpliwy – wskazują na to nasze obecne jak i wcześniejsze badania przeprowadzone na odmiennych modelach badawczych [10, 11], o tyle problemem otwartym pozostaje mechanizm działania modulatorów synaps elektrycznych. Zagadnienie to wymaga oddzielnych badań.

Podziękowania

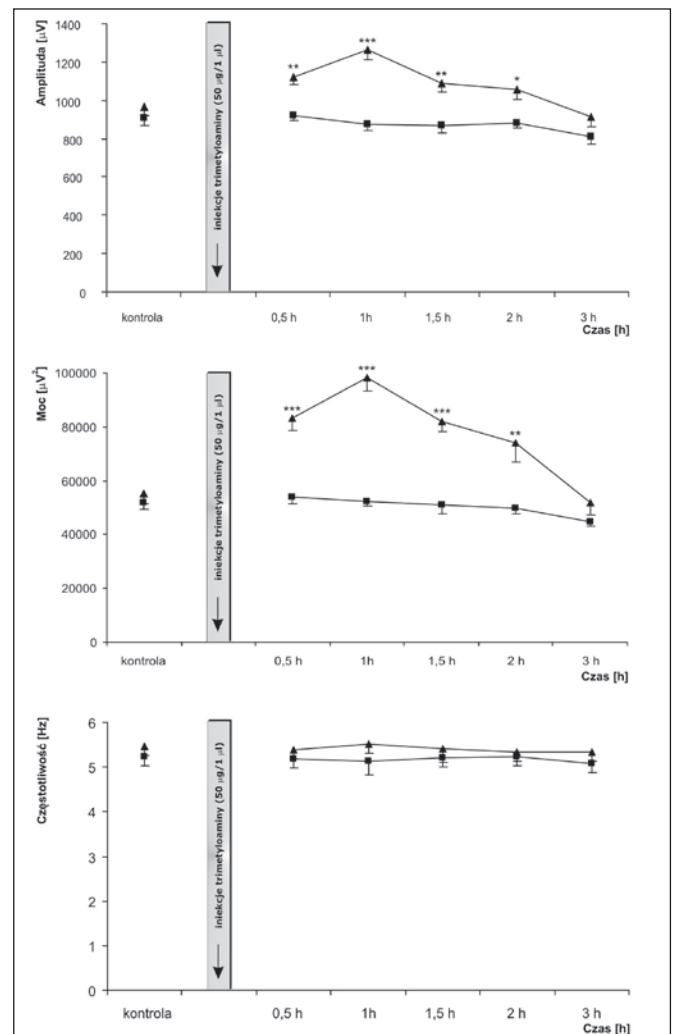
Praca finansowana z grantu Nr N401 2811 33.



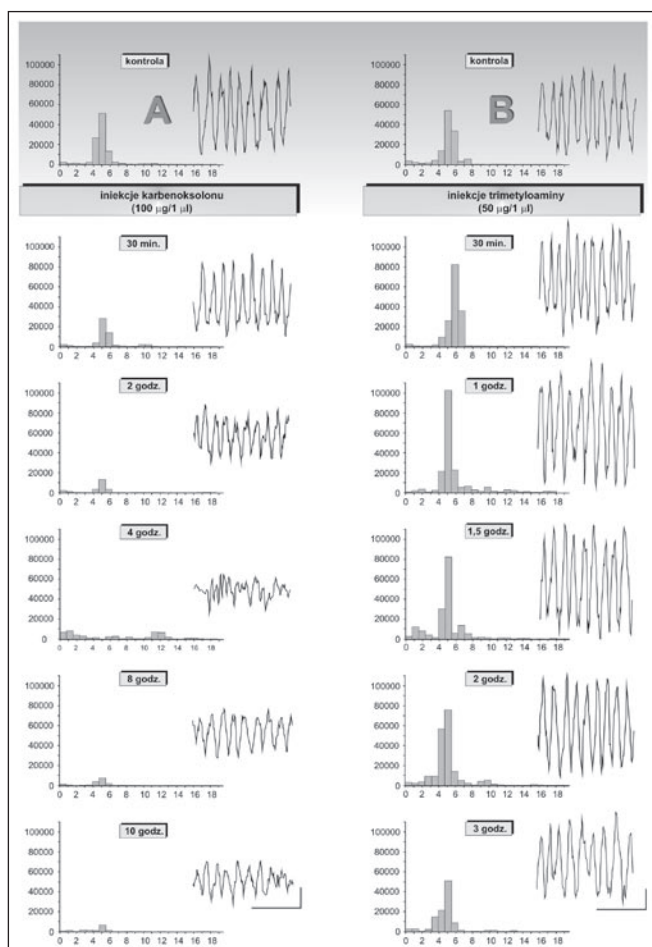
Rycina 1. Schemat przedstawiający lokalizację kaniuli iniekcyjnej oraz elektrody rejestracyjnej implantowanych do formacji hipokampa (HPC). Rycina opracowana na podstawie atlasu stereotaktycznego mózgu szczura [12].



Rycina 2. Dynamika zmian podstawowych parametrów spontanicznego rytmu theta rejestrowanego z formacji hipokampa po iniekcjach soli fizjologicznej (■) oraz karbenoksolonu (▲). Analiza statystyczna: U-test Manna-Whitneya (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs grupa kontrolna).



Rycina 3. Dynamika zmian podstawowych parametrów spontanicznego rytmu theta rejestrowanego z formacji hipokampa po iniekcjach soli fizjologicznej (■) oraz trimetyloaminy (▲). Analiza statystyczna: U-test Manna-Whitneya (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001 vs grupa kontrolna).



Rycina 4. Wpływ dohipokampalnych iniekcji karbenoksolonu (A) i trimetyloaminy (B) na spontaniczny rytm theta rejestrowany z formacji hipokampa. Rycina przedstawia dwusekundowe epizody rytmu theta z zapisu hipokampalnej aktywności EEG rejestrowanej przed iniekcją karbenoksolonu i trimetyloaminy (kontrola) oraz w wybranych poiniekcyjnych sekwencjach czasowych (kalibracja: 1 s/200 μ V). Histogramy dotyczą przedstawionych fragmentów zapisu analogowego (oś X – Hz, oś Y – μ V²).

Piśmiennictwo

1. Abel T., Kandel E. Positive and negative regulatory mechanisms that mediate long-term memory storage. *Brain Res. Rev.* 1998; 3: 317-330.
2. Eichenbaum H., Otto T., Cohen N.J. The hippocampus – what does it do? *Behav. Neural. Biol.* 1992; 57: 2-36.
3. O'Keefe J., Recce M.L. Phase relationship between hippocampal place units and the EEG theta rhythm. *Hippocampus* 1993; 3: 317-330.
4. Bland B.H., Oddie S.D. Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. *Behav. Brain Res.* 2001; 127: 119-136.

5. Kumar N.M., Gilula N.B. Cloning and characterization of human and rat liver cDNA encoding for a gap junction protein. *J. Cell Biol.* 1986; 103: 767-776.
6. Traub R.D., Whittington M.A., Buhl E.H., LeBeau F.E.N., Bibbig A., Boyd S., Cross H., Baldeweg T. A possible role for gap junctions in generation of very fast EEG oscillations preceding the onset of, and perhaps initiating, seizures. *Epilepsia* 2001; 42: 153-170.
7. Traub R.D., Kopell N., Bibbig A., Buhl E.H., LeBeau F.E.N., Whittington M.A. Gap junctions between interneuron dendrites can enhance synchrony of gamma oscillations in distributed networks. *J. Neurosci.* 2001a; 21: 9478-9486.
8. Ross F.M, Gwyn P., Spanswick D., Davies S.N. Carbenoxolone depresses spontaneous epileptiform activity in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuroscience* 2000; 100: 789-796.
9. Nunez A., Garcia-Austt E., Buno W. *In vivo* electrophysiological analysis of lucifer yellow-coupled hippocampal pyramids. *Exp. Neurol.* 1990; 108: 76-82.
10. Konopacki J., Kowalczyk T., Gołębiewski H. Electrical coupling underlies theta oscillations recorded in hippocampal formation slices. *Brain Res.* 2004; 1019: 270-274.
11. Gołębiewski H., Eckersdorf B., Konopacki J. Electrical coupling underlies theta rhythm in freely moving cats. *Eur. J. Neurosci.* 2006; 24, 6: 1759-70.
12. Paxinos G., Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.* Academic Press 2005.
13. Pagano R.R. *Understanding statistics in the behavioral sciences.* West Publishing Company, USA, 1986.
14. Spray D.C., Rozental R., Srinivas M. Prospects of rational development of pharmacological gap junction channel blockers. *Curr. Drug Targets* 2002; 3: 455-464.
15. Oddie S.D., Stefanek W., Kirk I.J., Bland B.H. Intraseptal procaine abolishes hypothalamic stimulation-induced wheel-running and hippocampal theta field activity in rats. *J. Neurosci.* 1996; 16, 5: 1948-56.
16. Smythe J.W., Colom L.V., Bland B.H. The extrinsic modulation of hippocampal theta depends on the coactivation of cholinergic and GABA-ergic medial septal inputs. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1992 Fall; 16, 3: 289-308.
17. Bland B.H., Colom L.V. Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Prog. Neurobiol.* 1993; 41: 157-208.
18. Kirk I.J., Oddie S.D., Konopacki J., Bland B.H. Evidence for differential control of posterior hypothalamic, supramammillary, and medial mammillary theta-related cellular discharge by ascending

and descending pathways. *J. Neurosci.* 1996; 16: 5547-5554.

Adres korespondencyjny:
Renata Bocian,

Katedra Neurobiologii,
Uniwersytet Łódzki,
ul. Rewolucji 1905 r. 66, 90-222 Łódź,
tel.: (0 42) 665 56 74, fax (0 42) 665 56 71,
renab@biol.uni.lodz.pl

Udział zakrętu zębatego formacji hipokampa w generowaniu rytmu theta *in vitro*

The contribution of the dental gyrus in the generation of hippocampal theta rhythm *in vitro*

Tomasz Kowalczyk, Henryk Gołębiowski, Piotr Nockowski, Renata Bocian, Anna Posłuszny, Jan Konopacki
Katedra Neurobiologii, Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

W obecnych doświadczeniach badano zdolność obszaru komórek ziarnistych zakrętu zębatego (DG) do samodzielnego generowania rytmu theta, powstającego w warunkach *in vitro* w wyniku tonicznego pobudzenia cholinergicznego. W badaniach posłużono się dwiema technikami: i/rejestracją profilu warstwowego rytmu theta, ii/rejestracją aktywności EEG skrawków częściowych. Analiza profilu warstwowego rytmu wykazała brak zmiany fazy oraz brak szczytu amplitudy rejestrowanej aktywności theta w obszarze zakrętu zębatego. Ponadto stwierdzono, że żaden z 32 przebadanych skrawków częściowych DG nie generował rytmu theta w odpowiedzi na perfuzję roztworem karbacholu. Uzyskane wyniki sugerują, że obszar górnej blaszki zakrętu zębatego nie jest zdolny do niezależnego generowania rytmu theta w warunkach *in vitro*.

Słowa kluczowe: rytm theta, *in vitro*, profil warstwowy, zakręt zębaty

Abstract

The ability of the dental gyrus (DG) to contribute to the independent generation of cholinergically induced theta rhythms was investigated in the present study. Two different techniques were used in these experiments including the recording of theta rhythm laminar profiles, and the recording of transected slices EEG activity. Detailed analysis of the laminar profiles demonstrated that there was no theta phase-shift or peak of theta amplitude in the dentate area. Moreover, the present study has revealed that a DG transected slice is not capable of producing

cholinergically induced theta rhythm itself; none of the 32 slices tested generated theta rhythm. The mechanisms underlying the generation of hippocampal theta rhythm recorded *in vitro* are discussed.

Key Words: theta rhythm, *in vitro*, dentate gyrus, laminar profile

Wstęp

Rytm theta stanowi najbardziej charakterystyczny przykład procesów oscylacyjnych i synchronizacyjnych zachodzących w sieciach neuronalnych ośrodkowego układu nerwowego. Koncepcje dotyczące generowania rytmu theta w formacji hipokampa (HPC) zakładają, że potencjały polowe rejestrowane zewnątrzkomórkowo w postaci rytmicznej aktywności theta, powstają w wyniku przestrzennego sumowania się synchronicznych potencjałów postsynaptycznych generowanych w poszczególnych warstwach HPC. Określenie topografii potencjałów elektrotonicznych powstających w formacji hipokampa podczas generowania rytmu pozwala na identyfikację obszarów komórkowych bezpośrednio biorących udział w powstawaniu aktywności rytmicznej [1]. Badania profili warstwowych fazy oraz amplitudy rytmu theta *in vivo* prowadzone od początku lat 70. ubiegłego wieku wykazały, że istnieją dwa niezależne, wewnątrzhipokampalne generatory theta. Pierwszy z nich zlokalizowano w warstwie wschodowej pola CA1 hipokampa właściwego, a drugi w warstwie ziarnistej zakrętu zębatego (DG). Rytm theta rejestrowany z obu generatorów był odwrócony w fazie o 180° [2, 3, 4, 5, 6].

Pierwszych rejestracji rytmu theta w warunkach pozaustrojowych dokonano pod koniec lat 80 ubie-

głego wieku [7, 8, 9]. Badania prowadzone od tego czasu udowodniły, że aktywność rytmiczna wywołana cholinergicznie w skrawkach formacji hipokampa *in vitro* odtwarza większość cech rytmu theta rejestrowanego w preparatach *in vivo* [7, 10]. Co więcej, wprowadzenie techniki rejestracji EEG w tzw. skrawkach częściowych pozwoliło wykazać, że w obrębie formacji hipokampa istnieje trzeci niezależny generator aktywności rytmicznej, zlokalizowany w obszarze komórek piramidalnych pola CA3c [9]. Wyniki dalszych badań topografii rytmu theta w preparatach HPC prowadzone w naszym laboratorium podważyły jednak koncepcję trzech niezależnych, wewnątrzhipokampalnych generatorów aktywności rytmicznej. W doświadczeniach tych analizowaliśmy przebieg zmian fazy i amplitudy rytmu theta *in vitro* [11]. Otrzymane wyniki (brak zmiany fazy oraz brak szczytu amplitudy fal theta w obszarze zakrętu zębatego) wskazywały, że obszar DG, uznawany wcześniej za niezależny generator theta, może nie brać udziału w powstawaniu tego rodzaju aktywności EEG w formacji hipokampa.

Celem obecnych badań jest ostateczne zweryfikowanie hipotezy trzech niezależnych generatorów rytmu theta w formacji hipokampa, a w szczególności określenie, czy obszar grzbietowej blaszki zakrętu zębatego generuje rytm theta niezależnie od pól CA1 i CA3c. Aby odpowiedzieć na tak postawione pytania, posłużyliśmy się dwiema technikami doświadczalnymi: i/rejestracją profilu warstwowego fazy i amplitudy rytmu theta, ii/rejestracją aktywności EEG skrawków częściowych HPC.

Materiały i metody

Doświadczenia przeprowadzono na 92 preparatach pobranych od 50 szczurów. Zwierzęta były anestetyzowane eterem, dekapitowane, a z mózgow preparowane były skrawki formacji hipokampa (~500 μm). Technika utrzymywania preparatów w warunkach pozaustrojowych przedstawiona została we wcześniejszych pracach [8, 9, 11]. Aktywność EEG wywoływana była perfuzją preparatów roztworem karbacholu (50 μM) w sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym. Sygnał EEG rejestrowany był przy użyciu elektrod szklanych o oporności 3-5 M Ω . Przeprowadzono dwa cykle doświadczalne.

Profil warstwowy rytmu theta

Badania przeprowadzono na 35 preparatach HPC pobranych od 20 szczurów. W każdym doświadczeniu aktywność EEG rejestrowana była przy użyciu dwóch elektrod: stacjonarnej, umieszczonej w warstwie wschodowej pola CA1 oraz wędrującej, przemieszczanej wzdłuż grzbietobrzuszej osi pre-

paratu w 22 punktach przez pole CA1, górną blaszkę DG, wnękę oraz dolną blaszkę DG (Rycina 2A, B). Analiza zapisów aktywności EEG dokonywana była przy użyciu programu *Spike 2.4* (Cambridge Electronic Design Ltd.). Badano zmiany amplitudy oraz fazy rytmu w kolejnych punktach rejestracyjnych elektrody wędrującej. Amplitudę w danym punkcie przedstawiano jako procent wartości amplitudy rytmu theta rejestrowanego przez elektrodę stacjonarną. Zmiany fazy rytmu theta rejestrowanego w kolejnych punktach w stosunku do rytmu rejestrowanego jednocześnie przez elektrodę stacjonarną obliczano na podstawie algorytmu kroskorelacji (256 Hz) pomiędzy dwusekundowymi odcinkami rytmu rejestrowanymi przez obie elektrody.

Rejestracja EEG skrawków częściowych

Doświadczenia przeprowadzono na 57 skrawkach częściowych pobranych od 30 zwierząt. W badaniach użytych zostało 15 skrawków częściowych pola CA1, 10 skrawków częściowych pola CA3c oraz 32 skrawki częściowe obszaru DG. Rycina 1 szczegółowo przedstawia technikę preparowania wszystkich trzech rodzajów skrawków częściowych formacji hipokampa. Analizie poddano następujące parametry rejestrowanego rytmu theta: częstotliwość (obliczana z algorytmu FFT), amplitudę, czas trwania epizodów rytmu theta oraz czas trwania przerw pomiędzy epizodami (określane bezpośrednio z zapisu sygnału EEG; *Spike 2*, Cambridge Electronic Design Ltd.).

Wyniki

Profil warstwowy rytmu theta

Rycina 2 przedstawia lokalizację 22 punktów toru elektrody wędrującej oraz przykłady zapisów rytmu theta. Zaobserwowano dwa szczyty amplitudy rytmu: pierwszy, w warstwie wschodowej pola CA1 i drugi, w warstwie spłotowo-drobinowej pola CA1. Jednocześnie, w warstwie promienistej CA1 zanotowano stopniową zmianę fazy rejestrowanego rytmu theta (Rycina 2C). Szczegółowa analiza profilu warstwowego fazy wykazała, że gdy elektroda wędrująca znajdowała się w warstwie piramidowej pola CA1 hipokampa właściwego (punkt 2), zaobserwowano pierwszą wyraźną zmianę fazy rytmu theta. W dalszych punktach toru, zlokalizowanych w warstwie promienistej pola CA1 (punkty 2-6) zarejestrowano stopniową zmianę fazy rytmu, która osiągnęła wartość 180° w okolicach warstwy spłotowo-drobinowej (punkt 7). Następnie, rytm rejestrowany z kolejnych warstw skrawka formacji hipokampalnej pozostawał odwrócony w fazie w stosunku do rejestrowanego jednocześnie przez elektrodę

stacjonarną o ok. 180° (punkty 7-18). W okolicach komórek ziarnistych dolnej blaszki DG zmiana fazy rejestrowanego rytmu spadła do ok. 150° (punkty 19-22) (Rycina 2D).

Zmiany wartości amplitudy rytmu theta przedstawione zostały jako procent wartości amplitudy rytmu rejestrowanego jednocześnie przez elektrodę stacjonarną (amplituda w punkcie 0 równa 100%, Rycina 2E). Pierwszy wyraźny szczyt amplitudy rytmu zaobserwowano w warstwie wschodowej pola CA1 (punkt 1). Następnie, amplituda rejestrowanego sygnału spadała, osiągając minimalną wartość tuż pod warstwą piramidową CA1 (punkt 3). Rytm theta o najwyższej amplitudzie (182% wartości amplitudy rytmu rejestrowanego z punktu odniesienia w warstwie wschodowej pola CA1) obserwowany był w warstwie splotowo-drobinowej (punkt 8). W dalszych punktach rejestracyjnych amplituda rytmu stopniowo spadała, osiągając w ostatnim, 22 punkcie toru, jedynie 24% wartości amplitudy rytmu rejestrowanego przez elektrodę stacjonarną (Rycina 2E).

Rejestracja EEG skrawków częściowych

Przeanalizowano zapisy aktywności EEG z 57 skrawków częściowych, w tym 10 skrawków częściowych CA3c, 15 skrawków częściowych CA1 oraz 32 skrawków częściowych DG. Wykazano, że obszar komórek piramidalnych pola CA3c formacji hipokampalnej jest zdolny do samodzielnego generowania rytmicznej aktywności wolnofalowej (Rycina 3A). W 6 z 10 przebadanych skrawków CA3c (60%), zarejestrowano rytm theta. Ponadto stwierdzono, że odizolowany obszar komórek piramidalnych pola CA1 jest również zdolny do samodzielnego generowania rytmu theta (6 z 15 przebadanych skrawków CA1 – 40%, generowało rytm theta w warunkach tonicznego pobudzenia cholinergicznego). Najważniejszą obserwacją, jakiej dokonano w omawianym cyklu doświadczeń, było stwierdzenie, że żaden z 32 przebadanych skrawków częściowych DG nie generował rytmu theta w wyniku perfuzji skrawków roztworem 50 μ M karbacholu (Rycina 3A).

Porównanie podstawowych parametrów rytmu theta rejestrowanego ze skrawków częściowych CA1 oraz CA3c przedstawione zostało na Rycinie 3B i C. Częstotliwość rytmu theta rejestrowanego ze skrawków CA1 była niższa od częstotliwości obserwowanej w skrawkach CA3c o ok. 0,8 Hz. Średnia wartość amplitudy była wyższa w przypadku rytmu rejestrowanego ze skrawków CA3c o ok. 170 μ V (Rycina 3B). Czas trwania epizodów rytmu theta był dłuższy średnio o ok. 4 sekundy w przypadku rytmu theta rejestrowanego ze

skrawków CA3c, natomiast czas trwania przerwy pomiędzy epizodami był wyraźnie krótszy (o ok. 50 sekund) w przypadku rejestracji ze skrawków CA3c (Rycina 3C).

Dyskusja

Badania topografii rytmu theta rejestrowanego z formacji hipokampa prowadzone były zarówno w warunkach *in vivo*, jak i *in vitro* [2, 3, 4, 5, 6, 11]. W doświadczeniach tych wykazano istnienie trzech podstawowych rodzajów profilu warstwowego rytmu *in vivo* (Rycina 4A i B). Typ I profilu warstwowego obserwowany u znieczulonych uretanem lub unieruchomionych kurarą szczurów charakteryzuje się gwałtowną zmianą fazy rytmu (o 180°), zachodzącą w warstwie promienistej pola CA1. Maksymalne wartości amplitudy rytmu theta rejestrowane są w warstwie wschodowej pola CA1 oraz w okolicach bruzdy hipokampalnej. Charakterystyczną cechą typu I profilu warstwowego jest tzw. „strefa ciszy” (ang. *null zone*), występująca 50-150 μ m poniżej warstwy komórek piramidalnych. W strefie ciszy rytm theta nie jest rejestrowany [2, 3, 6]. Typ II profilu warstwowego występuje u swobodnie poruszających się szczurów. Charakteryzuje się stopniową zmianą fazy rejestrowanego rytmu theta, zachodzącą w warstwie promienistej hipokampa właściwego oraz brakiem „strefy ciszy”. W tym typie profilu rytmu theta osiąga maksymalną amplitudę w okolicach warstwy piramidowej pola CA1 oraz w warstwie drobinowej górnej blaszki zakrętu zębatego [5]. Typ III profilu warstwowego został opisany u znieczulonych uretanem szczurów. W tym przypadku szczyty amplitudy rejestrowanego rytmu theta zlokalizowane są w warstwach: wschodowej oraz splotowo-drobinowej hipokampa właściwego. Zmiana fazy rytmu theta o 180° zachodzi stopniowo, podobnie jak w typie II. W typie III profilu zarejestrowano jednak drugą zmianę fazy rytmu theta występującą w warstwie drobinowej górnej blaszki zakrętu zębatego [4]. Interesujący wydaje się fakt, że badanie topografii rytmu theta w warunkach *in vivo* prowadzono przy założeniu obecności tylko dwóch wewnątrzhipokampalnych generatorów aktywności rytmicznej. Istnieją natomiast dane sugerujące istnienie trzeciego generatora zlokalizowanego w obszarze komórek piramidalnych pola CA3c [9, 12, 13]. W związku z tym badania topografii rytmu theta *in vitro* prowadzono w płaszczyźnie przechodzącej przez wszystkie trzy postulowane generatory rytmu, tzn. przez pole CA1, górną blaszkę DG oraz pole CA3c [11]. W doświadczeniach tych zarejestrowano trzy zmiany fazy: pierwszą, stop-

niową w warstwie promienistej oraz dwie, bardziej gwałtowne zmiany, zachodzące w grzbietowej oraz brzusznej części wnęki (Rycina 4A). Zaobserwowano jednocześnie trzy szczyty amplitudy rytmu theta: w warstwie wschodowej pola CA1, warstwie splotowo-drobinowej CA1 (tuż nad bruzdą hipokampalną) oraz w okolicach warstwy piramidowej pola CA3c (Rycina 4B). W omawianych badaniach *in vitro* nie zarejestrowano szczytu amplitudy rytmu w rejonie komórek ziarnistych zakrętu zębatego. Przeciwnie, obserwowano wyraźny spadek jej wartości, co mogło sugerować, że obszar ten może nie być zdolny do samodzielnego generowania rytmu theta [11].

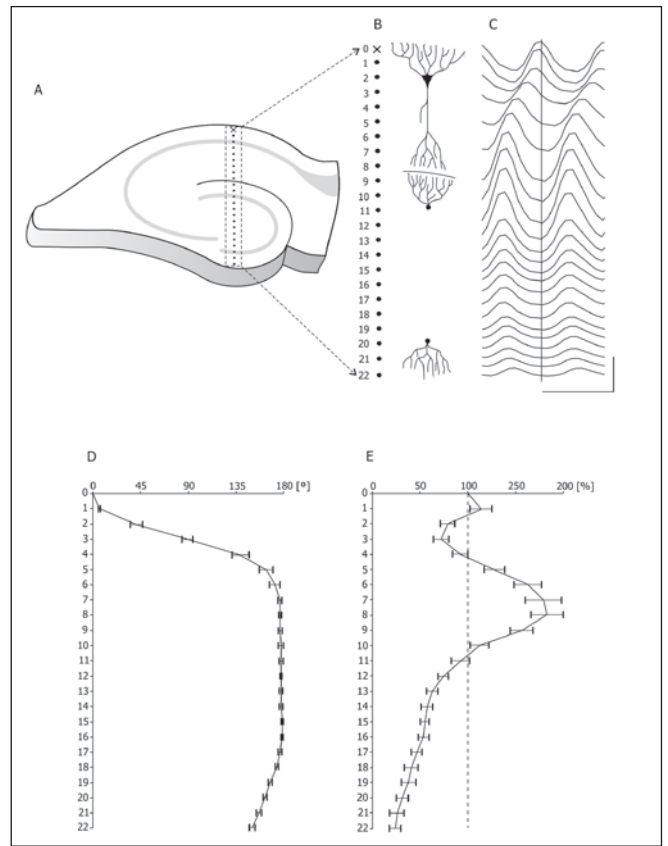
Obecne badania mają na celu ostateczne rozstrzygnięcie kontrowersji dotyczących obecności niezależnego generatora rytmu theta w obszarze DG. Aby otrzymać dane topograficzne, które można bezpośrednio porównać z wcześniejszymi wynikami *in vivo*, dokonywano rejestracji aktywności EEG *in vitro* wzdłuż toru leżącego w identycznej płaszczyźnie jak we wcześniejszych badaniach *in vivo* [2, 3, 4, 5, 6] (Rycina 3, 4). Rejestrując rytm theta wzdłuż toru biegnącego przez pole CA1 hipokampa właściwego, górną i dolną blaszkę zakrętu zębatego oraz wnękę, zaobserwowano dwa szczyty jego amplitudy – pierwszy w warstwie wschodowej, a drugi w warstwie splotowo-drobinowej pola CA1. Jednocześnie, w warstwie promienistej pola CA1 zarejestrowana została stopniowa zmiana fazy rytmu theta (Rycina 2D, E). Przebieg zmian fazy i amplitudy rytmu theta zarejestrowany w obecnych badaniach wykazuje duże podobieństwo do typu II profilu rytmu theta uzyskanego *in vivo* [5]. Zarówno w typie II *in vivo*, jak i w obecnych badaniach *in vitro* zmiana fazy rytmu theta miała charakter stopniowy i zachodziła w warstwie promienistej hipokampa właściwego. Pełne odwrócenie fazy rejestrowanego rytmu o 180° w obu przypadkach miało miejsce nad bruzdą hipokampalną (Rycina 4A). Profil amplitudy rytmu theta w obecnych badaniach był również zbliżony do typu II profilu *in vivo*, w obu zarejestrowano dwa szczyty amplitudy rytmu theta. Pierwszy z nich zlokalizowany był w okolicach warstwy wschodowej pola CA1, drugi w okolicach bruzdy hipokampalnej [5] (Rycina 4B). Istotną cechą rytmu rejestrowanego w obecnych badaniach jest fakt, że drugi szczyt amplitudy zlokalizowany jest nad bruzdą – w warstwie splotowo-drobinowej pola CA1, natomiast w obszarze zakrętu zębatego obserwowany jest wyraźny spadek amplitudy aktywności theta. Wyniki te sugerują, że rejon komórek ziarnistych DG może nie być zaangażowany w powstawanie aktywności rytmicznej w HPC.

W celu ostatecznego zweryfikowania problemu wewnątrzhipokampalnych generatorów rytmu theta, w drugim etapie obecnych badań, zastosowano metodę skrawków częściowych. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazują, że pole CA3c oraz pole CA1 hipokampa właściwego są niewątpliwie zdolne do samodzielnego generowania rytmu theta w wyniku ekspozycji na 50 μ M roztwór karbacholu. W żadnym z 32 przebadanych preparatów częściowych, w których obszar DG pozostał w całkowitej izolacji, nie zarejestrowano jednak aktywności rytmicznej w wyniku zastosowanego pobudzenia cholinergicznego (Rycina 3A). Powyższe dane pokazują, że obszar górnej blaszki zakrętu zębatego, oddzielony od dwóch pozostałych generatorów, nie generuje rytmu theta w warunkach *in vitro*. Rytm theta rejestrowany z okolic komórek ziarnistych DG w nienaruszonym preparacie formacji hipokampalnej może być przewodzony biernie z innych rejonów skrawka, na przykład, z bezpośrednio sąsiadującej z nim warstwy splotowo-drobinowej pola CA1. Istnieją wcześniejsze dane sugerujące, że również rytm theta rejestrowany z okolic bruzdy hipokampalnej w warunkach *in vivo* może nie być generowany w obszarze komórek ziarnistych zakrętu zębatego. Buzsaki [14] twierdził, że rytm theta rejestrowany z okolic bruzdy hipokampalnej generowany jest przez komórki piramidalne pola CA1, a następnie biernie przewodzony do obszaru DG [14]. Potwierdzeniem takiej tezy może być fakt, że w badaniach profilu warstwowego rytmu theta u szczurów z komórkami DG zniszczonymi promieniami Roentgena (obserwowano spadek liczby komórek ziarnistych o ponad 70%) nie zarejestrowano znaczących różnic w przebiegu zmian fazy oraz lokalizacji i wartości szczytów amplitudy rytmu theta w porównaniu do zwierząt kontrolnych [15]. Ponadto Leung [16, 17] stworzył potwierdzony eksperymentalnie model, wyjaśniający mechanizmy związane z generowaniem rytmu theta w HPC, który całkowicie pomijał udział zakrętu zębatego w powstawaniu aktywności rytmicznej. Sugestię tę potwierdzają również nasze ostatnie badania korelacji aktywności pojedynczych neuronów formacji hipokampa z rejestrowanym lokalnie rytmem theta *in vitro* [18]. Ujawniły one zaskakująco niską populację komórek ziarnistych DG, których wyładowania skorelowane były z rejestrowanym polowo rytmem theta.

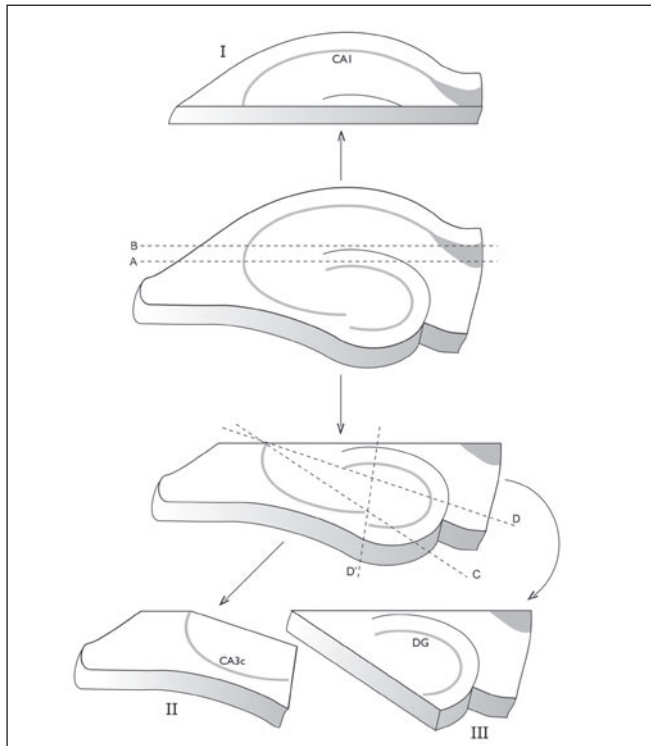
Na koniec należy zwrócić uwagę na różnice, jakie występują pomiędzy rytmem theta rejestrowanym ze skrawków częściowych CA1 i CA3c (Rycina 3B). Z przeprowadzonej analizy widać, że amplituda rytmu generowanego w skrawkach CA3c

jest wyraźnie wyższa od rejestrowanej w skrawkach CA1, czas trwania epizodów rytmu jest dłuższy, a czas przerw pomiędzy epizodami znacznie krótszy. Wyższa amplituda rejestrowanej aktywności EEG dowodzi większej ilości elementów komórkowych zaangażowanych w jej generowanie, a dłuższe epizody i krótsze między nimi przerwy wskazują na silniejszą synchronizację aktywności komórek biorących udział w generowaniu rytmu theta w skrawkach częściowych pola CA3c. Dane te zgodne są z wynikami prac *in vivo* sugerującymi, że obszar CA3c jest nadrzędnym generatorem aktywności rytmicznej, wywierającym pobudzający wpływ na pozostałe wewnątrzhipokampalne generatory rytmu theta [19, 20].

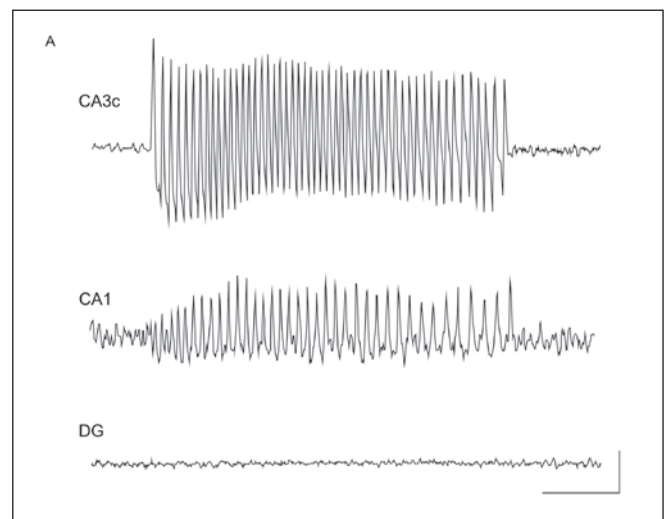
Podsumowując, przedstawione dane pokazują, że obszar górnej blaszki zakrętu zębatego, odseparowany od dwóch pozostałych obszarów preparatu (pół CA1 i CA3c), nie generuje rytmu theta w warunkach *in vitro*. Rytm theta rejestrowany z okolic komórek ziarnistych DG w nienaruszonym preparacie formacji hipokampalnej jest przewodzony biernie z innych rejonów skrawka, na przykład z bezpośrednio sąsiadującej z nim warstwy splotowo-drobinowej pola CA1.



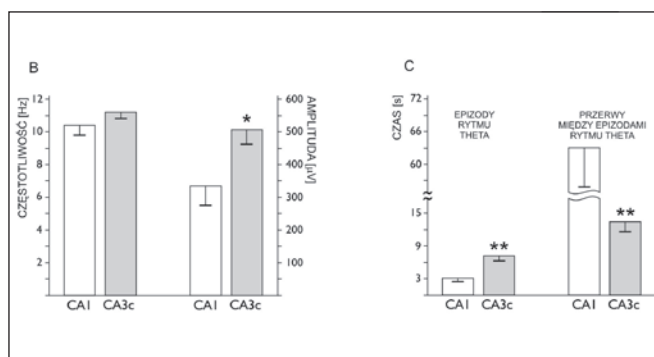
Rycina 2. A. Schemat formacji hipokampalnej z zaznaczonym położeniem elektrody stacjonarnej (krzyżyk) oraz 22 punktów rejestracyjnych elektrody wędrującej (czarne kropki). B. Schemat przebiegu elektrody wzdłuż drzewa dendrytycznego komórek piramidalnych i ziarnistych. C. Zapis profilu warstwowego rytmu theta (linia pionowa pokazuje szczyt fali rytmu rejestrowanego przez elektrodę stacjonarną w warstwie wschodowej pola CA1). Kalibracja: 1 s, 200 μ V. Uśredniony profil warstwowo-fazy (\pm SE) (D) oraz amplitudy (\pm SE) (E) rytmu theta. Wartości amplitudy przedstawiono jako procent wartości amplitudy rytmu theta rejestrowanego przez elektrodę stacjonarną (100% w punkcie 0).



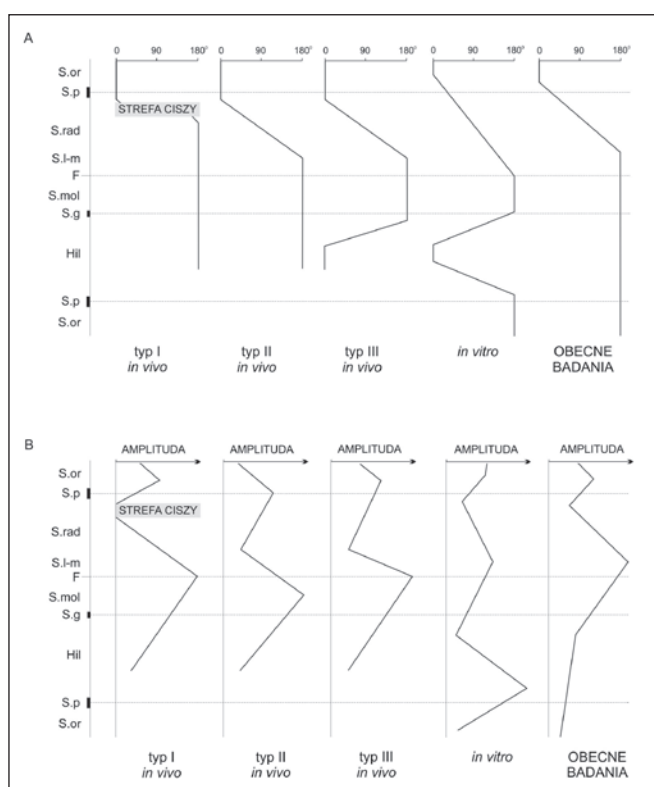
Rycina 1. Schemat techniki preparowania skrawków częściowych formacji hipokampalnej. Linie przerywane pokazują płaszczyzny cięcia skrawka: płaszczyzna A – w celu uzyskania skrawka częściowego CA1 (I); płaszczyzny B i C – w celu uzyskania skrawka częściowego DG (II); płaszczyzny B, D i D' – w celu uzyskania skrawka częściowego CA3c (III).



Piśmiennictwo



Rycina 3. A. Przykłady zapisów EEG rejestrowanych ze skrawków częściowych CA3c, CA1 oraz DG. Kalibracja 1 s, 200 μV. B. Porównanie wartości średnich (±SE) częstotliwości oraz amplitudy rytmu theta rejestrowanego w skrawkach częściowych CA1 oraz CA3c. C. Porównanie średniego czasu trwania epizodów rytmu theta oraz przerw pomiędzy epizodami (±SE) rytmu rejestrowanego w skrawkach częściowych CA1 oraz CA3c. Analiza statystyczna: Kruskal-Wallis ANOVA i Mann-Whitney test U, CA1 vs CA3c, * p<0,05, ** p<0,001.



Rycina 4. Porównanie profili warstwowych amplitudy (A) oraz fazy (B) rejestrowanych w obecnych doświadczeniach oraz wcześniejszych badaniach *in vivo* i *in vitro*. S.or – warstwa wschodowa; S.p – warstwa piramidowa; S.rad – warstwa promienista; S.l-m – warstwa splotowo-drobinowa; F – bruzda; S.mol – warstwa drobinowa; S.g – warstwa ziarnista; Hil – wnęka. Szczegóły w tekście.

1. B.H. Bland, The physiology and pharmacology of hippocampal formation theta rhythms, *Prog. Neurobiol.* 26 (1986) 1-54.
2. B.H. Bland R.S. Sainsbury, B.L. Creery, Anatomical correlates of rhythmicity of physiologically identified hippocampal formation neurons, *Expl. Brain Res.* 39 (1979) 205-219.
3. B.H. Bland, I.Q. Whishaw, Generators and topography of hippocampal theta (RSA) in the anesthetized and freely moving rat, *Brain Res.* 118 (1976) 259-280.
4. B.W.A. Feenstra, J.B. Holsheimer, Dipole-like neuronal sources of theta rhythm in dorsal hippocampus, dentate gyrus and cingulate cortex of the urethane-anesthetized rat, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 47 (1979) 532-538.
5. J. Winson, Patterns of hippocampal theta in the freely moving rat, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 36 (1974) 291-301.
6. J. Winson, Hippocampal theta rhythm. I. Depth profiles in the curarized rat, *Brain Res.* 103 (1976) 57-70.
7. J. Konopacki, Theta-like activity in the limbic cortex *in vitro*, *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22 (1998) 311-323.
8. J. Konopacki, B.H. Bland, M.B. MacIver, S.H. Roth, Cholinergic theta rhythm in transected hippocampal slices: independent CA1 and dentate generators, *Brain Res.* 436 (1987) 217-222.
9. J. Konopacki, B.H. Bland, S.H. Roth, Carbachol-induced EEG "theta" in hippocampal formation slices: evidence for a third generator in CA3c area, *Brain Res.* 451 (1988) 33-42.
10. J. Konopacki, H. Gołębiowski, B. Eckersdorf, T. Kowalczyk, R. Bocian, *In vitro* recorded theta-like activity in the limbic cortex: comparison with spontaneous theta and epileptiform discharges, *Acta Neurobiol. Exp.* 60 (2000) 67-85.
11. T. Kowalczyk, J. Konopacki, Depth amplitude and phase profiles of carbachol-induced theta in hippocampal formation slices, *Brain Res. Bull.* 58 (6) (2002) 569-574.
12. R. Feder, J.B. Jr. Ranck, Studies on single neuron in dorsal hippocampal formation and septum in unrestrained rat. Part II. Hippocampal slow waves and theta cell firing during bar pressing and other behaviors, *Exp. Neurol.* 41 (1973) 532-537.
13. H. Petsche, C. Stumpf, Topographic and topographic study of origin and spread of the regular synchronized arousal pattern in the rabbit, *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* 12 (1960) 589-600.
14. G. Buzsaki, Electroanatomy of the hippocampal rhythmic slow activity (RSA) in the behaving rat,

In: G. Buzsaki, and C.H. Vanderwolf, (Eds.) Electrical activity of the archicortex. Akademiai Kiado, Budapest, 1985, pp. 143-164.

15. I.Q. Whishaw, B.H. Bland, S.A. Bayer, Postnatal hippocampal granule cell agenesis in the rat: Effects on two types of rhythmical slow activity (RSA) in two hippocampal generators, Brain Res. 146: (1978) 249-268.

16. L.W.S. Leung, Model of gradual phase shift of theta rhythm in the rat, J.Neurophysiol. 52 (1984) 1051-1065.

17. L.W.S. Leung, Generation of theta and gamma rhythms in the hippocampus, Neurosci. Biobehav. Rev. 22 (1998) 275-290.

18. J. Konopacki, B. Eckersdorf, T. Kowalczyk, H. Gołębiewski, Firing cell repertoire during carba-

chol-induced theta rhythm in the rat hippocampal slices. Europ. J. Neurosci. 23 (2006) 1811-1818.

19. G. Buzsaki, Theta oscillations in the hippocampus. Neuron 33 (2002) 325-340.

20. B. Kocsis, A. Bragin, G. Buzsaki, Independence of multiple theta generators in the hippocampus: a partial coherence analysis. J. Neurosci. 19 (1999) 6200-6212.

Adres korespondencyjny:

Tomasz Kowalczyk,
Katedra Neurobiologii,
Uniwersytet Łódzki,
ul. Rewolucji 1905 r. 66, 90-222 Łódź,
e-mail: tokowal@biol.uni.lodz.pl

Wpływ projekcji oreksynowej na aktywność listka ciała kolankowatego bocznego

The influence of the orexinergic system on the activity of the intergeniculate leaflet neurons

Dobromiła Pękała, Tomasz Błasiak, Marian H. Lewandowski

Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii, Katedra Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński

Streszczenie

Jedną z kluczowych funkcji oreksyn, peptydów syntetyzowanych głównie przez neurony bocznego podwzgórza, jest udział w regulacji stanu snu i czuwania. Neurony oreksynowe tworzą dyfuzyjny system unerwiający wiele obszarów mózgowia, w tym również struktury należące do układu zegara biologicznego – jądra nadskrzyżowaniowe podwzgórza (ang. *suprachiasmatic nucleus* – SCN) oraz listek ciała kolankowatego bocznego (ang. *intergeniculate leaflet* – IGL). SCN jest odpowiedzialny za generację i regulację rytmów okołodobowych, w tym również najważniejszego dla organizmu cyklu snu i czuwania. IGL uczestniczy nie tylko w regulacji rytmów biologicznych, lecz także może brać udział w kontroli innych niezwiązanych z nimi procesów. Ponieważ układ oreksynowy może być czynnikiem modulującym funkcję struktur zegara, dlatego celem przedstawionych eksperymentów było zbadanie wpływu oreksyny A na aktywność listka ciała kolankowatego bocznego.

Słowa kluczowe: oreksyna, listek ciała kolankowatego bocznego, szczur

Abstract

The major function of the hypothalamic peptides – orexins is involvement in the regulation of the sleep-wake state. Orexinergic neurons project to many brain areas including structures of the biological clock – suprachiasmatic nucleus (SCN) and intergeniculate leaflet (IGL). SCN is responsible for the generation and regulation of the circadian rhythms including the most important sleep-wake cycle. IGL is involved not only in the regulation of the biological rhythms but it also takes part in controlling other noncircadian functions. Since orexinergic system might be the factor responsible for the modulation of the biological clock structures function, therefore the purpose of the presented data was to investigate the influence of orexin A on the activity of the intergeniculate leaflet neurons.

Key Words: orexin, lateral geniculate body leaflet, rat

Wstęp

Oreksyny (hipokretyny) są neurotransmiterami peptydowymi, które zostały odkryte w 1998 roku

przez dwie niezależne grupy badawcze. Peptydy te są syntetyzowane głównie przez neurony zlokalizowane w bocznej części podwzgórza [1]. Obecnie znane są dwa typy oreksyn – oreksyna A (OX A) oraz oreksyna B (OX B), które wywierają wpływ na aktywność komórki poprzez dwa różne receptory metabotropowe – receptor typu pierwszego (OX-R1) oraz receptor typu drugiego (OX-R2) [2, 3]. Początkowo sądzono, że główna funkcja tych peptydów jest związana z regulacją pobierania pokarmu. Jednak dalsze badania wykazały, że mogą one być zaangażowane w regulację wielu procesów fizjologicznych. Na podstawie danych anatomicznych stwierdzono, że pomimo stosunkowo niewielkiej liczby komórek oreksynowych, neurony te tworzą dyfuzyjny system unerwiający liczne struktury mózgowia, w tym również źródła klasycznej projekcji niespecyficznego pnia mózgu (serotonergiczne jądra szwu, neurony noradrenergiczne miejsca sinawego oraz cholinergiczne jądra nakrywki), stając się tym samym podstawowymi elementami w reakcji wzbudzenia mózgowia (ang. *arousal*). Istnieją dane sugerujące obecność włókien oreksynowych na obszarze struktur zegara biologicznego – jąder nadskrzyżowaniowych podwzgórza – głównego oscylatora rytmów okołodobowych [4] i listka ciała kolankowatego bocznego [5]. Najlepiej poznaną funkcją układu oreksynowego jest regulacja kluczowa dla organizmu rytmu snu i czuwania.

Informacja o zmieniających się warunkach świetlnych jest czynnikiem, który najsilniej wpływa na generowanie rytmów przez SCN i ich synchronizację do zewnętrznych warunków środowiska. Informacja świetlna dociera do SCN bezpośrednio z komórek zwojowych siatkówki, drogą siatkówkowo-podwzgórzową (ang. *retinohypothalamic tract* – *RHT*) lub pośrednio, drogą kolankowato-podwzgórzową poprzez IGL [6]. Nie mniej ważną rolę w regulacji rytmów okołodobowych odgrywa informacja nieświetlna. Bodźce nieświetlne, związane ze stanem wzbudzenia organizmu, przekazywane są bezpośrednio do SCN z licznych struktur mózgowia. Wiele danych wskazuje na możliwość udziału IGL w przekazywaniu informacji nieświetlnej do oscylatora [7, 8, 9]. Głównym źródłem informacji nieświetlnych, docierających do IGL, są projekcje niespecyficznego pnia mózgu [10].

Listek ciała kolankowatego bocznego został po raz pierwszy opisany w 1976 roku przez Hickeya i Speara [11]. IGL u szczura ma długość około 2 mm, położony jest we wzgórzu, pomiędzy częścią grzbietową a brzusznią ciała kolankowatego bocznego (ang. *lateral geniculate nucleus* – *LGN*). Cechą charakterystyczną IGL jest obecność komórek za-

wierających neuropeptyd Y, stanowiących u szczura element drogi kolankowato-podwzgórzowej (ang. *geniculo-hypothalamic tract*, *GHT*). Peptyd ten nie występuje w pozostałych częściach LGN. Kolejnym neuromodulatorem zlokalizowanym w IGL jest enkefalina (ENK). Komórki produkujące ENK wysyłają aksony do przeciwległego IGL. Ponadto wszystkie neurony IGL zawierają kwas γ -aminomasłowy, który jest również neuromodulatorem szlaku GHT [12, 13].

Główną funkcją IGL jest udział w integracji informacji świetlnej z nieświetlną i umożliwienie, poprzez drogę GHT, przekazania tego modulującego wejścia do SCN [14]. Przypuszczalnie układ oreksynowy może pośrednio lub bezpośrednio oddziaływać na struktury zegara biologicznego, dlatego celem przedstawionych badań było określenie wpływu oreksyny A na aktywność neuronalną listka ciała kolankowatego bocznego.

Materiały i metody

Materiał badawczy

Eksperymenty wykonano na 51 szczurach szczepu Wistar (wyłącznie samcach), w wieku 4-5 tygodni, ważących od 60-140 g, pochodzących z hodowli Instytutu Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego. Zwierzęta hodowano w standardowych klatkach, po 5-6 osobników w każdej, w warunkach stałej temperatury ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) i wilgotności (60%) oraz reżimie świetlnym 12:12 (12 godzin światło, 12 godzin ciemność; światło było automatycznie włączane o godzinie 8.00). Woda i standardowe pożywienie były dostępne ad libitum.

Preparatyka

W przeprowadzonych badaniach wykorzystano technikę zewnątrzkomórkowej rejestracji potencjałów czynnościowych w warunkach *in vitro*. Zwierzęta usypiano poprzez dootrzewnowe podanie Morbitalu (Biowet) w dawce 1,5 ml/1 kg masy ciała, a następnie przeprowadzano dekapitację. Wypreparowany mózg przenoszono do szalki Petriego, wypełnionej schłodzonym (do ok. 4°C) sztucznym płynem mózgowo-rdzeniowym (ang. *artificial cerebrospinal fluid*, *ACSF*) o składzie (w mM): KCl 2, NaCl 132, MgSO_4 1.25, KH_2PO_4 1.25, NaHCO_3 26, CaCl₂ 1,87, D-glukoza 10. Następnie wycinano blok tkanki zawierający wzgórze z listkiem ciała kolankowatego bocznego, który cięto na skrawki o grubości 400 μm przy użyciu wibratomu (Leica VT 1000 S). W trakcie preparatyki tkanka była zanurzona w schłodzonym ACSF oraz natleniana karbogenem (mieszanina gazów: 95% O_2 /5% CO_2). Skrawki zawierające IGL

przenoszono do interfazowej komory rejestracyjnej, gdzie przez cały czas trwania eksperymentu opłukiwane były sztucznym płynem mózgowo-rdzeniowym, natlenianym karbogenem. W interfazowej komorze rejestracyjnej utrzymywano stałą temperaturę wynoszącą 34°C. Przed rozpoczęciem rejestracji skrawki inkubowano w wyżej wymienionych warunkach przez 2 godziny.

Rejestracja

Zewnątrzkomórkową rejestrację potencjałów czynnościowych pojedynczych komórek (ang. *single-unit activity*) przeprowadzano, używając szklanych elektrod, o impedancji 3-9 MΩ, wykonanych przy użyciu wyciągarki horyzontalnej (Model P-97, Sutter Instrument CO). Elektrode rejestrującą, wypełnioną 2 M chlorkiem sodu lub sztucznym płynem mózgowo-rdzeniowym, wprowadzano do listka ciała kolankowatego bocznego pod kontrolą wzrokową przy użyciu binokularnej lupy. Do precyzyjnego umieszczenia i zmiany położenia elektrody w obrębie badanej struktury wykorzystywano manipulator wraz z holderem firmy Marzhauser Wetzlar. Sygnał pochodzący z elektrody początkowo był wzmocniony 10x (przedwzmacniacz firmy FHC) a następnie 1000x i przepuszczany przez dwudrogowy filtr (300–5000 Hz) w celu usunięcia komponent o niskiej i wysokiej częstotliwości (wzmacniacz Xcell-3, FHC). Przefiltrowany i wzmocniony sygnał przetwarzano przy pomocy przetwornika analogowo-cyfrowego (1401plus firmy Cambridge Electronic Design) i rejestrowano na komputerze.

Aktywność badanego neuronu obrazowano graficznie w postaci histogramu przedstawiającego ilość wygenerowanych potencjałów czynnościowych w ciągu jednej sekundy. Po zarejestrowaniu kontrolnej, spontanicznej aktywności komórki IGL (czas rejestracji nie krótszy niż 300 sekund) rozpoczynano domiejskowe podawanie oreksyny-A (Tocris) przy użyciu pompy ciśnieniowej (General Valve PicospritzerII). Mikropipeta wypełniona roztworem oreksyny-A w ACSF o stężeniu 1 mM znajdowała się w bliskiej odległości od elektrody rejestrującej, ale wystarczająco daleko, aby nie powodować mechanicznego pobudzenia badanej komórki. Ponadto aby wykluczyć możliwość, że otrzymane wyniki po iniekcji badanej substancji mogą być efektem mechanicznego podrażnienia neuronu, po wykonanym eksperymencie przeprowadzono kontrolne, domiejskowe ciśnieniowe podawanie ACSF. Po uzyskaniu stabilnej odpowiedzi na oreksynę-A, rozpoczęto podawanie roztworu antagonisty SB 334867 (Tocris) w ACSF o stężeniu 10 μM.

Wyniki

Po zarejestrowaniu kontrolnej spontanicznej aktywności badanego neuronu rozpoczęto ciśnieniowe, lokalne podawanie oreksyny A o stężeniu 1 μM. Spośród 91 badanych komórek listka ciała kolankowatego bocznego 22 (24%) reagowało na podawaną substancję. Odpowiedzi wszystkich wrażliwych na oreksynę A neuronów charakteryzowały się wzrostem częstotliwości generowanych potencjałów czynnościowych, pojawiającym się w czasie do ok. 60-150 sekund od momentu podania substancji. Minimalny czas trwania obserwowanego efektu wynosił od 200-300 sekund (Rycina 3). W przypadku 7 komórek po uzyskaniu stabilnej odpowiedzi na oreksynę A, przy stałych parametrach iniekcji, podawano antagonistę receptorów OX-R1 – SB 334867 o stężeniu 10 μM. Podanie antagonisty nie wpłynęło istotnie na aktywność neuronalną wywołaną aplikacją oreksyny A.

Dyskusja

Przedstawione wyniki są pierwszymi na świecie, które pokazują modulujący wpływ oreksyny A na aktywność neuronalną listka ciała kolankowatego bocznego. Stanowią one elektrofizjologiczne potwierdzenie wcześniejszych badań, przeprowadzonych głównie z zastosowaniem technik anatomicznych, przedstawiających połączenie układu oreksynowego z IGL [5]. Wykorzystana w prezentowanych badaniach technika zewnątrzkomórkowej rejestracji potencjałów czynnościowych pozwoliła stwierdzić, że neurony IGL są czułe na oreksynę A, a ponadto umożliwiła określenie charakteru odpowiedzi komórek na badaną substancję.

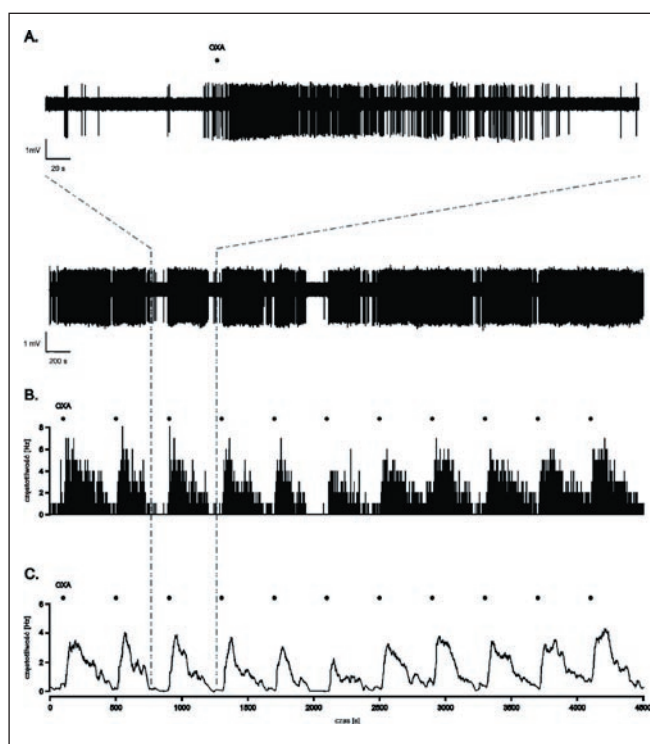
Wszystkie badane neurony, wrażliwe na OXA, wykazywały wzrost częstotliwości generowanych potencjałów czynnościowych utrzymujący się przynajmniej przez kilkaset sekund. Wyniki te są zgodne z wynikami innych prac elektrofizjologicznych, w których również wykazano pobudzający wpływ oreksyny A na aktywność neuronalną wielu struktur mózgowia [15, 16, 17]. Oreksyna A może wywierać wpływ na aktywność neuronów zarówno poprzez receptor typu pierwszego, jak i drugiego. Dokładny mechanizm transdukcji sygnału przez te receptory nie jest znany. W procesie tym mogą uczestniczyć różne typy białek G – Gi, Gq, Gs, aktywowane w wyniku pobudzenia receptorów oreksynowych [2, 3]. Aktywacja OXR prowadzi do wzrostu wewnątrzkomórkowego stężenia Ca²⁺. Jony wapnia są zaangażowane w wiele procesów zachodzących na poziomie komórkowym. Przede wszystkim niezbędne są w procesie synaptycz-

nym, ponieważ biorą udział w fuzji pęcherzyków synaptycznych i uwalnianiu neurotransmiterów z zakończeń presynaptycznych. Wzrost odpowiedzi pod wpływem oreksyny A może więc wynikać z bezpośredniej aktywacji presynaptycznych receptorów oreksynowych, zlokalizowanych na zakończeniach glutaminianergicznych, docierających do IGL np. z siatkówki. Konsekwencją tego może być zwiększone uwalnianie kwasu glutaminowego do szczeliny synaptycznej i w rezultacie podwyższona aktywność badanej komórki. Podobny mechanizm wskazujący na pośredni wpływ oreksyny A wykazano w badaniu wpływu tej substancji na aktywność neuronów jądra boczno-grzbietowego nakrywki [18]. Jest to klasyczny efekt torowania (ang. *facilitation*), charakterystyczny dla projekcji niespecyficznych mózgowia, do których również należy badany neuropeptyd.

Inna możliwość tłumacząca uzyskane wyniki to bezpośredni wpływ oreksyny A na badaną komórkę. Pobudzenie receptorów oreksynowych może prowadzić do wzrostu aktywności neuronu poprzez modulację prądów potasowych. Dzieje się tak w wyniku zahamowania przewodnictwa dla jonów potasowych. W proces ten może być zaangażowany potasowy prąd upływu (ang. *leak K⁺ current*) oraz zależny od napięcia prąd potasowy (ang. *voltage-gated K⁺ current*) [16]. Ponadto bezpośredni pobudzający wpływ OXA może również wynikać z aktywacji nioselektywnych kanałów kationowych (nioselektywne przewodnictwo kationowe ang. *nonselective cationic conductance – NSCC*). NSCC są napięciowo niezależnymi kanałami błonowymi umożliwiającymi przepływ kationów (Na⁺, K⁺ lub Ca²⁺) w różnych proporcjach. Kanały te są między innymi odpowiedzialne za kontrolowanie pobudliwości komórkowej [19].

We wszystkich badanych przypadkach (n=7) podanie antagonisty OX-R1 nie wywołało istotnych zmian w aktywności indukowanej oreksyną A. Wynik ten może sugerować, że oreksyna A wywiera modulujący wpływ na neurony IGL, działając poprzez receptor typu drugiego. Inne wytłumaczenie tego zjawiska może wiązać się ze zbyt niskim stężeniem SB 334867 zastosowanym w naszych badaniach. Dlatego konieczne są dalsze badania z uwzględnieniem różnych stężeń podawanych substancji.

Wywierająca modulujący wpływ projekcja oreksynowa oraz inne projekcje afferentne i efferentne IGL wskazują na wysoki stopień komplikacji procesów zachodzących w tej strukturze. Fakt ten może świadczyć o zaangażowaniu IGL w pełnienie wielu istotnych funkcji związanych nie tylko z regulacją rytmiki okołodobowej.



Rycina 1. Aktywność neuronu IGL. **A.** Sygnał surowy z przebiegu eksperymentu – panel dolny; Potencjały czynnościowe generowane przez badany neuron przed i po podaniu oreksyny A – panel górny **B.** Histogram przedstawiający aktywność badanego neuronu wywołaną oreksyną A. Szerokość słupka histogramu = 1s. **C.** Uśredniony (30 s) histogram aktywności. Każda kropka nad wykresem oznacza podanie oreksyny A o stężeniu 1 μ M.

Piśmiennictwo

1. Nambu T, Sakurai T, Mizukami K, Hosoya Y, Yanagisawa M, Goto K. Distribution of orexin neurons in the adult rat brain. *Brain Res.* 1999; 827: 243-260
2. Sakurai T, Amemiya A, Ishii M, Matsuzaki I, Chemelli RM, Tanaka H, Williams SC, Richardson JA, Kozłowski GP, Wilson S, Arch JR, Buckingham RE, Haynes AC, Carr SA, Annan RS, McNulty DE, Liu WS, Terrett JA, Elshourbagy NA, Bergsma DJ, Yanagisawa M. Orexins and orexin receptors: a family of hypothalamic neuropeptides and G protein-coupled receptors that regulate feeding behavior. *Cell* 1998; 92: 573-585
3. Kukkonen JP, Holmqvist T, Ammoun S, Akerman KE. Functions of the orexinergic/hypocretinergic system. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2002; 283: C1567-C1591
4. Weaver DR. The suprachiasmatic nucleus: A 25-year retrospective. *J. Biol. Rhythms* 1998; 13: 100-112
5. McGranaghan PA, Piggins HD. Orexin A-like immunoreactivity in the hypothalamus and thalamus

- of the Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) and Siberian hamster (*Phodopus sungorus*), with special reference to circadian structures. *Brain Res.* 2001; 904: 234-244
6. Pickard GE. Bifurcating axons of retinal ganglion cells terminale in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus and the intergeniculate leaflet of the thalamus. *Neurosci. Lett.* 1985; 55: 211-217
7. Rusak B, Meijer JH, Harrington ME. Hamster circadian rhythms are phase-shifted by electrical stimulation of the geniculo-hypothalamic tract. *Brain Res.* 1989; 493: 283-291
8. Janik D, Mrosovsky N. Intergeniculate leaflet lesions and behaviorally-induced shifts of circadian rhythms. 1994; *Brain Res.* 651: 174-182
9. Johnson RF, Smale L, Moore RY, Morin LP. Lateral geniculate lesions block circadian phase-shift responses to benzodiazepine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 85: 5301-5304
10. Vrang N, Mrosovsky N, Mikkelsen JD. Afferent projections of the hamster geniculate leaflet demonstrated by retrograde and anterograde tracing. *Brain Res. Bull.* 2003; 59: 267-288
11. Hickey TL, Spear PD. Retinogeniculate projections in hooded and albino rats: an autoradiographic study. *Exp Brain Res.* 1976; 24: 523-529
12. Card JP, Moore RY. Organization of lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *J. Comp. Neurol.* 1989 284: 135-147
13. Moore RY, Card JP. Intergeniculate leaflet: an anatomically and functionally distinct subdivision of the lateral geniculate complex. *J. Comp. Neurol.* 1994; 344: 403-430
14. Thankachan S, Rusak B. Juxtacellular recording/labeling analysis of physiological and anatomical characteristics of rat intergeniculate leaflet neurons. *J. Neurosci* 2005; 25: 9195-9204
15. Korotkova MT, Eriksson KS, Haas HL, Brown RE. Selective excitation of GABAergic neurons in the substantia nigra of the rat by orexin/hypocretin *in vitro*. *Regulatory Peptides* 2002; 104: 83-89
16. Murai Y., Akaike T. Orexins cause depolarization via nonselective cationic and K⁺ channels in isolated locus coeruleus neurons. *Neurosci. Res.* 2005; 51: 55-65
17. Govindaiah G, Cox CL. Modulation of thalamic excitability by orexins. *Neuropharmacology* 2006; 51: 414-425
18. Burlet S, Tyler CJ, Leonard CS. Direct and indirect excitation of laterodorsal tegmental neurons by hypocretin/orexin peptides: implications for wakefulness and narcolepsy *J. Neurosci.* 2002; 22: 2862-2872
19. Yang B, Ferguson AV. Orexin A depolarizes nucleus tractus solitarius neurons through effects on nonselective cationic and K⁺ conductances. *J. Neurophysiol.* 2003; 89: 2167-2175

Adres korespondencyjny:

Dobromiła Pękala,
Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii,
Katedra Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii,
Uniwersytet Jagielloński,
ul. R. Ingardena 6, 30-060 Kraków,
tel.: (012) 663 26 12 lub 26 13,
e-mail: dobromila.pekala@uj.edu.pl

Wysokoamplitudowe oscylacje 7-12 Hz w korze mózgowej szczurów – objaw padaczki czy zjawisko fizjologiczne?

High-voltage 7-12 Hz oscillations in rat cerebral cortex: Symptom of epilepsy or a physiological phenomenon?

Aleksander Sobolewski

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

Streszczenie

Epizody oscylacji w paśmie 7-12 Hz (zwane HVRS, ang. *high-voltage rhythmic spiking*) są charakterystyczną cechą rejestracji lokalnego potencjału polowego z kory baryłkowej szczurów. Mechanizm powstawania tej aktywności i jej funkcja pozostają jednak niewyjaśnione. Jest ona postrzegana albo jako zjawisko fizjologiczne (w szczególności wyraz „biernego” stanu kory), albo jako zjawisko o podłożu padaczkowym.

W naszych doświadczeniach na czuwających szczurach: (1) wprowadzenie stymulacji awersyjnej początkowo znacznie ograniczyło częstość występowania HVRS, co można wiązać ze wzrostem poziomu wzbudzenia szczura wskutek aplikowania bodźców awersyjnych, (2) pomimo powtarzania stymulacji awersyjnej, u niektórych szczurów aktywność HVRS stopniowo powracała, co można tłumaczyć habituacją tych zwierząt do bodźca awersyjnego, (3) nieawersyjna stymulacja

dotykowa również może powodować desynchronizację epizodów HVRS – zwłaszcza w przypadku dodatkowego podawania bodźców awersyjnych, co można tłumaczyć stale zwiększoną reaktywnością kory wskutek stosowania wzbudzących bodźców awersyjnych. Nasze wyniki sugerują, iż: (1) epizody HVRS to zjawisko będące korelatem niskiego poziomu wzbudzenia szczura i „biernego” stanu kory, (2) podczas takich epizodów kora nie traci gotowości do reakcji na słabe bodźce czuciowe, co stałoby w sprzeczności z padaczkowym charakterem badanych oscylacji.

Słowa kluczowe: kora baryłkowa, oscylacje, desynchronizacja, wzbudzenie, HVRS

Abstract

Episodes of 7 to 12 Hz oscillations (or high-voltage rhythmic spiking, HVRS) are a distinctive feature of local field potential recordings from rat barrel cortex. The mechanisms underlying the generation and function of these oscillations remain unknown. In addition, there is controversy as to whether HVRS should be regarded as a physiological phenomenon (specifically, corresponding to an 'idle' state of the cortex), or as events of an epileptic nature. In our experiments on awake rats, the following three observations were made: (i) aversive stimuli initially reduced HVRS activity, which could be explained by an increase in the level of arousal of rats caused by aversive stimuli; (ii) despite further application of aversive stimuli, HVRS gradually reappeared in some rats, which can be explained by the rats' habituation to the aversive stimuli; (iii) non-aversive tactile stimuli could also result in desynchronization of HVRS (more so if accompanied by aversive stimuli), which can be explained by the long-term background reactivity of the cortex being increased by the arousing aversive stimuli. Our results suggest that HVRS episodes are associated with a low level of arousal and an 'idle' state of the cortex. During such episodes, the cortex retains the ability to react to weak tactile stimuli, which contradicts the idea of an epileptic nature of these investigated oscillations.

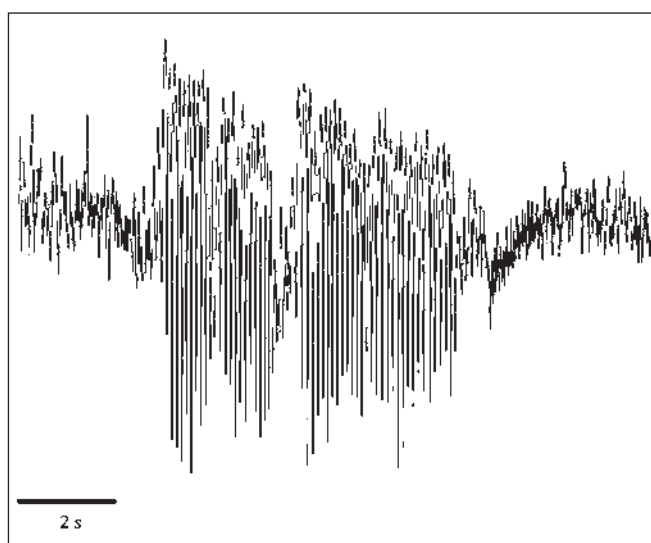
Key Words: barrel cortex, oscillations, desynchronization, arousal, HVRS

Wstęp

Szereg linii hodowlanych szczurów, w szczególności GEARS oraz WAG/Rij, wykazuje skłonności do spontanicznych, napadowych wyładowań w ko-

rze mózgowej, dających w EEG obraz zsynchronizowanych w obu półkulach, wysokoamplitudowych oscylacji w paśmie około 7-12 Hz. Wyładowaniom takim z reguły towarzyszy znieruchomienie szczurów oraz drżenie wibrys. Podanie leków przeciwpadaczkowych w rodzaju etosuksymidu ogranicza występowanie takich wyładowań. Z powyższych względów wyładowania te są interpretowane jako odpowiednik tzw. napadów nieświadomości u ludzi, a ww. szczury wykorzystywane są jako model do badań nad padaczką.

Mniej intensywne epizody oscylacji w tym paśmie częstotliwości pojawiają się w zapisach elektrofizjologicznych z kory mózgowej także innych szczepów szczurów, nieuznawanych za model padaczki [1]. W szczególności epizody takie występują w pierwszorzędowej korze czuciowej szczurów, zwanej korą baryłkową, odpowiedzialnej za reprezentację m.in. wibrys [2, 3]. W literaturze epizody te często określane są także terminem HVRS (ang. *high-voltage rhythmic spiking*). (Przykład takich epizodów – pochodzące z naszych badań nad szczurami Wistar i Long-Evans – przedstawia Rycina 1. Geneza i funkcje tych oscylacji pozostają przedmiotem kontrowersji. Część badaczy również uznaje je za zjawiska o podłożu padaczkowym [4, 5, 6]; inni widzą w nich prawidłową czynność fizjologiczną będącą np. wyrazem biernego (ang. *idle*) stanu kory mózgowej, odpowiadającą oscylacjom μ występującym w korze sensomotorycznej ludzi [7; 8]. Kwestia ta stanowi więc interesujący przedmiot badawczy. Po pierwsze, rozstrzygnięcia wymaga ww. kontrowersja, a po jej rozstrzygnięciu możliwe będzie dalsze prowadzenie badań nad HVRS jako funkcjonalnym mechanizmem fizjologicznym albo zjawiskiem z kręgu padaczki.

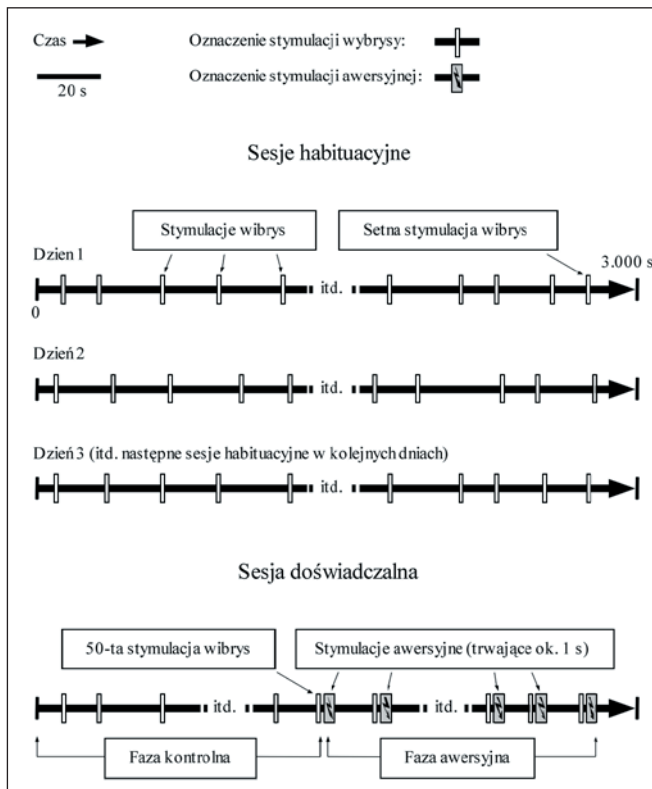


Rycina 1. HVRS zarejestrowane w korze baryłkowej szczura Wistar.

W niniejszym referacie omawiamy w skrócie wyniki badań nad epizodami oscylacji 7-12 Hz w korze mózgowej szczurów Wistar i Long-Evans, przeprowadzonych w Pracowni Układu Wzrokowego Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

Materiały i metody

Doświadczenie przeprowadzono na 10 szczurach. W doświadczeniu rejestrowano lokalny potencjał polowy (LFP) [9] z elektrody zaimplantowanej chronicznie w czwartej warstwie kory baryłkowej. Schemat doświadczenia przedstawia Rycina 2. Sesja doświadczalna składała się z dwóch faz. W pierwszej fazie (kontrolnej) szczury były umieszczane w hamaku, unieruchamiane i poddawane dotykowej stymulacji wibrysy (lub pęku sklejonych wibrysy) co około 15-40 sekund. Po około 50 do 60 takich stymulacjach wprowadzano dodatkowo bodziec awersyjny (trwający sekundę, niebólowy przepływ prądu elektrycznego przez małżowinę uszną), podawany w czasie od 150 do 500 ms (różnie u różnych szczurów) po stymulacji dotykowej wibrysy i kontynuowano sesję w ten sposób przez kolejne 50-60 stymulacji. (Tę drugą fazę nazywamy dalej fazą awersyjną). Łącznie sesja doświadczalna (obie fazy) trwała około 50 min. Ponadto, przed opisaną powyżej właściwą sesją doświadczalną, szczury były przez kilka dni przyzwyczajane do warunków fazy kontrolnej w codziennych sesjach habituacyjnych, trwających około 50 minut i składających się z około 100 stymulacji wibrysy.

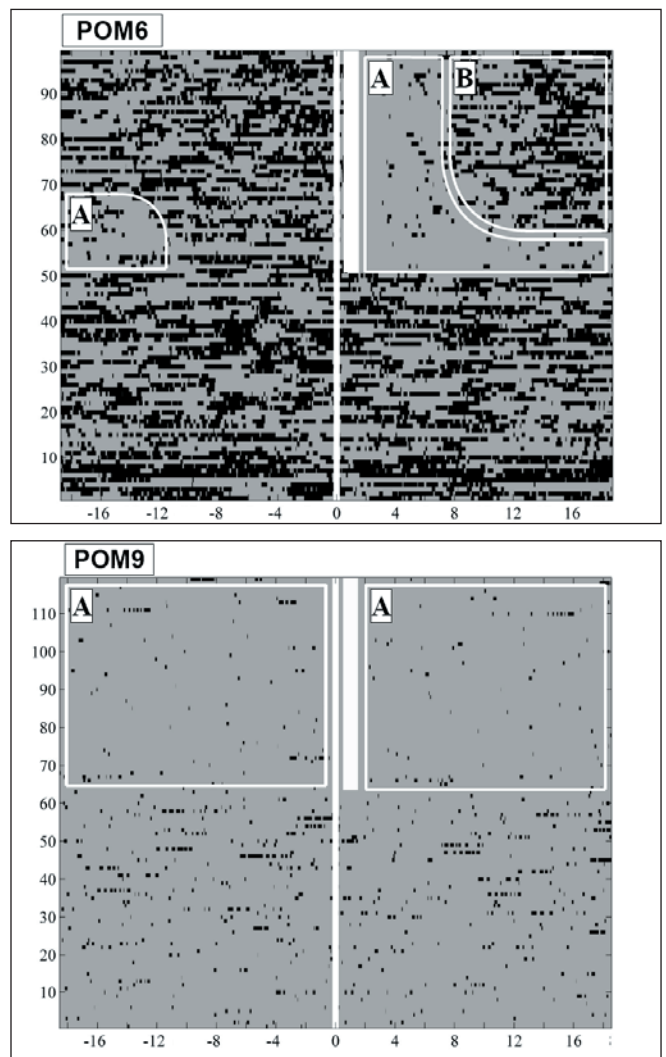


Rycina 2. Schemat doświadczenia.

Wyniki

W doświadczeniu zaobserwowaliśmy epizody oscylacji 7-12 Hz u wszystkich szczurów (w różnym nasileniu w zależności od osobnika). Stwierdziliśmy jednak, że u wszystkich wprowadzenie bodźca awersyjnego istotnie ograniczało występowanie tych epizodów (Ryc. 3). Taki wpływ bodźców awersyjnych na przedstawione zjawisko tłumaczymy tym, że omawiana aktywność oscylacyjna spada wraz ze wzrostem poziomu wzbudzenia szczura (zakładamy bowiem, że poziom wzbudzenia wzrasta wskutek aplikowania bodźców awersyjnych).

U niektórych szczurów zaobserwowaliśmy stopniowe ponowne zwiększanie się aktywności oscylacyjnej w paśmie 7-12 Hz wraz z powtarzaniem bodźca awersyjnego. Tłumaczymy to habituacją tych zwierząt do powtarzającego się, niebólowego bodźca awersyjnego. Brak habituacji u pozostałych szczurów tłumaczymy osobniczą zdolnością szczurów do habituacji do bodźca awersyjnego. Powyższe wyniki ilustruje Rycina 3.

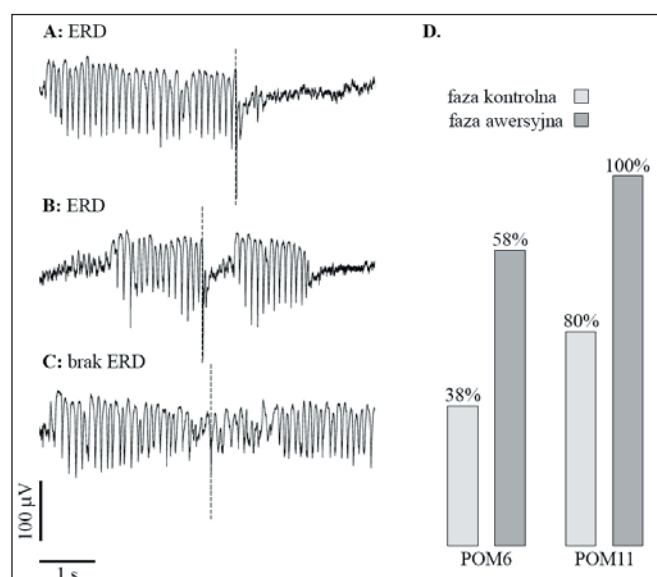


Rycina 3. Epizody oscylacji 7-12 Hz w LFP dwóch przykładowych szczurów (oznaczonych w doświadczeniu jako POM6 i POM9).

czeniu – i na powyższych rysunkach – akronimami POM6 i POM9). Na osi poziomej rysunków odłożono fragment czasu doświadczenia – kilkanaście sekund przed i po każdej stymulacji wibrisy. Na osi pionowej odłożono kolejne takie fragmenty doświadczenia, ponumerowane od 1 do 100 dla POM6 (a od 1 do 120 dla POM9, w przypadku którego stymulacji było 120), w kolejności odpowiadającej następującym po sobie stymulacjom. Epizody oscylacji 7-12 Hz oznaczone są czarnymi plamami na szarym tle. Pionowa gruba linia biegnąca przez całą wysokość rysunków oznacza moment stymulacji wibrisy. Jasny prostokąt tła po prawej stronie białej linii pokrywa fragment czasu, w którym aplikowany był bodziec awersyjny. Obszary oznaczone literą A ilustrują spadek zagęszczenia epizodów oscylacji 7-12 Hz po wprowadzeniu bodźca awersyjnego. Obszar B u szczura POM6 ilustruje wyraźny stopniowy powrót epizodów oscylacji wraz z powtarzaniem bodźców awersyjnych (habitucja). U szczura POM9 takie zjawisko nie występuje.

U dwóch szczurów, dla których dysponujemy dostateczną liczbą danych, stwierdziliśmy także liczne przypadki częściowej lub całkowitej desynchronizacji HVRS wywołanej stymulacją wibrisy (tzw. ERD, ang. *event-related desynchronization*) – Rycina 4A, B. (U tych dwóch szczurów stymulacje wibrisy zachodziły na epizody oscylacji 7-12 Hz po około 25 razy; u pozostałych szczurów – tylko kilkakrotnie, a wpływ stymulacji na przebieg tych epizodów był również trudniejszy do określenia).

ERD występowało szczególnie często w fazie awersyjnej doświadczenia (Rycina 4D). Wzrost efektywnej desynchronizacji epizodów HVRS w fazie awersyjnej można tłumaczyć długotrwałym zwiększeniem reaktywności kory wskutek stosowania bodźców awersyjnych.



Rycina 4. A, B. Przykłady desynchronizacji (ERD) epizodów HVRS przez stymulacje wibrisy (momenty stymulacji zaznaczone strzałką). **C.** Przykład braku ERD. **D.** Odsetek przypadków desynchronizacji wśród wszystkich przypadków zajścia stymulacji wibrisy na epizod HVRS u szczurów POM6 i POM11. Dane przedstawiono odrębnie dla fazy kontrolnej i awersyjnej.

Wnioski

Analiza wyników doświadczenia wskazuje, iż aktywność oscylacyjna w paśmie 7-12 Hz (aktywność HVRS) to zjawisko będące korelatem niskiego poziomu wzbudzenia szczura i tzw. biernego stanu kory (ang. *idle state*).

Obserwowany efekt desynchronizacji epizodów oscylacji 7-12 Hz przez bodźce nieawersyjne (stymulacje wibrisy) ma ważne implikacje teoretyczne. Bezwarunkowa siła tych bodźców była niewielka, szczury były do nich przyzwyczajane w sesjach habituacyjnych. Przerwanie epizodów HVRS przez nieawersyjną stymulację dotykową świadczy o zdolności kory baryłkowej do reakcji nawet na słabe bodźce, a więc przemawia za jej fizjologicznie prawidłową, a nie patologiczną aktywnością.

Podziękowania

Wykorzystane dane doświadczenia zostały zebrane przez zespół: prof. dr hab. Andrzej Wróbel, dr Ewa Kublik, dr Daniel Świejkowski z Pracowni Układu Wzrokowego Instytutu Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN.

Wykonanie powyższych badań było możliwe dzięki wsparciu finansowemu udzielonemu przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (gran-ty N40114631/3239 i COST/127/2007).

Piśmiennictwo

- Alonso A. Idling With the μ Rythm? Focus on "7 to 12 Hz Activity in Rat Gustatory Cortex Reflects Disengagement From a Fluid Self-Administration Task". *J Neurophysiol* 93: 2372-2373, 2005.
- Kublik E, Musiał P. Badanie układów czuciowych metodą potencjałów wywołanych. *Kosmos – Problemy nauk biologicznych* 3 (236): 327-336, 1997.
- Paxinos G. *Rat Nervous System* 3. Elsevier Academic Press 2004.
- Polack P, Charpier S. Intracellular activity of cortical and thalamic neurons during high-voltage rhythmic spike discharge in Long-Evans rats *in vivo*. *J Physiol* 571.2: 461-476, 2006.
- Shaw FZ. Is Spontaneous High-Voltage Rhythmic

- Spike Discharge in Long Evans Rats an Absence-Like Seizure Activity? *J Neurophysiol* 91: 63-77, 2004.
6. Shaw FZ. 7-12 Hz High-Voltage Rythmic Spike Discharges in Rats Evaluated by Antiepileptic Drugs and Flicker Stimulation. *J Neurophysiol* 97: 238-247, 2007.
7. Wiest MC, Nicolelis MAL. Behavioral detection of tactile stimuli during 7-12 Hz cortical oscillations in awake rats. *Nat Neurosci* 6.9: 913-914, 2003.
8. Fontanini A, Katz DB. 7 to 12 Hz Activity in Rat Gustatory Cortex Reflects Disengagement From a Fluid Self-Administration Task. *J Neurophysiol* 93: 2832-2840, 2005.
9. Wróbel A. Zbiorcza aktywność eklektyczna mózgu. *Kosmos – Problemy nauk biologicznych* 3 (236): 317-326, 1997.

Adres korespondencyjny:

Aleksander Sobolewski,
Instytut Biologii Doświadczalnej
im. M. Nenckiego,
Polska Akademia Nauk,
Zakład Neurofizjologii,
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa,
e-mail: a.sobolewski@nencki.gov.pl

Długość oraz częstotliwość występowania paczek beta jako neuronalny korelat zmian mechanizmu uwagi związanych z procesami starzenia

Length of beta bursts and their frequency of occurrence – a neuronal correlates of visual attention mechanism – change with age

Mateusz Gola¹, Jan Kamiński^{1,2}, Aneta Brzezicka¹, Andrzej Wróbel^{1,2}

¹Katedra Psychofizjologii Procesów Poznawczych, Wydział Psychologii, Szkoła Wyższa Psychologii Społecznej

²Pracownia Układu Wzrokowego, Zakład Neurofizjologii, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego

Streszczenie

W badaniach na zwierzętach stwierdziliśmy [6], że mechanizm uwagi rozprzestrzenia się w układzie wzrokowym za pośrednictwem charakterystycznych paczek oscylacji o częstotliwości elektroencefalograficznej w paśmie beta (12-29 Hz). W tej pracy podjęto próbę zaobserwowania podobnej aktywności w ludzkim EEG oraz scharakteryzowania jej w różnych grupach wiekowych. W zadaniu różnicowania przestrzennego, wymagającym udziału uwagi wzrokowej lub słuchowej stwierdziliśmy, że w sygnale EEG rejestrowanym w potylicznych odprowadzeniach można wyróżnić paczki aktywności beta. Stwierdziliśmy jednocześnie, że liczba i średni czas trwania tych paczek są największe u osób starszych źle radzących sobie z zadaniem, i odpowiednio mniejsze u starszych dobrze różnicujących bodźce oraz osób młodych. Wzrost liczebności i średniego czasu trwania paczek beta u osób starszych sugeruje, iż wzbudzanie uwagi wymaga u nich większego zaangażowania mechanizmu wywołującego oscylacje beta.

Słowa kluczowe: EEG, paczki beta, uwaga wzrokowa, starzenie

Abstract

The results of our animal studies [6] have suggested that short bursts of beta oscillatory activity (12-29 Hz) might be used as a carrier for attentional activation within the visual system (Wróbel 2000). Here we have made an effort to find a similar activity in human EEG data, and to relate it with aged dependent deficits of visual attention. Young and old subjects were involved in visual and auditory spatial differentiation paradigms. Beta burst activity was identified in all subjects but the number and duration of these bursts increased with age and behavioral performance. The results suggested that attentional mechanisms are more activate in elderly human subjects, yet their efficiency is not as good as in younger people.

Key Words: EEG, beta bursts, visual attention, ageing

Wstęp

Pytania dotyczące fizjologicznych mechanizmów starzenia trapią ludzkość od wieków. Od czasu, gdy nauka podjęła próby ich wyjaśnienia, powstało wiele modeli socjologicznych, psycho-

logicznych i biologicznych opisujących starzenie z różnych perspektyw. Wyniki najnowszych badań pozwalają stwierdzić, iż nie są to z pewnością procesy stochastyczne, a dużą w nich rolę odgrywają mechanizmy genetyczne oraz różne czynniki środowiskowe [1]. Wielość aspektów starzenia spowodowała, iż badacze wybiórczo eksplorują ten obszar, ograniczając się do wyjaśniania szczegółowych zagadnień. Ta praca nie jest wyjątkiem – postanowiliśmy skupić się w niej na neuronalnych korelatach zmian uwagi związanych z procesami starzenia.

Badania prowadzone w naszej pracowni wskazują na to, że nośnikiem pobudzenia będącego podłożem mechanizmu uwagi w układach zmysłowych jest aktywność oscylacyjna o częstotliwości w paśmie beta (12-29 Hz). Przedstawiona przez nas hipoteza zakłada, że oscylacje o częstotliwości beta pojawiają się w stanach wzmożonej uwagi w tych okolicach mózgu, które zajęte są przetwarzaniem określonego bodźca zmysłowego, wywołując podstawowy stan aktywności, potrzebny dla procesów percepcyjnych [6]. Najwięcej danych na ten temat pochodzi z badań na kotach, u których rejestrowaliśmy aktywność elektryczną mózgu podczas wykonywania zadań angażujących uwagę w modalności wzrokowej lub słuchowej. W doświadczeniach tych stwierdziliśmy, że w czasie, w którym kot obserwował z uwagą ekran aby rozpoznać bodziec informujący o lokalizacji nagrody, w wielu ośrodkach układu wzrokowego, w tym w korze wzrokowej, następował wzrost aktywności oscylacyjnej w zakresie pasma beta. W zadaniu słuchowym lub w próbach wzrokowych nie zakończonych prawidłową reakcją, aktywności takiej w układzie wzrokowym nie zaobserwowano.

Dane literaturowe sugerują, że również u ludzi, w stanie uwagi wzrokowej można rejestrować wzmożoną aktywność beta z elektrod EEG umieszczonych potylicznie, nad okolicą projekcyjną układu wzrokowego [2] oraz nad grzbietową drogą korowego przetwarzania informacji wzrokowej [3]. W naszym laboratorium stwierdziliśmy, że moc pasma beta sygnału EEG rejestrowanego z elektrod potylicznych u ludzi maleje wraz ze wzrostem natężenia uwagi wzrokowej [6]. Jednak jest to wynik tylko pozornie sprzeczny z hipotezą o roli pasma beta w procesach uwagi. Elektrody naczaskowe rejestrują bowiem aktywność mózgu pochodzącą z dużego obszaru kory (ok. 10 cm²), co sprawia, że różnice w synchronizacji fazowej oscylacji beta w aktywnych kolumnach wzrokowych mogą wzajemnie znosić się w uśrednionym sygnale. Potwierdzeniem ta-

kiej hipotezy są wyniki Gomeza, który wykazał, że ekspozycja statycznego bodźca wzrokowego pojawiającego się w oczekiwanej lub nieoczekiwanej przez uczestnika badania lokalizacji wywołuje wzrost aktywności beta jedynie w obszarze pola widzenia objętym uwagą [4].

Wzrost aktywności w zakresie częstotliwości beta podczas wykonywania zadań angażujących procesy uwagi jest związany ze zwiększeniem amplitudy i częstości występowania „paczek oscylacji” w tym paśmie, czyli erupcji aktywności beta, które rejestrowane w warstwie czwartej kory wzrokowej mają długość od kilkudziesięciu do kilkuset milisekund [5, 6]. Oscylacje beta wzbudzone przez znaczący bodziec w obszarach wzrokowych kory mózgu kota są przekazywane do innych obszarów mózgu, co wprowadza układ wzrokowy w stan pobudzenia, umożliwiając w efekcie powstanie synchronicznych oscylacji gamma, a przez to również percepcję. Nasza hipoteza przypisuje więc uwagowej aktywności beta rolę wzbudzającą, podobnie do uznanej już w literaturze roli aktywacyjnej pasma alfa w pobudzeniu niespecyficznym i roli pasma gamma w procesach integracyjnych [6].

W ostatnich badaniach [7] prowadzonych na kotach powiązано dwa podzakresy pasma beta (beta 1: 12-18 Hz oraz beta 2: 19-29 Hz) z powszechnie uznanym modelem dwukanałowej percepcji wzrokowej. Zgodnie z tym modelem istnieją dwa szlaki percepcji wzrokowej – szlak brzuszny (allocentryczny), biegnący od płata potylicznego do płata czołowego, związany z postrzeganiem obiektu oraz szlak grzbietowy (egocentryczny), biegnący od płata potylicznego do płata ciemieniowego, związany z postrzeganiem ruchu obiektów oraz możliwością manipulacji nimi. Nasze eksperymenty pokazały, że drogi te są aktywowane przez inne zakresy pasma beta: beta 1 związane jest z aktywacją szlaku brzuszego, natomiast beta 2 – grzbietowego. Podobne wyniki uzyskano z użyciem metody MEG na ludziach [8].

Zwiększona aktywność mózgu w paśmie beta, jako neuronalny korelat mechanizmu uwagi, powinna pozostawać w związku ze stosowanymi w psychologii poznawczej wskaźnikami jej funkcjonowania, takimi jak poprawność odpowiedzi oraz czasy reakcji mierzone w zadaniach wymagających zaangażowania zasobów uwagowych. Jakkolwiek sama definicja uwagi, formułowana na gruncie psychologii jest przedmiotem nieustannej dyskusji, to większość wyników badań dotyczących różnic grupowych pomiędzy osobami starszymi i młodymi pozostaje spójna. Najczęściej opisywanym w literaturze efektem ogólne

spowolnienie (ujawniane w czasach reakcji na bodziec) w przypadku osób starszych [9]. Ludzie starsi uzyskują w zadaniach uwagowych czasy reakcji dłuższe niż osoby młode. Również spowolnieniem w obrębie podstawowych procesów poznawczych wyjaśnia się obserwowane wśród osób starszych pogorszenie wykonywania zadań o znacznym stopniu złożoności [10]. Ostatnie badania skupiają się na określeniu deficytów procesów poznawczych (tj. przełączania uwagi, hamowania, dostępu do pamięci operacyjnej), które odpowiadają za obserwowane spowolnienie [11]. Jeśli paczki oscylacji beta mają związek z uwagą, to zmiana ich charakterystyki z wiekiem powinna korelować ze zmianami zachowania. Aktywność beta mogłaby więc stać się wskaźnikiem spowolnienia procesów poznawczych u ludzi w starszym wieku.

Hipoteza badawcza

Średnia długość paczek beta w sygnale EEG rejestrowanym z potylicznych elektrod u osób starszych podczas rozwiązywania zadania wymagającego uwagi będzie w próbach wzrokowych istotnie większa od średniej długości tych paczek u osób młodych.

Materiały i metody

Osoby badane

W eksperymencie wzięło udział 17 osób w dwóch grupach wiekowych. Dziesięcioro spośród uczestników badania to osoby w wieku od 19 do 27 lat ($21,70 \pm 2,36$, średnia \pm SD; sześć kobiet i czterech mężczyzn) natomiast siedmioro to osoby w wieku od 62 do 75 lat ($69,86 \pm 5,15$; pięć kobiet i dwóch mężczyzn). Warunkiem dopuszczenia do udziału w badaniu osób starszych było uzyskanie co najmniej 25 punktów w badaniu przesiewowym z wykorzystaniem Krótkiej Skali Oceny Stanu Psychicznego (*Mini Mental-State Examination*, MMSE).

Aparatura i materiały badawcze

W badaniu wykorzystano wielokanałowy wzmacniacz EEG, czepek *Electro-Cap*, słuchawki stereofoniczne oraz komputery typu PC z 17-calowymi monitorami. Program procedury eksperymentalnej napisano w programie *Inquisit 2.0*. Wszystkie analizy statystyczne wykonano za pomocą pakietu Matlab R2007b oraz pakietu statystycznego SPSS 14 PL.

W badaniu przygotowawczym wykorzystano Krótką Skalę Oceny Stanu Psychicznego (MMSE)

– trwający około 10 minut test przesiewowy objawów demencji składający się z zadań diagnozujących poziom podstawowych funkcji poznawczych (np. zapamiętywania, dokonywania operacji arytmetycznych, orientacji przestrzennej; Folstein i inni [12]).

Procedura doświadczalna

Badanie zaprojektowano w schemacie różnicowym mieszanym $2 \times (2) \times (3) \times (3)$. Dwóm grupom uczestników badania (osobom starszym oraz młodszym) prezentowano bodźce wzrokowe oraz słuchowe w trzech czasach odroczenia (3 s, 4 s, 5 s, 7 s) od bodźca wskazującego modalność próby (ang. *cue*) oraz w trzech stopniach trudności (określanych przez czasową odległość między dwoma bodźcami docelowymi, prezentowanymi asynchronicznie w lewym i prawym polu widzenia lub kanale słuchowym).

Do stworzenia procedury wykorzystano samodzielnie opracowane bodźce graficzne, oraz dźwiękowe. Przy ich tworzeniu brano pod uwagę możliwe niewielkie deficyty wzroku i słuchu u uczestników badania (szczególnie osób w wieku starszym), dlatego też stworzone bodźce charakteryzuje odpowiednio duży rozmiar (w przypadku bodźców wzrokowych) oraz natężenie dźwięku (w przypadku bodźców słuchowych). Wszystkie bodźce są łatwo dostrzegalne dla ludzi bez oślepienia i znacznych deficytów wzroku lub słuchu.

Po zapoznaniu się z instrukcją badania (prezentowaną na monitorze LCD) uczestnik rozpoczynał fazę wstępną, na którą składało się sześć prób, wybranych losowo spośród zaprezentowanych poniżej możliwych rodzajów zadań (Rycina 1):

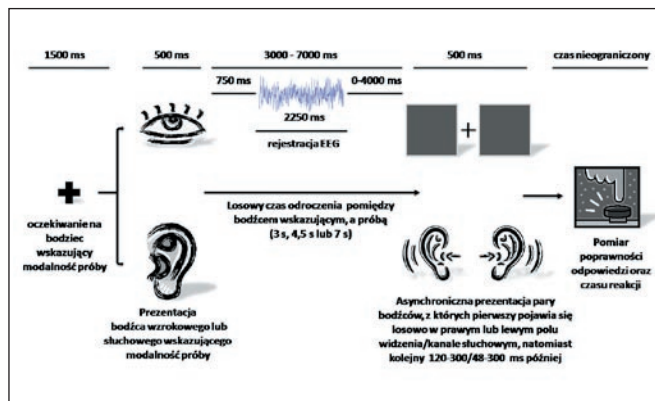
1. Zadanie wzrokowe. Prezentacja pary bodźców wzrokowych (dużych jasnoszarych kwadratów na czarnym tle), z których jeden pojawiał się od 160 do 600 milisekund wcześniej niż drugi (po lewej lub prawej stronie ekranu). Bodźce eksponowane były przez 300 milisekund. Ich wystąpienie sygnalizowano od 3 do 7 sekund wcześniej poprzez 500 milisekundową, jednoczesną ekspozycję obu bodźców wzrokowych.

2. Zadanie słuchowe. W sposób analogiczny prezentowane były bodźce słuchowe. Czas ekspozycji tych bodźców wynosi 100 milisekund, a różnica w pojawieniu się bodźców w prawym lub lewym kanale słuchowym mieściła się w zakresie od 48 do 300 milisekund. Próby słuchowe były sygnalizowane jednoczesnym dźwiękiem w obu kanałach, występującym na 3 do 7 sekund wcześniej i trwającym 500 milisekund.

3. Zadanie kontrolne. Prezentowane były jednocześnie dwa ciemnoszare kwadraty, przekreślone

liniami w kolorze bordo. Ich ekspozycja trwała pięć sekund, a po nich następowało przejście do kolejnej próby.

Uczestnik badania w próbach typu 1 i 2 miał za zadanie odpowiedzieć na pytanie, który z bodźców pojawił się pierwszy – prawy czy lewy. Czas odpowiedzi nie był limitowany. Podczas prób typu 3 osoba badana zgodnie z instrukcjami mogła zmniejszyć stan uwagi i odpocząć (nie musiała odpowiadać na żadne pytanie). Po fazie wstępnej, składającej się z sześciu ekspozycji, następowało badanie, podczas którego w losowej kolejności prezentowano 120 prób. Częstość wystąpienia każdego z rodzajów prób była w pełni równoważona. Co 30 prób następowała przerwa, której długość uczestnik badania regulował samodzielnie. Czas trwania procedury wynosił od 24 do 30 minut – zależnie od długości przerw, którą regulował uczestnik badania. Czas trwania całego badania uwzględniający założenie i podłączanie elektrod oraz czepka wynosił od 60 do 90 minut w zależności od oporności elektrycznej skóry u danego uczestnika badania.



Rycina 1. Graficzne przedstawienie procedury badania.

Rejestracja sygnałów

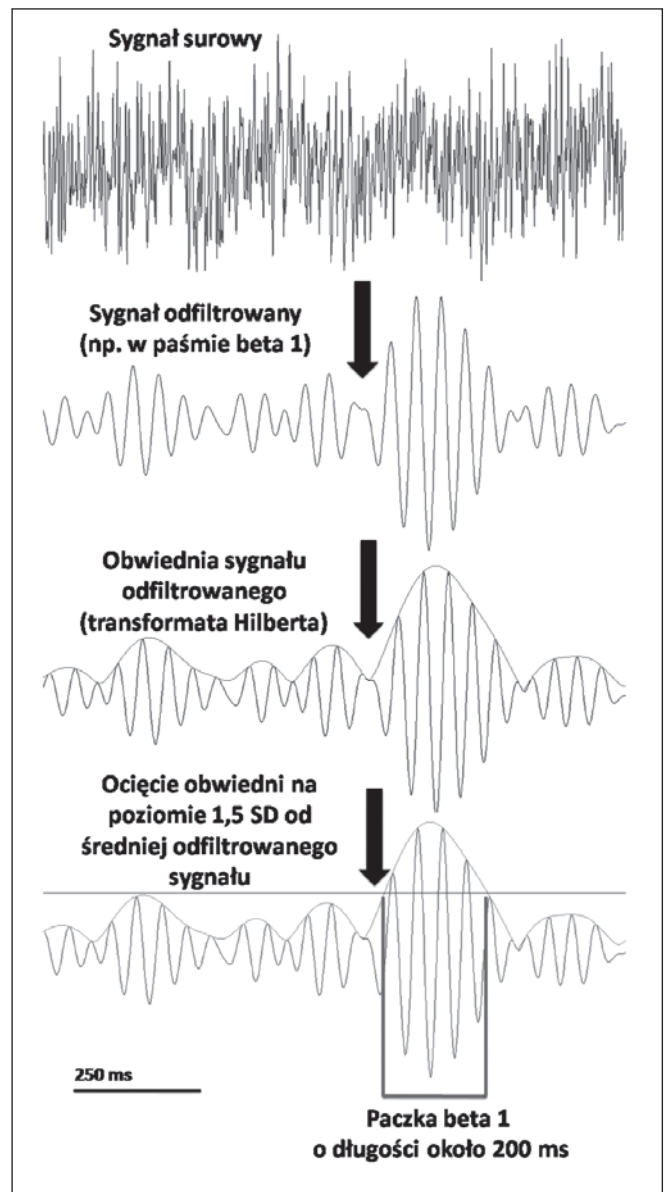
Sygnaly EEG rejestrowano ze skóry czaszki uczestnika badania. Do rejestracji wykorzystano 11 elektrod (w systemie 10/20): O1, O2, T3, T4, P3, P4, Pz, F3, F4, Fz. Rejestrowany sygnał wzmacniany był 20 000 razy. Zastosowano dwa filtry sprzętowe: dolnoprzepustowy 100 Hz oraz górnoprzepustowy 0, 1 Hz. Częstotliwość próbkowania sygnału wynosiła 400 Hz.

Analiza sygnałów

Przed przystąpieniem do analizy sygnałów dokonano wzrokowej klasyfikacji artefaktów. Do analizy włączono odcinki rejestrowanego sygnału następujące 750 milisekund po prezentacji wskazówki (cue) oraz kończące się 3000 milisekund po tej prezentacji. Taki wybór podyktowany był ko-

niecznością usunięcia sygnału zawierającego odpowiedź wywołaną prezentacją „wskazówki” oraz bodźcem docelowym. Kolejnym krokiem było odfiltrowanie sygnału w zakresach częstotliwości: beta 1: 12-18 Hz, beta 2: 19-29 Hz.

Na wartości absolutnej odfiltrowanego sygnału przeprowadzana była transformata Hilberta. Uzyskano w jej wyniku obwiednię filtrowanego sygnału. Za definicję „paczki oscylacji” przyjęto utrzymującą się przez minimum 70 milisekund wartość obwiedni przekraczającą 1,5 odchylenia standardowego od średniej sygnału zarejestrowanego u danej osoby przez daną elektrodę we wszystkich próbach włączonych do analizy. Procedura analizy sygnałów przedstawiona została na Rycinie 2.



Rycina 2. Graficzne przedstawienie sposobu analizy sygnałów.

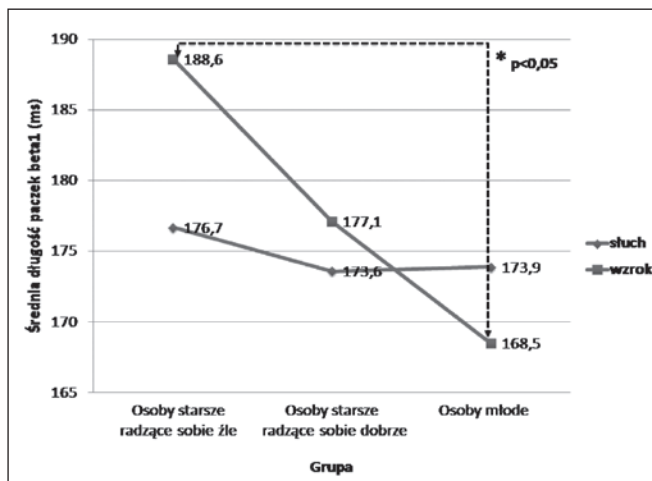
Wyniki

Na podstawie stopnia poprawności odpowiedzi osoby badane podzielono na trzy grupy:

- 1) Osoby starsze, źle radzące sobie z zadaniem (trzy kobiety, w wieku od 69 do 72 lat, $71 \pm 1,73$) – poprawność odpowiedzi na poziomie 59%-69% ($63,33\% \pm 5,13\%$).
- 2) Osoby starsze, radzące sobie dobrze z zadaniem (cztery osoby – dwie kobiety i dwu mężczyzn, w wieku od 62 do 75 lat, $69 \pm 6,98$) – poprawność odpowiedzi na poziomie 88%-96% ($90,5\% \pm 3,79\%$).
- 3) Osoby młode (10 osób – sześć kobiet i czterech mężczyzn w wieku od 19 do 27 lat, $21,70 \pm 2,36$) – poprawność odpowiedzi na poziomie 92%-97% ($94,9\% \pm 2,08\%$).

Wszystkie dalsze analizy przeprowadzone zostały w podziale na te trzy grupy.

Za pomocą analizy wariancji porównano średnie długości paczek beta 1 oraz beta 2 w sygnale zebranym z elektrod O1 i O2 (płaty potyliczne). Wyniki analizy długości paczek beta 1 przedstawiono na rycinie 3.



Rycina 3. Różnice średnich długości paczek beta 1 w sygnale z elektrod O1 i O2.

Analiza średnich długości paczek beta 1 wykazała istotną różnicę pomiędzy długością tych paczek w warunkach wzrokowych u osób starszych, źle rozwiązujących zadanie oraz osób młodych ($p < 0,05$). Paczki beta 1 są istotnie dłuższe dla osób starszych, źle rozwiązujących zadanie (średnia 188,6 ms) niż młodych (średnia 168,5 ms). W przypadku warunków słuchowych nie ujawniono istotnych różnic.

Analiza średnich długości paczek beta 2 nie wykazała istotnych różnic zarówno w warunkach wzrokowych, jak i słuchowych. Wyniki długości paczek w obu warunkach nie różniły się również od siebie w sposób istotny.

Analiza częstości występowania paczek beta 1 ujawniła istotne różnice w liczebnościach ważonych przez liczbę osób w grupie, w zależności od grup ($\chi^2(2) = 25,2$; $p < 0,001$). Wyniki przedstawiono w Tabeli 1.

	Średnia liczba paczek beta 1 na osobę w danej grupie
Osoby starsze, źle radzące sobie z zadaniem	133
Osoby starsze, dobrze radzące sobie z zadaniem	96
Osoby młode	63

Tabela 1. Różnice ważonej przez liczbę osób liczebności paczek beta 1 w sygnale z elektrod O1 i O2 w podziale na grupy.

Dyskusja

Otrzymane wyniki stanowią pozytywną weryfikację postawionej hipotezy. Co więcej, istotne różnice w długości i częstości występowania paczek stwierdziliśmy jedynie w paśmie beta 1. Wynik ten zgadza się z faktem, że bodźce używane w zastosowanym paradigmatcie nie poruszały się, a więc strumień grzbietowy najprawdopodobniej nie był w naszym doświadczeniu aktywowany przez częstotliwość uwagową beta 2.

Wzrost liczebności i czasu trwania paczek beta 1 w grupie osób starszych, źle radzących sobie z zadaniem uwagi wzrokowej w porównaniu do młodych, potwierdza hipotezę o podstawowym znaczeniu aktywności beta we wzbudzeniu uwagowym. Średnia liczba paczek beta 1 rejestrowana u osób starszych (133), źle radzących sobie z zadaniem była ponad dwukrotnie wyższa niż liczba paczek zidentyfikowanych u osób młodych (63). Wzrost liczebności i średniego czasu trwania paczek beta sugeruje, że wzbudzanie uwagi u osób starszych wymaga większej aktywności mechanizmu wywołującego oscylacje beta. Aktywacja ta nie kompensuje jednak całkowicie mniejszej pobudliwości sieci nerwowej, gdyż wyniki behawioralne u osób starszych są gorsze.

Pojawienie się różnic w paśmie beta 1 oraz brak takich różnic w paśmie beta 2 w kontekście zadania, w którym uczestnik badania miał do czynienia z bodźcami statycznymi, pojawiającymi się w stałym miejscu, jest zgodne z modelem wiążącym te dwa zakresy częstotliwości z dwoma szlakami wzbudzenia uwagi wzrokowej [7].

W oparciu o zaprezentowane wyniki można przypuszczać, że podobnie jak u kota [5, 6] również u ludzi, wzrost aktywności w paśmie beta jest związany ze wzbudzeniem uwagi w układzie zmy-

słowym o modalności zaangażowanej w danym zadaniu. Następnym krokiem powinno być podjęcie próby powiązania opisanego zjawiska z psychologicznymi modelami uwagi oraz konkretnymi procesami poznawczymi.

Podziękowania

Wykonanie powyższych badań było możliwe dzięki wsparciu finansowemu udzielonemu przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego (gran-ty N40114631/3239 i N106 017 31/1344).

Piśmiennictwo

1. Mossakowski M., i Strosznajder J., (2001). *Mózg a starzenie*. Centrum upowszechniania nauki PAN, Warszawa 2001.
2. Ray W.J. i Cole M.W., (1985). EEG alpha activity reflects attentional demands, and beta activity reflects emotional end cognitive processes. *Science*, 228, 750-752.
3. Gross J., Schmitz F., Schnitzler I., Kessler K., Shapiro K., Hommel B.I., Schnitzler A., (2004). Modulation of long-range neural synchrony reflectstemporal limitations of visual attention in humans. *Proc Natl Acad Sci*, 101 (35): 13050-13055.
4. Gomez C.M., Vazquez M., Vaquero E., Lopez-Mendoza D. i Cardoso M.J., (1998). Frequency analysis of the EEG during spatial selective attention. *International Journal of Neuroscience*, 95, 17-32.
5. Bekisz M. i Wróbel A., (1999). Coupling of beta and gamma activity in corticothalamic system of cats attending to visual stimuli. *NeuroReport*, 10, 3589-3594.

6. Wróbel A., (2000). Beta activity: A carrier for visual attention. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, 60, 247-260.
7. Wróbel A., Ghazaryan A., Bekisz M., Bogdan W. and Kamiński J., (2007) Two streams of attention dependent beta activity in the striate recipient zone of cat's lateral posterior – pulvinar complex. *J. Neurosci.* (2007) 27: 2230-2240.
8. Fox M.D., Corbetta M., Snyder A.Z., Vincent J. L., i Raichle M.E., (2006). Spontaneous neuronal activity distinguishes human dorsal and ventral attention systems. *Natl Acad Sci*, 10.1073/pnas.0604187103.
9. Salthouse T.A., (1996). The processing-speed theory of adult age differences in cognition. *Psychological Review*, 103 (3), 403-428.
10. Salthouse T. A., (1993). Speed mediation of adult age differences in cognition. *Developmental Psychology*, 29, 722-738.
11. Oberauer K., (2006). *Różnice w funkcjach poznawczych związane z wiekiem i cechami indywidualnymi* w: Engle R.W., Sędek G., Hecker U., McIntosh D.N., Ograniczenia poznawcze: Starzenie się i psychopatologia, Academica i Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2006.
12. Folstein M.F., Folstein S.E., McHugh P.R., (1975). „Mini-mental state”. A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician”. *Journal of psychiatric research* 12 (3): 189-98.

Adres korespondencyjny:

Mateusz Gola,
Szkoła Wyższa Psychologii Społecznej,
ul. Chodakowska 19/31, 03-815 Warszawa,
e-mail: mateusz.gola@gmail.com

Analiza okołodobowej aktywności neuronów serotoninergicznych przyśrodkowych jąder szwu szczura

Analysis of circadian activity of serotonergic neurons in the median raphe nuclei of the rat

Katarzyna Werhun, Marian H. Lewandowski

Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii, Instytut Zoologii UJ, Kraków

Streszczenie

Jądra nadskrzyżowaniowe (suprachiasmatic nuclei, SCN) podwzgórza u ssaków stanowią wewnętrzny generator rytmów biologicznych, tzw. zegar biologiczny. Serotoninergiczne unerwienie pochodzące z przyśrodkowych jąder szwu (*median*

raphe nuclei – MRN) jest jedną z trzech głównych projekcji do SCN, co wskazuje na jej silny wpływ i udział w aktywności zegara biologicznego ssaków. Pomimo dobrze udokumentowanej roli serotoniny (5-HT) w funkcjonowaniu zegara biologicznego ssaków, niewiele wiadomo o okołodobowej aktywności samych neuronów MRN. Szereg parametrów

charakteryzujących funkcjonowanie systemu serotonergicznego wykazuje okołodobowe zmiany, w tym stężenie hydroksylazy tryptofanu (tryptophan hydroxylase – TPH), poziom ekspresji mRNA dla genu *tph2* wewnątrz MRN czy uwalnianie 5-HT do różnych struktur mózgowia. Celem naszych doświadczeń było określenie okołodobowego profilu spontanicznej aktywności serotonergicznym neuronów przyśrodkowych jąder szwu szczura. Eksperymenty przeprowadzone zostały metodą zewnątrzkomórkowej rejestracji potencjałów czynnościowych *in vivo*. Neurony klasyfikowano jako serotonergiczne na podstawie parametrów elektrofizjologicznych. Zaobserwowaliśmy, iż również na poziomie generowania przez komórki 5-HT potencjałów czynnościowych mamy do czynienia z okołodobowymi wahaniami. Średnia aktywność neuronów 5-HT osiągała dwa maksima: na początku nocy i godzinę po rozpoczęciu dnia, oraz dwa minima: w środku fazy jasnej oraz fazy ciemnej. Dodatkowo zaobserwowaliśmy, iż pojedyncze komórki serotonergiczne mogą wykazywać różne wzorce aktywności i płynnie przechodzić z jednego w drugi.

Słowa kluczowe: przyśrodkowe jądra szwu (MRN), jądra nadskrzyżowaniowe (SCN), system serotonergiczny, aktywność spontaniczna neuronów, badania *in vivo*, glukokortykoidy

Abstract

The suprachiasmatic nuclei (SCN) of the hypothalamus constitutes the master clock involved in the generation and regulation of mammalian circadian rhythms. Serotonergic innervation arising from the median raphe nucleus (MRN) is one of the major inputs to the SCN, thereby indicating its important role in the regulation of the time-keeping system in mammals. Despite the well studied roles of serotonin (5-HT) in the circadian system, little is known regarding the function of serotonergic neurons of the MRN. Several parameters describing the functioning of the 5-HT system are the rhythmic, including tryptophan hydroxylase (TPH) protein levels, TPH2 mRNA expression within the MRN, and release of 5-HT within various brain structures. The aim of the present study was to determine the day/night profiles of spontaneous discharges from 5-HT neurons within the median raphe nucleus of the rat, by using *in vivo* measurements of extracellular single-unit activity. We have classified neurons as serotonergic on the basis of electrophysiological criteria. Our results indicate that the level of spontaneous discharges of 5-HT neurons follow circadian

fluctuations. The mean activity of the 5-HT neurons reached two peaks; one at the day/night transition and one hour after day onset. The activity also reached two nadirs in the middle of light and night phase. Additionally, we noticed that a single serotonergic cell can display different patterns of neuronal activity and switch from one pattern to another.

Key Words: *medial raphe nucleus, suprachiasmatic nucleus, serotonergic system, spontaneous neuron activity, in vivo, glucocorticoids*

Wstęp

Jądra nadskrzyżowaniowe (*suprachiasmatic nuclei*, SCN) podwzgórza mózgu ssaków są, obok listka ciała kolankowatego bocznego (*intergeniculate leaflet*, IGL), główną strukturą odpowiedzialną za generowanie i synchronizację rytmów okołodobowych, budują bowiem tzw. zegar biologiczny. Aktywność SCN ulega synchronizacji z czynnikami zewnętrznymi, z których najważniejszym jest dobowy cykl światło/ciemność [15, 17]. Informacja świetlna dociera do jąder nadskrzyżowaniowych zarówno bezpośrednio, przez monosynaptyczne połączenia z komórkami zwojowymi siatkówki (droga siatkówkowo–podwzgórzowa), jak również pośrednio poprzez IGL, który posiada połączenia nerwowe z SCN. Główny generator rytmów biologicznych synchronizowany jest również przez tzw. czynniki nieświatłne, takie jak reakcje wzbudzenia mózgowia, czynniki socjalne, dostępność pokarmu, emocje czy niektóre substancje farmakologiczne. Wpływy nieświatłne odgrywają szczególnie ważną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmów wyższych, a przede wszystkim człowieka. Jedną z dróg, którą informacja nieświatlna dociera do zegara biologicznego, stanowi projekcja serotonergiczna pochodząca z przyśrodkowych jąder szwu (*median raphe nuclei* – MRN). Serotonergiczne unerwienie z jąder szwu jest jedną z trzech głównych projekcji do SCN, co wskazuje na jej silny wpływ i udział w aktywności zegara biologicznego ssaków [3].

Serotonina (5-HT) jest zatem ważnym czynnikiem regulującym funkcjonowanie okołodobowego układu synchronizującego rytmy biologiczne gryzoni. Moduluje ona odpowiedź komórek SCN na wpływy świetlne. Podanie agonistów serotoniny do jąder nadskrzyżowaniowych osłabia wywołaną światłem ekspresję *c-fos*, jak również zmniejsza uwalnianie glutamianu poprzez działanie na zakończeniach siatkówki. Serotonina hamuje również wywołane światłem przesunięcie fazy rytmu aktywności lokomotorycznej [16, 17].

Pomimo dobrze udokumentowanej roli serotoniny w funkcjonowaniu zegara biologicznego ssaków, niewiele wiadomo o okołodobowej aktywności samych neuronów jąder szwu. Zarówno na drodze z grzbietowych jąder szwu (*dorsal RN*, *DRN*) do *IGL*, jak i z przyśrodkowych jąder szwu do *SCN* aktywność neuronów serotonergiczných wykazuje rytmiczne zmiany zarówno w warunkach światło/ciemność, jak i w warunkach stałego oświetlenia. Enzym uczestniczący w syntezie serotoniny – hydroksylaza tryptofanowa (*tryptophan hydroxylase*, *TPH*) wykazuje okołodobowe zmiany wewnątrz obu jąder szwu, zarówno na poziomie syntezy mRNA tego enzymu, jak i na poziomie samego białka. Także stężenie *TPH* na zakończeniach komórek serotonergiczných wewnątrz *SCN* i *IGL* wykazuje zmiany okołodobowe, które związane są z rytmicznym uwalnianiem serotoniny do tych struktur. Szereg parametrów opisujących funkcjonowanie systemu serotonergicznego wykazuje okołodobowe zmiany [5, 7, 11]. Jednak do tej pory nikt nie przeprowadził systematycznych badań spontanicznej aktywności neuronów 5-HT w różnych okresach doby. Dlatego celem prezentowanych eksperymentów było określenie, po raz pierwszy, okołodobowego profilu spontanicznej aktywności neuronów serotonergiczných przyśrodkowej części jąder szwu szczura w warunkach *in vivo*.

Materiały i metody

Eksperymenty przeprowadzono na samcach szczurów szczepu Wistar o wadze 250-350 g, pochodzących z hodowli Katedry Fizjologii Zwierząt Instytutu Zoologii UJ. Zwierzęta zostały poddane głębokiej narkozie przez dootrzewnowe podanie Urethanu (1,5 g/1000 g m.c.). Następnie umieszczone zostały w aparacie stereotaktycznym i podłączone do układu utrzymującego stałą temperaturę ciała ($37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$). Ogólny stan zwierzęcia był monitorowany przez ciągłą obserwację sygnałów EKG i EEG. Po odsłonięciu górnej powierzchni mózgowcaszki i uwidocznieniu szwów czaszkowych wyznaczających punkty Bregma i Lambda, zweryfikowano płaskie ułożenie czaszki. Następnie wykonano niewielkie kraniotomie, tak aby umożliwić stereotaktyczne umieszczenie elektrody rejestrującej w przyśrodkowych jądrach szwu [A/P= -12,3 mm (względem Bregmy), L/M= 0 mm (względem środka zatoki strzałkowej górnej), D/V= 8,8-10,2 mm (względem powierzchni mózgu), kąt mikromanipulatora = 30°], oraz dodatkowo nad zatoką strzałkową górną w celu wyznaczenia dokładnego środka mózgowia.

Spontaniczną aktywność serotonergiczných komórek nerwowych rejestrowano w warunkach

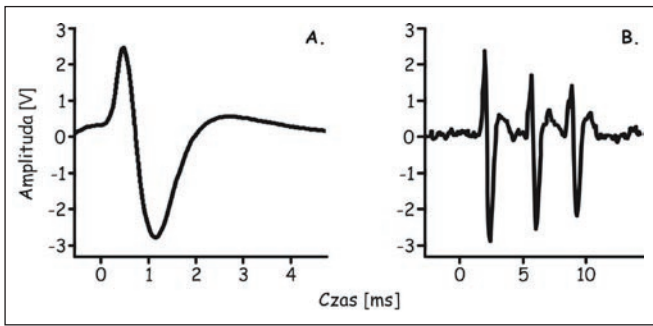
12 godzin światła/12 godzin ciemności (LD: 12/12), metodą zewnątrzkomórkowej rejestracji pojedynczych potencjałów czynnościowych. Do rejestracji wykorzystano szklane mikropipety o impedancji 9–15 M Ω , wypełnione 0,5 M roztworem chlorku sodu nasyconym barwnikiem Chicago Sky Blue. Sygnał po wzmocnieniu (10 000x) i filtracji (300–3000 Hz) przez wzmacniacz firmy Axon Instruments (model CyberAmp 380) był próbkowany przez przetwornik analogowo-cyfrowy firmy Cambridge Electronic Design (model micro2 mkII) obsługiwany przez oprogramowanie *Spike 2*. Poziom aktywności serotonergiczných komórek określano w trakcie trwania rejestracji. Ilość wygenerowanych przez badaną komórkę potencjałów czynnościowych w ciągu 1 sekundy przedstawiano graficznie w postaci histogramu aktywności.

Miejsce rejestracji każdorazowo zaznaczano, poprzez jonotoforetycznie zdeponowanie barwnika za pomocą elektrody rejestrującej, na którą podawano prąd o natężeniu 6 μA przez 4 min. Źródłem prądu stałego była prądowa jednostka izolująca firmy World Precision Instruments, model A360.

Po zakończonym eksperymencie elektrofizjologicznym zwierzęta poddawane były perfuzji, kolejno zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej i 4% roztworem paraformaldehydu (w objętości 250 ml). Następnie skrawki zawierające MRN wybarwiono przy pomocy techniki immunohistochemicznej na obecność serotoniny (poliklonalne przeciwciała anti-5-HT, JACKSON IR) w celu weryfikacji miejsca rejestracji. Tylko dane zarejestrowane z obszaru przyśrodkowych jąder szwu poddawane były dalszej analizie.

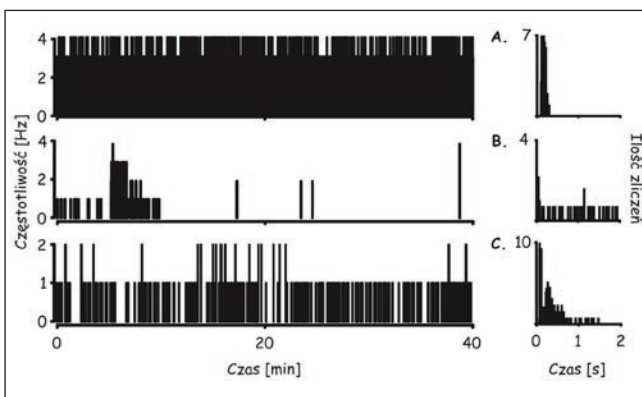
Wyniki

Neurony klasyfikowane były jako serotonergiczne, na podstawie elektrofizjologicznych kryteriów: potencjał czynnościowy charakteryzował się długim czasem trwania – przynajmniej 2 ms, kształt zewnątrzkomórkowego potencjału czynnościowego był dwu- lub trójfazowy z początkową komponentą dodatnią, natomiast częstotliwość generowania potencjałów czynnościowych wynosiła od 0 do 4 Hz (Rycina 1). Zazwyczaj aktywność tych komórek charakteryzowała również wysoka regularność. Wcześniejsze badania, wykorzystujące identyfikację antydromową lub farmakologiczną, jak również te łączące rejestracje pojedynczych potencjałów czynnościowych z techniką podwójnych barwień histochemicznymi, wykazały, iż taki wzorzec aktywności charakteryzuje komórki wyłącznie pozytywne serotoninowo, natomiast pozostałe komórki jąder szwu nie wykazują tego rodzaju aktywności [1, 2, 20].



Rycina 1. Przykłady zapisów zewnątrzkomórkowych potencjałów czynnościowych generowanych przez serotonergiczne neurony MRN. **A.** „Klasyczny”, pojedynczy potencjał czynnościowy. **B.** Triplet potencjałów czynnościowych.

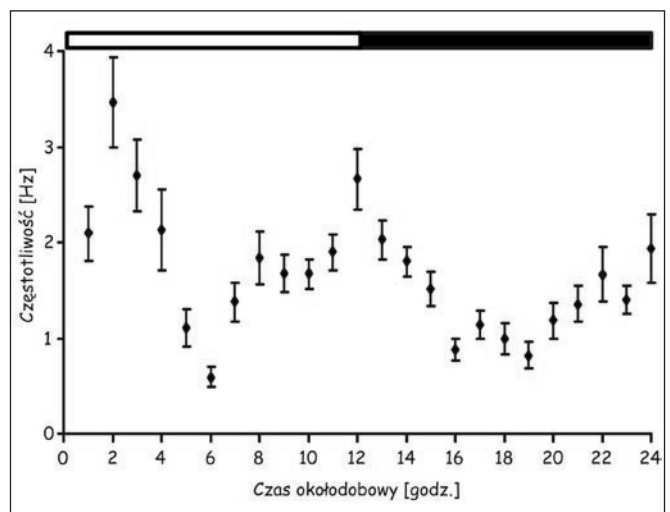
Spontaniczna aktywność komórek serotonergicznych charakteryzuje się wysoką regularnością. Jakkolwiek często obserwowaliśmy komórki, które po okresie regularnej pracy zmieniały swój wzór aktywności na nieregularny, erupcyjny lub też „milkły” (przestawały być aktywne), by po okresie względnej ciszy znów zacząć generować potencjały czynnościowe (Rycina 2). Obecnie istnieje już sporo prac, potwierdzających niektóre nasze obserwacje, opisujących taką aktywność komórek 5-HT w preparatyce *in vivo* [8, 9, 10]. Jednakże mowa jest w nich o subpopulacjach neuronów serotonergicznych, „klasycznych” – generujących pojedyncze potencjały czynnościowe w sposób regularny, bądź „erupcyjnych” – generujących potencjały czynnościowe w czasie erupcji aktywności (duplety, triplety potencjałów czynnościowych). Nasze obserwacje potwierdzają natomiast przypuszczenia, iż aktywność pojedynczych komórek 5-HT może płynnie przechodzić z jednego trybu pracy w drugi. Aby stwierdzić czy obserwowane wzorce aktywności są skorelowane z czasem okołodobowym, potrzebne są dodatkowe analizy.



Rycina 2. Histogramy spontanicznej aktywności neuronów MRN (lewy panel) oraz histogramy rozkładów interwałów między potencjałami czyn-

nościowymi dla poszczególnych rodzajów aktywności (prawy panel). Wszystkie histogramy wygenerowane zostały dla tej samej komórki w różnych momentach rejestracji. **A.** Aktywność regularna. **B.** Okresy „ciszy elektrycznej”. **C.** Aktywność nieregularna z okresami erupcji aktywności. Szerokość słupka dla histogramów aktywności – 1 s, szerokość słupka dla histogramów interwałów – 1 ms.

Po zarejestrowaniu aktywności spontanicznej pojedynczych komórek (czas rejestracji wynosił od 10 min do ponad 7 godzin) uzyskane dane zebrane zostały w 1-godzinne okresy czasowe i przedstawione w postaci zależności częstotliwości generowania potencjałów czynnościowych od czasu okołodobowego (Rycina 3). Zaobserwowaliśmy, iż aktywność komórek serotonergicznych zmienia się rytmicznie (sinusoidalnie) wokół doby. Średnia aktywność neuronów 5-HT osiągała dwa maksima, w okolicach początku nocy i godzinę po rozpoczęciu dnia, natomiast minimum aktywności obserwowaliśmy w środku fazy jasnej oraz fazy ciemnej. Analiza statystyczna wykazała, iż pomiędzy poszczególnymi punktami pomiarowymi występują istotne różnice. W celu potwierdzenia rytmicznego charakteru wahań częstotliwości generowania potencjałów czynnościowych przez komórki 5-HT wokół doby oraz lepszej wizualizacji tychże zmian, dopasowano model regresji nieliniowej.



Rycina 3. Wykres przedstawia zależność częstotliwości generowania potencjałów czynnościowych przez komórki MRN (średnia ± błąd standardowy) od czasu okołodobowego. LD 12:12, początek fazy jasnej o godzinie 08:00 to 0 czasu okołodobowego. Jednoczynnikowa analiza wariancji, oraz przeprowadzony po fakcie test Tukeya wykazały, iż pomiędzy poszczególnymi punktami pomiarowymi występują istotne statystycznie różnice ($F=7,37$; $p=4,02E-22$).

Dyskusja

Szereg badań, m.in. z użyciem technik molekularnych oraz mikrodializ, udowodnił, iż aktywność serotonergicznych komórek jąder szwu wykazuje okołodobowe (cirkadianne) wahania na wielu poziomach funkcjonowania, począwszy od syntezy serotoniny po jej uwalnianie do różnych jąder mózgowia, w tym także do głównych struktur zegara biologicznego [5, 11]. Nasze eksperymenty pokazują, iż również na poziomie generowanych przez komórki 5-HT potencjałów czynnościowych mamy do czynienia z okołodobowymi wahaniami. Nasuwa się więc pytanie o źródło owych zmian. Wiadomo, iż komórki jąder szwu nie posiadają ekspresji tzw. genów zegara [18], tak więc rytmiczna aktywność komórek 5-HT nie jest generowana endogennie, musi zatem pozostawać pod kontrolą głównego generatora rytmów biologicznych, jakim jest SCN. Ponieważ SCN nie posiada bezpośrednich połączeń nerwowych z jądrami szwu, sygnał do rytmicznej aktywności może być przekazywany komórkom 5-HT za pośrednictwem innych struktur ośrodkowego układu nerwowego, unerwianych przez SCN i posiadających połączenia z MRN, takich jak przyśrodkowy obszar przedwzrokowy (medial preoptic area), strefa poniżej jąder przykomorowych (subparaventricular zone) czy grzbietowo-przyśrodkowe jądro podwzgórza (dorsomedial hypothalamic nucleus) [6, 19]. Istnieje też możliwość, iż SCN kontroluje rytmiczną aktywność neuronów 5-HT za pomocą hormonalnych przekazników takich jak glukokortykoidy, które wpływają na funkcjonowanie serotonergicznych komórek jąder szwu [4, 12, 14]. Nasze ostatnie eksperymenty (dane nieopublikowane) udowodniły, iż adrenalectomia, likwidująca rytmiczne wahania poziomu kortykosteronu, znosi także rytmiczne uwalnianie serotoniny do jąder nadskrzyżowaniowych. Planowane przez nas eksperymenty elektrofizjologiczne, mające na celu lokalne podawanie agonistów i antagonistów receptorów glukokortykoidowych, zmierzają w kierunku odpowiedzi na pytanie, czy i jak aktywność elektryczna serotonergicznych komórek przyśrodkowych jąder szwu zależy od obecności kortykosteronu.

Piśmiennictwo

1. Aghajanian GK, Haigler HJ, L-Tryptophan as a selective histochemical marker for serotonergic neurons in single-cell recordings studies. *Brain Res.* 1974 81: 364-372.
2. Aghajanian GK, Vandermaelen CP, Intracellular identification of central noradrenergic and seroto-

- nergic neurons by a new double labeling procedure. *J Neurosci.* 1982 2 (12): 1786-92.
3. Azmitia EC, Segal M, An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J Comp Neurol.* 1978 179: 641-667.
4. Azmitia EC, Liao B, Chen YS, Increase of tryptophan hydroxylase enzyme protein by dexamethasone in adrenalectomized rat midbrain. *J Neurosci.* 1993 13: 5041-5055.
5. Barassin S, Raison S, Saboureau M, Bienvenu C, Maitre M, Malan A, Pevet P, Circadian tryptophan hydroxylase levels and serotonin release in the suprachiasmatic nucleus of the rat. *Eur J Neurosci.* 2002 15 (5): 833-40.
6. Deurveilher S, Semba K, Indirect projections from the suprachiasmatic nucleus to major arousal-promoting cell groups in rat: implications for the circadian control of behavioural state. *Neuroscience.* 2005 130 (1): 165-83.
7. Grossman GH, Farnbauch L, Glass JD, Regulation of serotonin release in the Syrian hamster intergeniculate leaflet region. *Neuroreport.* 2004 15 (1): 103-6.
8. Hajos M, Sharp T, Burst-firing activity of presumed 5-HT neurones of the rat dorsal raphe nucleus: electrophysiological analysis by antidromic stimulation. *Brain Res.* 1996 740 (1-2): 162-8.
9. Hajos M, Sharp T, Newberry NR, Intracellular recordings from burst-firing presumed serotonergic neurones in the rat dorsal raphe nucleus *in vivo*. *Brain Res.* 1996 737 (1-2): 308-12.
10. Hajos M, Allers KA, Jennings K, Sharp T, Charette G, Sik A, Kocsis B, Neurochemical identification of stereotypic burst-firing neurons in the rat dorsal raphe nucleus using juxtacellular labelling methods. *Eur J Neurosci.* 2007 25 (1): 119-26.
11. Malek ZS, Dardente H, Pevet P, Raison S, Tissue-specific expression of tryptophan hydroxylase mRNAs in the rat midbrain: anatomical evidence and daily profiles. *Eur J Neurosci.* 2005 22 (4): 895-901.
12. Malek ZS, Sage D, Pevet P, Raison S, Daily rhythm of tryptophan hydroxylase-2 mRNA within raphe neurons is induced by corticoid daily surge and modulated by enhanced locomotor activity. *Endocrinology.* 2007 148 (11): 5162-4.
13. Meyer-Bernstein EL, Morin LP, Electrical stimulation of the median or dorsal raphe nuclei reduces light-induced FOS protein in the suprachiasmatic nucleus and causes circadian activity rhythm phase shifts. *Neuroscience.* 1999 92: 267-279.
14. Moore RY, Eichler VB, Loss of a circadian adrenal corticosterone rhythm following suprachiasma-

- tic lesions in the rat. *Brain Res.* 1972 42: 201–206.
15. Morin LP, The circadian visual system. *Brain Res Rev.* 1994 19: 102-127.
16. Rea MA, Glass JD, Colwell CS, Serotonin modulates photic responses in the hamster suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci.* 1994 14: 3635-3642.
17. Rusak B, Zucker I, Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev.* 1979 59 (3): 449-526.
18. Shieh KR, Distribution of the rhythm-related genes *rPERIOD1*, *rPERIOD2*, and *rCLOCK* in the rat brain. *Neuroscience.* 2003 118 (3): 831-43.
19. Thompson RH, Canteras NS, Swanson LW, Organization of projections from the dorsomedial nucleus of the hypothalamus: a PHA-L study in the rat. *J Comp Neurol.* 1996 376 (1): 143-73.
20. Wang RY, Aghajanian GK, Antidromically identified serotonergic neurons in the rat midbrain raphe: evidence for collateral inhibition. *Brain Res.* 1977 132: 186-193.

Adres korespondencyjny:

Katarzyna Werhun,
Instytut Zoologii,
ul. Ingardena 6, 30-060 Kraków,
tel.: 0 604 329 888,
e-mail: kasia_miotacz@wp.pl

Zastosowanie metody empirycznej dekompozycji modalnej i złożoności Lempel'a-Ziv'a do analizy EEG chorych na schizofrenię

Empiric mode decomposition and Lempel-Ziv complexity method for EEG analysis in the schizophrenic patients

Artur Maciejewski¹, Mirosław Łątka¹, Wojciech Jernajczyk²

¹ Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej Politechniki Wrocławskiej

² Instytut Psychiatrii i Neurologii w Warszawie

Streszczenie

Pomimo prowadzonych od kilkudziesięciu lat badań, próby opracowania algorytmów, które mogłyby posłużyć do znalezienia cech EEG charakterystycznych dla schizofrenii nie zakończyły się powodzeniem. W tej pracy prezentujemy nowe podejście do analizy zapisów elektroencefalograficznych oparte o połączenie dwóch stosowanych dotąd niezależnie metod analizy szeregów czasowych: empirycznej dekompozycji modalnej EMD (*empirical mode decomposition*) i złożoności Lempel-Ziv'a (*Lempel-Ziv complexity*). EMD umożliwia reprezentację sygnału jako sumy kilku składowych, zwanych independent mode functions (IMF). Taka reprezentacja jest szczególnie użyteczna w przypadku sygnałów nieliniowych i niestacjonarnych. W proponowanym podejściu dynamika mód IMF jest scharakteryzowana ilościowo za pomocą algorytmu złożoności Lempel'a-Ziv'a LZC (*Lempel-Ziv Complexity*). Taki schemat opisu zmienności szeregów czasowych nazywamy analizą EMD-LZC. Dokonano analizy EMD-LZC zapisów EEG

(wykonanych w standardzie 10-20) 17 zdrowych osób i 15 osób chorych na schizofrenię, nieleczonych przynajmniej przez tydzień. Dla trzeciej mody IMF, złożoność dla grupy schizofreników była niższa od złożoności grupy kontrolnej. Statystycznie istotne różnice pomiędzy grupami zaobserwowano dla 14 odprowadzeń EEG. Dla porównania, różnice pomiędzy fourierowskimi widmami mocy dla obu grup nie były znaczące w żadnym z 19 odprowadzeń.

Słowa kluczowe: schizofrenia EEG, empiryczna dekompozycja modalna, złożoność Lempel'a-Ziv'a

Abstract

Over the last few decades, numerous attempts have been made to indentify electroencephalographic (EEG) manifestations of schizophrenia. However, clinical applicability of these studies has not been demonstrated. We present a novel approach to EEG analysis which is based on combination of two methods of time series analysis. Empirical mode decomposition is used

to decompose a signal into several independent mode functions (IMF). Then, Lempel-Ziv complexity is used to quantify variability of such modes. We dub this approach EMD-LZC analysis. We carry out EMD-LZC analysis of EEG (performed according to 10-20 standard) of 17 healthy volunteers and 15 schizophrenic patients who were not medicated for at least a week. We find that variability of the third IMF mode is lower in the patients. The statistically significant differences were observed in 14 channels. Interestingly enough, the Fourier power spectra of both cohorts were not statistically different in any of 19 EEG channels.

Key Words: schizophrenia, EEG, empirical mode decomposition, Lempel-Ziv complexity

Wstęp

Analiza wzrokowa czynności bioelektrycznej ludzkiego mózgu, mimo początkowo (w latach 40. i 50. ubiegłego wieku) wiązanych z nią nadziei, nie przyniosła zadowalających wyników w badaniach nad patogenezą i kliniką chorób psychicznych.

Kolejne lata rozwoju elektroencefalografii przyniosły rozpowszechnienie szybkiej transformaty Fouriera (FFT). Metoda ta okazała się na pewnym etapie dość skuteczna w zakresie analizy wpływu leków psychotropowych na EEG. Po wprowadzeniu zapisu cyfrowego sygnału EEG zwiększyła się ilość prób, jak dotąd niezadowolająco skutecznych, znalezienia algorytmów, które mogłyby posłużyć do rozpoznania i wyodrębnienia cech EEG charakterystycznych dla schizofrenii [1, 2].

Niektóre badania wykazały, że chorzy na schizofrenię, którzy pochodzą z rodzin obciążonych tym schorzeniem, cechują się prawidłowym EEG. Natomiast u pacjentów, którzy stanowią wypadki sporadyczne zachorowań w rodzinie, można mówić o częstszym występowaniu nieprawidłowości w czynności bioelektrycznej [3, 4]. Obserwacji tych nie udało się ostatecznie potwierdzić [5]. Ustalono, że obecność nieprawidłowości EEG jest prognostykiem większej skuteczności farmakoterapii u pacjentów cierpiących na schizofrenię. Odwrotną zależność zaobserwowano u pacjentów z innymi zaburzeniami psychicznymi [6]. W 24-godzinnych badaniach czynności bioelektrycznej OUN (ośrodkowego układu nerwowego) wykazano, że u około 30 procent pacjentów chorych na schizofrenię występują nieprawidłowości EEG. Jednak nie znaleziono

żadnego związku między zmianami EEG a występującymi u badanych objawami klinicznymi [7]. Jedno z badań wykazało ponad dwukrotnie wyższą ilość nieprawidłowości EEG w lewej półkuli w porównaniu do prawej półkuli mózgu [8]. Nowsze badania nie potwierdziły tego spostrzeżenia [9].

Ilościowe badania EEG wykazały z kolei zwiększoną moc fal theta w okolicach środkowo-czołowych u pacjentów cierpiących na schizofrenię [10]. W innych badaniach stwierdzono u pacjentów z tym rozpoznaniem mniejszy udział czynności z pasma alfa [11; 12].

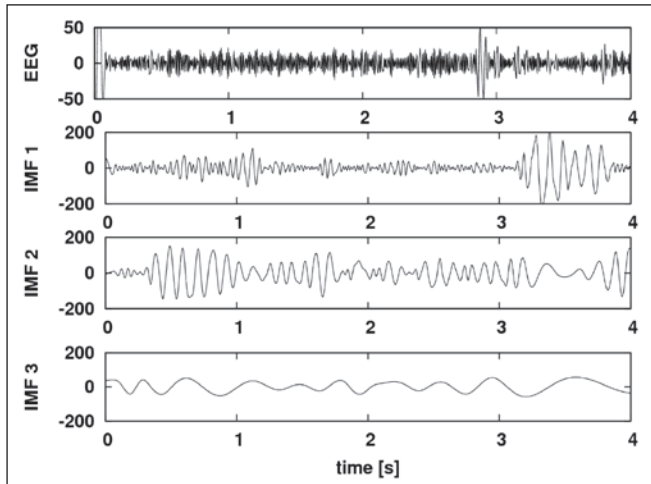
Dotychczasowe badania EEG z użyciem analizy wzrokowej i ilościowej nie doprowadziły do znalezienia cech czynności bioelektrycznej OUN, które miałyby znaczenie diagnostyczne [5]. Celem pracy jest próba sprawdzenia, czy zastosowanie algorytmu EMD-LZ do analizy sygnału EEG pozwoli na diagnostyczne zróżnicowanie czynności bioelektrycznej osób zdrowych i chorych na schizofrenię.

Materiały i metody

W pracy dokonano analizy EMD-LZC zapisów EEG 17 zdrowych ochotników i 15 osób chorych na schizofrenię (nie leczonych farmakologicznie przynajmniej przez tydzień). Do obliczeń z każdego badania wybrano około 2 minutowy fragment bez artefaktów spoczynkowego zapisu EEG (oczy zamknięte) wykonanego przy zastosowaniu międzynarodowego standardu 10-20 rozstawienia elektrod.

Od prawie pół wieku tradycyjna analiza widmowa jest podstawowym narzędziem ilościowej oceny patologicznych zmian w zapisach EEG. Coraz głębsze zrozumienie niestacjonarnych i nieliniowych własności EEG, jak do tej pory, miało niewielki wpływ na praktykę kliniczną. W tej pracy prezentujemy nowe podejście do analizy zapisów elektroencefalograficznych oparte o połączeniu dwóch stosowanych dotąd niezależnie metod analizy szeregów czasowych: empirycznej dekompozycji modalnej EMD (empirical mode decomposition) [13] i złożoności [14]. EMD umożliwia reprezentację sygnału jako sumy kilku składowych, zwanych *independent mode functions* (IMF). Najbardziej fundamentalną własnością takich mód jest możliwość wyznaczenia za pomocą transformaty Hilberta ich *chwilowej amplitudy*, a przede wszystkim, *chwilowej częstotliwości*. Metoda EMD jest z gruntu nieliniowa i niestacjonarna. Należy jednak podkreślić, iż nie jest dozwolone utożsamianie mody

z konkretną częstotliwością sygnału, ale raczej z pewnym przedziałem częstotliwości, który nie jest ustalany a priori, ale jest wynikiem adaptacyjnej analizy danych doświadczalnych. Przykład dekompozycji EMD sygnału EEG przedstawiono na rycinie 1.



Rycina 1. Fragment sygnału EEG zdrowego ochotnika (kanał T4) i pierwsze 3 mody IMF empirycznej dekompozycji modalnej (EMD).

W proponowanym podejściu dynamika mód IMF jest scharakteryzowana ilościowo za pomocą algorytmu złożoności Lempel-Ziv'a LZC (Lempel-Ziv Complexity). Dla zwięzłości taki schemat opisu zmienności szeregów czasowych nazywamy analizą EMD-LZC. Złożoność Lempel-Ziv'a $c(n)$ determinowana jest ilością niezależnych ciągów znaków, zwanych słowami, potrzebnych do reprodukcji łańcucha symboli $S=s_0s_1\dots s_n$ (zdania) o długości n . Proces rekonstrukcji zdania oparty jest na dwóch operacjach:

- wstawianiu nowego słowa
- kopiowaniu napotkanego wcześniej słowa, które jest przechowywane w dynamicznie tworzonego słownika.

Łańcuch S jest przeglądany od lewa do prawa i $c(n)$ jest zwiększane o 1 za każdym razem, kiedy napotkane zostanie nowe słowo. Najczęściej $c(n)$ jest normalizowane przez złożoność losowego ciągu symboli. Dla losowego binarnego łańcucha o długości n , złożoność dana jest wyrażeniem $n/\log_2 n$. Po zastosowaniu takiej normalizacji, bezstratna metoda kompresji słownikowej, jaką jest LZC, pozwala określić stopień złożoności sygnału za pomocą parametru Q , z przedziału 0 (maksymalne uporządkowanie) do 1 (minimalne

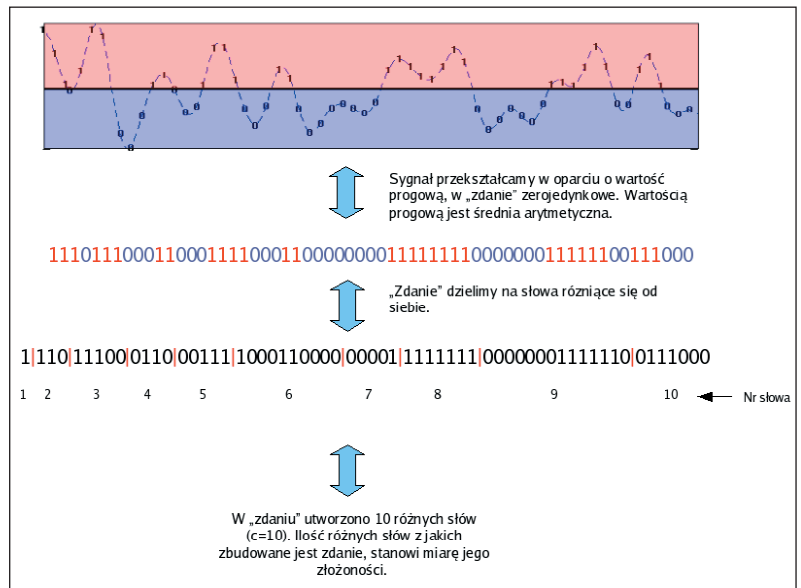
uporządkowanie). Rycina 2 ilustruje zastosowanie LZC do analizy zmienności szeregu czasowego.

Punktem wyjściowym jest konwersja sygnału na łańcuch binarny. Wszystkie wyrazy szeregu większe od arbitralnie wybranej wartości progowej (w tej pracy jest to wartość średnia sygnału) zostają zastąpione przez 1, a wyrazy mniejsze od tej wartości przez 0. Następnie wyznaczona zostaje liczba słów, za pomocą których można zrekonstruować binarny łańcuch reprezentujący analizowany sygnał. Ta liczba po podzieleniu przez wspomniany czynnik normalizacyjny wyznacza wartość parametru Q .

Wartości Q wyznaczono dla trzech pierwszych mód IMF wszystkich 19 kanałów EEG grupy chorych na schizofrenię i osób zdrowych. Dla porównania wykonano także analizę FFT wszystkich kanałów tych samych odcinków zapisów czynności bioelektrycznej OUN. Do analizy statystycznej użyto testu T.

Wyniki

Analiza statystyczna wartości znormalizowanej złożoności wykazała w 28 porównaniach istotne statystycznie różnice między sygnałami EEG pa-



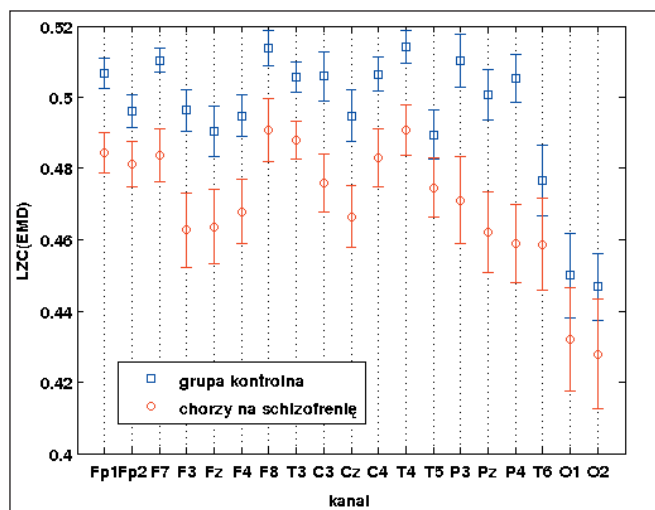
Rycina 2. Schemat obliczeń złożoności Lempel-Ziv'a szeregu czasowego.

cjentów chorych na schizofrenię a osób zdrowych. Najwyraźniejsze i najliczniejsze różnice między zmiennością sygnału EEG chorych i zdrowych wystąpiły w modzie trzeciej. W żadnym z 57 porównań analizy FFT czynności bioelektrycznej pacjentów chorych na schizofrenię i zdrowych nie uzyskano różnic istotnych statystycznie. Wyniki porównania zawarte są w Tabeli 1.

Kanal	IMF 1		IMF 2		IMF 3		30 Hz		10 Hz		3 Hz	
	h	p	h	p	h	p	h	p	h	p	h	p
Fp1	0	0.210	0	0.140	1	0.00120	0	0.57	0	0.68	0	0.21
Fp2	0	0.480	0	0.630	0	0.05600	0	0.78	0	0.63	0	0.43
F7	0	0.100	0	0.054	1	0.00042	0	0.61	0	0.55	0	0.33
F3	0	0.053	1	0.052	1	0.00280	0	0.53	0	0.53	0	0.38
Fz	0	0.060	1	0.051	1	0.03090	0	0.38	0	0.67	0	0.74
F4	0	0.280	1	0.041	1	0.01060	0	0.78	0	0.84	0	0.52
F8	0	0.350	0	0.080	1	0.01090	0	0.51	0	0.76	0	0.40
T3	0	0.550	1	0.014	1	0.00510	0	0.29	0	0.63	0	0.64
C3	0	0.100	0	0.120	1	0.00444	0	0.58	0	0.99	0	0.84
Cz	1	0.046	1	0.013	1	0.01100	0	0.22	0	0.88	0	0.61
C4	0	0.310	0	0.210	1	0.00671	0	0.62	0	0.63	0	0.35
T4	1	0.040	0	0.310	1	0.00190	0	0.53	0	0.42	0	0.68
T5	0	0.050	0	0.480	0	0.15000	0	0.88	0	0.39	0	0.69
P3	0	0.070	1	0.016	1	0.00459	0	0.34	0	0.14	0	0.17
Pz	0	0.100	1	0.013	1	0.00145	0	0.10	0	0.30	0	0.30
P4	0	0.150	1	0.034	1	0.00021	0	0.61	0	0.18	0	0.13
T6	0	0.320	0	0.180	0	0.23000	0	0.98	0	0.36	0	0.38
O1	1	0.010	1	0.013	0	0.27000	0	0.42	0	0.14	0	0.62
O2	0	0.080	1	0.027	0	0.19000	0	0.23	0	0.21	0	0.25

Tabela 1. Wyniki testu T dla analizy EMD-LZC (kolumny IMF 1, IMF 2, IMF 3) i tradycyjnej analizy widmowej (kolumny 30 Hz, 10 Hz, 3 Hz). Wartość parametru $h=1$, dla wygody zaznaczonej w Tabeli czcionką pogrubioną, oznacza istnienie statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą kontrolną złożoną z 17 zdrowych ochotników a grupą 15 chorych na schizofrenię nieleczonych farmakologicznie.

Na rycinie 3 przedstawiono wartości znormalizowanej złożoności Q dla trzeciej mody IMF. Z tej ryciny wynika, że zmienność mody trzeciej jest znacznie niższa w grupie chorych na schizofrenię. Analiza statystyczna wykazała znamienne statystycznie różnice aż w 15 z 19 odprowadzeń.



Rycina 3. Złożoność LZC dla trzeciej mody IMF. Wyniki przedstawiono jako średnia \pm odchylenie standardowe.

Podsumowanie

Analiza metodą EMD-LZ odcinków zapisów EEG bez artefaktów wykazała, że w porównaniu do

tradycyjnej analizy widmowej opartej na FFT opracowany przez nas algorytm znacznie skuteczniej różnicuje sygnał EEG czynności bioelektrycznej osoby chorej na schizofrenię od osoby zdrowej. Proponowany przez nas algorytm może więc okazać się przydatny nie tylko w diagnozowaniu schizofrenii, lecz także stać się przydatnym narzędziem w badaniach nad patogenezą tej grupy schorzeń.

Piśmiennictwo

1. Boutros NN, Arfken C, Galderisi S, Warrick J, Pratt G, Iacono W. The status of spectral EEG abnormality as a diagnostic test for schizophrenia. Schizophrenia research. 2008 Feb; 99 (1-3): 225-37.
2. Tandon R, Keshavan MS, Nasrallah HA. Schizophrenia, "Just the Facts": What we know in 2008 Part 1: Overview. Schizophrenia research. 2008 Mar; 100 (1-3): 4-19.
3. Kendler KS, Hays P 1982 Familial and sporadic schizophrenia: a symptomatic, prognostic and EEG comparison. Am. J. Psychiatry 139: 1557-1562.
4. Neil JF, Merkgangas JR, Davies RK I in. 1978, Validity and clinical utility of neuroleptic -facilitated electroencephalography in psychotic patients. Clin. Electroencephalogr. 11: 38-48.
5. Small JG. 2005 Psychiatric disorders and EEG. W red. E. Niedermeyer, FL da Silva Electroencephalography basic principles, clinical applications and related fields. 639-657. Philadelphia, Baltimore, New York, London. Lippincot Williams and Wilkins.
6. Feighner JP, Robins E, Guze SB, i in. 1972 Diagnostic criteria for use in psychiatric research. Arch. Gen. Psychiatry 26: 57-63.
7. Stevens JR, Bigelow L, Denney D. i in. 1979 Telemetered EEG-EOG during psychotic behaviors of schizophrenia. Arch. Gen. Psychiatry 36: 251-262.
8. Abrams R, Taylor MA. 1979 Differential EEG patterns in affective disorders and schizophrenia. Arch. Gen. Psychiatry.36: 1355-1358.
9. Jernajczyk W, Antczak J., Wichniak A., Wierzbicka A., Musińska I. (2001) Badania nieprawidłowości EEG u nieleczonych i leczonych pacjentów chorych na schizofrenię. Farmakoterapia w psychiatrii i Neurologii, 3, 249-256.
10. Westphal KP, Grozinger B, Diekmann V. i in. 1990 Slower theta activity over the midfrontal cortex in schizophrenic patients. Acta Psychiatr. Scand. 81: 132-138.
11. Javitt DC. 1997 Psychophysiology of schizophrenia. Curr. Opin. Psychiatry. 10: 11-15.
12. Shagas C. 1977, Twisted thoughts, twisted brain waves? w: Psychopathology and brain dysfunction, red. C Shagas, S Gershon, AJ Friedhoff, 353-378. New York: Raven Press.

13. Huang NE, Shen Z, Long SR, Wu MC, Shih HH, Zheng Q, et al. The empirical mode decomposition and the Hilbert spectrum for nonlinear and non-stationary time series analysis. *Proc Roy Soc Lond.* 1998; 454: 903-93.
14. Lempel A, Ziv J. On the complexity of finite sequences. *IEEE Trans Inform Theory.* 1976; 22: 75-81.

Adres korespondencyjny:

Wojciech Jernajczyk,
Zakład Neurofizjologii Klinicznej,
Instytut Psychiatrii i Neurologii,
Al. Sobieskiego 9, 02-957 Warszawa,
tel.: (22) 45 82 713,
e-mail: jernajcz@ipin.edu.pl

**Sesja V: Elektrofizjologia wyższych czynności nerwowych**

Modyfikacja częstości generacji potencjałów czynnościowych przez neurony kory mózgowej wywołana uczeniem asocjacyjnym – badania *ex vivo*

Modification of cortical neuron firing rates induced by associative learning – *ex vivo* experiments

Yury Garkun¹, Marek Bekisz¹, Grzegorz Hess², Małgorzata Kossut¹

¹Instytut Biologii Eksperymentalnej im. Nenckiego, PAN, Warszawa,

²Instytut Farmakologii, PAN, Kraków

Streszczenie

U dorosłych myszy skojarzenie stymulacji wibrys z szokiem elektrycznym w ogon wywołuje poszerzenie rozmiarów reprezentacji korowej stymulowanych wibrys oraz zmiany niektórych markerów neurochemicznych. W tej pracy badaliśmy, czy takie uczenie asocjacyjne wywołuje również zmiany częstości generacji potencjałów czynnościowych przez neurony w obrębie korowej reprezentacji stymulowanej wibrysy. Przygotowywaliśmy skrawki mózgu zawierające pole baryłkowe kory somatosensorycznej i przeprowadzaliśmy pod kontrolą wzrokową rejestracje whole-cell z neuronów warstwy IV. Porównywaliśmy wyniki z myszy trenowanych z danymi ze zwierząt kontrolnych. W trakcie rejestracji komórki były wypełniane barwnikiem fluorescencyjnym w celu dokładniejszej identyfikacji morfologicznej. W czasie rejestracji potencjałów czynnościowych przy błonowym napięciu progowym używaliśmy sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego (ASCF) o składzie zbliżonym do CSF *in situ*. Nasze wstępne rezultaty pokazują, że komórki pobudzające warstwy IV w obrębie reprezentacji korowej „trenowanej” wibrysy mają zwiększoną częstość generacji potencjałów czynnościowych w porównaniu do neuronów z kontrolnych zwierząt. Te wyniki sugerują, że stosowane

kojarzenie asocjacyjne może prowadzić do długotrwałych zmian w puli pobudzających/hamujących wpływów w obrębie reprezentacji korowej stymulowanej wibrysy lub może zmieniać właściwości generacji potencjałów czynnościowych przez neurony w obrębie tego obszaru kory.

Słowa kluczowe: skrawki mózgu, kora baryłkowa, warunkowanie klasyczne, plastyczność

Abstract

In adult mice, repetitive pairing of whisker stimulation with an electrical shock to the tail induces expansion of the cortical representation of stimulated vibrissae accompanied by changes of several neurochemical markers. In this study, we investigated whether this associative learning induced also changes the neuronal firing rate within the cortical representation area of the stimulated vibrissae. We prepared brain slices containing the barrel field of the somatosensory cortex and performed whole-cell recordings from visually identified layer IV neurons. We compared results from trained mice, obtained after the end of pairing, with data from control animals. Cells were filled during recording with fluorescent dye to allow more detailed morphological examinations. We used an artificial cerebrospinal fluid

(ACSF) close to the composition of CSF *in situ*, to record spikes at threshold potential. Our preliminary results show that layer IV excitatory cells within the cortical representation area of "trained" vibrissae have an enhanced frequency of action potentials compared to neurons from control animals. This data suggests that associative pairing may result in long-lasting changes in the net excitatory/inhibitory influences within the cortical representation area of the stimulated whisker or may change the intrinsic firing properties of neurons within that area.

Key Words: *brain slices, barrel cortex, classical conditioning, plasticity*

Wstęp

Uczenie się i zapamiętywanie modyfikuje połączenia pomiędzy neuronami w zaangażowanych w te procesy ośrodkach mózgu. Zmieniają się własności i charakterystyka odpowiedzi pewnej subpopulacji neuronów w tych ośrodkach. Niektóre z takich zmian są przypuszczalnie bardzo trwałe (na ten temat istnieje bardzo mało dowodów eksperymentalnych [1], ale przyjmuje się, że powinny one towarzyszyć trwałemu śladowi pamięciowemu). Inne zmiany mogą być przemijające i potrzebne tylko na określonym etapie procesu zapamiętywania. Zjawiska leżące u podstaw zmiany siły synaps to: zmiany ilości wydzielanego neuroprzekaźnika, zmiany liczby receptorów postsynaptycznych, zmiany wydajności receptorów postsynaptycznych, zmiany liczby lub regulacji napięciowo-zależnych kanałów potasowych i sodowych regulujących pobudliwość dendrytów, zmiana liczby i kształtu synaps, zmiana pozycji synaps na neuronie. Od lat usiłuje się zidentyfikować te zmiany. Złożona budowa mózgu ssaków, a zwłaszcza ogromna liczba neuronów, bardzo utrudniała podobnie dokładne badania. Podejmujemy próbę wykorzystania do badań neuronalnych mechanizmów uczenia się ssaków, obszaru kory mózgowej gryzoni o uporządkowanej w charakterystyczny sposób budowie komórkowej. W mózgu niektórych gryzoni istnieje szczególnie zbudowana droga czuciowa – należąca do układu trójdzielnego droga przekazująca informacje z wibrysu na pyszczku do kory somatosensorycznej [2]. Wibrysy tworzą zintegrowany organ dotykowy, którego reprezentacja w ośrodkowym układzie nerwowym ma, na wszystkich piętrach wstępującej drogi czuciowej, szczególną organizację morfologiczną. Każda wibrysa reprezentowana jest w jądrze głównym nerwu trójdzielnego, w jądrze brzuszno-bocznym wzgórza i w pierwszorzędowej korze somatosensorycznej przez specyficzne grupowania komórek. W korze

mózgowej mają one walcowatą strukturę, w której ciała komórkowe skupione są w ścianach walca, a wewnątrz jest wypełnione neuropilem (Rycina 1A). Ze względu na taką budowę zostały one przez swoich odkrywców – Woolseya i Van der Loosa [2] – nazwane baryłkami. Obszar kory somatosensorycznej, w którym występują, nazywa się korą baryłkową. Układ pięciu rzędów baryłek w korze odwzorowuje położenie pięciu rzędów wibrysu na pyszczku (Rycina 1A). Na prostym preparacie histologicznym w barwieniu Nissla, a nawet na niebarwionych grubych skrawkach, można zidentyfikować poszczególne baryłki i w ten sposób bez trudu określić miejsce projekcji określonych obwodowych receptorów czuciowych. Jest to bardzo dogodnie przy badaniach ośrodkowych korelatów manipulacji, jakim poddaje się receptory obwodowe. Dokładnie wiadomo bowiem, który fragment kory należy analizować lub, w którym miejscu prowadzić rejestracje elektrofizjologiczne. Jest to unikatowy model zmian plastycznych kory mózgowej indukowanych przez proces uczenia się. W 1996 roku opisano sposób wywołania takich zmian przez zastosowanie treningu czuciowego opartego na paradygmacie warunkowania klasycznego [3]. W badaniach nad mechanizmami zaobserwowanych zmian wykryliśmy wzrost oddziaływań hamujących w skośnych szlakach wewnątrzkorowych z kolumny korowej reprezentującej wibryse zaangażowaną w trening [4]. Rejestracje wewnątrzkomórkowe na skrawkach mózgu trenowanych myszy potwierdziły nasilenie oddziaływań hamujących w wyniku treningu [5]. Stwierdzono w nich zwiększenie częstotliwości występowania spontanicznych IPSCs w neuronach IV warstwy kory, należących do kolumny korowej pobudzanej przez wibryse zaangażowaną w treningu.

Istnieją dane literaturowe pokazujące zmiany w częstości generacji potencjałów czynnościowych przez komórki warstwy IV kory wzrokowej po przejściowej depriwacji sensorycznej u młodych myszy [6, 7]. Nasze obecne badania miały na celu sprawdzenie, czy podobne zmiany zaobserwujemy również u dorosłych myszy po wywołaniu asocjacji pomiędzy bodźcami czuciowymi w procesie warunkowania klasycznego, polegającym na kojarzeniu stymulacji sensorycznej wybranego rzędu wibrysu z drażnieniem elektrycznym ogona.

Materiały i metody

Doświadczenia przeprowadzono na 5-6 tygodniowych myszach płci żeńskiej. Procedury zastosowane w trakcie doświadczeń zostały zatwierdzone przez Lokalną Komisję Etyczną nr 1 d/s Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

Trening zwierząt

Trening behawioralny, oparty na metodzie warunkowania klasycznego, polegał na stymulacji dotykowej (pędzelkiem) jednego wybranego rzędu B wibrys na pyszczku myszy. Po trzykrotnej 3-sekundowej stymulacji wibrys (bodziec warunkowy – CS) następował szok elektryczny w ogon (bodziec bezwarunkowy – UCS). Po sześciosekundowej przerwie czynność ta zostawała powtórzona, a cały taki cykl był powtarzany przez 10 minut dziennie, przez 3 dni [3].

Doświadczenia elektrofizjologiczne

Myszy usypiano przy pomocy narkozy wziewnej (isofluran) i dekapitowano. Operacje na myszach trenowanych przeprowadzano 24 godziny po zakończeniu treningu. Po wyjęciu mózgu z czaszki, zanurzano go w zimnym (0°C) sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym (ACSF) o następującym składzie (mM): NaCl 126, KCl 3, NaH₂PO₄ 1,25, NaHCO₃ 24, MgSO₄ 3, CaCl₂ 1, D-glukoza 10, nasycanym mieszaniną gazową karbogen (95% O₂/5% CO₂) i mającym wartość pH 7,3-7,4. Skrawki o grubości 350 μm wycinano przy pomocy mikrotomu z wibrującym ostrzem (Leica VT1000S) z obszaru mózgu zawierającego korę baryłkową, w płaszczyźnie nachylonej pod kątem 55 stopni w stosunku do płaszczyzny strzałkowej. Takie cięcie umożliwia uzyskanie skrawka kory, gdzie na przekroju widocznych jest 5 kolumn baryłkowych, z których każda należy do innego rzędu wibrys (A-E). Po preparatyce skrawki przechowywane były w komorze inkubacyjnej typu zanurzeniowego wypełnionej ACSF o powyższym składzie i mającym temperaturę 32°C, przez okres 2-6 godzin. Pojedynczy skrawek przenoszono do zanurzeniowej komory rejestracyjnej zamontowanej na podstawie pod obiektywem mikroskopu prostego Olympus BX61WI, przepłukiwanej przez ACSF o temperaturze 32°C, z szybkością 2-2,5 ml/min. Skład ACSF w komorze rejestracyjnej był taki sam jak wyżej, z wyjątkiem stężeń soli magnezu i wapnia, które wynosiły (mM): MgSO₄ 2, CaCl₂ 2. W świetle przechodzącym, pod małym powiększeniem, możliwa była łatwa identyfikacja poszczególnych baryłek. Po zastosowaniu metody różnicowego kontrastu interferencyjnego w podczerwieni (IR-DIC) obiektywu 20-40x, dodatkowego powiększenia 4-2x oraz odpowiedniej kamery czułej w zakresie 775 nm (np. Hamamatsu C7500), można zaobserwować pojedyncze neurony i ustalać, w oparciu o ich kształt, rodzaj komórki, z której przeprowadza się rejestracje.

Wykonywano rejestracje aktywności komórkowej metodą „whole-cell”. Mikropipety szklane

(elektrody) wypełnione były roztworem zawierającym (mM): K-gluconate 130, NaCl 6, HEPES 10, EGTA 10, CaCl₂ 1, MgCl₂ 2, Na₂-ATP 2, Na-GTP 0,3, o osmolarności 280-290 mOsm oraz wartości pH 7,2-7,3. Zastosowany mikroskop umożliwiał również obserwację fluorescencji i w celu dokładniejszej weryfikacji morfologicznej neuronów do roztworu elektrodowego dodawano również, przed ustaleniem pH oraz osmotyczności, barwnik Alexa Fluor® 568 (40 μM) lub Lucifer Yellow (0,1-0,2 mg/ml). Elektrody o oporności 4-6 MΩ, zainstalowane na mikromanipulatorze Burleigh, umieszczano pod kontrolą wzrokową na powierzchni neuronów, doprowadzono do powstania złącza wysokooporowego (>1 GΩ), a następnie błonę przerywano, aby uzyskać dostęp elektryczny do wnętrza komórki. Do rejestracji aktywności komórek używano wzmacniacza Axopatch 200B (Axon Instrument) pracującego w modzie „fast current clamp”. Charakterystyki odpowiedzi rejestrowanych neuronów badano, podając prostokątne impulsy prądowe w zakresie od -0,2 do +0,4 nA i czasie trwania 400 ms. Sygnały rejestrowano i analizowano na komputerze za pomocą interfejsu analogowo-cyfrowego Digidata 1322A oraz oprogramowania pCLAMP (Axon Instruments). Częstość próbkowania wynosiła 20 lub 10 kHz, a sygnały filtrowano analogowo dolnoprzepustowo odpowiednio do 5 lub 3 kHz.

Wyniki

Przedstawione w tej pracy wyniki obejmują rejestracje z neuronów pobudzeniowych warstwy IV. Uwzględnione neurony miały oporność błony powyżej 100 MΩ i spoczynkowy potencjał poniżej -65 mV. Neurony pobudzeniowe, wstępnie selekcjonowane wzrokowo jako posiadające nieduże ciało komórkowe, weryfikowane były następnie elektrofizjologicznie na podstawie charakterystycznego dla komórek tego typu regularnego wzoru generacji potencjałów czynnościowych (ang. *regular spiking*), wykazującego stopniowe zwiększanie się odstępów czasowych pomiędzy poszczególnymi potencjałami.

W standardowym używanym przez nas ACSF (patrz Materiały i metody) przy spoczynkowym napięciu błonowym badane neurony nie generowały w ogóle potencjałów czynnościowych, a toniczna depolaryzacja do napięcia progowego powodowała wyzwolenie jedynie niewielkiej ich liczby i tylko przez początkowy kilkusekundowy okres depolaryzacji. Z tego powodu do badania częstości generacji potencjałów czynnościowych wymienialiśmy standardowy ACSF obmywający skrawki na

płyn o składzie zbliżonym do CSF in situ, posiadający zmodyfikowaną zawartość następujących soli (mM): KCl 3,5, MgCl₂ 0,5, CaCl₂ 1 – wg. Maffei i wsp. [6]. Przy prędkości przepływu komory rejestracyjnej 2-2,5 ml/min, efekt zmiany składu ASCF obserwowaliśmy po 2-3 minutach jako 2-4 mV depolaryzację połączoną z nasileniem się spontanicznej aktywności synaptycznej oraz pojawiające się od czasu do czasu potencjały czynnościowe. Zauważalny był również niewielki spadek oporności błony komórkowej, najprawdopodobniej wskutek zwiększonej aktywności synaptycznej.

Z uwagi na to, że neurony jednak rzadko i w sposób przejściowy generowały potencjały czynnościowe przy napięciu spoczynkowym, komórki depolaryzowaliśmy następnie do wartości progowej dla generacji potencjałów czynnościowych, wynoszącej około -60 mV. Nasze wstępne wyniki pokazują, że w takich warunkach komórki pobudzeniowe warstwy IV, rejestrowane w obrębie baryłki będącej reprezentacją trenowanej wibrysy, generują potencjały czynnościowe znacznie częściej niż analogiczne neurony rejestrowane u nietrenowanych myszy kontrolnych (Rycina 2).

Dyskusja

Otrzymane wyniki sugerują, że stosowane kojarzenie asocjacyjne może prowadzić do długotrwałych zmian w puli pobudzających i hamujących wpływów w obrębie reprezentacji korowej stymulowanej wibrysy lub może zmieniać właściwości generacji potencjałów czynnościowych przez neurony w obrębie tego obszaru kory.

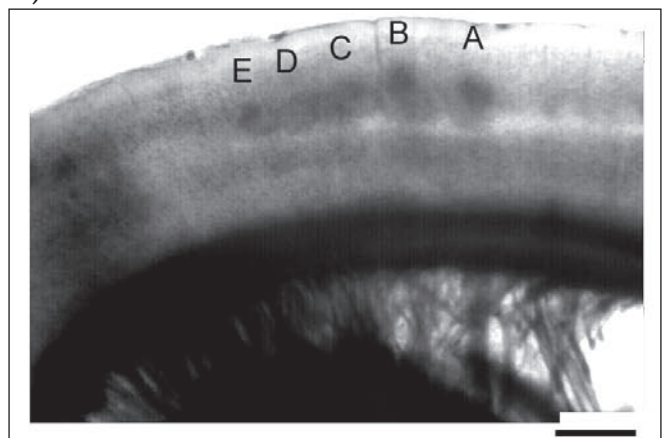
Należy podkreślić, że opisany wyżej efekt wzrostu częstości generacji potencjałów nie jest niezgodny z poprzednio uzyskanymi danymi wykazującymi wzrost oddziaływań hamujących w skośnych szlakach wewnątrzkorowych z kolumny korowej reprezentującej wibrycę zaangażowaną w trening [4] oraz zwiększenie częstotliwości występowania spontanicznych IPSCs w neuronach IV warstwy kory należących do kolumny korowej pobudzanej przez trenowaną wibrycę [5]. Wynika to z faktu, że dla stosowanego przez nas roztworu wypełniającego pipety rejestracyjne, potencjał odwrócenia dla jonów chloru, policzony z równania Nernsta, wynosi ok. -63 mV, co jest wartością bardzo zbliżoną do napięcia progowego dla generacji potencjałów czynnościowych w zmodyfikowanym ACSF. Z tego powodu wpływ zmian w oddziaływaniach hamujących może mieć w opisanych w tej pracy rejestracjach niewielkie znaczenie. Zaobserwowany wzrost częstości generacji potencjałów czynnościowych wynikać może raczej ze zmian w sile i dynamice

wewnątrzkorowych interakcji pobudzeniowych lub ze wzrostu pobudliwości własnej rejestrowanych komórek. Zmiany aktywności spontanicznej znaleziono także w korze wzrokowej deprywowanych wzrokowo szczurów [6]. Wydaje się, że takie wzmoczenie aktywności spontanicznej może ułatwiać zachodzenie zmian neuroplastycznych. Być może opisane zjawisko pozwala nam również zrozumieć lepiej zaobserwowany już wcześniej wzrost markerów gabaergicznych. Być może służy on właśnie tłumieniu takiego dużego wzrostu pobudliwości.

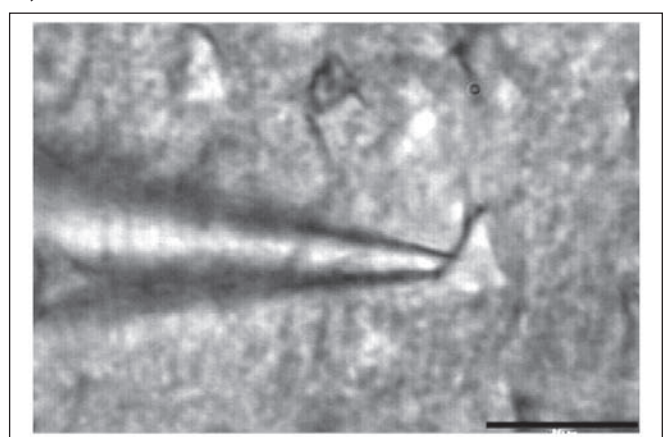
Podziękowania

Badania przedstawione w pracy były finansowane w ramach grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr N303 081 31/2682 oraz z funduszy wymiany naukowej MNiSW.

A)

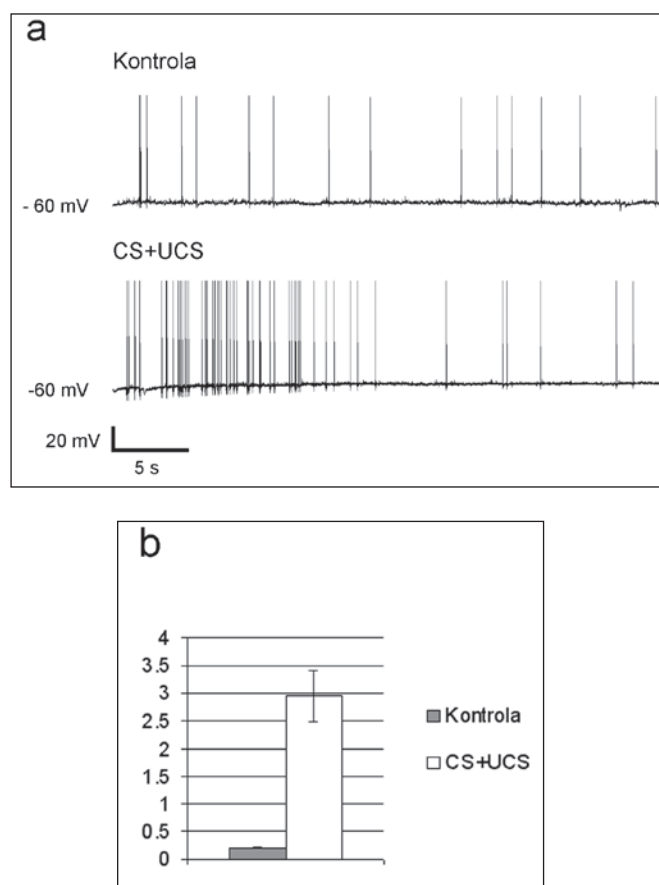


B)



Rycina 1. Rejestracja neuronów ze zidentyfikowanych baryłek. **A.** Żywy skrawek z widocznymi baryłkami, zaznaczonymi literami od A do E. Skala – 500µm. **B.** Duże powiększenie (kontrast interferencyjny) widoczny neuron (prawdopodobnie pobudzeniowy) i pipeta rejestrująca. Skala – 20 µm.

Piśmiennictwo



Rycina 2. Aktywność spontaniczna komórek IV warstwy o regularnych wyładowaniach wzrasta po treningu. **A.** Reprezentatywny zapis z neuronu baryłki rzędu B w skrawku mózgu z trenowanej i z kontrolnej myszy. **B.** Średnia aktywność spontaniczna neuronów u trenowanych i kontrolnych myszy (oszczędnych – 1/s).

- Weinberger NM. Specific long-term memory traces in primary auditory cortex. *Nat Rev Neurosci.* 2004; 5 (4): 279-290.
- Woolsey TA, Van der Loos H. The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex. The description of a cortical field composed of discrete cytoarchitectonic units. *Brain Res.* 1970; 17 (2): 205-242.
- Siucinska E, Kossut M. Short-lasting classical conditioning induces reversible changes of representational maps of vibrissae in mouse SI cortex – a 2DG study. *Cereb Cortex.* 1996; 6 (3): 506-513.
- Urban-Ciecko J, Kossut M, Hess G. Effects of sensory learning on intracortical synaptic transmission in the barrel cortex of mice. *Acta Neurobiol Exp (Wars).* 2005; 65 (2): 195-200.
- Tokarski K, Urban-Ciecko J, Kossut M, Hess G. Sensory learning-induced enhancement of inhibitory synaptic transmission in the barrel cortex of the mouse. *Eur J Neurosci.* 2007; 26 (1): 134-141.
- Maffei A, Nelson SB, Turrigiano GG. Selective reconfiguration of layer 4 visual cortical circuitry by visual deprivation. *Nat Neurosci.* 2004; 7 (12): 1353-1359.
- Maffei A, Nataraj K, Nelson SB, Turrigiano GG. Potentiation of cortical inhibition by visual deprivation. *Nature.* 2006; 443 (7107): 81-84.

Adres korespondencyjny:

Yury Garkun,
Instytut Biologii Eksperymentalnej PAN,
tel.: (022) 589 22 48,
e-mail: y.garkun@nencki.gov.pl

Wpływ stresu unieruchomienia na długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (LTP) w zakręcie zębatym myszy

The influence of restraint stress on long-term potentiation (LTP) in the dentate gyrus of mice

Jadwiga Spyrka^{1,2}, Grzegorz Hess^{1,2}

¹ Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii, Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński, Kraków

² Zakład Fizjologii, Instytut Farmakologii PAN, Kraków

Streszczenie

Czynniki zaburzające homeostazę organizmu, aktywują system odpowiedzi stresowej, którym jest oś podwzgórze-przysadka-nadnercza. Konsekwencją aktywacji tego układu są zmiany funkcji wielu obszarów mózgu, w tym hipokampa. Długotrwa-

łe wzmocnienie synaptyczne (LTP) jest komórkowym modelem tworzenia śladów pamięciowych. W niniejszej pracy badano wpływ łagodnego stresu unieruchomienia na LTP w zakręcie zębatym myszy. Myszy szczepu C57BL/6 unieruchamiano na okres 10 minut przez 1, 3, 7, 14 lub 21 dni. Doświadczenia elektrofizjologiczne przeprowadzono na skraw-

kach mózgu inkubowanych *in vitro*. Wykazano, że stres unieruchomienia wpływa dwukierunkowo na możliwość wywołania LTP w zakręcie zębatym. Stwierdzono nasilenie LTP, gdy było ono indukowane w skrawkach uzyskanych bezpośrednio po zastosowaniu stresu unieruchomienia, a także w skrawkach uzyskanych ze zwierząt stresowanych przez 14 i 21 dni. Natomiast trzydniowy stres powodował osłabienie LTP, a po 1 i po 7 dniach stresu wielkość LTP nie różniła się od kontroli.

Słowa kluczowe: hipokamp, plastyczność synaptyczna, LTP, stres

Abstract

Different stress factors stimulate the stress response systems of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. The HPA axis responses affect functions of various brain areas including the hippocampal formation. Long-term potentiation (LTP) is a cellular model of learning and memory processes. In the present study, C57BL/6 male mice were used. Animals were subjected to daily restraint, lasting 10 min, for 1, 3, 7, 14, and 21 days. The induction of LTP in the dentate gyrus was attempted in these *in vitro* slices. The data show that restraint stress bidirectionally affects LTP induction. LTP was enhanced in slices obtained from animals stressed immediately before slice preparation and a similar effect occurred after 14 and 21 days of restraint. On the other hand, 3 days of stress exposure diminished LTP. Restraint lasting 1 and 7 days did not alter the degree of LTP.

Key Words: hippocampus, synaptic plasticity, LTP, stress

Wstęp

Długotrwałe wzmocnienie synaptyczne (*long-term potentiation*, LTP), po raz pierwszy opisane przez Bliss i Lomo [1] w 1973 roku, to zjawisko polegające na zależnym od aktywności zwiększeniu wydajności synaptycznej. Obecnie fenomen ten jest uważany za komórkowy model powstawania śladów pamięciowych. Badania *in vivo* wykazały, że LTP utrzymuje się wiele godzin lub nawet dni i jest swoiste dla stymulowanych synaps. W zakręcie zębatym do wywołania LTP konieczne jest uwalnianie glutamianu i depolaryzacja błony komórki postsynaptycznej. Depolaryzacja następuje na skutek aktywacji receptorów glutaminianergicznych typu AMPA. Jednocześnie wystąpienia tych dwóch procesów powoduje aktywację postsynaptycznych recepto-

rów glutaminianergicznych typu NMDA i napływ jonów Ca^{2+} do wnętrza komórki postsynaptycznej. Zwiększone stężenie wewnątrzkomórkowych jonów wapniowych, spotęgowane także poprzez aktywację metabotropowych receptorów glutaminianergicznych oraz napięciowo-zależnych kanałów wapniowych, zapoczątkowuje łańcuch procesów biochemicznych prowadzących do wzmocnienia przekazywania. We wczesnej fazie LTP aktywowane są kaskady kinaz białkowych, natomiast w późnej fazie LTP, zależnej od syntezy białek, następuje indukcja transkrypcji genów oraz translacji. Procesy te prowadzą do wielu zmian strukturalnych i funkcjonalnych w synapsie [2, 3].

Reakcja stresowa jest to fizjologiczny mechanizm, który uaktywnia się, gdy następuje zaburzenie homeostazy organizmu przez rozmaite czynniki psychologiczne i fizyczne, nazywane stresorami. Stresory aktywują układ odpowiedzi stresowej, jakim jest oś podwzgórze-przysadka-nadnercza (PPN). Ostatnim etapem w łańcuchu kolejno uwalnianych przez struktury tego układu hormonów jest synteza i wydzielanie kortykosteronu przez korę nadnerczy. Hormon ten krążąc wraz z krwią, dociera do centralnego układu nerwowego, gdzie wiąże się z receptorami mineralokortykoidowymi (MR) oraz glukokortykoidowymi (GR) [4].

Różne rodzaje stresu wpływają negatywnie na morfologię oraz aktywność neuronów hipokampa. Stres unieruchomienia, trwający 6 godzin dziennie przez 21 dni, wywołuje zmniejszenie liczby podjednostek NR1, NR2A i NR2B receptora NMDA w polu CA1 i zakręcie zębatym hipokampa szczura, a także zmniejsza liczbę kolców dendrytycznych komórek piramidalnych pola CA1 [5]. Jednorazowy stres unieruchomienia, trwający 3 godziny, nasila neurogenezę w zakręcie zębatym myszy, natomiast osłabia to zjawisko u szczura [6]. Ponadto u szczura ostry stres unieruchomienia, trwający 30 minut, osłabia LTP w polu CA1 [7]. Z drugiej strony, łagodny stres wymuszonego pływania nasila LTP w zakręcie zębatym u szczurów *in vivo* [8].

Obecnie niewiele wiadomo na temat tego, w jaki sposób łagodny stres moduluje możliwość wywołania LTP w zakręcie zębatym myszy. Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu jednokrotnego i wielokrotnego stresu na indukcję LTP w zakręcie zębatym myszy w modelu łagodnego stresu unieruchomienia.

Materiały i metody

Doświadczenia wykonano na samcach myszy szczepu C57BL/6 w wieku 4-11 tygodni. Zwierzęta z grupy kontrolnej były poddawane codziennemu

handlingowi, a myszy z grup doświadczalnych poddawano stresowi unieruchomienia trwającemu 10 min przez 1, 3, 7, 14 oraz 21 dni. Myszy unieruchamiano w urządzeniu przytrzymującym zwierzę za szyję, jednak nie utrudniającym swobodnego oddychania. Zwierzęta dekapitowano pod narkozą halotanową, bezpośrednio po zastosowaniu stresu unieruchomienia (grupa stres – dekapitacja, S-D) lub w 24 godziny po ostatnim unieruchomieniu. Mózg preparowano w sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym (*artificial cerebro-spinal fluid*, ACSF) o temperaturze 5-7°C, zawierającym (w mM): 124 NaCl, 26 NaHCO₃, 1,25 NaH₂PO₄, 4 MgSO₄, 4,5 KCl, 1,8 CaCl₂ i 10 glukozy, nasyconym karbogenem (95% O₂/5% CO₂). Po wyizolowaniu, mózg cięto w płaszczynie horyzontalnej na skrawki o grubości 450 μm.

Skrawki umieszczano w przepływowej, interfazowej komorze inkubacyjnej, gdzie były perfundowane przez ACSF przepływający z prędkością 2 ml/min, początkowo o temperaturze pokojowej. Następnie podgrzewano roztwór do temperatury 32°C i pozostawiano skrawki w komorze przez 2 godziny zanim rozpoczęto eksperyment elektrofizjologiczny. ACSF używany podczas inkubacji zawierał 1 mM MgSO₄ oraz 0,2 μM bikukuliny, dodawanej do roztworu przed rozpoczęciem doświadczenia (pozostałe związki jak w roztworze wykorzystywanym do izolacji mózgu). Postsynaptyczne pobudzające potencjały polowe (*field excitatory postsynaptic potential*, fEPSP) rejestrowano w warstwie molekularnej zakrętu zębatego przy użyciu szklanej mikropipety o oporności 1,1-1,8 MΩ, wypełnionej ACSF. fEPSP wywoływało stymulacją bocznej drogi przesywającej (*lateral perforant path*, LPP) przy użyciu dwubiegunowej, stalowej elektrody stymulującej, stosując bodźce trwające 100 μs, dostarczane co 20 s. Intensywność stymulacji ustalano tak, aby wielkość rejestrowanych fEPSP stanowiła 30% wartości maksymalnej. Każdorazowo sprawdzano umieszczenie elektrod, stosując protokół pulsów sparowanych (2 bodźce w odstępie 50 ms powtarzane co 20 s), wykorzystując tę właściwość bocznej drogi przesywającej, iż po zastosowaniu takiego protokołu w obszarze LPP występuje zjawisko facylitacji (*paired-pulse facilitation*, PPF). LTP indukowano czterema jednosekundowymi seriami bodźców o częstotliwości 100 Hz (*high frequency stimulation*, HFS), powtarzanymi co 25 s.

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ±SEM. Porównanie między grupami doświadczalnymi przeprowadzono, stosując test ANOVA, a znamienność statystyczną różnic pomiędzy badanymi grupami zaznaczono, jeżeli wartość *p* była mniejsza niż 0,05.

Wyniki

Wpływ stresu unieruchomienia na PPF

Na początku każdej rejestracji weryfikowano położenie elektrod, rejestrując potencjały przy zastosowaniu protokołu pulsów sparowanych (Rycina 1A). W skrawkach uzyskanych z myszy z grupy kontrolnej, poddanych procedurze handlingu tuż przed dekapitacją, PPF wyniosło 35,75%±7,27% (n=7), a w skrawkach otrzymanych ze zwierząt dekapitowanych tuż po zastosowaniu stresu unieruchomienia (grupa S-D) PPF wyniosło 25,77%±7,51% (n=8; Rycina 1B). W skrawkach uzyskanych ze zwierząt kontrolnych PPF w bocznej drodze przesywającej wyniosło 22,95%±3,69% (n=9), po 1 dniu stresu 25,73%±5,23% (n=6), po 3 dniach unieruchomienia 26,18%±6,96% (n=5), po 7 dniach stresu 28,18%±5,56% (n=8), po 14 dniach 26,44%±5,1% (n=7), natomiast po 21 dniach unieruchomienia 42,07%±11,14% (n=7; Rycina 1C). Różnice te nie są istotne statystycznie.

Wpływ stresu unieruchomienia na LTP

W skrawkach otrzymanych ze zwierząt kontrolnych uzyskano stabilne LTP utrzymujące się przez co najmniej 2 godziny (55,21%±1,73%, n=9) (Ryciny 2A, B, 3B). Podobny wynik otrzymano w skrawkach pochodzących z mózgow myszy z grupy kontrolnej poddanych procedurze handlingu tuż przed dekapitacją (48,13%±8,72%, n=7; Rycina 3A). W skrawkach zwierząt stresowanych tylko jeden raz tuż przed preparacją, LTP wyniosło 100,47%±0,53% (n=8; Rycina 3A). Po 1 i 7 dniach stresu unieruchomienia uzyskano LTP na poziomie kontrolnym, odpowiednio 36,75%±7,12% (n=6) i 69,83%±15,36% (n=8). Trzydniowy stres unieruchomienia spowodował statystycznie istotny spadek LTP (3,05%±5,72%; n=5) natomiast 14 i 21 dni stresu istotnie statystycznie nasiliło LTP odpowiednio 98,19%±15,49% (n=7) i 98,24%±15,34% (n=7; Rycina 3B).

Dyskusja

Przedstawione wyniki wskazują, że łagodny stres unieruchomienia wpływa dwukierunkowo na plastyczność synaptyczną w zakręcie zębatym myszy. Tuż po zastosowaniu stresu następuje nasilenie LTP, jednak efekt ten jest krótkotrwały, gdyż w 24 godziny po unieruchomieniu wielkość zarejestrowanego LTP nie różni się od wielkości kontrolnej. Zjawisko nasilenia LTP zarejestrowano po 14 dniach codziennego unieruchamiania zwierzęcia. Efekt ten utrzymuje się przez 21 dni. Natomiast stres trwający 3 dni zmniejsza LTP, jednakże to osłabienie jest

nietrwałe i po 7 dniach unieruchamiania, wielkość LTP jest porównywalna z wartościami uzyskiwanymi w kontroli.

Istnieją liczne dane, pokazujące modulujący wpływ różnych rodzajów stresu na plastyczność synaptyczną hipokampa. Ostry stres unieruchomienia osłabia LTP w polu CA1 zarówno w badaniach prowadzonych techniką *in vitro* [7] jak i *in vivo* [9]. Natomiast różnego rodzaju stresory albo osłabiają LTP [10], albo nasilają to zjawisko w zakręcie zębatym [11]. Uzyskane wyniki pokazują, że stres zarówno jednokrotny, jak i chroniczny nie wpływa na PPF, co sugeruje, iż uzyskany efekt nie jest związany ze zmianami w uwalnianiu neurotransmitera do szczeliny synaptycznej.

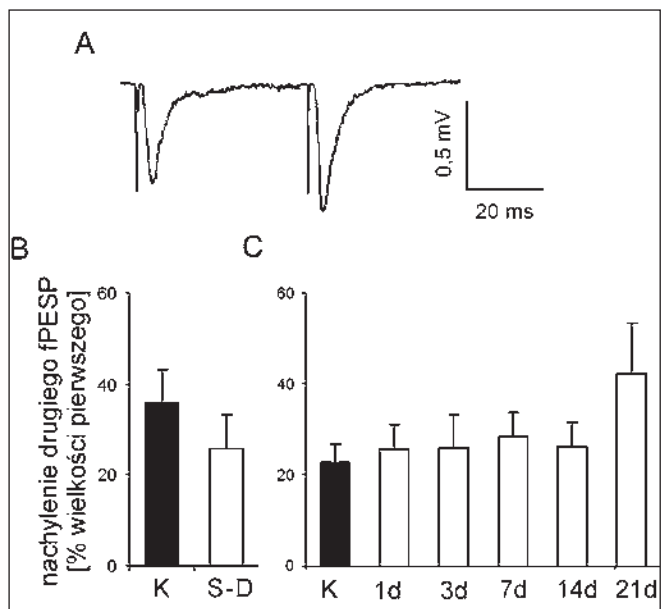
Odpowiedź stresowa jest związana ze zwiększoną syntezą i wydzielaniem kortykosteronu. Hormon ten jest ligandem receptorów mineralokortykoidowych i glukokortykoidowych, przy czym wykazuje dziesięciokrotnie większe powinowactwo do receptorów MR. Dlatego też w stanie utrzymywania homeostazy organizmu, gdy w krwiobiegu znajduje się niewiele kortykosteronu, aktywowane są przede wszystkim receptory MR. Natomiast w efekcie aktywacji osi PPN i wyrzutu kortykosteronu aktywowane są również receptory GR. Obydwa typy receptorów pełnią istotną funkcję w procesach plastyczności, przy czym receptory GR są zaangażowane w procesy konsolidacji pamięci, a receptory MR uczestniczą w procesach nabywania śladów pamięciowych. Zwiększenie wydajności synaptycznej oraz powstanie LTP następuje, gdy w hipokampie aktywowane są głównie receptory mineralokortykoidowe i jedynie niewielka ilość receptorów glukokortykoidowych. Tak dzieje się, gdy zwierzęta zostaną poddane działaniu łagodnego stresora. Natomiast silny stresor lub stres chroniczny powoduje aktywację receptorów GR, co skutkuje osłabieniem LTP [12]. Ponadto, Gessing i wsp. w badaniach przeprowadzonych na szczurach poddanych stresowi wymuszonego pływania wykazali, iż taki rodzaj stresu powodował zwiększenie ilości receptorów MR w hipokampie [13]. Tak więc zwiększona ilość receptorów mineralokortykoidowych w komórkach może powodować przesunięcie balansu pomiędzy ilością aktywowanych receptorów MR i GR w odpowiedzi stresowej. Konsekwencją tych zmian może być ułatwiona indukcja LTP.

Przypuszczalnie, wywołana stresem zmiana stosunku ilości receptorów mineralokortykoidowych do glukokortykoidowych w komórkach hipokampa nie jest jedynym mechanizmem powodującym zredukowanie negatywnych efektów stresu. W tym procesie mogą uczestniczyć inne receptory lub układy neuroprzekazników. Badania przeprowa-

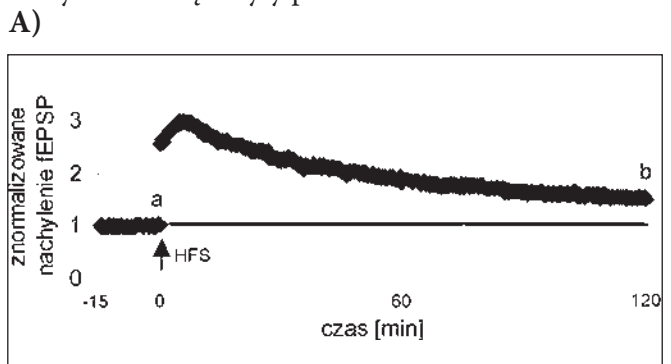
dzone na szczurach poddanych stresowi wymuszonego pływania pokazują, iż ten rodzaj stresu prowadzi do nasilenia transmisji serotonergiczej w hipokampie [14]. Ponadto serotonina zwiększa ilość mRNA dla receptorów GR i MR w komórkach hipokampa, co wykazano w badaniach przeprowadzonych na hodowlach komórkowych [15]. Wydaje się więc, że modulacja plastyczności synaptycznej, wywołana stresem, jest uzależniona od licznych czynników, które wymagają dalszych badań.

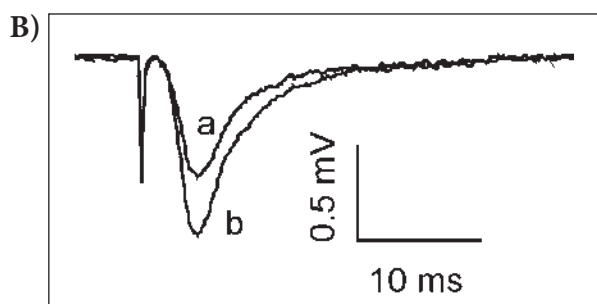
Podziękowania

Badania finansowane z grantu BW/IZ/62/2006.

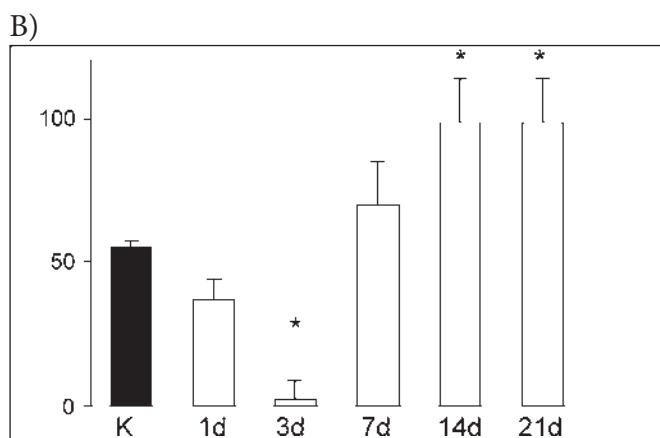
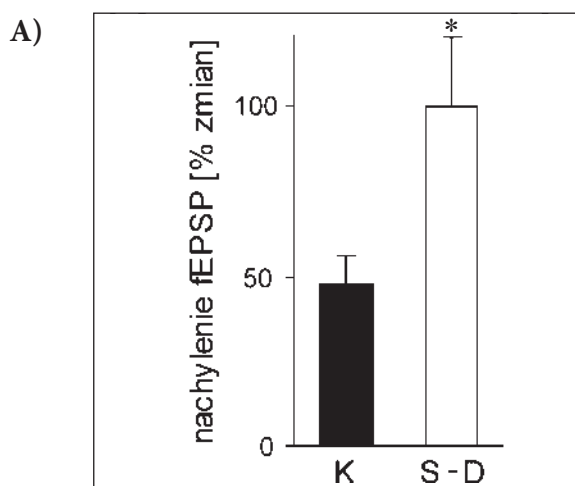


Rycina 1. Wpływ stresu unieruchomienia na PPF w zakręcie zębatym. **A.** przykładowe fEPSP rejestrowane po zastosowaniu protokołu pulsów sparowanych. Zastosowany stres nie wpływa na PPF ani w skrawkach myszy stresowanych jednokrotnie (**B**) ani wielokrotnie (**C**). Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SEM, różnice w uzyskanych wartościach są nieistotne statystycznie ($p > 0,05$; ANOVA). K – kontrola; S-D – stres-dekapitacja; 1d, 3d, 7d, 14d, 21d – liczba dni, w trakcie których zwierzęta były poddawane stresowi.





Rycina 2. A. Przykład rejestracji LTP w skrawku użytym z myszy kontrolnej, B. fEPSP zarejestrowane przed (a) i 2 godziny po zastosowaniu HFS (b).



Rycina 3. Wpływ stresu unieruchomienia na LTP w zakręcie zębatym. A. Nasilenie LTP po zastosowaniu unieruchomienia w grupie zwierząt stresowanych jednokrotnie tuż przed dekapitacją (grupa stres-dekapitacja, S-D). B. Zmiany wywołane jednokrotnym i wielokrotnym stresem unieruchomienia. Wyniki przedstawiono jako średnią \pm SEM, * $p < 0,05$; ANOVA. Symbole – jak na Rycinie 1.

Piśmiennictwo

1. Bliss TVP, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol (Lond)* 1973; 232: 331-356.

2. Lisman J. Long-term potentiation: outstanding questions and attempted synthesis. *Phil Trans Soc Lond B* 2003; 358: 829-842.

3. Miyamoto E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci* 2003; 100: 433-442.

4. de Kloet ER, Joels M, Holsboer F. Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6: 463-475.

5. Pavlak R, Shankaranarayanan Rao BS, Melchor JP, Chattarji S, McEwen B, Strickland S. Tissue plasminogen activator and plasminogen mediate stress-induced decline of neuronal and cognitive function in the mouse hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 18201-18206.

6. Bain MJ, Dwyer SM, Rusak B. Restraint stress affects hippocampal cell proliferation differently in rats and mice. *Neurosci Lett* 2004; 368: 7-10.

7. Kim JJ, Foy MR, Thompson RF. Behavioral stress modifies hippocampal plasticity through N-methyl-D-aspartate receptor activation. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 4750-4753.

8. Ahmed T, Frey JU, Korz V. Long-term effects of brief acute stress on cellular signaling and hippocampal LTP. *J Neurosci* 2006; 26: 3951-3958.

9. Pavlides C, Nivon LG, McEwen BS. Effects of chronic stress on hippocampal long-term potentiation. *Hippocampus* 2002; 12: 245-257.

10. Bramham CR, Southard T, Ahlers ST, Sarvey JM. Acute cold stress leading to elevated corticosterone neither enhances synaptic efficacy nor impairs LTP in the dentate gyrus of freely moving rats. *Brain Res* 1998; 789: 245-255.

11. Kavushansky A, Vouimba RM, Cohen H, Richter-Levin G. Activity and plasticity in the CA1, the dentate gyrus, and the amygdala following controllable vs uncontrollable water stress. *Hippocampus* 2006; 16: 35-42.

12. de Kloet ER, Oitzl MS, Joels M. Stress and cognition: are corticosteroids good or bad guys? *Trends Neurosci* 1999; 22: 422-6.

13. Gesing A, Bilang-Bleuel A, Droste SK, Linthorst AC, Holsboer F, Reul JM. Psychological stress increases hippocampal mineralocorticoid receptor levels: involvement of corticotropin-releasing hormone. *J Neurosci* 2001; 21: 4822-4829.

14. Linthorst AC, Penalva RG, Flachskamm C, Holsboer F, Reul JM. Forced swim stress activates rat hippocampal serotonergic neurotransmission involving a corticotropin-releasing hormone receptor-dependent mechanism. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 2441-2452.

15. Lai M, McCormick JA, Chapman KE, Kelly PAT, Seckl JR, Yau JLW. Differential regulation of cortico-

steroid receptors by monoamine neurotransmitters and antidepressant drugs in primary hippocampal culture. *Neuroscience* 2003; 118: 975–984.

Adres korespondencyjny:

Jadwiga Spyrka,

Zakład Neurofizjologii i Chronobiologii,
Instytut Zoologii, Uniwersytet Jagielloński,
ul. R. Ingardena 6,
30-060 Kraków,
tel.: (012) 663 26 37,
e-mail: spyrka@if-pan.krakow.pl

Modele niejednorodnych procesów punktowych a kodowanie informacji w układzie wzrokowym

Models of inhomogeneous point processing and information coding in the visual system

Gabriela Mochol, Daniel Krzysztof Wójcik, Marek Wypych, Andrzej Wróbel, Wioletta Joanna Waleszczyk
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

Streszczenie

Powierzchniowe warstwy wzgórków czworaczych górnych kota posiadają główne wejścia z dwóch typów komórek zwojowych siatkówki – Y i W. Naszym celem było zbadanie, czy odmienne źródła informacji wzrokowej przekładają się na różnice w zmienności odpowiedzi komórek wzórka górnego i jeśli tak, czy oznacza to inne schematy kodowania informacji wzrokowej. W tym celu porównaliśmy dane doświadczalne z danymi odniesienia pochodzącymi z dwóch modeli: niejednorodnego procesu Poissona (IPP) oraz niejednorodnego procesu Markowa dla interwałów (IMI). Dla danych doświadczalnych, przy wzroście częstości generacji iglic podczas stymulacji wolno poruszającym się bodźcem (przypuszczalne wejście W) obserwowaliśmy wzrost zmienności odpowiedzi. Z kolei w trakcie reakcji na szybki ruch bodźca (przypuszczalne wejście Y) widoczny był wzrost precyzji odpowiedzi. Żaden z modeli nie oddawał w pełni tego typu zależności. Niezgodność z modelem IPP pozwala odrzucić hipotezę kodowania informacji częstością iglic. Niezgodność z modelem IMI dla odpowiedzi na wolne prędkości pozwala przypuszczać, że istotną rolę w przetwarzaniu informacji odgrywają złożone zależności czasowe pomiędzy potencjałami czynnościowymi. W przypadku odpowiedzi na wysokie prędkości model IMI dobrze opisuje aktywność komórki. Zaobserwowane różnice w zmienności odpowiedzi pomiędzy komórkami wzórka o odmiennej preferencji na prędkość bodźca sugerują, że informacja wzrokowa przekazywana kanałami W i Y jest kodowana w odmienny sposób.

Słowa kluczowe: wzórki czworacze górne, zmienność odpowiedzi, współczynnik Fano, droga wzrokowa

Abstract

Superficial layers of the cat's superior colliculus receive their main inputs from two classes of retinal ganglion cells, Y and W. Our aim was to answer the following questions: if distinct sources of a visual signal imply differences in response variabilities of collicular neurons and if so, do they suggest different schemes of visual information coding. To this end, the experimental data were compared to surrogate spike trains derived from two models, Inhomogeneous Poisson Process (IPP) and Inhomogeneous Markov Interval Process (IMI). In the experimental data, we observed an increase of variability during stimulation by slow velocities (W input). On the other hand, during responses to high velocities (Y input), augmentation of response reliability was visible. No model could account for these dependencies. The disagreement with the IPP model allows us to reject the hypothesis of rate coding. The disagreement with the IMI model for low velocities suggests that more complex temporal dependencies play a role in the processing of information for the W channel. The IMI model could account well for the properties of responses to fast stimuli. Observed differences in response variabilities between collicular neurons with different velocity preferences imply distinct scheme coding in the cases of Y and W visual pathways.

Key Words: Superior Colliculus, response variability, Fano factor, visual pathway

Wstęp

Pierwszą hipotezą starającą się wyjaśnić naturę kodu neuronalnego była teoria kodowania częstością iglic. Według niej wszystkie informacje

o parametrach bodźca zawarte są w intensywności odpowiedzi neuronu mierzonej liczbą generowanych w jednostce czasu potencjałów czynnościowych [1]. Przy takim założeniu dokładny czasowy wzorzec pojawiania się pojedynczych potencjałów czynnościowych nie odgrywa istotnej roli w przekazywaniu informacji. Alternatywną do kodowania częstotliwością stała się koncepcja kodowania czasowego. Zgodnie z nią czasy generacji kolejnych iglic lub odstępy pomiędzy nimi niosą ze sobą istotne informacje o cechach bodźca, szczególnie, jeśli ma on złożony charakter [2]. Kluczowym czynnikiem pozwalającym rozstrzygnąć, z jakim rodzajem kodu mamy do czynienia, jest czasowa precyzja generacji kolejnych potencjałów czynnościowych. Reakcja komórek nerwowych na wielokrotne powtórzenia identycznego bodźca jest z reguły zmienna. Aby opisać zmienność odpowiedzi, ciągi potencjałów czynnościowych często opisuje się w języku procesów punktowych poprzez wyznaczenie prawdopodobieństwa wygenerowania iglicy w danym czasie.

W najprostszym modelu, zwanym niejednorodnym procesem Poissona (*Inhomogeneous Poisson Process*, IPP) [3, 4], zakłada się, że prawdopodobieństwo wygenerowania potencjału czynnościowego w danej chwili zależy tylko od bodźca i jest niezależne od czasów generacji poprzednich iglic. Tym samym odrzuca się jakiegokolwiek zależności czasowe wewnątrz ciągu iglic. W tak przyjętym opisie zmienność z powtórzenia na powtórzenie, wyrażona jako stosunek wariancji liczby iglic do jej średniej liczonych w danym interwale czasu, jest stale równa jedności niezależnie od poziomu odpowiedzi czy wybranego odcinka czasu. Model IPP daje najprostszy opis rzeczywistych odpowiedzi neuronalnych, natomiast nie uwzględnia na przykład takich zjawisk jak okres refrakcji. Jest jednak punktem wyjścia dla innych modeli, w których bierze się pod uwagę różne aspekty aktywności neuronów. Jednym z nich jest niejednorodny proces Markowa dla interwałów (*Inhomogeneous Markov Interval* model, IMI) [5]. W modelu tym prawdopodobieństwo generacji potencjału czynnościowego zależy od czasu po bodźcu i czasu, który minął od poprzedniej iglicy. W najprostszej wersji, używanej przez nas, prawdopodobieństwo to dane jest iloczynem dwóch czynników. Pierwszy z nich opisuje zależną od czasu modulację aktywności neuronu wywołaną bodźcem. Drugi zależy od czasu od ostatniej iglicy i odzwierciedla własności błonowe badanej komórki, w tym okres refrakcji. Oba wyżej opisane modele posłużyły nam do próby zcharakteryzowania zmienności odpowiedzi neuronów wzgórków czworaczych górnych kota.

Wzgórek czworaczy górny ssaków to główne jądro śródmózgowia biorące udział w zachowaniach

kierowanych wzrokiem – ruchach głowy i gałek ocznych w kierunku obiektów zainteresowania. Neurony górnych warstw otrzymują bezpośrednie wejście tylko z dwóch typów komórek zwojowych siatkówki Y i W. Pewna liczba neuronów otrzymuje konwergentną informację z obydwu kanałów [6]. Przedmiotem naszych analiz była próba odpowiedzi na pytanie, czy z uwagi na odmienne wejście z dwóch różnych kanałów przetwarzania informacji wzrokowej istnieją różnice w zmienności odpowiedzi komórek wzgórka czworaczego górnego sugerujące różne schematy kodowania informacji.

Materiały i metody

Wszystkie procedury doświadczalne były zatwierdzone przez I Lokalną Komisję Etyczną d/s Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

Rejestracja i stymulacja wzrokowa

Eksperymenty były przeprowadzone na dorosłych kotach, będących pod wpływem narkozy wziewnej (izofluran, 33% O₂/66% N₂O). Szczegółowy opis prowadzonych podobnych doświadczeń: operacji chirurgicznej, rejestracji sygnałów elektrofizjologicznych oraz stymulacji wzrokowej znajduje się we wcześniejszej publikacji [7]. W skrócie, zewnątrzkomórkowe rejestracje pojedynczych neuronów z górnych warstw wzgórków czworaczych górnych były przeprowadzane przy użyciu mikroelektrod wolframowych. Komórki były stymulowane pałeczką świetlną (2°x1°) poruszającą się w jednej z osi pola recepcyjnego w obie strony z różną prędkością od 2°/s do 1000°/s. Przy zmianie kierunku bodźca przez 1 s znajdował się poza polem recepcyjnym. Liczba powtórzeń bodźca wahała się od 10 do 100 i zależała od prędkości. Generacja bodźca wzrokowego i rejestracja sygnału odbywała się z wykorzystaniem programu *Spike2* oraz przetwornika analogowo-cyfrowego Power 1401 Plus (Cambridge Electronic Design, UK).

Analiza danych

Wszystkie analizy matematyczne były wykonane przy użyciu programu *Matlab* (The MathWorks Inc.). Dla każdej komórki i każdej prędkości z osobna, poprzez zsumowanie liczby iglic po wszystkich powtórzeniach w odpowiednich interwałach czasowych, skonstruowaliśmy histogram po bodźcu (PSTH). Za czasową podstawę histogramu przyjęliśmy okres poruszania się bodźca w obydwu kierunkach łącznie z czasem, kiedy znajdował się on poza polem recepcyjnym. Oś czasu została podzielona na 200 przedziałów niezależnie od prędkości. Histogramy zostały wygładzone filtrem gaussowskim o szerokości sześciu przedziałów. Poniżej będziemy

się odnosić do tak wygładzonych histogramów jako do funkcji częstości wyładowań $r(t)$.

Współczynnik Fano

Za miarę zmienności odpowiedzi z powtórzenia na powtórzenie przyjęliśmy współczynnik Fano [8, 9, 10, 11]. Jest on zdefiniowany jako wariancja liczby potencjałów czynnościowych podzielona przez ich średnią liczbę: $F(\Delta t) = \sigma^2(n) / \mu(n)$, gdzie n jest liczbą iglic w danym przedziale czasu Δt . Ze względu na niestacjonarność danych doświadczalnych współczynnik Fano był liczony w krótkich przedziałach czasu [11]. W ten sposób otrzymaliśmy funkcję zmienności w czasie $F(t)$. W sytuacji, gdy w danym odcinku czasu średnia liczba iglic równa była zero, w sposób arbitralny przypisaliliśmy współczynnik Fano równy jedności jako odniesienie do niejednorodnego procesu Poissona. Otrzymany współczynnik Fano w funkcji czasu $F(t)$ wygładziliśmy dokładnie w ten sam sposób jak PSTH.

Dane modelowe

Aby rozstrzygnąć, czy w przypadku naszych danych eksperymentalnych informacja o bodźcu wzrokowym zakodowana jest tylko i wyłącznie poprzez częstość wyładowań, czy też mamy do czynienia z bardziej precyzyjnym systemem kodowania uwzględniającym zależności czasowe pomiędzy iglicami, zdecydowaliśmy się porównać wyniki doświadczalne z wynikami analizy danych modelowych. Do generacji danych odniesienia użyliśmy dwóch procesów stochastycznych: IPP [3] oraz IMI [5]. Do generacji sztucznego zbioru danych z modelu IPP użyliśmy wygładzonej funkcji częstości wyładowań $r(t)$. W tak przyjętym paradygmacie prawdopodobieństwo pojawienia się potencjału czynnościowego w czasie t równe jest iloczynowi $r(t) \cdot \Delta t$ gdzie jako Δt przyjęliśmy 1 ms. W drugim z modeli (IMI) prawdopodobieństwo wygenerowania potencjału czynnościowego zależy od dwóch zmiennych: bieżącego czasu t i czasu od ostatniej iglicy τ i równe jest $\lambda_1(t) \cdot \lambda_2(\tau)$. Funkcja $\lambda_1(t)$ jest proporcjonalna do $r(t)$, natomiast $\lambda_2(\tau)$ to krzywa powstała poprzez nieparametryczne dopasowanie do histogramu interwałów pomiędzy iglicami wygenerowanymi w okresie aktywności spontanicznej. Dane odniesienia generowane były metodą przerzedzania (*thinning method* [3]). Każdy z wygenerowanych zbiorów danych miał taką samą strukturę jak odpowiadające mu dane doświadczalne (liczba powtórzeń, dziedzina czasu).

Wyniki

Do analiz wybraliśmy 36 komórek, co do których mieliśmy pewność, że ich iglice są dokładnie

wyselekcjonowane. Na podstawie profilu preferencji prędkości dziewięć z nich zostało zaklasyfikowanych jako komórki odpowiadające tylko na wolne prędkości (2-50°/s) i z uwagi na to otrzymujące prawdopodobnie wejście tylko z kanału W. Kolejnych dziewięć komórek odpowiadało tylko na szybkie prędkości (100-1000°/s), a zatem otrzymywało najprawdopodobniej wejście z komórek zwojowych siatkówki typu Y. Reszta komórek odpowiadała w szerokim paśmie prędkości i stanowiła heterogenną grupę neuronów otrzymujących sygnał z obu kanałów wzrokowych. Komórek pobudzanych przez bodziec poruszający się zarówno z małą, jak i wysoką prędkością było trzynaście, natomiast pięć komórek było pobudzanych przez wolne prędkości bodźców, a szybki ruch bodźca powodował wygaszenie ich aktywności. Dla każdej komórki i dla każdej prędkości, która wywoływała odpowiedź wzrokową, wyznaczyliśmy funkcję częstości wyładowań $r(t)$ i współczynnik Fano $F(t)$. Dokładnie taki sam schemat analizy zastosowaliśmy do danych otrzymanych z modeli IPP oraz IMI. W przypadku danych doświadczalnych obserwowaliśmy odmienne zachowanie funkcji zmienności $F(t)$ w odpowiedzi na wolny ruch w porównaniu z odpowiedziami na szybko poruszający się bodziec. Wraz ze wzrostem aktywności wywołanej niską prędkością bodźca wzrastała zmienność odpowiedzi (Rycina 1, na dole po lewej). Natomiast w paśmie wysokich prędkości zmiany przebiegu $F(t)$ były w przeciwfazie ze zmianami aktywności neuronów (zarówno w przypadku wzrostu, jak i spadku odpowiedzi) (Rycina 1, na dole po prawej). Obserwowane zmiany nie były zgodne z predykcją modelu IPP – w okresie odpowiedzi współczynnik Fano był istotnie różny od jedności. W przypadku danych z modelu IPP $F(t)$ nieznacznie fluktuował wokół jedynki zarówno w trakcie odpowiedzi, jak i w czasie czynności spontanicznej, przy jednocześnie wiernym odtworzeniu funkcji częstości wyładowań $r(t)$ (Rycina 2, dolny panel). Dane odniesienia generowane modelem IMI wierniej odtwarzały dane doświadczalne. Podobnie jak w przypadku modelu IPP funkcja $r(t)$ była dobrze przybliżona. Zmienność w okresie aktywności spontanicznej była porównywalna ze zmiennością rzeczywistych sygnałów. Udało nam się odtworzyć spadek zmienności w przypadku szybkich ruchów bodźca (Rycina 3, na dole po prawej). Niemniej jednak, dane z modelu IMI nie odtwarzały wzrostu zmienności w odpowiedzi na wolne prędkości (Rycina 3, na dole po lewej).

Dyskusja

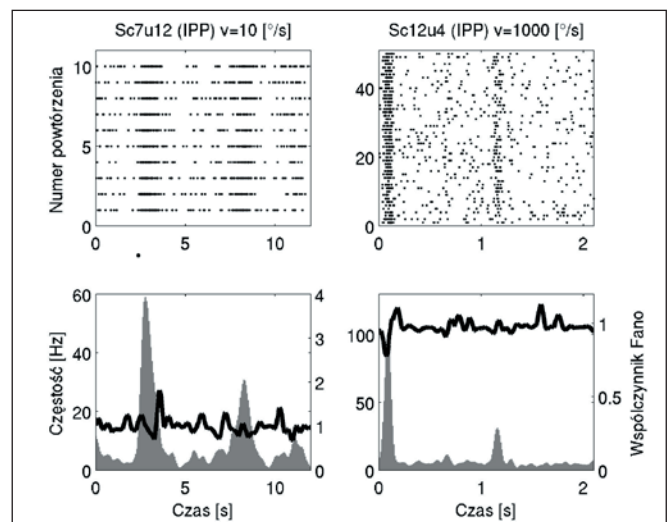
Zaobserwowane różnice w zmienności odpowiedzi pomiędzy komórkami odpowiadającymi na wolne

i szybkie prędkości bodźca pozwalają przypuszczać, że informacja wzrokowa przekazywana dwoma odrębnymi kanałami W i Y jest kodowana w odmienny sposób. Niezgodność doświadczenia z modelem IPP pozwala z dużym prawdopodobieństwem odrzucić hipotezę kodowania informacji o szybkim i wolnym ruchu wyłącznie częstością iglic [3, 12]. Zgodność modelu IMI dla komórek odpowiadających na wysokie prędkości sugeruje, że okres refrakcji pełni w tym przypadku kluczową funkcję w precyzji odpowiedzi [8, 11]. Niezgodność z modelem IMI dla komórek otrzymujących wejście z kanału W pozwala przypuszczać, że bardziej złożone zależności czasowe pomiędzy potencjałami czynnościowymi, a nie tylko czas od ostatniej iglicy, odgrywają istotną rolę w przekazywaniu informacji z siatkówki na wyższe piętra układu wzrokowego [12]. Z literatury wiadomo, że wpływ na obserwowaną zmienność odpowiedzi ma rodzaj prezentowanego bodźca. Bodźce dynamiczne, o bogatej strukturze czasowo-przestrzennej wywołują precyzyjniejsze odpowiedzi niż bodźce stacjonarne [10, 13]. Także intensywność bodźca odgrywa istotną rolę w zmienności odpowiedzi. Dane literaturowe pokazują, że przy rosnącym kontraście odpowiedzi stają się mniej zmienne [8, 9]. Komórki należące do kanału Y w siatkówce i ciele kolankowatym bocznym odpowiadają intensywnie już przy małym kontraście, podczas gdy komórki kanału W, które cechuje słaba reakcja na bodziec w całym zakresie kontrastu, reagują lepiej wraz z jego wzrostem [14]. Jest prawdopodobnym, że różnice w zależnościach czasowych zmienności odpowiedzi komórki obu kanałów odzwierciedlają odmienną czułość na kontrast.

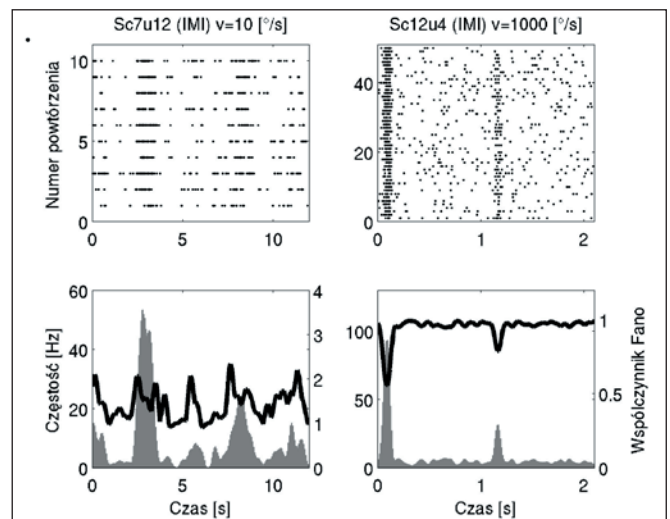
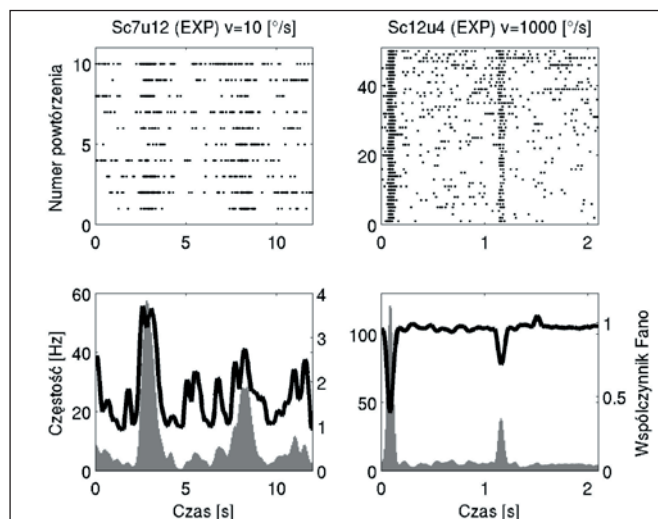
Podziękowania

Badania były możliwe dzięki finansowaniu z grantów: N40114631/3239 oraz COST/127/2007.

Rycina 1. Dane doświadczalne dla komórki odpowiadającej na wolne prędkości (lewa kolumna) i komórki pobudzonej przez szybki ruch bodźca (prawa kolumna). Górny panel przedstawia odpowiedzi neuronów na pojedyncze powtórzenia bodźca. Liczba powtórzeń jest różna w przypadku wolnego i szybkiego bodźca. Kropka oznacza czas pojawienia się pojedynczej iglicy. Dolny panel: W postaci histogramu przedstawiono funkcję częstości generacji iglic $r(t)$, jej wartość zaznaczono na lewej osi. Czarna krzywa przedstawia współczynnik Fano w funkcji czasu $F(t)$, jego wartości podano na prawej osi. W przypadku komórki preferującej wolny bodziec widzimy wzrost zmienności w trakcie trwania odpowiedzi. Efekt przeciwny widoczny jest dla komórki pobudzonej przez wysoką prędkość – zmienność spada w trakcie odpowiedzi.



Rycina 2. Dane z modelu IPP dla komórki odpowiadającej na wolne prędkości (lewa kolumna) i komórki pobudzonej przez szybki ruch bodźca (prawa kolumna). Dla obu komórek funkcja $F(t)$ fluktuuje wokół jedności i nie odzwierciedla zależności obserwowanych dla danych doświadczalnych. Opis szczegółowy taki jak pod Ryciną 1.



Rycina 3. Dane z modelu IMI dla komórki odpowiadającej na wolne prędkości (lewa kolumna) i komórki pobudzonej przez szybki ruch bodźca (prawa kolumna). Dane odniesienia nie są zgodne z danymi doświadczalnymi dla odpowiedzi na wolny ruch natomiast w przypadku wysokich prędkości widzimy zbliżony do doświadczalnego spadek zmienności odpowiedzi. Opis szczegółowy taki jak pod Ryciną 1.

Piśmiennictwo

1. Shadlen MN, Newsome WT. Noise, neural codes and cortical organization. *Curr Opin Neurobiol* 1994; 4 (4): 569-579.
2. Softky WR. Simple codes versus efficient codes. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5 (2): 1370-1371.
3. Dayan P, Abbott LF. Theoretical neuroscience. Computational and mathematical modeling of neural system. The MIT Press, Cambridge, Massachusetts; London, England, 2001.
4. Perkel DH, Gerstein G, Moore GP. Neuronal spike trains and stochastic point processes. I. The Single Spike Train. *Biophys. J.* 1967, 7, 391-418.
5. Kass RE, Ventura V. A Spike-Train Probability Model. *Neural Computation* 2001 Aug; 13 (8): 1713-1720.
6. Waleszczyk WJ, Wang Ch, Benedek G, Bruke W, Dreher B. Motion sensitivity in cat's superior colliculus: contribution of different visual processing channels to response properties of collicular neurons. *Acta Neurobiol Exp* 2004 64 (2), 209-228. Review.
7. Waleszczyk WJ, Wang C, Burke W, Dreher B. Ve-

locity response profiles of collicular neurons: parallel and convergent visual information channels. *Neuroscience* 1999; 93 (3): 1063-1076.

8. Berry MJ, Warland DK, Meister M. The structure and precision of retinal spike trains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997 13; 94 (10): 5411-5416.

9. Buračas GT, Zador AM, DeWeese MR, Albright TD. Efficient discrimination of temporal patterns by motion – sensitive neurons in primate visual cortex. *Neuron* 1998; 20 (5): 959-969.

10. de Ruyter van Steveninck RR, Lewen GD, Strong SP, Koberle R, Bialek W. Reproducibility and variability in neuronal spike trains. *Science* 1997 21; 275 (5307): 1805-1808.

11. Kara P, Reinagel P, Reid RC. Low response variability in simultaneously recorded retinal, thalamic, and cortical neurons. *Neuron* 2000; 27 (3), 635-646.

12. Berry MJ, Meister M. Refractoriness and neural precision. *J Neurosci.* 1998 15; 18 (6): 2200-2211. Review.

13. Mainen ZF, Sejnowski TJ. Reliability of spike timing in neocortical neurons. *Science* 1995 9; 268 (5216): 1503-1506.

14. Rowe MH, Cox JF. Spatial receptive-field structure of cat retinal W cells. *Vis Neurosci.* 1993; 10 (4): 765-779.

Adres korespondencyjny:

Gabriela Mochol,
Instytut Biologii Doświadczalnej, PAN,
ul. L. Pasteura 3; 02-093 Warszawa,
tel.: (022) 589 24 24,
e-mail: g.mochol@nencki.gov.pl;

W poszukiwaniu mechanizmów preferencji kierunku ruchu bodźca przez neurony wzrokowe górnych warstw wzgórków górnych

In search of mechanisms of directional preference for stimulus motion in visual neurons in superficial layers of the superior colliculus

Marek Wypych, Gabriela Mochol, Anaida Ghazaryan, Andrzej Wróbel, Wioletta J. Waleszczyk
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN, Warszawa

Streszczenie

Wzgórek czworaczy górny (ang. *superior colliculus*, SC) to ewolucyjnie stare jądro śródmózgowia otrzymujące informacje różnej modalności i pełniące kluczową funkcję m.in. w generowaniu reakcji ruchowych, takich jak szybkie ruchy oczu,

uszu lub głowy w kierunku bodźca. Dla prawidłowego generowania reakcji wzrokowo-ruchowych SC musi dysponować efektywnymi mechanizmami przetwarzania informacji o zmianach w polu widzenia. Jednym z podstawowych zjawisk ważnych dla zrozumienia percepcji ruchu w układzie wzrokowym jest preferencja kierunku ruchu bodźca,

której mechanizmy w SC nie są poznane. Badając czasowo-przestrzenne pola recepcyjne neuronów, staraliśmy się sprawdzić czy mechanizmy powstawania preferencji kierunku w SC kota mogą być podobne do któregoś z dwóch klasycznych modeli wyjaśniających to zjawisko w siatkówce i korze wzrokowej. Otrzymane przez nas wyniki sugerują istotną rolę komórek GABAergicznymi w przetwarzaniu informacji wzrokowej w SC, jednakże stoją w sprzeczności z klasycznymi modelami preferencji kierunku ruchu.

Słowa kluczowe: *wzgórek górny, preferencja kierunku ruchu, kot, układ GABAergiczny, widzenie*

Abstract

The superior colliculus (SC) is an evolutionary old midbrain nucleus which receives polymodal inputs and plays a crucial role in generating orientation behavior like saccades towards a stimulus, etc. For adequate generation of visuo-motor reflexes, the SC needs to use effective mechanisms of processing information about changes in the visual field. One of the fundamental phenomena important for our understanding of motion perception in visual systems is the preference for direction of stimulus motion. Mechanisms underlying directional selectivity in the SC are unknown. Testing spatio-temporal receptive field structure, we wanted to check if the mechanisms of directional preference in the SC of the cat could be similar to either of the two classical models explaining this phenomenon in retinal and cortical cells. Obtained results suggest an important role for GABAergic neurons in the processing of visual information in the SC. However, these results are opposite to classical models of directional preference.

Key Words: *superior colliculus, directional preference, cat, GABAergic system, vision*

Wstęp

Wzgórek czworaczy górny (ang. *superior colliculus*, SC) to jądro śródmózgowia pełniące kluczową rolę m.in. w generowaniu reakcji ruchowych takich jak szybkie ruchy oczu, uszu lub głowy w kierunku bodźca. Jądro to zaopatrywane jest zarówno w informacje modalności wzrokowej (do warstw powierzchniowych), słuchowej (do warstw głębokich), jak i czuciowej (warstwy głębokie i środkowe) [przegląd w: 1]. Strumień informacji wzrokowej z SC przekazywany jest do wzgórza, do kompleksu jądra tylnobocznego i poduszki,

a stamtąd do szeregu wzrokowych pól korowych wyższego rzędu [przegląd w: 1]. Ponadto impulsy z głębokich warstw tej ewolucyjnie starszej części mózgu, trafiają do przedruchowych struktur pnia mózgu, a stamtąd m.in. do motoneuronów wywołujących ruchy oczu i głowy [przegląd w: 2]. Dla prawidłowego generowania reakcji wzrokowo-ruchowych wzgórek górny musi dysponować efektywnymi mechanizmami wychwytywania zmian w polu widzenia – także podczas ruchu własnego. Jednym z fundamentalnych zagadnień istotnych dla zrozumienia percepcji ruchu w układzie wzrokowym jest kwestia preferencji kierunku ruchu bodźca. Zjawisko odpowiedzi neuronu na ruch w wybranym kierunku obserwowane jest w większości struktur wzrokowych, a w SC kota dotyczy ono większości komórek [np. 3]. Informacja wzrokowa dochodzi do powierzchniowych warstw SC zarówno bezpośrednio z siatkówki [przegląd w: 4] jak i z wielu wzrokowych pól korowych [5]. Wiele badań sugeruje jednak, że mechanizm powstawania preferencji kierunku ruchu zlokalizowany jest w samym SC [6, 7].

W neurofizjologii znane są dwa podstawowe modele percepcji kierunku ruchu bodźca – zakładają one asymetrię w czasowo-przestrzennej strukturze pól recepcyjnych neuronów. Model percepcji ruchu bodźca zaproponowany przez Reichardta [8] dla siatkówki muszki zakłada gradient latencji pobudzenia w polu recepcyjnym neuronu czulego na określony kierunek ruchu bodźca. Czasowo-przestrzenne sumowanie pobudzenia w neuronie powoduje, że preferowany jest kierunek, w którym bodziec porusza się od obszaru pola recepcyjnego o dłuższej latencji odpowiedzi do obszaru o krótszej latencji odpowiedzi – dzięki temu pobudzenia z różnych części pola recepcyjnego docierają do neuronu w tym samym czasie (Rycina 1A). Model zaproponowany przez Barlowa i Levicka [9] dla komórek zwojowych siatkówki królika zakłada istnienie hamowania, które nie pokrywa się przestrzennie z pobudzeniem. Ruch bodźca rozpoczynający się z obszaru, w którym występuje pobudzenie, jest kierunkiem preferowanym, natomiast ruch bodźca w kierunku przeciwnym powoduje w pierwszej kolejności hamowanie, które nie dopuszcza do przekroczenia progu pobudzenia koniecznego dla generacji potencjałów czynnościowych (Rycina 1B).

Aby zatem sprawdzić, który z modeli mógłby wyjaśnić powstawanie preferencji kierunku ruchu bodźca w SC, postanowiliśmy zbadać strukturę czasowo-przestrzennych pól recepcyjnych (ang. *spatio-temporal receptive fields*, STRF) komórek SC wykazujących taką preferencję.

Materiały i metody

Doświadczenia przeprowadzono na uśpionych, dorosłych kotach obu płci. Procedury zastosowane w trakcie doświadczeń [dokładny opis w: 10] zostały zatwierdzone przez I Lokalną Komisję Etyczną d/s Doświadczeń na Zwierzętach w Warszawie.

W czasie doświadczeń rejestrowano aktywność pojedynczych neuronów z górnych warstw SC w odpowiedzi na bodźce wzrokowe prezentowane za pomocą sterowanego komputerowo projektora. Używanym przez nas bodźcem była prostokątna plamka świetlna (0, 5° x 1° lub 1° x 2°) prezentowana na sferycznym ekranie znajdującym się w odległości ok. 75 cm od oczu kota. Prezentowaliśmy zarówno bodźce ruchome, jak i stacjonarne. W przypadku ruchu, bodziec poruszał się po preferowanej (najczęściej poziomej) osi pola recepcyjnego w obu kierunkach z prędkościami od 2 do 1000 °/s. Czasowo-przestrzenną strukturę pól recepcyjnych neuronów rejestrowano prezentując (włączając na 0,5-1 s i wyłączając na 0,5-1 s) bodźce stacjonarne w różnych miejscach głównej osi pola recepcyjnego w pseudolosowym porządku (Rycina 2). Aktywność neuronów rejestrowana była przy pomocy konwertera analogowo-cyfrowego (CED 1401 plus) i programu Spike 2. Rejestracje zapisywane były w pamięci komputera i analizowane szczegółowo *off-line* z pomocą programu Spike 2 oraz środowiska *Matlab*.

Wyniki

W celu zbadania relacji między czułością neuronu na kierunek ruchu bodźca a strukturą STRF rejestrowano odpowiedzi neuronów na bodźce poruszające się wzdłuż osi pola recepcyjnego oraz czas opóźnienia odpowiedzi na bodźce stacjonarne w poszczególnych punktach na tej osi. Z dotychczas przeanalizowanych profili STRF i odpowiedzi na ruch dla 35 neuronów z górnych warstw SC wyłoniły się dwie charakterystyki:

1 – gradient latencji odpowiedzi neuronu na bodziec pojawiający się (i znikający) w różnych miejscach pola recepcyjnego. Przy czym krótsze latencje występowały w części pola recepcyjnego położonej bliżej *area centralis* (*ac* – część siatkówki o największej gęstości komórek zwojowych), a dłuższe w części pola położonej dalej od *ac* (Rycina 3A). Taką charakterystykę czasowo-przestrzenną zaobserwowano dla około 65% neuronów;

2 – zmniejszenie aktywności iglicowej komórki poniżej „czynności spontanicznej” w odpowiedzi na pojawienie się (zniknięcie) bodźca w części pola recepcyjnego bliższej *ac*, i zwiększenie w części pola położonej dalej od *ac* (Rycina 3B). Ten wzorzec dotyczył około 25% neuronów.

Niezależnie od charakteru STRF, rejestrowane neurony wykazywały preferencję kierunku ruchu od *area centralis* na zewnątrz.

Dyskusja

Rozpoznawanie kierunku ruchu obiektów w polu widzenia jest jednym z zasadniczych procesów w percepcji wzrokowej. Poznanie mechanizmów leżących u podstaw tego procesu stanowi fundamentalne zagadnienie i jest istotne dla zrozumienia całego procesu widzenia. Mechanizm preferencji kierunku ruchu przez neurony siatkówki i kory wzrokowej był i jest badany przez wiele laboratoriów na świecie [np.: 9, 11-14]. Uważa się, że preferencja kierunku ruchu w komórkach zwojowych siatkówki wynika z asymetrii wejść hamujących [9, 11], natomiast w komórkach korowych o prostych polach recepcyjnych (ang. *simple*), z asymetrii latencji wejść pobudzeniowych [15]. Wiele prac jednak [np. 12, 13] wskazuje, że także w komórkach kory, w mechanizmach preferencji kierunku ruchu istotną rolę odgrywa hamowanie. Natomiast ciągle bardzo niewiele wiadomo na temat mechanizmów rozróżniania kierunku ruchu bodźca wzrokowego przez neurony wzgórków czworaczych górnych.

Nasze badania dostarczają informację o czasowo-przestrzennej strukturze pól recepcyjnych neuronów SC. Obserwujemy występowanie podobnych asymetrii w STRF do tych obserwowanych dla komórek zwojowych w siatkówce [11] lub komórek typu *simple* w pierwszorzędowej korze wzrokowej [15], jednakże zastosowanie klasycznych modeli [8, 9] do otrzymanych przez nas STRF nie wyjaśnia obserwowanej preferencji kierunku. Otrzymane przez nas wyniki stoją w sprzeczności z tymi modelami sugerując, że preferencja kierunku ruchu bodźca przez neurony SC opiera się na mechanizmach innych niż w komórkach zwojowych siatkówki czy komórkach typu *simple* pierwszorzędowej kory wzrokowej.

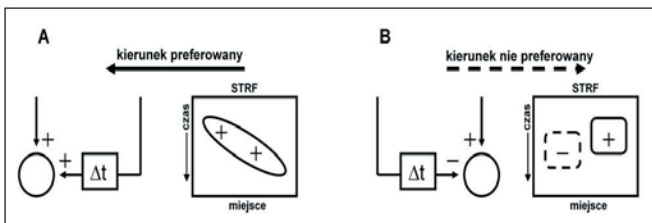
U części neuronów wzgórków czworaczych górnych w obszarze pola recepcyjnego położonym bliżej *area centralis* aktywność była tłumiona przez bodziec wzrokowy, co sugeruje rolę oddziaływań hamujących w mechanizmach preferencji kierunku ruchu przez te neurony. Jedną z hipotez wyjaśniającą preferencję kierunku ruchu od części hamującej do części pobudzeniowej pola recepcyjnego, mogłoby być zjawisko „odbicia” (ang. *rebound*; odhamowania neuronu na skutek wcześniejszej hiperpolaryzacji), którego udział sugerowany jest np. w późnej fazie odpowiedzi komórek korowych na bodźce stacjonarne [16]. Udział hamowania w mechanizmach przetwa-

rzania informacji wzrokowej w SC sugeruje także fakt, że neurony GABAergiczne tworzą bardzo dużą populację we wzgórku czworaczym górnym – ok. 40% ogólnej liczby komórek [17]. Wiadomo też o istnieniu projekcji GABAergicznych z obszaru przedczworaczego i brzusznej części ciała kolankowatego bocznego [za: 1], jednakże rola tych połączeń w przetwarzaniu informacji wzrokowej nie jest jeszcze poznana. Bardzo nieliczne badania *in vivo* [18], wskazały na istotną rolę receptorów GABA_A w kształtowaniu pola recepcyjnego w SC oraz zależność habituacji odpowiedzi od receptorów GABA_B. Obwody neuronalne wzgórka górnego zawierające komórki GABAergiczne są przedmiotem badań neuroanatomicznych oraz elektrofizjologicznych *in vitro* [19], w których wykazano m.in. rolę receptorów GABA_C w hamowaniu interneuronów SC, a w efekcie w odhamowaniu neuronów nie GABAergicznych.

Dotychczas nie przeprowadzono badań *in vivo* nad wpływem GABA na strukturę STRF i preferencje kierunku ruchu bodźca przez neurony SC. Przeprowadzenie takich badań wydaje się istotne dla pełniejszego poznania roli układu GABAergicznego w przetwarzaniu informacji wzrokowej we wzgórku górnym.

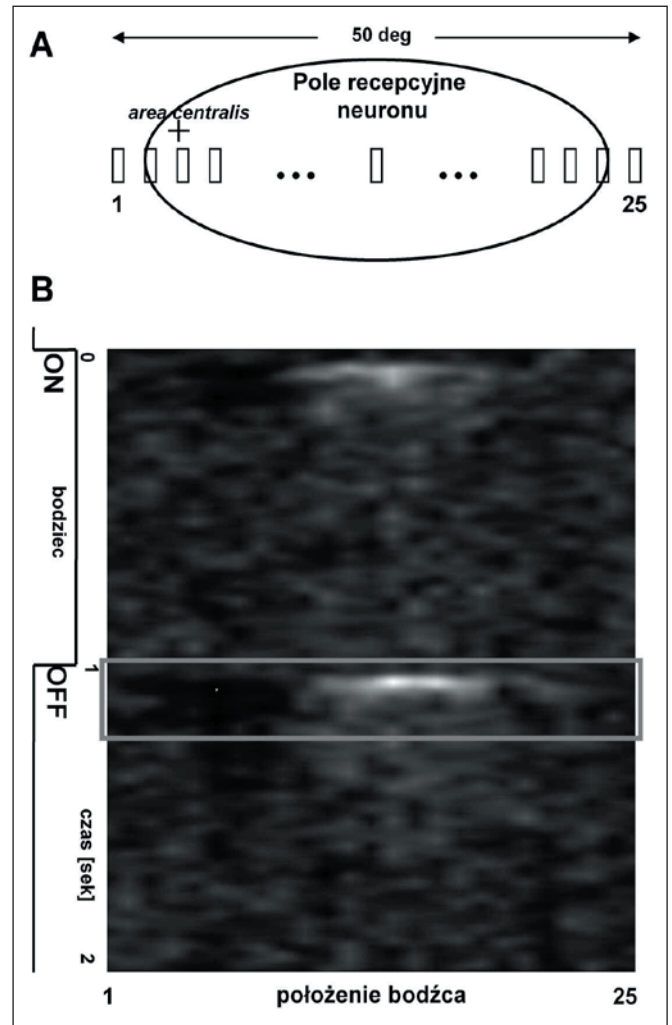
Podziękowania

Badania były możliwe dzięki finansowaniu z grantów: KBN 3 P04C 082 22, MNiSW N303 046 31/1483, N40114631/3239 oraz COST/127/2007.

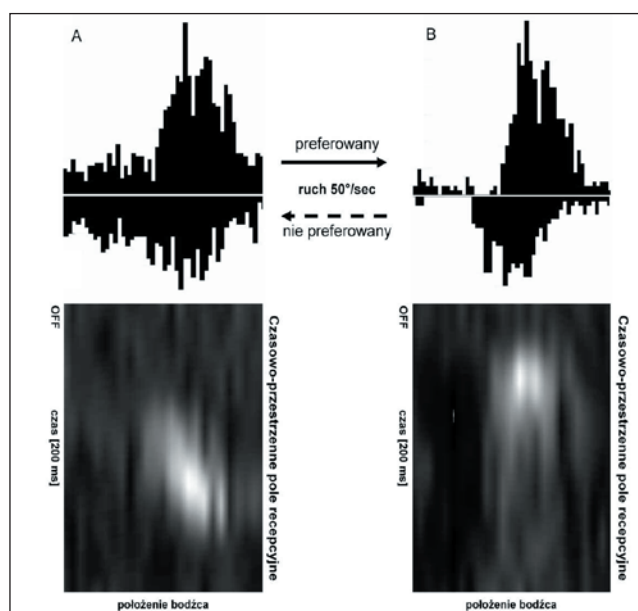


Rycina 1. Klasyczne modele preferencji kierunku ruchu bodźca przez neuron. **A.** W modelu Richarda [8] preferencja kierunku powstaje w rezultacie różnicy latencji wejść pobudzeniowych z różnych części pola recepcyjnego – w wyniku ruchu bodźca w kierunku preferowanym pobudzenia z różnych części pola recepcyjnego docierają do komórki w tym samym czasie, powodując większą odpowiedź. W STRF widać stosowną asymetrię pobudzenia. **B.** W modelu Barlowa i Levicka [9] preferencja kierunku ruchu jest wynikiem hamowania odpowiedzi na ruch w kierunku niepreferowanym – depolaryzacja związana z przejściem bodźca przez pobudzeniową część pola recepcyjnego jest niewystarczająca do wywołania aktyw-

ności neuronu, jeśli wcześniej bodziec wywołał hiperpolaryzację błony komórkowej, przechodząc przez hamującą część pola. STRF pokazuje występowanie obszarów pobudzeniowego i hamulcowego oraz odpowiednią asymetrię latencji.



Rycina 2. Metoda badania struktury czasowo-przestrzennych pól recepcyjnych (STRF). **A.** Rejestrowano aktywność neuronów w czasie prezentacji bodźca, jakim była plamka świetlna pojawiająca się (i znikająca) w przypadkowej kolejności w 25-ciu miejscach na poziomej osi pola recepcyjnego. **B)** Czasowo-przestrzenne pole recepcyjne to wykres przedstawiający czasowy rozkład aktywności neuronu w odpowiedzi na bodziec prezentowany w różnych miejscach pola recepcyjnego. Aktywność przedstawiono w skali szarości – jaśniejszy obszar reprezentuje wyższą aktywność neuronów (warto zauważyć, że na pojawienie się bodźca w pobliżu *area centralis* komórka reagowała zmniejszeniem aktywności poniżej poziomu „spontanicznego”). Na kolejnych rysunkach przedstawiany będzie tylko 200 ms fragment będący odpowiedzią na wyłączenie bodźca (zaznaczony ramką).



Rycina 3. Struktura czasowo-przestrzennych pól recepcyjnych (STRF) i histogramy odpowiedzi na ruch w różnych kierunkach przykładowych neuronów z górnych warstw wzgórków górnych. **A.** STRF wykazuje wyraźne różnice w latencjach dochodzących pobudzeń. Preferowany kierunek stoi jednak w sprzeczności z modelem Reichardta (porównaj Ryc. 1A). **B.** Na STRF widać obszar pobudzeniowy i, na lewo od niego, hamulcowy – jednak kierunek ruchu preferowany przez neuron jest przeciwny do oczekiwanego na podstawie modelu Barlowa i Levicka (por. Ryc. 1B).

Piśmiennictwo

1. May PJ. The mammalian superior colliculus: laminar structure and connections. *Prog Brain Res.* 2006; 151: 321-78.
2. Muñoz DP. Commentary: saccadic eye movements: overview of neural circuitry. *Prog Brain Res.* 2002; 140: 89-96.
3. Waleszczyk WJ, Wang C, Burke W and Dreher B. Velocity response profiles of collicular neurons: parallel and convergent visual information channels. *Neuroscience.* 1999; 93: 1063-1076.
4. Waleszczyk WJ, Wang C, Benedek G, Burke W, Dreher B. Motion sensitivity in cat's superior colliculus: contribution of different visual processing channels to response properties of collicular neurons. *Acta Neurobiol Exp.* 2004; 64: 209-228.
5. Harting JK, Updyke BV, Van Lieshout DP. Corticotectal projections in the cat: anterograde transport studies of twenty-five cortical areas. *J. Comp. Neurol.* 1992; 324: 379-414.
6. Mendola JD and Payne BR. Direction selectivity and physiological compensation in the superior colliculus following removal of areas 17 and 18. *Vis Neurosci.* 1993; 10: 1019-1026.

7. Cynader M, Berman N, Hein A. Cats raised in a one-directional world: effects on receptive fields in visual cortex and superior colliculus. *Exp Brain Res.* 1975; 22 (3): 267-80.
8. Reichardt W. Autocorrelation, a principle for the evaluation of sensory information by the central nervous system. W: Rosenblith WA ed. *Sensory Communication*, New York: Wiley; 1961: 303-317.
9. Barlow HB, Levick WR. The mechanism of directionally selective units in rabbit's retina. *J Physiol.* 1965; 178: 477-504.
10. Waleszczyk WJ, Nagy A, Wypych M, Berényi A, Paróczy Z, Eördégh G, Ghazaryan A, Benedek G. Spectral receptive field properties of neurons in the feline superior colliculus. *Exp Brain Res.* 2007; 181 (1): 87-98.
11. He S, Jin ZF, Masland RH. The nondiscriminating zone of directionally selective retinal ganglion cells: comparison with dendritic structure and implications for mechanism. *J Neurosci.* 1999; 19: 8049-8056.
12. Livingstone MS. Mechanisms of direction selectivity in macaque V1. *Neuron.* 1998; 20: 509-526.
13. Crook JM, Kisvárdy ZF, Eysel UT. Evidence for a contribution of lateral inhibition to orientation tuning and direction selectivity in cat visual cortex: reversible inactivation of functionally characterized sites combined with neuroanatomical tracing techniques. *Eur J Neurosci.* 1998; 10 (6): 2056-75.
14. Pack CC, Conway BR, Born RT, Livingstone MS. Spatiotemporal structure of nonlinear subunits in macaque visual cortex. *J Neurosci.* 2006; 26: 893-907.
15. Murthy A, Humphrey AL, Saul AB, Feidler JC. Laminar differences in the spatiotemporal structure of simple cell receptive fields in cat area 17. *Vis Neurosci.* 1998; 15 (2): 239-56.
16. Pernberg J, Jirrmann KU, Eysel UT. Structure and dynamics of receptive fields in the visual cortex of the cat (area 18) and the influence of GABAergic inhibition. *Eur J Neurosci.* 1998; 10 (12): 3596-606.
17. Mize RR. The organization of GABAergic neurons in the mammalian superior colliculus. *Prog Brain Res.* 1992; 90: 219-248.
18. Binns KE, Salt TE. Different roles for GABAA and GABAB receptors in visual processing in the rat superior colliculus. *J Physiol.* 1997; 504: 629-39.
19. Schmidt M, Boller M, Ozen G, Hall WC. Disinhibition in rat superior colliculus mediated by GABA_C receptors. *J Neurosci.* 2001; 21: 691-699.

Adres korespondencyjny:

Marek Wypych,
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego,
ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa,
tel. (022) 589 22 67,
e-mail: wypych@nencki.gov.pl

Dwa strumienie uwagowej aktywności beta w pętłach korowo-wzgórzowych

Two streams of attentional beta activity in cortico-thalamic loops

Jan Kamiński

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, Zakład Neurofizjologii, Warszawa

Streszczenie

W zadaniu różnicowania instrumentalnego z odroczeniem, wymagającym przestrzennej dyskryminacji bodźców wzrokowych i słuchowych, rejestrowano lokalne potencjały polowe (LFPs, *local field potentials*) z różnych okolic kory wzrokowej oraz kompleksu jądra tylno-bocznego i poduszki kota (LP-P). Analiza wyników wykazała, że podczas prób wzrokowych wzrastała aktywność w paśmie beta (12-25 Hz) w ogonowej części strefy bocznej jądra tylno-bocznego (LPI-c) i we wzrokowych obszarach kory: polach 17 i 18 oraz środkowej bruzdy suprasylwialnej (MSS). Podczas prób słuchowych i tych prób wzrokowych, które kończyły się nieprawidłową reakcją zwierzęcia, aktywność beta nie zmieniała się, co wskazuje, że jej wzrost w próbach wzrokowych jest związany z mechanizmem uwagi wzrokowej. Analiza korelacji fazowej wykazała dalej, że dwa podpasma beta aktywują dwa oddzielne systemy w pętłach korowo-wzgórzowo-korowych.

Słowa kluczowe: uwaga wzrokowa, elektryczna aktywność mózgu, lokalne potencjały polowe, pętla korowo-wzgórzowa, oscylacje beta, kot

Abstract

During a behavioral task based on delayed spatial discrimination of visual or auditory stimuli, local field potentials (LFPs) were recorded from different visual cortical areas and subdivisions of the cat's lateral posterior-pulvinar complex of the thalamus (LP-P). During visually attentive tasks, we observed an increase of beta activity (12-25 Hz) calculated from signals recorded in the caudal part of the lateral zone of the LP-P (LPI-c), from cortical areas 17 and 18, and from the complex located at the middle suprasylvian sulcus (MSS). Such an increase of beta activity was not observed during an auditory attentive task nor during the visual trials that ended with an erroneous response, thus proving its relationship to mechanisms associated with the visual attention. Phase-correlation analy-

sis revealed that two distinct cortico-thalamo-cortical systems were synchronized by the beta activities of different frequencies.

Key Words: visual attention, brain electric activity, local field potentials, corticothalamic system, beta oscillations, cat

Wstęp

Projekcja z warstwy 6 kory wzrokowej moduluje aktywność ciała kolankowatego bocznego (LGN), które przekazuje informację wzrokową z siatkówki do kory [1]. Jedną z proponowanych funkcji takiej pętli jest wzmocnienie wzrokowego sygnału aferentnego przechodzącego przez LGN przez aktywność korowo-wzgórzową z warstwy 6. Wzmocnienie to jest optymalne w paśmie częstotliwości beta (12-25 Hz) [2]. Aktywność w tym paśmie koreluje ze stanem uwagi w układzie wzrokowym i dlatego może stanowić neuronalne podłoże uwagi [3, 4]. W skład innej, mniej zbadanej pętli w układzie wzrokowym wchodzi neuronów korowo-wzgórzowe warstwy 5 kory wzrokowej i kompleks drugorzędowych jąder wzgórza: jądra tylnobocznego i poduszki (LP-P), które przekazują informację z warstwy 5 kory pierwszorzędowej do asocjacyjnych pól wzrokowych. Eksperymenty na małpach pokazały, że LP-P jest związane z uwagą wzrokową, gdyż uszkodzenia tego obszaru zaburzają mechanizm uwagi w zadaniu rozróżniania wzorców wzrokowych [5]. Również lezje LP-P u ludzi powodują zaburzenia uwagi wywołanej bodźcem [6].

Materiały i metody

Badanie zostało przeprowadzone na dziesięciu dorosłych kotach, samcach o masie 3-3,5 kg. Zwierzęta trenowane były w zadaniu przestrzennego różnicowania instrumentalnego z odroczeniem, w którym miały znaleźć miejsce nagrody, kierując się prostymi bodźcami warunkowymi o modalności wzrokowej lub słuchowej. Próby wzrokowe i słuchowe zaczynały się bodźcem przygotowan-

czym, który informował kota o modalności bodźca warunkowego w danej próbie. Próba wzrokowa zaczynała się krótkim błyskiem światła. Po 8 do 14 sekundach od błysku przygotowawczego wyświetlany był bodziec docelowy w postaci plamki świetlnej o czasie trwania 1 s. Plamka wyświetlana była na jednych z dwóch przednich drzwiczek skrzynki doświadczalnej, w której znajdował się kot i wskazywała te, za którymi umieszczona była nagroda w postaci kawałka mięsa. W próbie słuchowej bodźcem przygotowawczym i docelowym był biały szum. Bodziec docelowy odtwarzany był z lewej lub prawej strony klatki doświadczalnej wskazując odpowiednie drzwiczki, za którymi kryła się nagroda. Elektrody rejestrujące implantowane były jednocześnie w kilka struktur wzrokowych: część przednią (LPI-r) i tylną (LPI-c) strefy bocznej jądra tylnobocznego (*lateral zone of the lateral posterior-pulvinar complex; LPI*), w poduszkę właściwą (*pulvinar, Pul*), w pierwszorzędową korę wzrokową (pola 17 i 18) i korę środkowej bruzdy suprasylwialnej (ang. *middle suprasylvian sulcus, MSS*) od strony przyśrodkowej i bocznej.

W analizie badano przebieg sygnału od czasu ekspozycji bodźca przygotowawczego do bodźca docelowego. Dokładniejszy opis metody można znaleźć w publikacji [7].

Wyniki

Analiza widma fourierowskiego (FFT) lokalnych potencjałów polowych (LFP) rejestrowanych z kory wzrokowej (pola 17, 18 i MSS) wykazała istotne zwiększenie amplitudy pasma beta w czasie prób wzrokowych. Wzrost aktywności kory wzrokowej w zakresie częstotliwości beta obserwowany był jedynie w tych próbach wzrokowych, po których zwierzę wykonało prawidłową reakcję (wybrało drzwiczki wskazane bodźcem warunkowym). Należy podkreślić, że wzrost ten nie mógł być wywołany specyficznym bodźcem wzrokowym, ponieważ w analizowanym okresie oczekiwania na docelowy bodziec warunkowy kotom nie prezentowano żadnego (ani wzrokowego ani słuchowego) bodźca. Analiza sygnału pochodzącego z kompleksu jądra tylnobocznego i poduszki (LP-P) wykazała, że tylko w części ogonowej strefy bocznej jądra tylnobocznego (LPI-c) zarejestrowano wzrost aktywności beta w próbach wzrokowych. Nie znaleziono istotnych różnic między próbami wzrokowymi i słuchowymi w żadnej rejestracji z części przedniej strefy bocznej jądra tylnobocznego (LPI-r) ani z jądra poduszki.

Dalsza analiza widma sygnału z LPI-c wykazała, że miejsca rejestracji oddalone nie więcej niż

0,8 mm od granicy z poduszką w grzbietowo-bocznym (ang. *dorsolateral, dl*) rejonie LPI-c wykazywały wzrost aktywności w wysokim paśmie beta (16-25 Hz) podczas zadania wzrokowego, natomiast miejsca rejestracji oddalone więcej niż 0,8 mm od granicy z poduszką, w brzuszno-przyśrodkowym (ang. *ventromedial, vm*) LPI-c wykazywały aktywność w niskim paśmie beta (12-19 Hz). Podobnie udało się rozróżnić dwa podpasma beta w rejestracjach korowych. Obszar przyśrodkowy kory MSS był aktywowany w niskim paśmie beta (13-18 Hz), natomiast obszar boczny w wysokim paśmie beta (19-25 Hz). Pole 18 kory wzrokowej wykazywało wzrost aktywności w wysokim paśmie beta (18-24 Hz). Natomiast pole 17 kory wzrokowej wykazywało aktywację w całym zakresie pasma beta.

Aby sprawdzić funkcjonalne połączenia między danymi strukturami w układzie wzrokowym, użyto nowej metody nazwanej względny czasem wysokiej synchronizacji (ang. *relative time of high synchronicity, RTS*). Pierwszy etap uzyskania RTS zaczyna się od obliczenia biegnącej korelacji fazowej. Wartość takiej korelacji fluktuuje w czasie i może osiągać wysokie wartości nawet dla sygnałów, dla których średnie korelacje fazowe mają niską wartość. Przyjmuje się, że korelacja między sygnałami (fazowa lub zwykła) powyżej wartości 0,75 może być wyznacznikiem funkcjonalnego połączenia między danymi obszarami [14]. Dlatego, oddzielnie dla prób wzrokowych i słuchowych, mierzono czas, w którym korelacja fazowa sygnałów przekroczyła 0,75. Następnie obliczano sumę wszystkich odcinków czasu, w którym korelacja przekraczała wartość 0,75 dla każdej chwili w próbie – w ten sposób otrzymano miarę skumulowanego czasu wysokiej synchronizacji (ang. *cumulative time of high synchronicity, CTS*). Całkowity czas synchronizacji, czyli zsumowany czas korelacji powyżej 0,75 w całej próbie, był średnio 10-20% dłuższy w próbach wzrokowych niż w słuchowych. Względny czas synchronizacji obliczano według wzoru CTS/czas. Po takim przekształceniu otrzymywano procent czasu, w którym wartość korelacji fazowej przekroczyła 0,75. Rozbieżność pomiędzy względny czasem synchronizacji dla prób wzrokowych i słuchowych występowała w pierwszych dwóch sekundach i nie zmieniała się w pozostałym okresie próby. Wielkość tej rozbieżności przyjęto jako miarę różnicy między czasami względnej synchronizacji (*Difference between relative Times of high Synchronicity, DTS*) w próbach wzrokowych i słuchowych. Następnie wartości DTS porównywano dla sygnałów z par elektrod umieszczonych we wszystkich badanych strukturach układu wzrokowego.

Rycina 1 przedstawia średnie wartości DTS obliczone dla par sygnałów rejestrowanych z elektrod w pierwszorzędowej korze wzrokowej oraz dwóch różnych rejonach w LPI-c. DTS dla sygnałów filtrowanych w całym paśmie beta (12-25 Hz) dla pól 17 i 18 kory wzrokowej i brzuszno-przyśrodkowego (vm) rejonu LPI-c są istotnie większe od zera. Oznacza to, że podczas dwóch pierwszych sekund po rozpoczęciu próby czas korelacji fazowej o wartości większej niż 0,75 był istotnie dłuższy dla prób wzrokowych niż słuchowych. Taki wynik wskazuje na to, że obszar brzuszno-przyśrodkowy LPI-c lepiej synchronizuje swoją aktywność z korą wzrokową w próbach wymagających uwagi wzrokowej w porównaniu do prób, których rozwiązanie wymagało uwagi słuchowej. Przeprowadzono również bardziej dokładną analizę na parach sygnałów, które wykazywały aktywność beta w tym samym podpaśmie (nisko- lub wysokoczęstotliwościowym). W tych przypadkach, przed przeprowadzeniem korelacji filtrowano sygnał odpowiednio w niskim i wysokim paśmie beta. Wartości DTS uzyskane z takiej analizy pokazują, że pole 17 kory wzrokowej synchronizuje swą aktywność tylko z rejonem brzuszno-przyśrodkowym LPI-c (Rycina 1A), natomiast aktywność kory w polu 18 synchronizuje się z aktywnością w rejonie grzbietowo-bocznym LPI-c (Rycina 1D). Podobne obliczenia przeprowadzono dla połączeń funkcjonalnych między przyśrodkowym MSS a LPI-c i polami 17 i 18 pierwszorzędowej kory wzrokowej (Rycina 2). Okazało się, że przyśrodkowa część bruzdy MSS synchronizuje swą aktywność w niskim paśmie beta zarówno z brzuszno-przyśrodkowym LPI-c (Rycina 2A), jak i z polem 17 kory wzrokowej (Rycina 2C). Nie znaleziono istotnych zależności dla połączeń między boczną częścią bruzdy MSS a LPI-c.

Dyskusja

Zgodnie z poprzednimi badaniami nad uwagą wzrokową [3, 8] prezentowane wyniki potwierdzają, że mechanizm neuronalny uwagi wzrokowej opiera się na zwiększonej aktywności w paśmie beta pojawiającej się w pętłach korowo-wzgorzowo-korowych układu wzrokowego, na kolejnych etapach przetwarzania informacji wzrokowej. Rezultaty te wpisują się w koncepcję pasma beta jako nośnika uwagi wzrokowej [4]. Również w badaniach na ludziach wykazano, że pasmo beta odgrywa istotną rolę w zjawisku uwagi wzrokowej. Badania nad „mrugnięciem uwagi” (ang. *attentional blink*), prowadzone przy użyciu magnetoencefalografii (MEG) dowiodły,

że podczas zadania angażującego procesy uwagi, potyliczne i ciemieniowe płaty ludzkiego mózgu synchronizują swą pracę w paśmie beta [9]. Także w badaniu dotyczącym pamięci krótkotrwałej, przy pomocy rejestracji ECoG (prowadzonej podczas operacji na przytomnych pacjentach z napadami epileptycznymi) wykazano aktywację kory w paśmie beta [10]. Wydaje się, że tak mała liczba doniesień na temat udziału aktywności beta w zadaniach wymagających uwagi u ludzi wiąże się z faktem, że naskalpowe elektrody EEG uśredniają sygnał z dużego obszaru kory i jego amplituda znacznie zależy od sumarycznej aktywności pola, z którego następuje rejestracja. Dlatego synchronizacja specyficznej mozaiki złożonej ze stosunkowo małych układów pobudzonych kolumn kory może nie być widoczna w sygnale EEG rejestrowanym u ludzi [4].

Wyniki badania wykazują również, że kompleks LP-P bierze udział w procesie uwagi wzrokowej. Kompleks jądra tylnego-bocznego i poduszki (LP-P) dzięki swojemu specyficznemu położeniu w układzie wzrokowym [11] jest od pewnego czasu uważany za ważny ośrodek uwagi wzrokowej [12]. Jego proponowaną funkcją jest udział w selekcji i przekazywaniu informacji między korą pierwszorzędową a wyższymi piętrami układu wzrokowego.

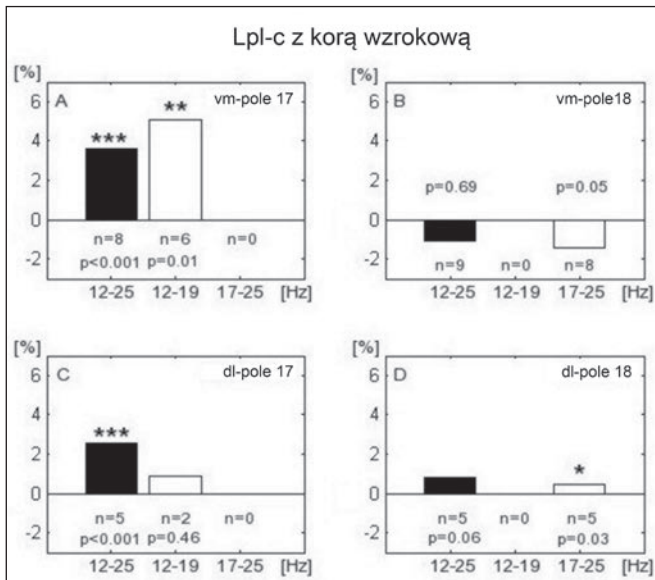
Kluczem do zidentyfikowania obwodów funkcjonalnych aktywowanych w układzie wzrokowym przez mechanizm uwagi był pomiar korelacyjny funkcji mierzącej różnicę we względnym czasie wysokiej synchronizacji (DTS). Podsumowanie wyników tej analizy przedstawia Rycina 3. Pole 17 kory, brzuszno-przyśrodkowe LPI-c i przyśrodkowa część środkowej bruzdy suprasylwialnej synchronizują swą aktywność w niskim paśmie beta (12-19 Hz). Natomiast pole 18 i grzbietowo-boczne LPI-c synchronizują swą aktywność w wysokim paśmie beta (17-25 Hz). Nie udało się pokazać funkcjonalnego połączenia bocznej części MSS z pozostałymi elementami układu pracującego w wysokim paśmie beta. Jedną z przyczyn mogła być mała liczba punktów ($n=3$) rejestracyjnych w bocznym MSS, niewystarczająca do przeprowadzenia odpowiedniej analizy statystycznej.

Badania nad percepcją wzrokową u ludzi wskazują, że jest ona organizowana w dwóch procesach zachodzących w korze mózgu wzbudzonej mechanizmem uwagi. Informacja allocentryczna o obiekcie wzrokowym przetwarzana jest na drodze od płata potylicznego do skroniowego (tzw. strumień brzuszny), a egocentryczna, określająca możliwość manipulacji tym obiektem – na drodze

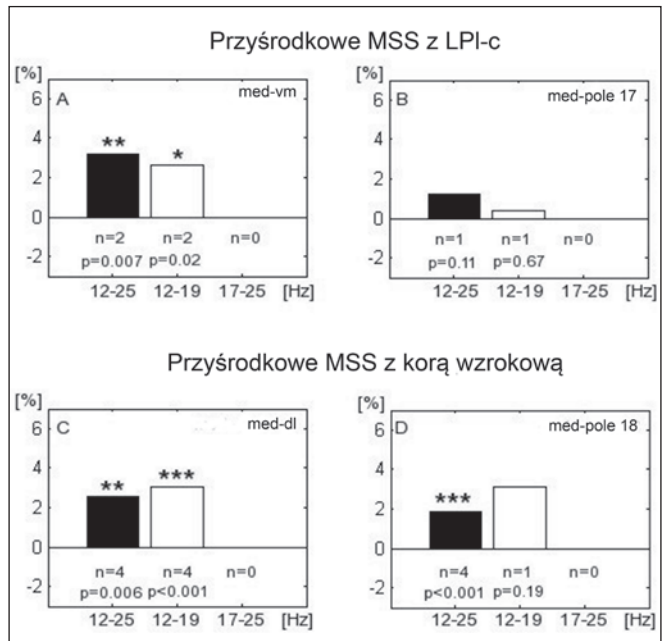
potyliczno-ciemieniowej (tzw. strumień grzbietowy). Podobnie zorganizowane jest prawdopodobnie przetwarzanie informacji wzrokowej w mózgu kota [1]. Nasze wyniki uzupełniają ten schemat o dwa istotne odkrycia. Po pierwsze wykazaliśmy, że mechanizm uwagi wzrokowej polega na wzbudzeniu obu szlaków korowych sygnałem elektrycznym o różnej częstotliwości: niskim paśmie beta w strumieniu brzuszno-przyśrodkowym i wysokim paśmie beta w strumieniu grzbietowym. Po drugie udowodniliśmy, że sygnały te nie rozchodzą się jedynie bezpośrednio, przez połączenia korowo-korowe, ale również na drodze pośredniej przez różne części jądra tylnego wzgórza [7, 13].

Podziękowania

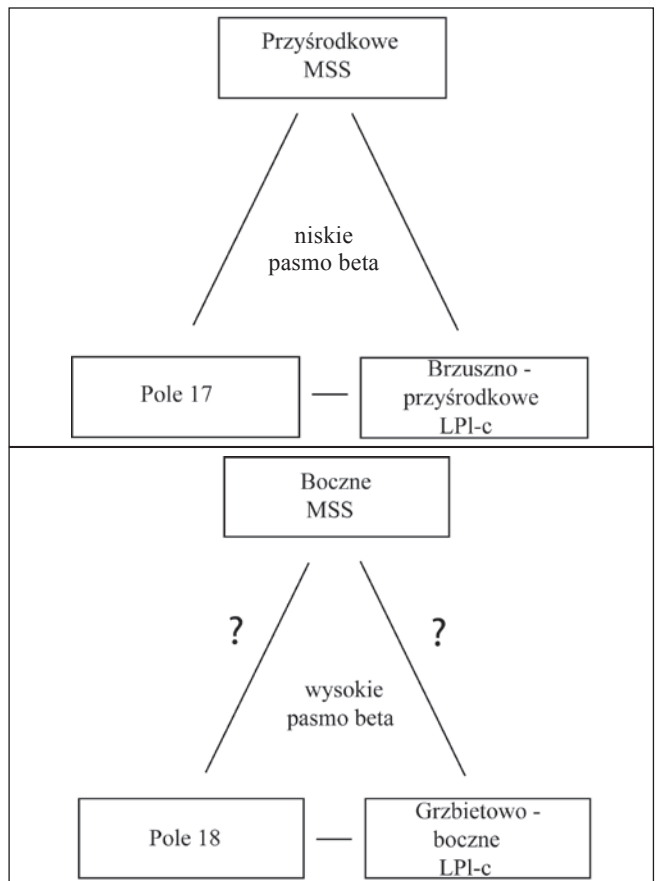
Badanie zostało sfinansowane z grantu N40114631/3239 i COST/127/2007.



Rycina 1. Średnie wartości DTS obliczone dla par sygnałów rejestrowanych z elektrod w pierwszorzędowej korze wzrokowej (pole 17 i 18) oraz dwóch rejonach w LPI-c (vm: rejon brzuszno-przyśrodkowy, dl: grzbietowo-boczny). Słupki reprezentują względną czas wysokiej synchronizacji (>0,75) podczas prób wzrokowych minus względną czas wysokiej synchronizacji podczas prób słuchowych podzielony przez dwie sekundy (ponieważ wartość DTS mierzona była 2 sekundy po ekspozycji bodźca przygotowawczego). Słupki czarne przedstawiają wartości liczone dla wszystkich par elektrod w całym zakresie pasma beta; białe przedstawiają dane dla tych par elektrod, które charakteryzowały się aktywnością w tym samym paśmie beta (niskim lub wysokim). Do obliczenia statystycznej istotności różnic użyto dwuczynnikowej analizy wariancji (modalność*elektroda).



Rycina 2. Porównanie średnich wartości DTS pomiędzy rejestracjami z przyśrodkowej (med) części kory MSS a grzbietowo-bocznym (dl) i brzuszno-przyśrodkowym (vm) rejonami LPI-c (A, B) oraz przyśrodkowym MSS a polami 17 i 18 kory wzrokowej (C, D). Do obliczenia wyników użyto dwuczynnikowej analizy wariancji (modalność*elektroda).



Rycina 3. Dwa funkcjonalne strumienie w układzie korowo-wzgórzowym wzbudzone przez

mechanizm uwagi wzrokowej, oparte na aktywności w paśmie częstotliwości beta: beta 1 (12-19 Hz) i beta 2 (17-25 Hz). LPl-c – tylna część strefy bocznej jądra tylna-bocznego i poduszki; MSS – środkowa bruzda suprasylwialna.

Piśmiennictwo

1. Guillery, R. i Sherman, S. (2002). Thalamic relay functions and their role in corticocortical communication: generalizations from the visual system. *Neuron*, 33, 163-175.
2. Lindstorm, S. Wróbel, A. (1990). Frequency dependent corticofugal excitation of principal cells in the cat's dorsal lateral geniculate nucleus. *Exp Brain Res*, 79, 313-318.
3. Bekisz, M. i Wróbel, A. (1993). 20 Hz rhythm of activity in visual system of perceiving cat. *Acta Neurobiologiae Experemintalis*, 53, 175-182.
4. Wróbel, A. (2000). Beta activity: a carrier for visual attention. *Acta Neurobiologiae Experemintalis*, 60, 247-260.
5. Chalupa, L. i Coyle, R. i Lindsley, D. (1976). Effect of pulvinar lesion on visual pattern discrimination in monkeys. *Journal of Neurophysiology* 39, 354-369.
6. Michael, G. A. i Buron, V. (2005). The Human Pulvinar and Stimulus-Driven Attentional. *Behavioral neuroscience* 119 (5), 1353-1367.
7. Wróbel, A., Ghazaryan, A., Bekisz, M., Bogdan, W. i Kamiński, J. (2007). Two Streams of Attention-Dependent beta activity in the Striate Recipient Zone of Cat's Lateral Posterior-Pulvinar Complex. *Journal of Neuroscience* 27 (9), 2230-2240.
8. Wróbel, A., Bekisz, M., Kublik, E., Waleszczyk, W. (1994). 20 Hz bursting beta activity in the cortico-thalamic system of visually attending cats. *Acta Neurobiologiae Experemintalis*, 54, 95-107.
9. Gross, J., Schmitz, F., Schnitzler, I., Kessler, K., Shapiro, K., Hommel, B. i Schnitzler, A. (2004).
10. Tallon-Baudry, C., Bertrand, O. i Fischer, C. (2001). Oscillatory synchrony between human extrastriate areas during visual short-term memory maintenance. *Journal of Neuroscience* 21, 1-5.
11. Shipp, S. (2003). The functional logic of cortico-pulvinar connections. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 358, 1605-1624.
12. Olshausen., B., Anderson, C. i Van Essen, D. C. (1993). A neurobiological model of visual attention and invariant pattern recognition based on dynamic routing of information. *Journal of Neuroscience* 13, 4700-4719.
13. Kamiński, J. (2007). *Uwaga wzrokowa a aktywność w pętłach korowo-wzgorzowych: Rola dwóch strumieni pasma beta*. Praca magisterska, Wydział Psychologii, Szkoła Wyższa Psychologii Społecznej, Warszawa.
14. Armitage, P. i Berry, G. (1994). *Statistical methods in medical research*. Oxford: Blackwell Scientific.

Adres korespondencyjny:

Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego, PAN,
ul. Ludwika Pasteura 3, 02-093 Warszawa,
tel.: (022) 589 23 64,
e-mail: j.kaminski@nencki.gov.pl

