

УДК 612.822

ЭНДОГЕННАЯ ПЕЙСМЕКЕРНАЯ АКТИВНОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ НЕЙРОНОВ МОЛЛЮСКА

Костюченко О.В., Кореньюк И.И.¹

*В ходе исследования изолированных нейронов ППа2 и ППа7 моллюска *Helix lucorum* определено эндогенное происхождение их импульсной активности. Обсуждаются вопросы участия входящего кальциевого тока и роли аксодендритного дерева в генерации пейсмерной активности.*

Ключевые слова: пейсмерная активность, осциллогенез, аксодендритное дерево.

ВВЕДЕНИЕ

Автономная активность нейронов имеет большое значение для процессов нервной интеграции [1]. Такие обычные для живых организмов ритмы как биение сердца, дыхание, выделение гормонов, циклы сна и бодрствования зависят от функционирования нервных клеток, связанных с генерацией ритмоводящей (пейсмерной) активности [2,3]. Однако, механизмы подобных автономных ритмов нейронов все еще остаются недостаточно изученными. В настоящее время прочно установлена ведущая роль трансмембранных градиентов ионов Na^+ и K^+ и создаваемых ими входящих и выходящих токов через ионные каналы в поддержании электрической возбудимости клеточной мембраны. Как показывают исследования [3–6], ионы кальция, кроме участия в регуляции различных биохимических процессов, протекающих в цитоплазме, играют важную роль в возникновении потенциалов действия (ПД). При этом особое внимание уделяется низкопороговым кальциевым каналам, которые обеспечивают постоянную тенденцию клеточной мембраны к деполяризации в допороговой для генерации ПД области [7,8].

Идентифицированные нервные клетки моллюсков служат удобной моделью для изучения механизмов различных форм осциллогенеза. Это связано с тем, что активность одного и того же нейрона можно исследовать как в интактном состоянии, так и в изолированном. Целью данной работы было выяснение природы импульсной активности идентифицированных нейронов моллюска и участия входящего кальциевого тока в генерации ритмоводящей активности.

¹ Кафедра физиологии человека и животных, E-mail: oks@torba.com, korenyuk@ccssu.crimea.ua

МЕТОДИКА

Эксперименты были проведены на нейронах правого париеального ганглия моллюска *Helix lucorum*, позиции которых указаны на рис. 1.

Изолированное окологлоточное кольцо фиксировали за нервы посредством вольфрамовых игл на дне экспериментальной проточной камеры (объем 0,5 мл.). После механического удаления наружной оболочки, подглоточный ганглий обрабатывали ферментом Pronasa E («Sigma») в течение 45 мин с последующим промыванием раствором Рингера следующего ионного состава (в мМ): NaCl–100, KCl–4, CaCl₂–10, MgCl₂–4, трис-HCl (pH 7,5)–10. Температура раствора поддерживалась в пределах 18–21⁰С.

Для внутриклеточного отведения биопотенциалов использовали стеклянные микроэлектроды с сопротивлением 10–30 МОм, заполненные 2,5 М KCl.

Механическая изоляция нейронов из ганглия проводилась по следующей схеме. После идентификации нейрона ППа2 или ППа7 по месту расположения, размеру и характеру импульсной активности, в течение 10–15 мин регистрировали фоновую электрическую активность. Затем микроэлектрод выводили из клетки и делали перерезку коннективы между ППаГ и ВГ (рис. 1, линия *a*). Эта процедура в последующем облегчала извлечение нейрона с частью аксодендритного дерева из ганглия. Далее в нервную клетку снова вводили микроэлектрод и, убедившись в том, что она находится в нормальном физиологическом состоянии, выделяли ее из ганглия с помощью микроэлектрода и соответствующего микроманипулятора.

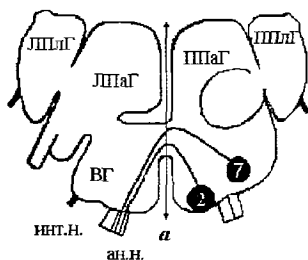


Рис. 1. Схематическое изображение центральной нервной системы моллюска *Helix*, показывающее типичные позиции нейронов ППа2 и ППа7.

a – линия перерезки коннективы между правым париеальным и висцеральным ганглием. ППлГ и ЛПлГ – правый и левый плевроальные ганглии, ППаГ и ЛПаГ – правый и левый париеальные ганглии, ВГ – висцеральный ганглий, инт.н. – интестинальный нерв, ан.н. – анальный нерв. Направление аксонов данных нейронов приведено в соответствии с опубликованными данными [9].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для нейрона ППа2 типичной является мономодальная ритмическая активность (рис. 2), хотя этот нейрон иногда спонтанно или при внеклеточной аппликации во-

дорастворимой фракции из мозга улиток, содержащей модулирующий фактор, может генерировать, так называемую, медленную пачечную активность [10]. Для нейрона ППа7 характерна высокочастотная электрическая активность с наличием обильного синаптического притока [9]. Однако, в некоторых препаратах этот нейрон демонстрирует ритмическую мономодальную активность, частота которой плавно зависит от поляризующего тока и эта активность сохраняется в присутствии 1мМ CdCl_2 .

Для решения вопроса о характере активности клеток ППа2 и ППа7 мы использовали наряду с изоляцией нейронов наружное приложение 1мМ Cd^{2+} , который высокоэффективно и обратимо блокирует кальциевый ток. При этом мы анализировали возможное участие кальциевого тока в генерации самой пейсмекерной активности.

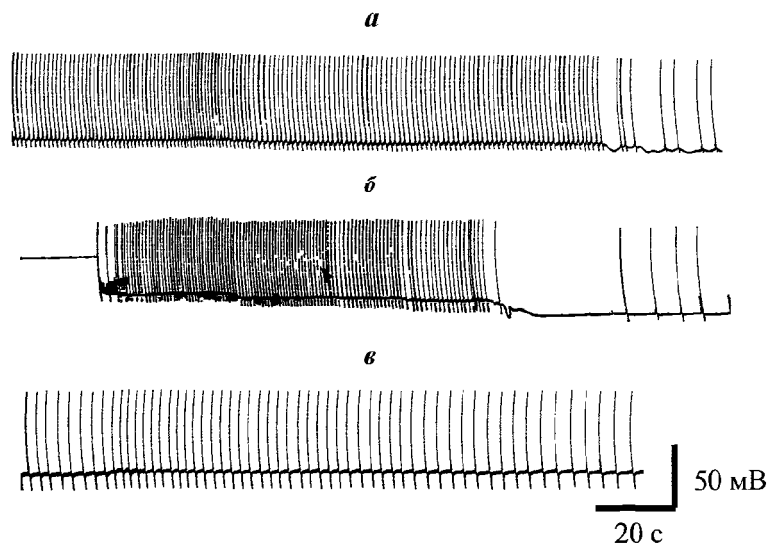


Рис.2. Генерация электрической активности нейрона ППа2.

а – в интактном ганглии, *б* – во время изоляции, *в* – в изолированном состоянии (через 30 мин после изоляции).

В ходе экспериментов было изолировано и исследовано 12 нейронов ППа2 и 15 – ППа7.

Как видно из рис.2, полностью изолированный из ганглия нейрон ППа2, продолжал генерировать спонтанную ритмическую активность. Амплитуда ПД и ритм их следования были близки к таковым значениям в интактном ганглии. Изоляция нейрона ППа7 также не прекращала генерацию в нем ритмической пейсмекерной активности (не показано). Крайне нерегулярная активность клетки в ганглии из-за синаптического притока после изоляции всегда становилась мономодальной.

Таким образом, определено, что данные нейроны способны генерировать электрические разряды в отсутствие каких-либо внешних сигналов (напр., влияния ме-

диаторов, модуляторов, гормонов) и, следовательно, природа их импульсной активности является эндогенной.

Эффект аппликации блокатора кальциевых каналов – CdCl_2 – был изучен по программе: фон–аппликация–отмывание. Изменение амплитуды и частоты ПД нейронов ППа2 и ППа7 при действии блокатора были однонаправленными.

Как видно из рис. 3 и 4, перфузия экспериментальной камеры 1мМ CdCl_2 спустя 5–15 с вызвала увеличение частоты и незначительное снижение амплитуды ПД. На рис. 3 и 4 (б, в) представлены графики спектральной плотности мощности регистрируемого сигнала до и после аппликации CdCl_2 . Видно, что внеклеточное приложение ионов кадмия приводило к увеличению частоты генерации ПД в 3 и 7,5 раз для клеток ППа7 и ППа2 соответственно. После отмывания хлористого кадмия частота ПД уменьшалась. Таким образом, наблюдаемое увеличение частоты ПД на фоне аппликации блокатора кальциевых каналов можно оценивать как свидетельство устранения входящего кальциевого тока, так как именно он приводит к уширению спайка и увеличению рефрактерного периода за счет гиперполяризации клетки, вызванной активацией Ca -стимулируемой калиевой проводимости [11]. Блокирование кальциевой проводимости, как и следовало ожидать, уменьшает межимпульсный интервал.

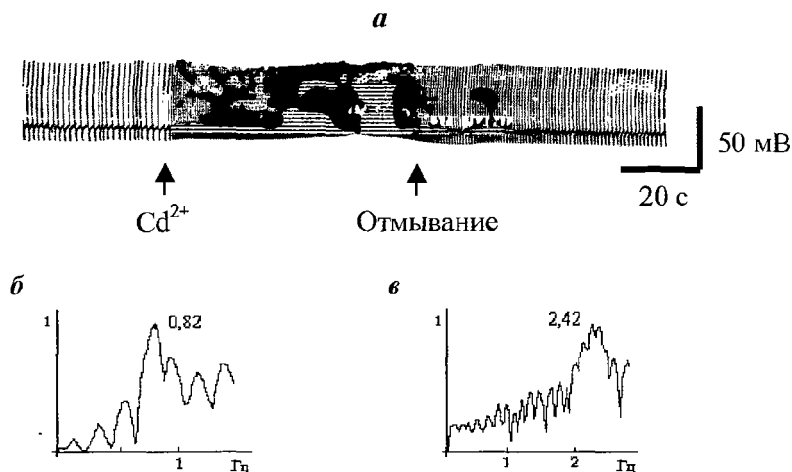


Рис.3. Влияние CdCl_2 (1мМ) на электрическую активность изолированного нейрона ППа7.

a – генерация ПД до, во время и после аппликации блокатора, *б* и *в* – спектральная плотность мощности регистрируемых ПД в относительных единицах до и после аппликации Cd^{2+} соответственно (ось ординат). Ось абсцисс – частота, Гц.

Из полученных данных следует, что поскольку ионы кадмия не устраняли ритмическую активность данных клеток, то входящий кальциевый ток не принима-

ет непосредственного участия в генерации ритмических разрядов эндогенных пейсмекерных нейронов ППа2 и ППа7.

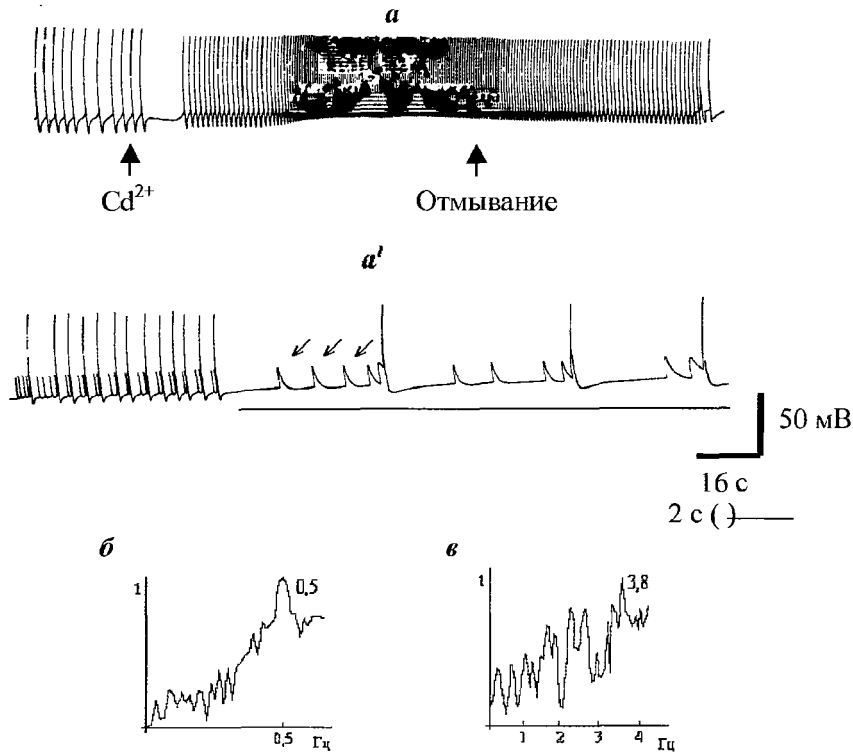


Рис.4. Влияние CdCl_2 (1мМ) на электрическую активность изолированного нейрона ППа2.

а, б, в – обозначения такие же, как и на рис.3, *а* и *а'* – непрерывная запись. Стрелками на *а'* показаны дендритные ПД.

Следует отметить, что в ходе исследований у двух изолированных нейронов ППа2 и двух – ППа7 наряду с соматическими ПД наблюдались спайки, по амплитуде не превышающие 18 мВ (рис. 4, *а'*). Они были зарегистрированы как в стандартном растворе Рингера, так и в растворе Рингера, содержащем 1мМ CdCl_2 . Исходя из этих данных можно предположить, что генерация пейсмекерной активности возникает в локусе, удаленном от сомы, наиболее вероятно, в дендритном дереве. Возникающие в дендритах импульсы электротонически распространяются к наиболее возбудимой области нейрона (аксонному холмику), где и имеет место генерация соматических ПД.

В пользу такого предположения говорит и тот факт, что спустя 40–60 мин от начала изоляции нейрона из ганглия, его спонтанная импульсная активность прекращалась, хотя искусственная деполяризация клетки приводила к генерации соматических ПД. Наблюдение за клеткой в микроскоп показало, что прекращение

ритмоводящей активности, в данном случае, коррелирует с втягиванием аксодендритного участка в сому. Таким образом, изменения структуры дендритного дерева и, соответственно, его электрических характеристик и являются основной и специфической причиной исчезновения пейсмекерной активности в исследованных изолированных нейронах.

Из рис.4, a' видно, что амплитуда дендритных потенциалов в 3,5 раза меньше амплитуды соматических ПД. Исходя из этого, мы вычислили расстояние вдоль волокна от места генерации импульсов до сомы. Расчет проводили по формуле [6]:

$$x = \frac{\rho S}{\pi D} \ln \left(\frac{V_0}{V} \right),$$

где ρ – отношение входной проводимости аксона к проводимости мембраны сомы, $S = \pi d^2$ – площадь поверхности сомы, d – диаметр сомы, D – диаметр аксона, V_0/V – отношение амплитуды соматических ПД к амплитуде дендритных ПД. При расчете x мы использовали следующие значения параметров нейрона: $d \approx 200$ мкм, $\rho = 0,6$, $D \approx 25$ мкм, и получили значение $x \approx 1,2$ мм. Полученный результат согласуется с данными Тауца [12].

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на многочисленные попытки понять механизм генерации пейсмекерной активности в нейронах, этот феномен все еще остается до конца неизученным. Основные трудности связаны с тем, что в клетке присутствует множество ионных и цитоплазматических процессов, способных обеспечить генерацию ПД и трудно выделить, какие из них необходимы для сдвига мембранного потенциала (МП) в сторону деполяризации, а какие только сопутствуют этому процессу.

В данной работе будет уместным определить выражения "пейсмекерная" активность и "эндогенная". Под пейсмекерной активностью мы понимаем электрическую активность клетки, частота которой плавно зависит от поляризующего тока. В этом случае экзогенное воздействие какого-либо деполяризующего биологически активного соединения приводит, в наших терминах, к пейсмекерной активности. Под эндогенной активностью мы понимаем такую активность, которую генерирует нейрон в отсутствие каких-либо внешних сигналов.

Также представляется необходимым ввести определения "дендрита" и "аксона", так как для униполярных нейронов моллюсков морфологически трудно разделить эти две структуры общего аксодендритного дерева. Дендритами мы называем ту часть аксодендритного дерева, которая воспринимает приходящие синаптические сигналы и/или генерирует ритмоводящую активность, а аксоном – ту часть, которая служит для распространения ПД к соответствующим целям (напр., в висцеральный нерв).

Из результатов, полученных в ходе экспериментов, следует, что нейроны ППа2 и ППа7 имеют эндогенный характер пейсмекерной активности. Полная изоляция нейронов из ганглия и длительная внеклеточная аппликация ионов кадмия, блока-

тора Са-зависимого освобождения биологически активных соединений из пресинаптических окончаний, как к интактным клеткам, так и к изолированным, не приводила к исчезновению в них спонтанной активности. Хотя через некоторое время (40–60 мин и более) после изоляции активность клетки и исчезала, но это явление коррелировало с вытягиванием аксодендритного дерева в сому.

Многие модели генерации пейсмекерной активности предполагают ведущее участие ионов кальция в этом процессе. Как известно из литературы [13], входящий кальциевый ток через низкопороговые кальциевые Т-каналы приводит к постоянной деполяризации мембраны, тем самым обеспечивая осцилляции МП.

В наших экспериментах мы исключаем непосредственное участие ионов кальция в генерации пейсмекерной активности, так как наружное приложение CdCl_2 (1мМ) не приводило к ингибированию спонтанной электрической активности данных нейронов.

Не вызывает сомнений также, что локус генерации пейсмекерной активности нервной клетки расположен, вероятнее всего, в дендритном дереве. Так, в течение последних десяти лет были получены данные, подтверждающие точку зрения, что нейрональная мембрана некоторых дендритных шипиков обладает возбудимыми каналами, которые могут генерировать локальные потенциалы и ПД, активно распространяющиеся на сому [14,15]. Локализация пейсмекерного локуса на дистальных дендритах также была показана для NMDA-индуцированной пачечной активности в допаминэргических клетках черной субстанции [16] и, следует отметить, что последние математические модели пейсмекерной активности клетки уже отражают эти находки [17].

Список литературы

1. Соколов Е.Н. О роли пейсмекерного потенциала нейрона в механизме поведения // Журнал высшей нервной деятельности, Т.23, Вып.6, 1973, С.1241–1243.
2. Кэндел Э. Клеточные основы поведения. – М.: Мир, 1980. – 598 с.
3. Clapham D.E. Not so funny anymore: pacing channels are cloned // *Neuron*, V.21, №1, 1998, P.5–7.
4. Berridge M.J. Neuronal calcium signalling // *Neuron*, V.21, №1, 1998, P.13–26.
5. Костюк П.Г. Молекулярные механизмы кальциевой проводимости и ее роль в поддержании клеточной возбудимости // Всесоюзная конференция по нейронаукам, посвященная 100-летию со дня рождения академика АН УССР Д.С.Воронцова: Тез. докл./ Киев, 1986. – С.7–9.
6. Магура И.С. Проблемы электрической возбудимости нейрональной мембраны. – Киев: Наук. думка, 1981. – 208 с.
7. Llinas R., Yarom Y. Oscillatory properties of guinea-pig inferior olivary neurones and their pharmacological modulation: an in vitro study // *J.Physiol.* V.376, 1986, P.163–182.
8. Bal T., McCormick D.A. Synchronized oscillations in the inferior olive are controlled by the hyperpolarization-activated cation current I_{h} // *J.Neurophysiol.*, V.77, №6, 1997, P.3145–3156.
9. Koval L.M., Kononenko N.I. Newly identified nerve cells of the snail, *Helix pomatia*, associated with the generation of pacemaker activity // *Neurosci. Behav. Physiol.*, V.24, №1, 1994, P.41–46.
10. Кононенко Н.И. Изменчивость электрической активности нейрона ППа2 виноградной улитки // *Нейрофизиология*, Т.13, №4, 1981, С.406–412.
11. Meech R.W., Standen L.B. Potassium activation in *Helix aspersa* neurons, under voltage clamp: A component mediated by calcium influx // *J. Physiol.*, V.249, 1975, P.211–239.
12. Tauc L. Site of origin and propagation of spike in giant neuron of *Aplysia* // *J. Gen. Physiol.*, V.45, 1962, P.1077–1097.

13. Akasu T., Shoji S., Hasuo H. Inward rectifier and low-threshold calcium currents contribute to the spontaneous firing mechanism in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus // *Pflugers. Arch.*, V.425, 1993, P.109–116.

14. Segev I., Rall W. Excitable dendrites and spines: earlier theoretical insights elucidate recent direct observations // *Trends Neurosci.*, V.21, 1998, P.453–460.

15. Yuste R., Tank D.W. Dendritic integration in mammalian neurons, a century after Cajal // *Neuron*, V.16, 1996, P.701–716.

16. Seutin V., Johnson S.W., North R.A. Effect of dopamine and baclofen on N-methyl-D-aspartate induced burst firing in rat ventral tegmental neurons // *Neuroscience*, V.58, 1994, P.201–206.

17. Li Y.X., Bertram R., Rinzel J. Modeling N-methyl-D-aspartate-induced bursting in dopamine neurons // *Neuroscience*, V.71, №2, 1996, P.397–410.

Анотація

Костюченко О.В., Коренюк І.І. Ендогенна пейсмеркерна активність ізольованих нейронів слимака // Ученые записки ТНУ, 2000, 99, No.1, 3 — 4.

В ході дослідження ізольованих нейронів ППа2 та ППа7 слимака Helix lucorum виявлено ендогенне походження їх імпульсної активності. Обговорюються питання про участь вхідного кальцієвого струму та ролі аксодендритного дерева в генерації пейсмеркерної активності.

Ключові слова: пейсмеркерна активність, осцилогенез, аксодендритне дерево.

Summary

Kostyuchenko O.V., Korenyuk I.I. Endogenous pacemaker activity of isolated mollusc neurons // Uchenye zapiski TNU, 2000, 99, No.1, 3 — 4.

During the investigation of the isolated RPa2 and RPa7 neurons of snail Helix lucorum it was discovered that their impulse activity had endogenous nature. The questions of the participation of inward calcium current and the role of axodendritic tree in generation of pacemaker activity are being discussed.

Keywords: pacemaker activity, oscillogenesis, axodendritic tree.