

Udział synaps elektrycznych w generowaniu hipokampalnego rytmu theta *in vivo*

Henryk Gołębiwski, Barbara Eckersdorf, Jan Konopacki.

Katedra Neurobiologii Uniwersytetu Łódzkiego

Streszczenie

W obecnych doświadczeniach badano rolę synaps elektrycznych formacji hipokampa w generowaniu lokalnie rejestrowanego rytmu theta u swobodnie poruszających się kotów. Dohipokampalne mikroiniekcje karbenoksolonu oraz chininy (30 µg/1 µl) odwracalnie obniżały amplitudę i moc hipokampalnego rytmu theta występującego spontanicznie, jak i wywołanego drażnieniem czuciowym czy elektrycznym formacji siatkowatej śródmózgowia. Hamujący wpływ ujawnił się w 30 minut po mikroiniekcji i obserwowany był przez około 9 godzin od podania każdego z zastosowanych środków farmakologicznych. Następnie oba parametry aktywności rytmicznej stopniowo wracały do wartości kontrolnych. Częstotliwość rytmu nie ulegała zmianom przez cały czas doświadczeń.

Wyniki uzyskane w obecnych badaniach dostarczają pierwszych bezpośrednich dowodów wskazujących na istotny udział synaps elektrycznych formacji hipokampa w mechanizmach synchronizacji leżących u podstaw generowania rytmu theta w warunkach *in vivo*.

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

Wstęp

Oscylacyjne zmiany potencjałów błonowych i towarzyszące im wyładowania iglicowe neuronów rejestrowane zewnątrzkomórkowo jako rytmiczne potencjały polowe stanowią wyznacznik pobudliwości w sieciach neuronalnych OUN [2, 4]. Szczególne zainteresowanie eksperymentatorów budzi aktywność występująca w paśmie częstotliwości charakterystycznej dla rytmu theta.

Ogólnie przyjęto, że aktywność theta związana jest z formacją hipokampa (HPC), ponieważ w tej strukturze jest ona najlepiej wyrażoną aktywnością elektroencefalograficzną [2, 3, 5, 15, 20]. Mechanizm generowania rytmu jest

wielopoziomowy, a w jego powstawanie zaangażowane są liczne struktury pnia mózgu, tylnego podwzgórza i przegrody. Model generowania rytmu theta zakłada, że jądra pnia mózgu: jądra przednie mostu oraz jądra konarowomostowe nakrywki wysyłają ciągły strumień impulsacji do neuronów przyśrodkowej części przegrody poprzez stację pośrednią, jaką jest obszar tylnego podwzgórza [2, 4, 5, 9, 21]. Z obszaru przyśrodkowej przegrody impulsacja dociera do neuronów HPC, wywołując rytmiczne oscylacje potencjałów błonowych w neuronach tej struktury. Wahania potencjałów błonowych komórek HPC, ulegając przestrzennemu zsumowaniu, dają w efekcie połowy rytm theta [2, 4, 5].

Istotą synchronizacji jest to, aby grupa neuronów generowała potencjały z tą samą częstotliwością i by były one fazowo zgodne [26]. Niezbędne jest do tego komunikowanie się neuronów zachodzące za pośrednictwem przewodnictwa synaptycznego. Ostatnie badania sugerują zaangażowanie synaps elektrycznych (połączeń szczelinowych, gap junction, GJ) w aktywność oscylacyjną sieci neuronalnych [6, 27, 28, 29]. Strukturę synaps elektrycznych opisał w latach 60. ubiegłego wieku Robertson [22], określając je jako kanały o heksagonalnej strukturze. Biochemiczną identyfikację białek tworzących kanał przeprowadzili Kumar i Gilula w 1986 roku [18].

Połączenia szczelinowe umożliwiają, zgodny z gradientem potencjału, przepływ prądu jonowego pomiędzy komórkami [19]. Stąd neurony połączone synapsami elektrycznymi działają z precyzją pojedynczego neuronu [1]. Identyfikacji synaps elektrycznych dokonywano stosując technikę wprowadzania do wnętrza neuronu barwnika i obserwowanie jego rozprzestrzeniania się na inne, sąsiednie komórki. Zastosowanie tej metody w badaniach na szczurach (*in vivo*) pozwoliło dokonać wizualizacji neuronów formacji hipokampa, wcześniej zdiagnozowanych jako komórki, których aktywność związana była z połowo rejestrowanym rytmem theta [16]. Te informacje sugerowały, że GJ pomiędzy komórkami HPC stanowią istotny element strukturalny, zapewniający określony stopień synchronizacji sieci neuronalnej, niezbędny do powstania rytmicznej aktywności wolnofalowej theta.

Badania prowadzone techniką *in vitro* wykazały, że połączenia szczelinowe biorą udział w generowaniu aktywności epileptycznej [12, 24, 28]. Związane są one także z powstawaniem rytmu gamma i oscylacjami o wysokiej częstotliwości (150–200 Hz) [27, 29].

Nasze wcześniejsze badania prowadzone na skrawkach HPC (*in vitro*) poświęcone były udziałowi synaps elektrycznych w genezie hipokampalnego rytmu theta. Wykazaliśmy, że blokery synaps elektrycznych – karbenoksolon i chinina dodane do sztucznego płynu mózgowo-rdzeniowego opłukującego skrawek, znoszą rytmiczną aktywność pojawiającą się w wyniku

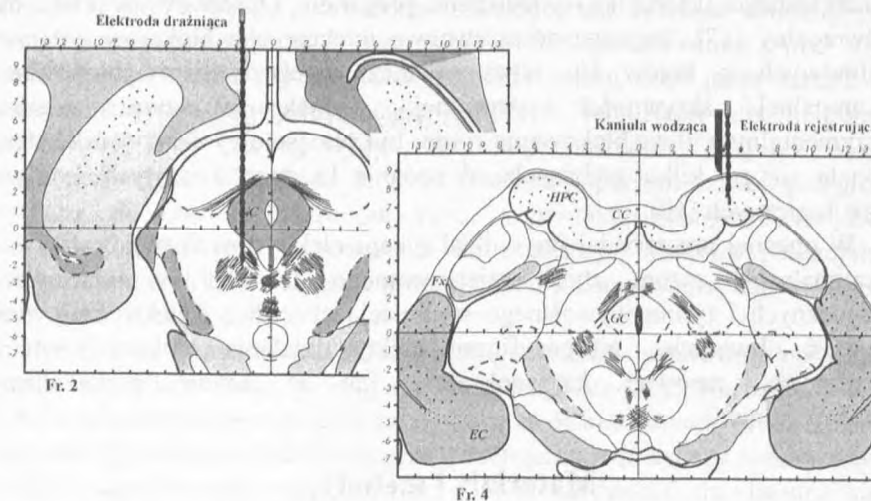
cholinergicznego (karbachol) pobudzenia preparatu. Obserwowany efekt był nieodwracalny [17]. Stosując dootrzewnowe iniekcje obu blokerów połączeń szczelinowych u kotów (*in vivo*) również obserwowaliśmy blokowanie hipokampalnej aktywności rytmicznej. Jednak w tym układzie eksperymentalnym efekt blokowania rytmu był przejściowy – aktywność theta pojawiała się po kilku godzinach od podania każdego z użytych środków farmakologicznych [10].

W obecnej pracy badaliśmy udział synaps elektrycznych w powstawaniu hipokampalnego rytmu theta rejestrowanego u kota w warunkach spontanicznych i rytmu wywołanego stymulacją czuciową i elektryczną. Aby wykluczyć obwodowe, niespecyficzne efekty działania blokerów synaps elektrycznych, zarówno karbenoksolon, jak i chininę podawaliśmy dohipokampalnie.

Materialy i metody

Każdemu z sześciu kotów zaimplantowano (w narkozie barbituranowej, Hexobarbital, 90 mg/kg) jednostronnie: kaniulę wodzącą do obszaru grzbietowego hipokampa, dwubiegoną elektrodę rejestrującą do warstwy drobinowej HPC, a także dwubiegoną elektrodę drażniącą do obszaru formacji siatkowatej śródmózgowia (Ryc. 1). Implantacji dokonywano w oparciu o współrzędne stereotaktyczne z atlasu Jaspera i Ajmone-Marsan [13]. Szczegóły operacji oraz warunki prowadzenia doświadczeń opisano wcześniej [11].

Kota umieszczano w kamerze doświadczalnej i dokonywano 120 sekundowego zapisu kontrolnego hipokampalnego EEG w warunkach spontanicznych, podczas drażnienia czuciowego (gwizdanie, klaskanie machanie ręką) oraz w trakcie elektrycznego drażnienia MRF (100Hz, 0.2 ms, 0.2-0.5 mA; 10 s). Dokonywaliśmy mikroiniekcji karbenoksolonu oraz chininy, w dawce 30µg i objętości 1µl. Następnie w kolejnych okresach poiniekcyjnych (15, 30, 60 min. oraz 2, 4, 6, 8, 10 i 12 godzin) rejestrowaliśmy aktywność elektroencefalograficzną HPC pojawiającą się spontanicznie oraz aktywność wywołaną drażnieniem czuciowym i elektrycznym. Hipokampalną aktywność EEG analizowano off-line stosując program komputerowy Spike-2 (Cambridge Electronic Design, UK). Sześćdziesiąt dwusekundowych próbek aktywności EEG rejestrowanej w warunkach spontanicznych i po drażnieniu czuciowym (zarówno w kontroli, jak i w kolejnych okresach poiniekcyjnych), poddawano analizie szybkiej transformanty Fouriera (FFT). Oznaczano w ten sposób dominującą częstotliwość i moc dominującej częstotliwości w paśmie theta



Ryc. 1. Schemat przedstawiający lokalizacje elektrody rejestrującej i drażniącej oraz umiejscowienie kaniuli zaimplantowanej chronicznie w mózgu kota (Jasper i Ajmone-Marsan, 1954).

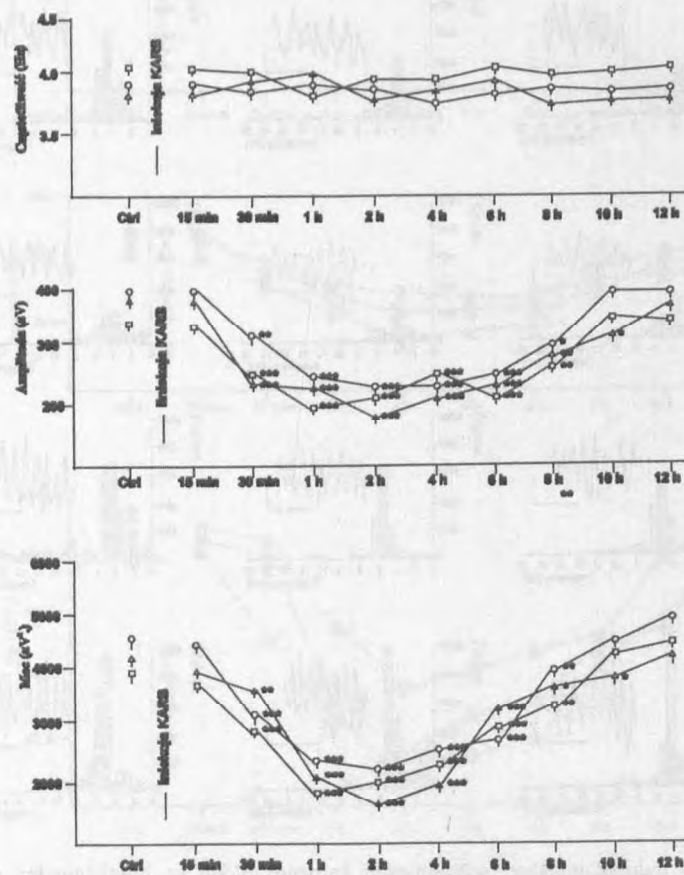
(3-7 Hz). W przypadku aktywności wywołanej drażnieniem elektrycznym MRF analizowano 5 dwusekundowych próbek zapisu aktywności elektroencefalograficznej HPC. Amplituda rytmu theta określana była bezpośrednio z zapisu analogowego EEG. Średnie wartości trzech mierzonych parametrów aktywności rytmicznej: częstotliwości, amplitudy oraz mocy, wyznaczone w warunkach kontrolnych i po iniekcji każdego z zastosowanych blokerów synaps elektrycznych, poddawano jednoczynnikowej analizie wariancji (Kruskal-Wallis) a następnie testowi Manna-Whitneya.

Wyniki

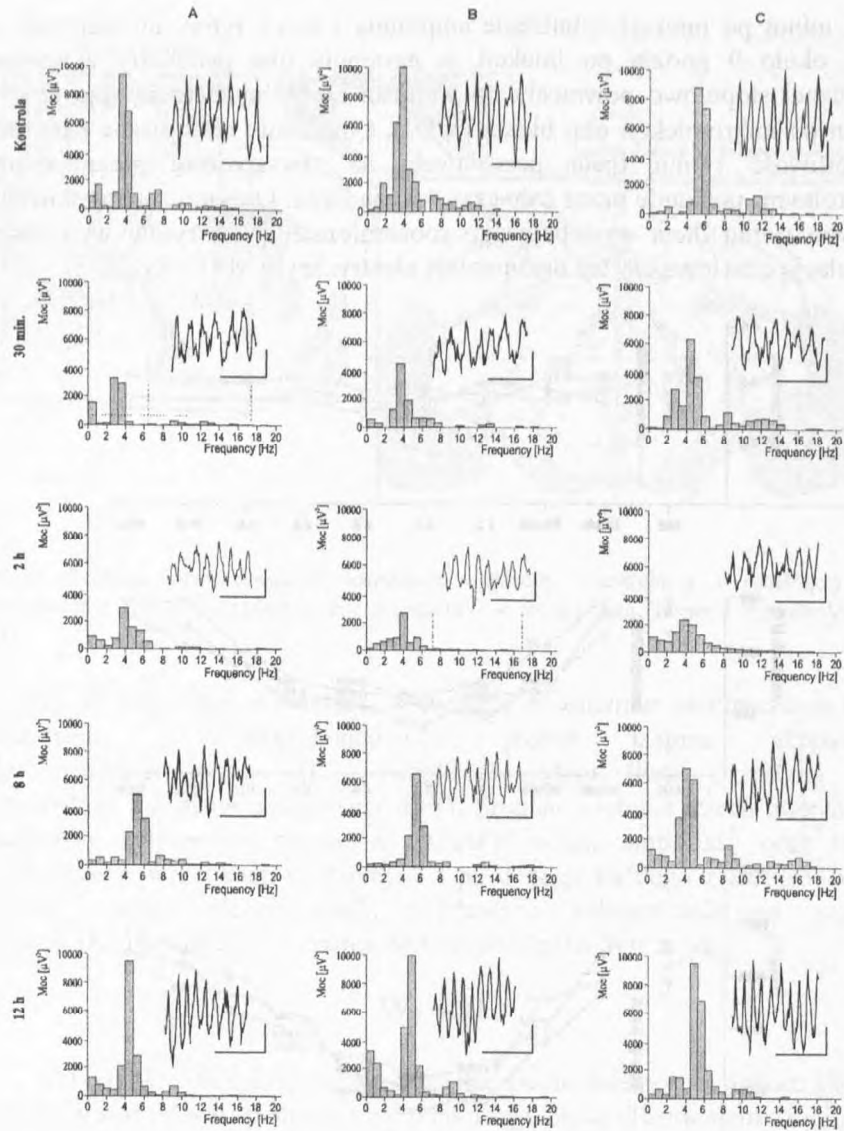
Aktywność polowa rejestrowana z HPC swobodnie poruszającego się kota zarówno w warunkach spontanicznych, jak i wywołana drażnieniem czuciowym składała się z fragmentów aktywności nieregularnej poprzedzielanych regularnym rytmem theta. Drażnienie czuciowe, a jeszcze bardziej elektryczne drażnienie MRF zwiększało prawdopodobieństwo pojawienia się rytmu theta w zapisie EEG.

Dohipokampalne mikroiniekcje zarówno karbenoksolonu, jak i chininy nie zmieniały ogólnego zachowania zwierząt. Powodowały one natomiast statystycznie istotne obniżenie amplitudy i mocy rytmu theta rejestrowanego z HPC kota (w porównaniu z parametrami kontrolnymi). Efekt ten widoczny był

w 30 minut po iniekcji. Obniżenie amplitudy i mocy rytmu utrzymywało się przez około 9 godzin po iniekcji, a następnie oba parametry aktywności rytmicznej stopniowo powracały do wartości kontrolnych (osiągając je w 12 godzin po mikroiniekcji obu blokerów GJ). Odmiennie niż opisane parametry, częstotliwość rytmu theta pozostawała na statystycznie niezmiennym (kontrolnym) poziomie przez cały czas doświadczeń. Opisane zmiany dotyczyły zarówno rytmu theta występującego spontanicznie, jak i rytmu wywołanego stymulacją czuciową czy też drażnieniem elektrycznym MRF (Ryc. 2-5).

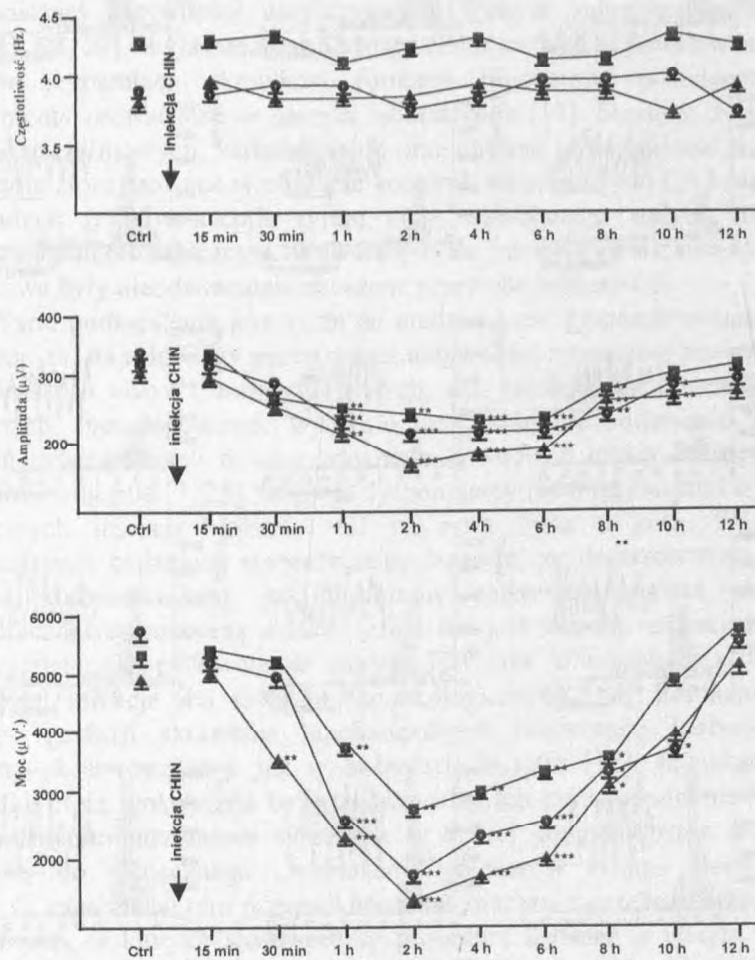


Ryc. 2. Średnie wartości (\pm SE) mierzonych parametrów rytmu theta: [częstotliwości (Hz); amplitudy (μ V); mocy (μ V²)] spontanicznego Δ , wywołanego sensorycznym \circ , oraz elektrycznym drażnieniem \square MRF rejestrowanego w kontroli (K) oraz w kolejnych sekwencjach czasowych po dohipokampalnej mikroiniekcji karbenksolonu.

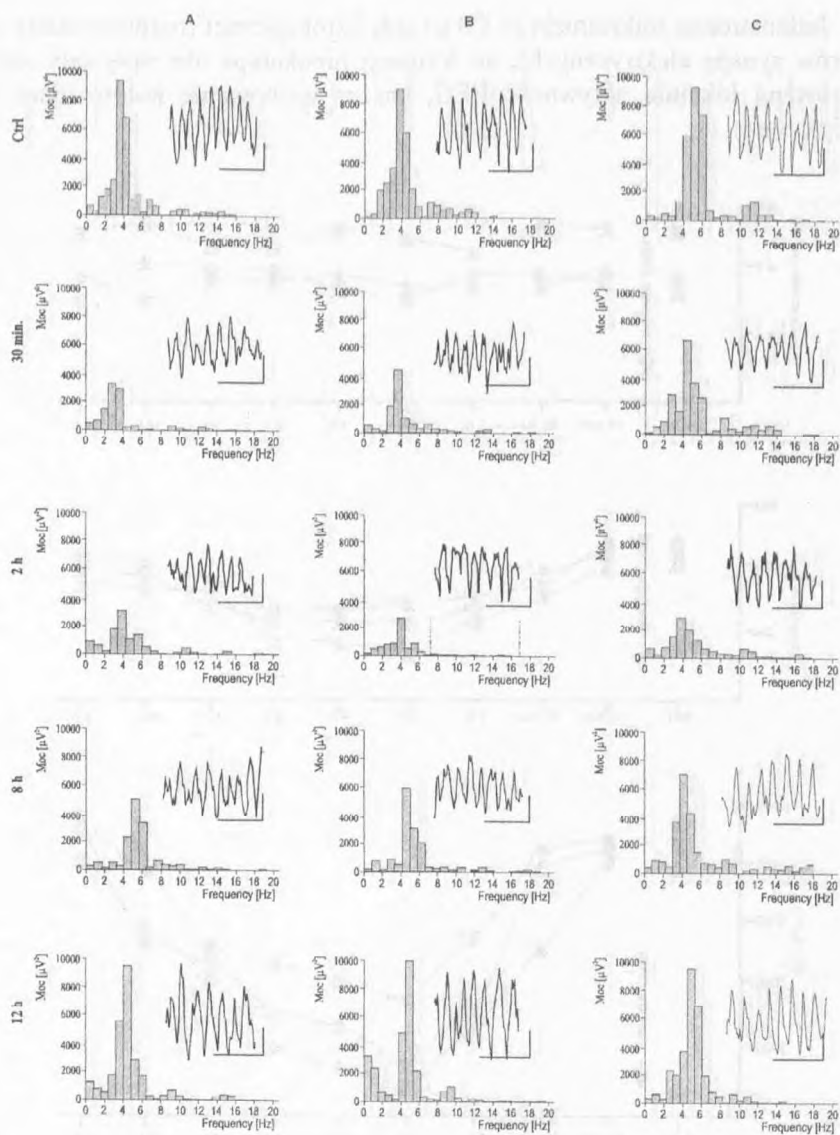


Ryc. 3. Wpływ dohipokampalnej mikroiniekcji karbenoksolonu na hipokampalny rytm theta. A – spontaniczny; B – wywołany drażnieniem sensorycznym; C – wywołany drażnieniem elektrycznym MRF. Histogramy przedstawiają FFT z 2-sek. odcinków zapisu kontrolnego EEG oraz wybranych sekwencji czasowych po iniekcji karbenoksolonu. W prawej części każdego histogramu umieszczono 2 sekundowe fragmenty analogowego zapisu aktywności EEG hipokampa.

Jednostronne mikroiniekcje 1.0 μl soli fizjologicznej (rozpuszczalnik obu blokerów synaps elektrycznych), do formacji hipokampa nie wpływały ani na rejestrowaną lokalnie aktywność EEG, ani na zachowanie kotów (dane nie zamieszczone).



Ryc. 4. Średnie wartości (\pm SE) mierzonych parametrów rytmu theta: [częstotliwości (Hz); amplitudy (μV); mocy (μV^2)] spontanicznego Δ , wywołanego sensorycznym \circ , oraz elektrycznym drażnieniem \square MRF rejestrowanego w kontroli (K) oraz w kolejnych sekwencjach czasowych po dohipokampalnej mikroiniekcji chininy.



Ryc. 5. Wpływ dohipokampalnej mikroiniekcji chininy na hipokampalny rytm theta. A – spontaniczny; B – wywołany drażnieniem sensorycznym; C – wywołany drażnieniem elektrycznym MRF. Histogramy przedstawiają FFT z 2-sek. odcinków zapisu kontrolnego EEG oraz wybranych sekwencji czasowych po iniekcji chininy. W prawej części każdego histogramu umieszczono 2 sekundowe fragmenty analogowego zapisu aktywności EEG hipokampa.

Dyskusja

Udział przewodnictwa elektrycznego w powstawaniu rytmu theta nie podlegał dotychczas systematycznemu badaniu, choć od kilku lat przybywa informacji świadczących o istotnej roli połączeń szczelinowych w genezie synchronicznej aktywności oscylacyjnej o różnym zakresie częstotliwości [8, 12, 27, 28, 29]. Wyjaśnieniu roli synaps elektrycznych w powstawaniu rytmu theta w preparatach skrawków formacji hipokampa poświęcone były eksperymenty prowadzone w naszym laboratorium [17]. Stosując dwa blokery połączeń szczelinowych, karbenoksolon oraz chininę wykazaliśmy, że synapsy elektryczne zlokalizowane w obszarze komórek piramidowych CA3 hipokampa biorą udział w powstawaniu rytmu theta wywołanego stałym, tonicznym pobudzeniem cholinergicznym. Wywołany rytm i skorelowana z nim aktywność komórkowa były nieodwracalnie znoszone przez oba blokery GJ.

Warte podkreślenia jest to, że do niedawna nie dysponowaliśmy danymi wskazującymi na rolę GJ w generowaniu aktywności rytmicznej prowadzonymi na modelu *in vivo* - anestetyzowanych, czy swobodnie poruszających się zwierzętach. Prawdopodobnie wynikało to z faktu, że podawanie blokerów połączeń synaptycznych *in vivo* wywołuje obwodowe efekty niespecyficzne, z letalnymi włącznie [7, 23]. Obecnie dysponujemy już informacjami o wpływie obwodowych iniekcji blokerów GJ na rytm theta u kota. W naszych wcześniejszych badaniach stwierdziliśmy bowiem, że dootrzewnowe iniekcje zarówno karbenoksolonu, jak i chininy całkowicie znoszą aktywność synchroniczną rejestrowaną z HPC. Efekt ten jest w pełni odwracalny, rytm theta pojawia się ponownie w zapisie EEG po kilkunastu godzinach od obwodowej iniekcji obu środków farmakologicznych [10]. Zanikanie rytmu theta po perfuzji skrawków hipokampalnych roztworami karbenoksolonu i chininy obserwowaliśmy już w badaniach *in vitro* [17]. Jednakże w tym przypadku efekt blokowania był nieodwracalny, co prawdopodobnie wynikało z niemożliwości utrzymania skrawków w dobrej kondycji przez długi czas, niezbędny do skutecznego „wypłukania” blokerów synaps elektrycznych. O tym, że czas ma w tym przypadku istotne znaczenie przekonują nas wyniki doświadczeń, w których stosowaliśmy procedurę łączoną *in vivo/in vitro*. W tych eksperymentach badaliśmy aktywność EEG preparatów skrawków HPC pobranych od szczurów poddanych obwodowej premedykacji roztworami blokerów synaps elektrycznych. Wykazaliśmy, że karbenoksolon i chinina przejściowo znosiły rejestrowany z hipokampa rytm theta (*in vitro*). Efekt ten zależał od czasu, jaki upływał pomiędzy dootrzewnową iniekcją blokerów GJ a pobraniem skrawków do badań *in vitro* (patrz Kowalczyk i wsp. w obecnym tomie). Odwracalność efektów blokowania rytmu theta wskazuje, że nie

wynikają one z uszkodzenia tkanki nerwowej przez stosowane blokery, ale przypuszczalnie spowodowane są wpływem tych środków farmakologicznych na neuronalne mechanizmy synchronizacji.

Wyniki obecnych doświadczeń *in vivo*, w których dokonywaliśmy dohipokampalnych iniekcji karbenoksolonu i chininy potwierdzają to przypuszczenie. Wykazaliśmy, że dohipokampalne iniekcje blokerów synaps elektrycznych redukowały w około 50% amplitudę i moc rytmu theta. Obwodowe podanie obu środków farmakologicznych natomiast, całkowicie blokowało aktywność rytmiczną na wiele godzin. Różnice w działaniu karbenoksolonu i chininy wynikają więc ze sposobu podawania blokerów GJ. Podane dootrzewnowo, przenikają przez barierę krew-mózg [14, 28] i blokują synapsy elektryczne nie tylko na obwodzie, ale również te zlokalizowane na różnych piętrach systemu neuronalnego odpowiedzialnego za generowanie hipokampalnego rytmu theta. System ten biegnie przez pień mózgu, tylne podwzgórze, przegrodę do formacji hipokampa [2, 4, 5]. Natomiast oba środki podane miejscowo wywierają działanie jedynie w obszarze dyfuzji, stąd efekty tłumienia rytmu theta są bardziej ograniczone.

W naszych obecnych doświadczeniach efekt obniżenia amplitudy i mocy hipokampalnego rytmu theta wystąpił po około 30 minutach od lokalnych mikroiniekcji karbenoksolonu i chininy. Podobne odroczenie efektów obserwowaliśmy w badaniach *in vitro* [17] i po dootrzewnowym podaniu obu blokerów [10]. Odroczenie efektów po podaniu blokerów synaps elektrycznych opisali także Ross i współpracownicy [24], badając znoszenie aktywności epileptycznej w obszarze CA1 skrawka HPC. Wydaje się, że mechanizm tego efektu wiązać można z długotrwałymi procesami fosforylacji i agregacji podjednostek białkowych tworzących koneksyny [25].

Podsumowując, wyniki obecnych doświadczeń po raz pierwszy wskazują na uczestnictwo synaps elektrycznych w procesach synchronizacji aktywności neuronalnej leżących u podstaw generowania rytmu theta u swobodnie poruszających się zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Bennett M.V.L. (1997) Gap junctions as electrical synapses. *J. Neurocytology*. 26: 349-466.
2. Bland B. H. (2000) The medial septum: node of the ascending brainstem hippocampal synchronizing pathways. W: Numan R. (ed). *The behavioral neuroscience of the septal region*. Springer-Verlag, New York, s. 115-145.
3. Bland B.H. (1986) The physiology and pharmacology of hippocampal theta rhythms. *Prog. Neurobiol.* 26: 1-54.

4. Bland B.H., Oddie S.D. (2001) Theta band oscillation and synchrony in the hippocampal formation and associated structures: the case for its role in sensorimotor integration. *Behav. Brain Res.* 127: 119-136.
5. Bland B. H., Colom L.V. (1993) Extrinsic and intrinsic properties underlying oscillation and synchrony in limbic cortex. *Prog. Neurobiol.* 41: 157-208.
6. Carlen P.L., Skinner F., Zhang L., Naus C., Koshnir M., Velasquez J.L.P. (2000) The role of gap junctions in seizures. *Brain Res. Rev.* 32: 235-241.
7. Cascio W.E., Yang H., Muller-Borer B.J., Johnson T.A. (2005) Ischemia-induced arrhythmia: the role of connexins, gap junctions, and attendant changes in impulse propagation. *J. Electrocardiol.* 38: 55-59.
8. Draguhn A., Traub R.D., Shmitz D., Jefferys G.R. (1998) Electrical coupling underlies high-frequency oscillations in the hippocampus in vitro. *Nature* 394: 189-192.
9. Gołębiewski H. (2005) Rola przegrody w generowaniu hipokampalnego rytmu theta u kota. Wydawnictwo Uniwersytetu Łódzkiego, s. 7-43.
10. Gołębiewski H., Eckersdor B., Konopacki J. (2005) The effect of gap junction blockage on hippocampal theta activity. *Acta Neurobiol. Exp.* 65: 325.
11. Gołębiewski H., Eckersdor B., Konopacki J. (2002) Septal cholinergic mediation of hippocampal theta in the cat. *Brain Res. Bull.* 49: 407-412.
12. Jahromi S.S., Wentland K., Piran S., Carlen P.L. (2002) Anticonvulsant actions of gap junctional blockers in an in vitro seizure model. *J. Neurophysiol.* 88: 1893-1902.
13. Jasper H., Ajmone-Marsan C. A. (1954) A stereotaxic atlas of the diencephalon of the cat. National Research Council of Canada, Ottawa.
14. Jellinck P. H., Monder C., McEwan B. S., Sakai R.R. (1993) Differential inhibition of beta-hydroxysteroid dehydrogenase by carbenoxolone in rat brain regions and peripheral tissues. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 46: 209-213.
15. Konopacki J. (1998) Theta-like activity in the limbic cortex in vitro. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22: 311-323.
16. Konopacki J., Bland B.H., Dyck R. (2003) Intracellular recording and labeling of neurons in midline structures of the rat brain in vivo using sharp electrodes. *J. Neurosci. Meth.* 127: 85-93.
17. Konopacki J., Kowalczyk T., Gołębiewski H. (2004) Electrical coupling underlies theta oscillations recorded in hippocampal formation slices. *Brain Res.* 1019: 270-274.
18. Kumar N.M., Gilula N.B. (1986) Cloning and characterisation of human and rat liver cDNAs encoding for a gap junction protein. *J. Cell Biol.* 103: 767-776.
19. MacVicar B.A., Dudek F.E. (1981) Electronic coupling between pyramidal cells: A direct demonstration in rat hippocampal slices. *Science* 213: 782-785.
20. Miller R. (1991) W: Braitenberg V., Barlow H. B., Bullock T. H., Florey E., Grusser O. J., Peters A.(eds.). Cortico-hippocampal interplay and the representation of contexts in the brain. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, s. 35-127.
21. Nowacka A., Jurkowlanec E., Trojnar W. (2002) Microinjection of procaine into the pedunculopontine tegmental nucleus suppresses hippocampal theta rhythm in urethane-anesthetized rats. *Brain Res. Bull.*, 58: 377-384.
22. Robertson J.D. (1963) The occurrence of the subunit pattern in the unit membrane of club endings in the Mauthner cell synapses in gold fish brains. *J. Cell Biol.* 19: 201-221.
23. Rodriguez-Sinovas A., Garcia-Dorado D., Ruiz-Meana M., Soler-Soler J. (2004) Enhanced effect of gap junction uncouplers on macroscopic electrical properties of reperfused myocardium. *J. Physiol.* 15;559: 245-257.

24. Ross F.M., Gwyn P., Spanswick D., Davies S.N. (2000) Carbenoxolone depresses spontaneous epileptiform activity in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neuroscience* 100: 789-796.
25. Spray D. C., Rosenthal R., Srinivas M. (2002) Prospects of rational development of pharmacological gap junction channel blockers. *Curr. Drug Targ.* 3: 455-464.
26. Steriade M., Gloor P., Linas R. R., Lopes Da Silva F. H., Mesulam M. M. (1990) Basic mechanisms of cerebral rhythmic activities. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 61: 982-993.
27. Traub R.D., Bibbig A., Fisahn A., LeBeau F.E.N., Whittington M. Buhl A.E.H. (2000) A model of gamma frequency network oscillations induced in the rat CA3 region by carbachol in vitro. *Europ. J. Neurosci.* 12: 4093-4106.
28. Traub R.D., Draguhn A., Whittington M.A., Baldeweg T., Bibbig A., Buhl E.H., Schmitz D. (2002) Axonal gap junctions between principal neurons: A novel source of network oscillations, and perhaps epileptogenesis. *Rev. Neurosci.* 13: 1-30.
29. Traub R.D., Whittington M.A., Buhl E.H., LeBeau F.E.N., Bibbig A., Boyd S., Cross H., Baldeweg T. (2001) A possible role for gap junction in generation of very fast EEG oscillations preceding the onset of, and perhaps initiating, seizures. *Epilepsia* 42: 153-170.

Adres do korespondencji:

Henryk Gołębiewski

Katedra Neurobiologii Uniwersytetu Łódzkiego

ul. Rewolucji 1905r nr 66

90-222 Łódź

tel. (48 42) 66 55 673

e-mail: hgoleb@biol.uni.lodz.pl