

## Udział synaps elektrycznych w powstawaniu hipokampalnego rytmu theta w warunkach pozaustrojowych\*

*Tomasz Kowalczyk, Henryk Gołębiewski, Jan Konopacki*

Katedra Neurobiologii Uniwersytetu Łódzkiego

### Streszczenie

Badano aktywność elektroencefalograficzną preparatów formacji hipokampa pobieranych od szczurów premedykowanych roztworem blokera synaps elektrycznych, karbenoksolonu (CARB, 100 mg/kg). Wykazano, że dootrzewnowe podanie CARB znosi przejściowo cholinergicznie wywoływany rytm theta oraz skorelowaną z nim aktywność komórek piramidowych pola CA3c formacji hipokampa *in vitro*. Obserwowany efekt był całkowicie odwracalny i zależał od czasu odroczenia procedury preparowania skrawków od dootrzewnowej iniekcji karbenoksolonu.

Uzyskane wyniki wskazują, że synapsy elektryczne są istotnym elementem zapewniającym poziom synchronizacji aktywności sieci neuronalnej formacji hipokampa, niezbędny do powstawania rytmu theta. Efekt zablokowania synaps elektrycznych ma charakter odwracalny.

### Wstęp

Rytm theta jest wysokoamplitudową, wolnofalową aktywnością elektroencefalograficzną (EEG) generowaną w strukturach układu limbicznego, w tym w formacji hipokampa (HPC). Aktywność ta powiązana jest z różnorodnymi wzorcami behawioralnymi, procesami uwagi i zapamiętywania a także integracją procesów czuciowo-ruchowych [2, 3]. Rytm theta stanowi najbardziej charakterystyczny przykład procesów oscylacyjnych i synchronizacyjnych zachodzących w sieciach neuronalnych ośrodkowego układu nerwowego. Koncepcje dotyczące generowania rytmu w formacji hipokampa 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. U podstaw procesów związanych

---

\* Wyniki badań przedstawione w pracy uzyskano w ramach grantu KBN nr 0081/P04/2002/23

z sumowaniem się w czasie aktywności pojedynczych neuronów leży zdolność komunikowania się komórek nerwowych pomiędzy sobą. Odkrycie w początkach lat 30-tych chemicznego przekąźnictwa synaptycznego [17] zdominowało na szereg lat kierunki badawcze dotyczące współdziałania komórek nerwowych. Jednakże badania Furshpana i Pottera z lat 50-tych wykazały, że poza chemicznym przekąźnictwem synaptycznym istnieje również szybkie przekąźnictwo przez tzw. „szlaki elektryczne” [7]. Następne lata przyniosły kolejne obserwacje dotyczące elektrycznego komunikowania się komórek nerwowych. Na początku lat 60. Robertson opisał strukturę morfologiczną synaps elektrycznych, występujących w komórkach Mauthnera rdzenia kręgowego złotej rybki [20]. Przełomowe wydają się jednak badania Benetta, które wykazały obecność synaps elektrycznych w ośrodkowym układzie nerwowym wyższych kręgowców [1]. Synapsy elektryczne to błonowe struktury kanałowe określone jako tzw. połączenia szczelinowe (ang. gap junctions, GJs). Biochemiczna identyfikacja białek tworzących heksagonalną strukturę głównego kanału połączenia szczelinowego (koneksonu) opisana została przez Kumara i Gilula w roku 1986 [16]. Dzięki połączeniom szczelinowym istnieje możliwość natychmiastowego przemieszczenia się prądu jonowego pomiędzy komórkami zgodnie z różnicą potencjałów [18]. Synapsy elektryczne mogą być zatem istotnym elementem strukturalnym mechanizmów synchronizacyjnych i oscylacyjnych w sieciach neuronalnych OUN [4, 6, 8, 9, 19, 22, 23, 24, 25].

W roku 1987 opracowaliśmy model wywoływania rytmu theta w skrawkach formacji hipokampa *in vitro*, perfundowanych sztucznym płynem mózgowo-rdzeniowym, zawierającym agonistę receptora cholinergicznego – karbachol [10, 12, 13, 14, 15]. Badania prowadzone w naszym laboratorium pozwoliły ustalić, że rejestrowana w warunkach pozaustrojowych aktywność oscylacyjna odtwarza większość cech rytmu theta występującego *in vivo* [10]. Częstotliwość oraz amplituda rytmu theta rejestrowanego zarówno *in vitro*, jak i *in vivo* posiadają bardzo podobne zakresy, a oba wzorce aktywności elektroencefalograficznej pojawiają się w kilkusekundowych epizodach. Oba wzorce EEG posiadają podobne podłoże neurotransmisyjne wyrażające się dynamicznym współdziałaniem pomiędzy układem cholinergicznym i GABAergicznym. Co więcej, rozwój ontogenetyczny w obu przypadkach przebiega podobnie i, co szczególnie ważne, wzorce aktywności wewnątrzkomórkowej związanej z rytmem theta zarówno *in vivo* jak i *in vitro* są zbliżone [10].

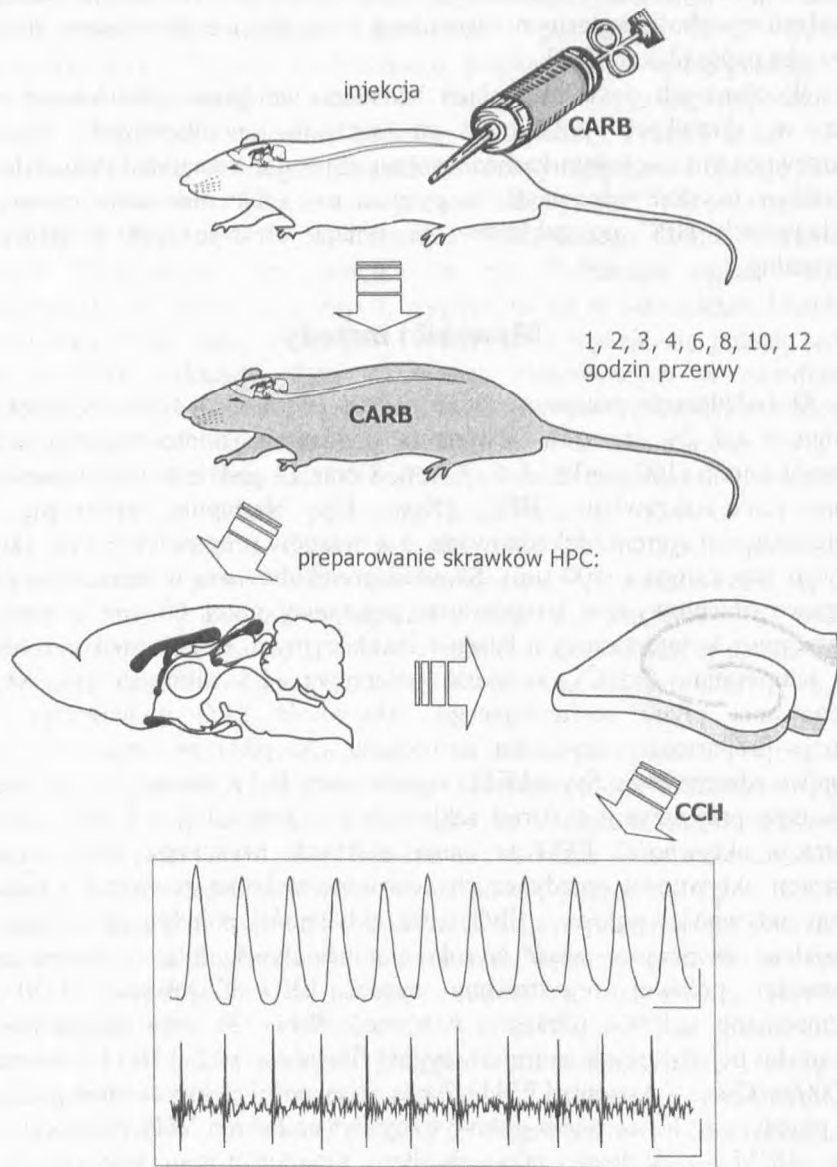
W prowadzonych przez nas badaniach *in vitro* zajmowaliśmy się również problemem bezpośredniego udziału połączeń szczelinowych w powstawaniu hipokampalnego rytmu theta. Stosując dwa blokery połączeń szczelinowych, chininę i karbenoksolon (CARB), wykazaliśmy, że synapsy elektryczne biorą

udział w powstawaniu rytmu theta wywołanego in vitro stałym, tonicznym pobudzeniem cholinergicznym: wywołany rytm był nieodwracalnie znoszony przez oba użyte blokery [13].

W obecnych doświadczeniach badaliśmy zdolność generowania rytmu theta w skrawkach pobranych od szczurów poddawanych wcześniej dootrzewnowym iniekcjom karbenoksolonu. Stosując taki układ doświadczalny chcieliśmy uzyskać odpowiedź na pytanie, czy efekt zniesienia rytmu theta w skrawkach HPC po zablokowaniu synaps elektrycznych struktury jest odwracalny.

### Material i metody

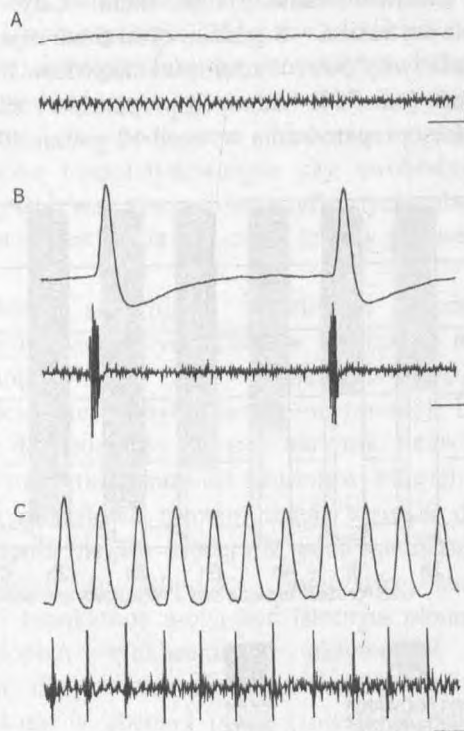
Doświadczenia przeprowadzono na 164 preparatach formacji hipokampa pobranych od 24 szczurów. Zwierzęta poddawano dootrzewnowej iniekcji karbenoksolonu (100 mg/kg) 1, 2, 3, 4, 6, 8 oraz 12 godzin przed rozpoczęciem preparowania skrawków HPC (Ryc. 1.). Następnie zwierzęta były anestezjowane eterem, dekapitowane, a z mózgów preparowane były skrawki formacji hipokampa (~500  $\mu\text{m}$ ). Skrawki preinkubowano w sztucznym płynie mózgowo rdzeniowym w temperaturze pokojowej przez 60 min. a następnie umieszczano w interfazowym basenie inkubacyjnym, w którym kontrolowana była temperatura (35°C), szybkość przepływu (1.5 ml/min.) oraz stopień natlenowania płynu perfundującego. Aktywność EEG wywoływana była perfuzją preparatów roztworem karbacholu (50  $\mu\text{M}$ ) w sztucznym płynie mózgowo-rdzeniowym. Sygnał EEG rejestrowany był z obszaru CA3c formacji hipokampa przy użyciu elektrod szklanych o oporności 5 – 8 M $\Omega$ . Podczas rejestracji aktywności EEG ta sama elektroda wykorzystywana była do rejestracji aktywności pojedynczych neuronów techniką zewnątrzkomórkową. Sygnał aktywności polowej (EEG) oraz aktywności pojedynczych neuronów rozdzielano za pomocą wejść wysokoopornościowych. Dla uzyskania zapisu aktywności polowej rejestrowany sygnał EEG filtrowano (1-30 Hz) i wzmacniano (x1000) (Grass – Astromed P511). W celu zarejestrowania aktywności pojedynczych neuronów sygnał filtrowano (0.3-3 Hz) i wzmacniano (x 10000) (Grass – Astromed P511). Zapis aktywności elektroencefalograficznej oraz pojedynczych neuronów dokonywany był na taśmie VHS (rejestrator FM Sony 420M – Vetter), przy ciągłym monitorowaniu wzrokowym na oscyloskopie cyfrowym (Tektroniks TDS 3014) oraz audiomonitorze (Grass AM-8). Archiwizacja danych oraz analiza off-line dokonana została przy pomocy programu Spike 2-4.22 (Cambridge Electronic Design Ltd.).



Ryc. 1. Schemat procedury doświadczalnej, szczegóły w tekście. Kalibracja 0.1sek., 500  $\mu$ V.

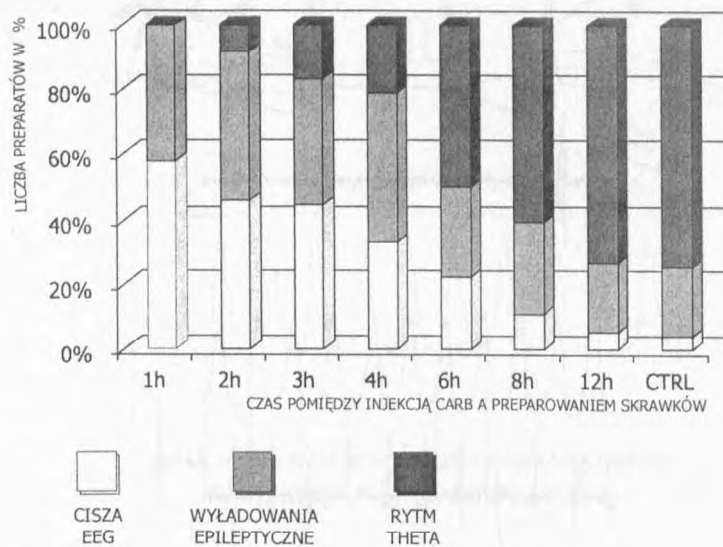
## Wyniki

W obecnych badaniach rejestrowaliśmy aktywność EEG preparatów formacji hipokampa pobieranych od szczurów premedykowanych karbenksolonem, blokerem synaps elektrycznych (100 mg/kg). Preparaty formacji hipokampa pobierane od premedykowanych zwierząt, perfundowane roztworem agonisty cholinergicznego karbacholu generowały dwa rodzaje zsynchronizowanej aktywności elektroencefalograficznej: aktywność epileptyczną lub rytm theta. Poza połową aktywnością EEG, w przedstawionej pracy rejestrowano również aktywność pojedynczych neuronów. Rycina 2 przedstawia wzorce aktywności pojedynczych komórek nerwowych pola CA3c formacji hipokampa występujące jednocześnie z aktywnością połową, rejestrowaną w obecnych doświadczeniach.



**Ryc. 2.** Wpływ dootrzewnowych iniekcji karbenksolonu na wywoływaną cholinergicznie aktywność EEG in vitro. Rycina przedstawia przykładowe zapisy aktywności połowej (górny panel) oraz aktywności pojedynczych neuronów (dolny panel) dokonywane przy czasie odroczenia procedury preparowania wynoszącym odpowiednio: 1 h (A), 4 h (B) oraz 8 h (C). Szczegóły w tekście. Kalibracja 0.1 sek., 500  $\mu$ V.

Wpływ dootrzewnowych iniekcji karbenoksolonu na zdolność skrawków formacji hipokampa do generowania synchronicznych wzorców EEG w zależności od czasu odroczenia pomiędzy iniekcją CARB a preparowaniem skrawków przedstawiony został na rycinie 3. Dootrzewnowa iniekcja karbenoksolonu powodowała zanik zdolności generowania rytmu theta w preparatach HPC. Efekt ten był w pełni odwracalny. Iniekcja CARB dokonywana 1 – 3 godziny przed preparowaniem skrawków, w dużym stopniu zmniejszała prawdopodobieństwo pojawienia się rytmu theta w preparatach poddanych następnie pobudzeniu cholinergicznemu (nie więcej niż 21% preparatów generowało rytm theta). Większość preparatów nie generowała żadnej aktywności zsynchronizowanej (cisza EEG) lub występowała jedynie nieregularna aktywność epileptyczna (Ryc. 3.). Wraz z wydłużaniem czasu odroczenia pomiędzy iniekcją CARB a preparowaniem skrawków wzrastało prawdopodobieństwo zarejestrowania rytmu theta. Gdy okres odroczenia procedury preparowania wynosił 6 – 8 godzin, rytm theta rejestrowany był w 50 – 62 % preparatów. Całkowity powrót zdolności skrawków hipokampalnych do generowania rytmu theta (ok. 78% badanych preparatów) zaobserwowano gdy czas odroczenia procedury preparowania wynosił 12 godzin (Ryc. 2.).



**Ryc. 3.** Wpływ dootrzewnowych iniekcji karbenoksolonu na wywołaną cholinergicznie aktywność EEG in vitro. Wykres przedstawia prawdopodobieństwo wywołania rytmu theta lub aktywności epileptycznej wyrażone liczbą preparatów w procentach.

## Dyskusja

W obecnych doświadczeniach badaliśmy aktywność EEG preparatów formacji hipokampa pobranych od szczurów poddawanych wcześniej dootrzewnowym iniekcjom karbenoksolonu, blokera synaps elektrycznych. Wykazaliśmy, że CARB znosi przejściowo cholinergicznie wywoływany rytm theta oraz skorelowaną z nim aktywność komórek piramidowych pola CA3c, głównego wewnątrzhipokampalnego generatora rytmu [12, 15]. Efekt ten był całkowicie odwracalny i zależał od czasu odroczenia procedury preparowania skrawków od dootrzewnowej iniekcji karbenoksolonu.

Badania prowadzone od końca lat 80. ubiegłego wieku wskazywały na istotną rolę synaps elektrycznych w powstawaniu synchronicznej aktywności EEG w ośrodkowym układzie nerwowym. W badaniach tych wykazano, że połączenia szczelinowe biorą udział w powstawaniu aktywności epileptycznej [4, 8, 9, 19, 22, 24] rytmu gamma [23] i tzw. szybkich oscylacji, 150-200 Hz [6, 25]. Co ciekawe, istnieje niewiele danych doświadczalnych dotyczących udziału przewodnictwa elektrycznego w powstawaniu rytmu theta. Może być to związane z faktem, że podawanie blokerów połączeń szczelinowych w warunkach *in vivo* (anastetyzowanym czy swobodnie poruszającym się szczurom), może wywoływać szereg niespecyficznych zaburzeń fizjologicznych a przy zastosowaniu wysokich dawek, efekt letalny jest wielce prawdopodobny [5, 21].

Pierwsze dane sugerujące możliwość uczestnictwa połączeń szczelinowych w generowaniu rytmu theta w warunkach *in vivo* opublikowane zostały przez Konopackiego i wsp. w roku 2003. Autorzy ci, analizując korelację aktywności pojedynczych neuronów formacji hipokampa z rytmem theta, wprowadzali do badanego neuronu barwnik, neurobiotynę. Interesujący był fakt, że w 25% wszystkich barwień neuronów, których aktywność związana była z rejestrowanym połowo rytmem theta, barwnik dyfundował do kilku neuronów (wybarwieniu ulegała więcej niż jedna komórka) [11]. Obserwacja ta sugerowała pośrednio, że istniejące połączenia szczelinowe pomiędzy neuronami formacji hipokampa mogą być istotnym elementem strukturalnym, zapewniającym stopień synchronizacji aktywności elektrofizjologicznej neuronów, niezbędny dla powstawania rytmu theta *in vivo*.

Wyniki uzyskane w obecnej pracy (zniesienie rytmu theta *in vitro* po podaniu CARB) są zgodne z naszymi wcześniejszymi badaniami [13]. W doświadczeniach tych wykazaliśmy, że synapsy elektryczne zlokalizowane w obszarze komórek piramidowych CA3 hipokampa biorą udział w powstawaniu rytmu theta wywoływanego *in vitro* stałym, tonicznym pobudzeniem cholinergicznym. Perfuzja preparatów formacji hipokampa roztworami blokerów połączeń szczelinowych, karbenoksolonu lub chininy

znosiła rytm theta. Efekt ten był jednak nieodwracalny [13]. Wcześniejsze doświadczenia Rosa i wsp. [22] przeprowadzone in vitro wykazały, że karbenoksolon nieodwracalnie obniża częstotliwość wyładowań epileptycznych. Autorzy ci wiązali ten efekt z uszkodzającym działaniem karbenoksolonu na tkankę nerwową. Nasze obecne badania przeprowadzone były na niestosowanym wcześniej modelu doświadczalnym. To nie preparaty formacji hipokampa poddawano działaniu CARB, a szczury od których pobierano następnie skrawki formacji hipokampa poddawano dootrzewnowej iniekcji karbenoksolonu. Przeprowadzone badania wskazują, że blokujące działanie karbenoksolonu na zdolność do generowania rytmu theta przez preparaty formacji hipokampa może być w pełni odwracalne. Powrót zdolności do generowania rytmu theta do wartości kontrolnych zaobserwowaliśmy, gdy czas odroczenia pomiędzy dootrzewnowym podaniem CARB a preparowaniem skrawków wynosił 12 godzin. Brak powrotu rytmu theta w poprzednich badaniach in vitro [13] wynikał prawdopodobnie ze zbyt krótkiego czasu wypłukiwania karbenoksolonu z tanki mózgowej. Na tej podstawie przypuszczamy, że efekt działania CARB ogranicza się do wpływu na mechanizmy synchronizacji a nie wynika z trwałego uszkodzenia tkanki nerwowej.

### Piśmiennictwo

1. Bennett M.V.L. (1963) Electronic junctions between teleost spinal neurones: electrophysiology and ultrastructure. *Science* 141: 262-264.
2. Bland B.H. (1986) The physiology and pharmacology of hippocampal theta rhythms. *Prog. Neurobiol.* 26: 1-54.
3. 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.
4. 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.
5. Cascio W.E., Yang H., Müller-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.
6. 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.
7. Furshpan E.J., Potter D.D. (1959) Transmission at the giant motor synapses of the crayfish. *J. Physiol.* 145: 289-325.
8. 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.
9. Katsumaru H., Kosaka T., Heizmann C.W., Hama K. (1988) Gap junction on GABAergic neurons containing the calcium-binding protein parvalbumin in the rat hippocampus (CA1 region). *Exp. Brain Res.* 72: 363-370.



10. Konopacki J. (1998) Theta-like activity in the limbic cortex in vitro. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 22: 311-323.
11. 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.
12. Konopacki J., Bland B.H., Roth S.H. (1988) Carbachol-induced "theta" in hippocampal formation slices: evidence for a third generator in CA3c area. *Brain Res.* 451: 33-42.
13. Konopacki J., Kowalczyk T., Gołębiewski H. (2004) Electrical coupling underlies theta oscillations recorded in hippocampal formation slices. *Brain Res.* 1019: 270-274.
14. Kowalczyk T., Gołębiewski H., Eckersdorf B., Konopacki J. (2001) Window effect of temperature on carbachol-induced theta-like activity recorded in hippocampal formation in vitro. *Brain Res.* 901: 184-194.
15. Kowalczyk T., Konopacki J. (2002) Depth amplitude and phase profiles of carbachol-induced theta in hippocampal formation slices. *Brain Res. Bull.* 58(6): 569-574.
16. 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.
17. Loewi O. (1933) Problems connected with the principle of humoral transmission of nervous impulses. *Proc. R. Soc. Ser. B* 118: 299-316.
18. MacVicar B.A., Dudek F.E. (1981) Electronic coupling between pyramidal cells: A direct demonstration in rat hippocampal slices. *Science* 213: 782-785.
19. Perez-Valasquez J.L., Valiante T.A., Carlen P.L. (1994) Modulation of gap junction mechanisms during calcium-free induced field burst activity: A possible role for electronic coupling epileptogenesis. *J. Neurosci.* 14: 4308-4317.
20. 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.
21. 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.
22. 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.
23. Traub R.D., Bibbing 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.
24. Traub R.D., Draguhn A., Whittington M.A., Baldeweg T., Bibbing 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.
25. Traub R.D., Whittington M.A., Buhl E.H., LeBeau F.E.N., Bibbing 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:

**Tomasz Kowalczyk**

Katedra Neurobiologii Uniwersytetu Łódzkiego

Ul. Rewolucji 1905 r. nr 66

90-222 Łódź

Tel. (48 42) 66 55 681

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