

ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ НЕЙРОНІВ ТРІЙЧАСТОГО ГАНГЛІЯ В ПЕРВИННІЙ КУЛЬТУРІ

Надійшла 14.08.2012.

З використанням методики “петч-клемп” у конфігурації “ціла клітина” досліджено електрофізіологічні характеристики нейронів трійчастого ганглія в умовах первинної культури. Діаметр сом культивованих нейронів варіював від 12 до 50 мкм. Усі нейрони відповідно до виду електричної активності були поділені на три групи. Нейрони з діаметром сом більше 30 мкм у відповідь на тривалий деполяризуючий поштовх струму генерували поодинокі потенціали дії (ПД), тоді як у нейронах меншого розміру виникала тонічна активність (різні за виглядом серії ПД). Параметри ПД нейронів, що відносилися до кожної з груп, вірогідно розрізнялися.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: трійчастий ганглії, первинна культура нейронів, потенціали дії (ПД), фазна викликана імпульсна активність, тонічна імпульсна активність.

ВСТУП

У трійчастому ганглії (ТГ) локалізовані семи нейронів первинних сенсорних аферентів, периферичні волокна котрих входять до складу трійчастого нерва. Є переконливі підстави вважати, що соматосенсорні ноцицептивні та неноцицептивні нейрони сенсорних гангліїв мають відмінні електрофізіологічні та морфологічні властивості [1–3]. Це було продемонстровано щодо нейронів спінальних дорсальнокорінцевих гангліїв (ДКГ) [1].

В усякому разі більша частина ноцицептивних нейронів ДКГ мають сом діаметром менше 30 мкм. Вони генерують відносно тривалі потенціали дії (ПД) із фазою реполяризації, в межах якої спостерігається помітне зменшення швидкості зміни потенціалу; деякими дослідниками така фаза кваліфікується як платоподібна [2, 3]. Виявилось, що ноцицептивні нейрони і ДКГ, і ТГ є чутливими до капсаїцину [4, 5]. Таким чином, результати попередніх досліджень давали певні можливості для ідентифікації типу первинних сенсорних нейронів в експериментах *in vitro*.

Були отримані вказівки на те, що характеристики ПД та електричної активності нейронів ТГ дещо відрізняються від таких у нейронів ДКГ. Згадувалося, що нейрони ТГ в умовах *in vitro* залежно від

форми фази реполяризації ПД можуть бути поділені на дві групи [6]. Повідомлялося про кореляцію між розміром соми нейрона ТГ і видом електричної активності, яку він генерує. Нейрони діаметром менше 30 мкм у разі прикладання тривалих поштовхів струму генерували тонічну активність, а клітини більшого розміру – фазну, що пояснювалося відмінностями в рівнях експресії калієвих та кальцієвих каналів. Клітини, що були здатні до тонічної активності, в більшості випадків виявляли чутливість до капсаїцину, тоді як нейрони з більшим розміром соми були нечутливими до цього агента [7].

Дослідження властивостей нейронів сенсорних гангліїв є досить актуальними, оскільки ураження периферичних нервових волокон різного генезу може призводити до розвитку важких патологічних синдромів (гіпералгезії, алодинії, каузалгії) [8, 9]. Зокрема, виявилось, що після травми нервові волокна починають генерувати в місці ушкодження ектопічну електричну активність; спонтанна генерація ПД може відбуватись і в сомах нейронів сенсорних гангліїв. У подібних умовах спостерігається проростання симпатичних волокон у сенсорні ганглії [10–12]. Причини, які спонукають до цих ефектів, поки що досліджені на рівні цілого організму. Застосування тих або інших впливів, що призводять до змін електричної активності сенсорних нейронів в умовах первинної культури, може допомогти у виявленні конкретних механізмів, які

¹ Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ (Україна).
Ел. пошта: mariyka.t@gmail.com (М. В. Телька).

лежать в основі патологічних змін у периферичних нервах.

Ми досліджували електрофізіологічні властивості нейронів ТГ у первинній культурі, оскільки відповідні відомості поки що залишаються обмеженими. Результати електрофізіологічних експериментів дали можливість виділити групу нейронів, які за властивостями відповідають ноцицептивним одиницям в умовах *in vivo*. Отримані дані допоможуть створити певну базу для подальшого дослідження різних впливів на окремі групи нейронів ТГ в умовах культури.

МЕТОДИКА

Для приготування первинної культури нейронів ТГ ганглії неонатальних щурят (P1–P5) виділяли та вміщували в камеру з розчином, що складався з буфера HEPES та мінімального середовища Ігла (MEM; “Sigma”, США) з додаванням 25 од/мл бензилпеніциліну. У камері ганглії очищували від супутніх тканин та розрізали на декілька частин. Для ферментативної обробки використовували 0.2 %-вий розчин пронази (“Sigma”, США). Після 15-хвилинної ферментативної обробки зразки тканини декілька разів промивали в розчині для культивування (мінімальне середовище Ігла, 10 % кінської сироватки з додаванням 26 мМ NaHCO₃ та 25 од/мл бензилпеніциліну; “Gibco”, США). Зразки тканини в цьому розчині механічно дисоціювали, використовуючи пастерівські піпетки різного діаметра. Після дисоціації суспензію клітин висівали в чашки Петрі на скельця, які попередньо були оброблені полі-L-орнітином. Культивування здійснювалося при температурі 37 °С в атмосфері повітря, збагаченого CO₂ до 5 %. Нейрони росли та морфологічно диференціювалися протягом дев’яти–14 днів; до розчину для культивування додавали фактор росту нервової тканини (5 нг/мл). З метою припинення проліферації гліальних клітин на третій день у розчин для культивування додавали 7 мкМ цитозин-А-Д-арабіно-фуранозиду (ARA-C).

Електрофізіологічні дослідження виконували із застосуванням методу “петч-клемп” у конфігурації “ціла клітина”. Відведення від нейронів ТГ проводили з використанням підсилювача Axopatch-1D (“Axon Instruments”, США); вимірювали струми через мембрану в режимі фіксації напруги або визначали зміни потенціалу мембрани в режимі фіксації струму. Експерименти виконували на дев’ятий–

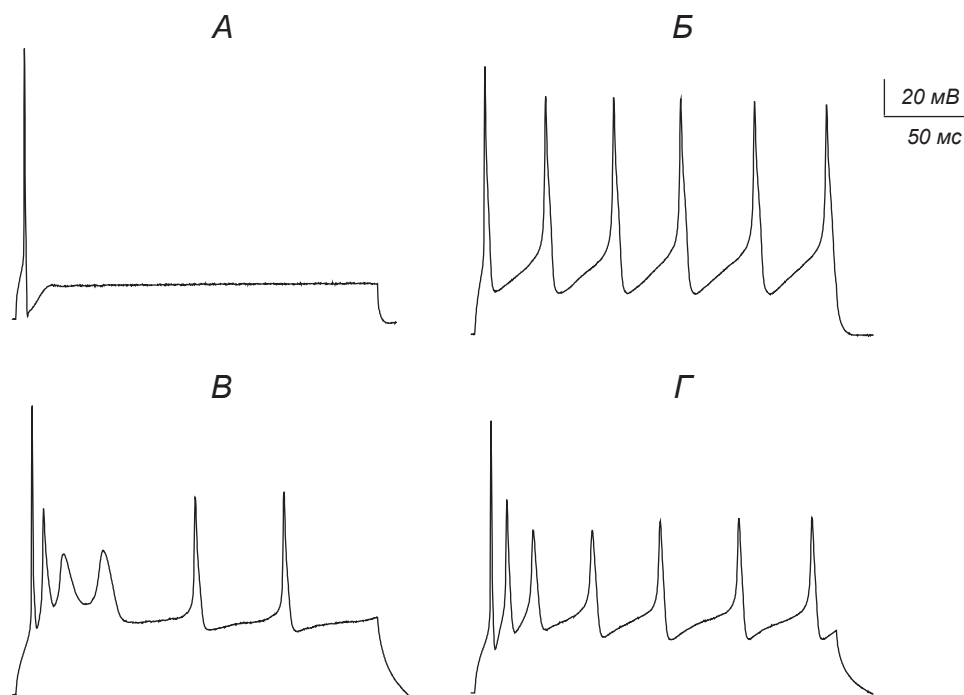
24-й день культивування при кімнатній температурі. Скельця з культивованими нейронами ТГ вміщували в камеру із зовнішньоклітинним розчином наступного складу (у мілімолях на 1 л): NaCl – 140, KCl – 3, MgCl₂ – 2, CaCl₂ – 2, глюкоза – 10, HEPES – 10 (всі реактиви фірми “Sigma”, США); рН 7.4. Піпетки для відведення електричних відповідей (опір від 3 до 5 МОм) заповнювали внутрішньоклітинним розчином, до складу якого входили (у мілімолях на 1 л): калію глюконат – 155, EGTA – 10, MgCl₂ – 2, HEPES – 10 (всі реактиви фірми “Sigma”, США); рН 7.3. В електрофізіологічні дослідження брали нейрони, мембранний потенціал яких становив не менше –40 мВ. Потенціал, підтримуваний на мембрані, складав –70 мВ, що дозволяло уникати інактивації потенціалкерованих іонних каналів.

Пасивні характеристики мембрани визначали в режимі фіксації струму. Для оцінки опору та ємності мембрани використовували прикладання гіперполяризуючих поштовхів струму невеликої амплітуди. У режимі фіксації потенціалу контролювали якість контакту “мембрана–піпетка” згідно зі значенням сталої часу ємнісного струму, що виникав у відповідь на прикладання коротких (10 мс) гіперполяризуючих прямокутних поштовхів напруги невеликої амплітуди (–10 мВ).

У режимі фіксації струму через мембрану пропускали тривалі деполяризуючі поштовхи струму, що незначно перевищували поріг. Це призводило до виникнення поодиноких ПД. Амплітуду останніх вимірювали відносно значення потенціалу, котре відповідало порогу виникнення імпульсу. Вимірювали також амплітуду слідової гіперполяризації та тривалість фаз ПД. Тривалість фази реполяризації ПД визначалася між моментами, коли амплітуда ПД знижувалася від 90 до 10 % максимуму. Силу деполяризуючого стимулу потім збільшували з інкрементом 10–25 пА доти, доки частота генерації ПД не досягала максимального значення.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Всього було досліджено 17 зразків первинної культури дисоційованих клітин ТГ щурят. Відповідно до розміру соми всі клітини ($n = 64$) були поділені на дві групи – з діаметрами соми більше та менше 30 мкм. Для кожної групи нейронів було визначено пасивні електрофізіологічні характеристики мембрани. Ємність мембрани великих нейронів становила в середньому 85 ± 6 пФ, опір варіював від 70



Р и с. 1. Відповіді нейронів на прикладання тривалих деполяризуючих імпульсів струму. *A* – фазна відповідь нейрона з діаметром соми більше 30 мкм; *Б–Г* – тонічні відповіді нейронів з діаметром соми менше 30 мкм (приклади реакцій нейронів другої – *Б* та третьої груп – *В, Г*).

до 170 МОм, середній мембранний потенціал становив -51 ± 2.0 мВ. Нейрони з меншим діаметром соми мали вхідний опір у межах 230–630 МОм, середні ємність та мембранний потенціал становили 36 ± 3 пФ та -40 ± 1.9 мВ відповідно.

Характеристики відповідей культивованих нейронів ТГ на дію тривалих деполяризуючих поштовхів струму були різними. Згідно з видом електричної активності нейрони можна було поділити на три групи. Клітини першої групи генерували лише поодинокі ПД (фазні відповіді) (рис. 1, *A*). Електрична активність інших нейронів виглядала як серії ПД з частотою від 20 до 45 c^{-1} (тонічні відповіді; *Б–Г*). Нейрони з діаметром сом більше 30 мкм генерували фазну активність (поодинокі ПД), тоді як більша частина (80 %) нейронів меншого діаметра – тонічну викликану активність. Деякі з таких клітин генерували ПД однакової форми, сталої амплітуди та приблизно зі сталою частотою (*Б*). Такі нейрони були віднесені нами до другої групи. Тонічні відповіді нейронів третьої групи нейронів склалися з початкової пачки ПД, амплітуда яких

послідовно зменшувалася, та наступного тонічного розряду, що складався з ПД значно меншої амплітуди, ніж така першого ПД з відповіді (*В, Г*).

У більшості культивованих нейронів ТГ (85 %) фаза спаду (реполяризації) ПД мала більш або менш виражений „вигин”. Це зумовлювало присутність локальних максимумів у складі перших похідних ПД за часом перебігу фази реполяризації (рис. 2, *A, Б*). Для трьох груп нейронів були проаналізовані вищезгадані характеристики ПД (*В*). Клітини другої групи генерували ПД з найбільш вираженим „вигином” на фазі реполяризації. Тривалості ПД та фази реполяризації нейронів другої групи були вірогідно більшими, ніж такі у нейронів двох інших груп (*В, б, в*). Нейрони третьої групи генерували ПД найбільшої амплітуди та з найменшою величиною слідової гіперполяризації (*В, а, з*). У деяких нейронах цієї групи замість слідової гіперполяризації спостерігалася слідова деполяризація (рис. 1, *В*).

Результати проведених досліджень показують, що нейрони ТГ у первинній культурі не є гомо-

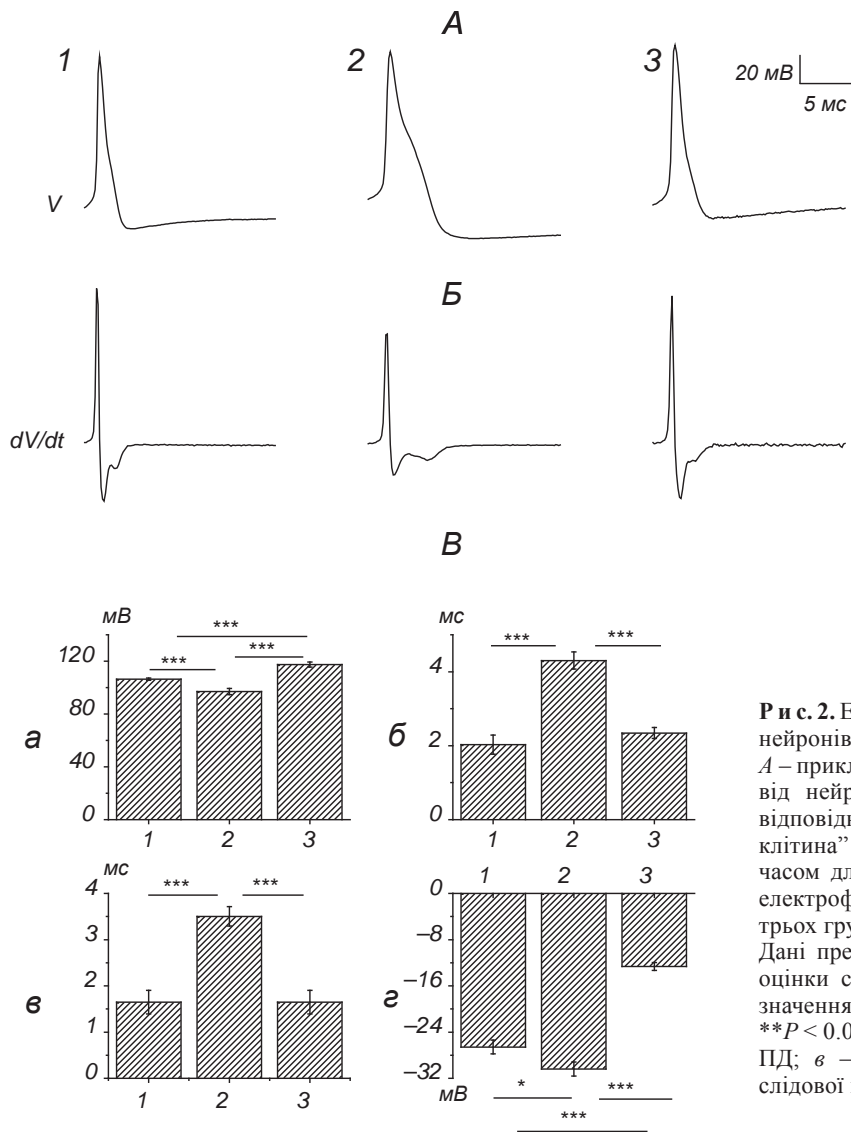


Рис. 2. Електрофізіологічні характеристики культивованих нейронів трійчастого ганглія (ТГ).

А – приклади потенціалів дії (ПД) різної форми, відведених від нейронів ТГ першої, другої та третьої груп (1–3 відповідно) в умовах „петч-клемп” у конфігурації „ціла клітина” в режимі фіксації струму. *Б* – перші похідні ПД за часом для нейронів відповідних груп. *В* – діаграми значень електрофізіологічних параметрів, які були виміряні в трьох групах нейронів ($n = 13$, $n = 27$ та $n = 24$ відповідно). Дані представлені як середні \pm похибка середнього. Для оцінки статистичної вірогідності різниць між середніми значеннями використовувався *t*-тест Ст’юдента ($*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$). *a* – амплітуда ПД; *б* – тривалість ПД; *в* – тривалість фази реполяризації; *г* – амплітуда слідової гіперполяризації.

генними за електричними властивостями. З урахуванням розміра сом досліджених нейронів та їх електрофізіологічних властивостей виявилось, що невеликі нейрони ТГ із довготривалими ПД здатні до генерації тривалих розрядів зі сталою частотою, а нейрони більшого розміру схильні до генерації фазної активності. Імпульсна активність нейронів малого діаметра, вірогідно, може бути досить складною та різноманітною.

Електрофізіологічні властивості нейронів другої групи є подібними до тих, що описані для свіжодисоційованих сенсорних нейронів гангліїв миші.

Показано, що дрібні нейрони даного типу є чутливими до капсаїцину та відповідають за своїми характеристиками ноцицептивним одиницям [4, 7]. В експериментах *in situ* та *in vivo* було показано, що в умовах аксотомії частина (15 %) нейронів ДКГ щурів, периферичні відростки котрих є А-волокнами, генерують пачкову активність (burstig activity) [15]. Вигляд цієї активності є подібним до зареєстрованої нами в частині культивованих нейронів із сомами діаметром менше 30 мкм.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. L. Diouhri, L. Bleazard, and S. N. Lawson, "Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea pig dorsal root ganglion neurons," *J. Physiol.*, **513**, No. 3, 857-872 (1998).
2. X. Fang, S. McMullan, S. N. Lawson, and L. Diouhri, "Electrophysiological differences between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurones in the rat *in vivo*," *J. Physiol.*, **565**, No. 3, 927-943 (2005).
3. L. Diouhri and S. N. Lawson, "Differences in the size of the somatic action potential overshoot between nociceptive and non-nociceptive dorsal root ganglion neurons in the guinea pig," *Neuroscience*, **108**, No. 3, 479-491 (2001).
4. S. N. Lawson, "Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurons with C-, A δ or A α /beta-fibers," *Exp. Physiol.*, **87**, No. 2, 239-244 (2002).
5. N. E. Lazarov, "Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus," *Prog. Neurobiol.*, **66**, No. 1, 19-59 (2002).
6. E. Puil and I. Spigelman, "Electrophysiological responses of trigeminal root ganglion neurons *in vitro*," *Neuroscience*, **24**, No. 2, 635-646 (1988).
7. L. Catacuzzeno, B. Fioretti, D. Pietrobonand, and F. Franciolini, "The differential expression of low-threshold K⁺ currents generates distinct firing patterns in different subtypes of adult mouse trigeminal ganglion neurons," *J. Physiol.*, **586**, No. 21, 5101-5118 (2008).
8. K. Fried, U. Bongenhielm, F. M. Boissonade, and P. P. Robinson, "Nerve injury-induce pain in the trigeminal system," *Neuroscientist*, **7**, No. 2, 155-165 (2001).
9. M. S. Ramer, W. Stephen, N. Thomson, and S. B. McMahon, "Causes and consequences of sympathetic basket formation in dorsal root ganglia," *Pain*, **6**, 111-120 (1999).
10. E. M. Mclachlan, W. Janig, M. Devor, and M. Michaelis, "Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprout within dorsal root ganglia," *Nature*, **363**, No. 6429, 543-546 (1993).
11. Y. Xie, J. Zhang, M. Petersen, and R. H. Lamotte, "Functional changes in dorsal root ganglion cells after chronic nerve constriction in the rat," *J. Neurophysiol.*, **73**, No. 5, 1811-1820 (1995).
12. J. Sato and E. R. Perl, "Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury," *Science*, **251**, No. 5001, 1608-1610 (1991).
13. C. Cabanes, López de Armentia M. F. Viana, and C. Belmonte, "Postnatal changes in membrane properties of mice trigeminal ganglion neurons," *J. Neurophysiol.*, **87**, No. 5, 2398-2407 (2002).
14. F. Brocard, D. Verdier, I. Arsenault, et al., "Emergence of intrinsic bursting in trigeminal sensory neurons parallels the acquisition of mastication in weanling rats," *J. Neurophysiol.*, **96**, 2410-2424 (2006).
15. R. Amir, M. Michaelis, and M. Devor, "Burst discharge in primary sensory neurons: triggered by subthreshold oscillations, maintained by depolarizing afterpotentials," *J. Neurosci.*, **22**, No. 3, 1187-1198 (2002).