

М. Б. ШТАРК, Л. В. ВОСКРЕСЕНСКАЯ, А. С. РАТУШНЯК,
С. Н. ОЛЕНЕВ, И. В. ПОПОВ

К ИССЛЕДОВАНИЮ ИМПУЛЬСНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ ГИППОКАМПА IN VITRO

(Представлено академиком Е. М. Крепом 19 IV 1971)

Нервная ткань, культивируемая *in vitro* и сохраняющая при этом морфотипические и функциональные свойства, представляет собой принципиально новый объект электрофизиологических исследований. Условия *in vitro* открывают исключительные возможности для раздельной оценки собственных свойств мембран центральных и периферических нейронов и их взаимодействия в сравнительно легко контролируемых и управляемых условиях (^{2, 11-16}). Настоящая работа является частью цикла исследований, посвященного изучению фоновой и вызванной импульсной активности (и.а.) нейронов гиппокампа, культивируемых вне организма, и анализу ее статистической структуры с помощью ЭВМ.

Для эксплантации служил дорсальный гиппокамп (область CA₁) крысят в возрасте от 1 до 5 дней. После разреза корковой пластинки обнажался гиппокамп, извлекался его фрагмент, измельчался на кусочки (примерно 0,5 × 1 мм), которые помещались на покровные стекла, покрытые коллагеном. Стекла опускались в стаканы с питательной средой (среда Игла, 90%; человеческая сыворотка В(III), 10%; инсулин 0,1 ед/мл; глюкоза 600 мг-% и антибиотики) и помещались в термостат при $T = 37^\circ$. Через 3—63 дня культура на стекле переносилась в камеру для электрофизиологических исследований, температура среды в которой стабилизировалась. Контроль манипуляций обеспечивался микроскопом МБИ-3Б, снабженным фазово-контрастным устройством КФ-4. Визуализация экспериментального поля, положения клеток и эксплантатов относительно микроэлектродов (рис. 1 в, д) достигалась с помощью телевизионной установки типа ПТУ-23М, экран одного из ВКУ которой был обращен в экспериментальную камеру. Введение микроэлектродов в поле зрения, установка их относительно краевой зоны эксплантата (рис. 1 в, з), тел и отростков нейронов (рис. 1 д) и пенетрация мембран проводилась с помощью микроманипулятора фирмы «Цейсс» (Иена). В качестве микроэлектродов использовались микропипетки диаметром 0,5—1 м, заполненные 3М раствором KCl или 0,9% NaCl, сопротивлением 6—14 мом, связанные через катодный повторитель со входом усилителя УБП-02. И.а. после амплитудной дискриминации и формирования подавалась на магнитофон «Яуза» и пластины двухлучевого осциллоскопа Д-561, а затем вводилась в ОЗУ ЭЦВМ «Днепр» * (^{6, 8, 9}). Для изучения морфологии культуры фиксированные препараты окрашивались методами Холмса-Вольфа, Бодиана и Ниссля (рис. 1а, б). Всего в работе проанализирована и.а. 30 нейронов сроком от 3 до 63 дней культивирования (рис. 1 см. вклейку к стр. 731).

А. Качественная оценка и.а. нейронов гиппокампа *in vitro* позволяет выделить несколько ее вариантов: квазипериодическое распределение разрядов и группированные спайки частотой от 2—4 до 15—20 имп/сек и пачечную форму и.а. частотой 1:20 гц, с интервалами меж-

* Обработка и.а. проводилась Н. Н. Глушковым в Институте математики СО АН СССР. Авторы глубоко признательны ему.

ду пачками в 3—4 сек. Сходная оценка дана для нейронов среднего мозга мыши (¹⁴) *. Условия эксперимента позволили нам обеспечить длительную регистрацию и.а. в течение 3—4 час. (рис. 2 а) с сохранением стабильных значений амплитуд.

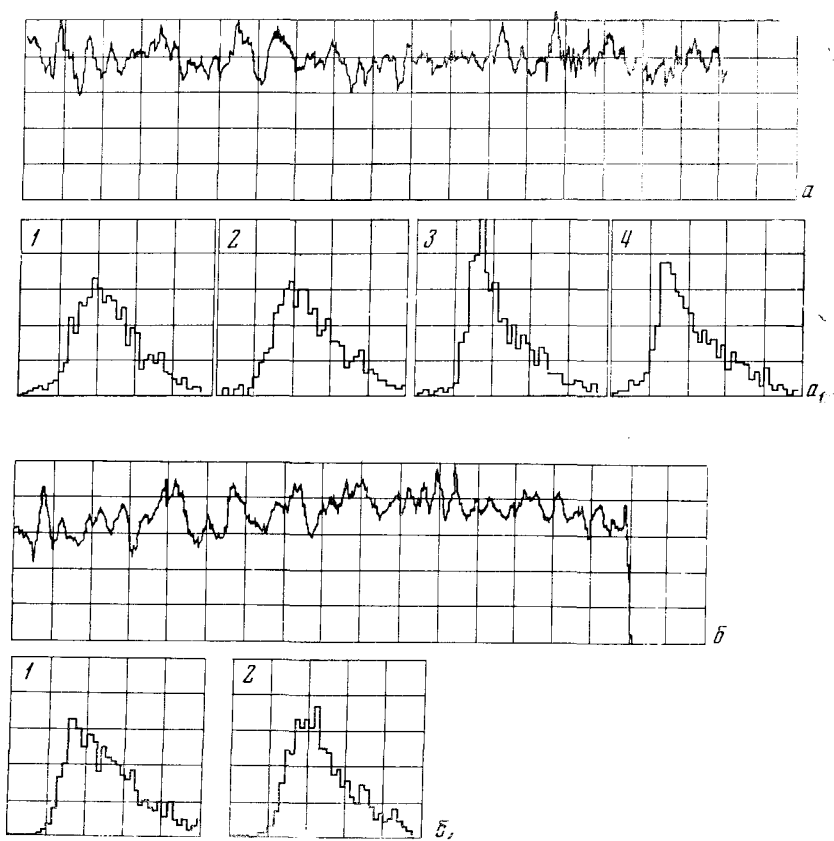


Рис. 2. а, б — временной ход интенсивности, а₁, б₁ — дифференциальные гистограммы распределения м.и.и. Опыты №№ 21, 22

	α	η	массив	№ массива	№ дорожки	№ нейрона	№ кадра
а, б	0,5-00 мин.	005 имп/сек	ус. 12,5 сек	01	1	002 (001)	01—04
а ₁	00-50 сек.	010 %	1024 интерв.	01	1	002	02
2	00-50 »	010 %	1024 »	01	1	002	04
3	00-50 »	010 %	1024 »	01	1	002	07
4	00-50 »	010 %	1024 »	01	1	002	08
б ₁	00-50 »	010 %	1024 »	01	1	002	02
2	00-50 »	010 %	1024 »	01	1	002	03

Б. Количественные характеристики. Классификационный анализ распределений м.и.и. первого порядка позволил выделить несколько типов гистограмм: унимодальный, асимметричный с экспоненциальным и неэкспоненциальным спадом, би- и полимодальный. Возможно заметить наличие так называемых «переходных» режимов и.а., когда один и тот же нейрон характеризуется динамичными изменениями распределения м.и.и., что может свидетельствовать об обратимых изменениях функционального состояния клеточных элементов в процессе их длительного исследования (рис. 2 а). Этот режим и.а. представляется нам удобной моделью для изу-

* Авторы благодарят д-ра В. Шлаффера (Беркли, Калифорнийский университет, США) за любезно предоставленную возможность ознакомиться с материалами его докторской диссертации (¹⁴).

чения зависимости и.а. от собственных свойств мембран нейронов и тех особенностей, которые привносятся синаптическими взаимодействиями в процессе роста культуры *in vitro*. Весьма важно, что на протяжении длительной регистрации и.а. характер распределения м.и.и. для всех нейронов оставался, как правило, постоянным (рис. 2 а, в).

Стационарность и.а. приобретает принципиальное значение в условиях длительных раздражений клеточных элементов, связанных с проводимыми нами исследованиями «обучения» нейронов *in vitro*. Предварительный анализ временного хода интенсивности (рис. 2 а, б) позволил выделить не менее трех видов зависимостей его от времени: стабильную, квазистабильную (рис. 2 а) и нестабильную интенсивность с периодическими «качаниями» (рис. 2 б), природа которых представляет специальный интерес. Изучение временного хода первого начального и второго центрального моментов показали, что в 26 опытах из 38 импульсный поток является стационарным, по крайней мере, в широком смысле.

Оценка и.а. в различные сроки исследования эксплантатов (от 3 до 63 дней) позволяет считать, что количество спонтанно активных нейронов и частота и.а. возрастают по мере увеличения продолжительности культивирования. На основании морфологического контроля культур в фазовом контрасте и фиксированных препаратов, окрашенных по Бодиану и Нислю, можно заключить, что описанные характеристики и.а. были получены нами при изучении пирамидных клеток гиппокампа (рис. 1 б).

Таким образом, в работе была достигнута возможность длительной регистрации и.а. нейронов гиппокампа крыс *in vitro*. Основное заключение, состоит в том, что по мере роста и клеточной дифференцировки в эксплантатах гиппокампа крыс количество спонтанно активных нейронов возрастает. Это может быть связано по меньшей мере с двумя обстоятельствами: появлением в краевых участках эксплантатов и зонах роста нервных элементов или с установлением синаптического взаимодействия между ними, а также с клетками близко расположенных эксплантатов. Возможность такого взаимодействия в последнее время — предмет электронномикроскопических и электрофизиологических исследований^(11, 14).

Анализ качественных и количественных характеристик и.а. нейронов гиппокампа *in vitro* показывает, что они в значительной степени идентичны таковым *in situ*^(1, 9). Это важное обстоятельство позволяет говорить о сохранении основных структурно-функциональных свойств этого отдела мозга в условиях культивирования и в связи с этим обеспечивает перспективы использования такой «модели» для изучения клеточных механизмов церебральных функций *in vitro*, прежде всего — памяти и обучения.

Институт автоматизации и электрометрии
Сибирского отделения Академии наук СССР
Новосибирский государственный медицинский институт
Сибирский филиал Академии медицинских наук СССР
Новосибирск

Поступило
8 IV 1971

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ О. С. Виноградова, Журн. высш. нервн. деят., 15, 3, 500 (1965). ² Р. Л. Зехнер, Д. Г. Флеминг, В кн. Системная организация физиологических функций, М., 1969, стр. 41. ³ Н. Н. Кокина, Н. М. Жуковская, Цитология, 10, 8, 955 (1968). ⁴ Н. Н. Кокина, Журн. эволюцион. физиол. и биохим., 6, 5, 11 (1970). ⁵ Б. И. Котляр, Биол. науки, 12, 3, 20 (1969). ⁶ В. А. Львов, Н. Н. Глушков, В. М. Сторожук, Матер. 1-й Всесоюз. конф. по электр. аппаратуре для исследований в области в. н. д., М.—Иваново, 1966, стр. 218. ⁷ М. Б. Штарк, Н. Г. Юргелайтис, Е. Н. Фок, Физиол. журн., 16, 4, 550 (1968). ⁸ М. Б. Штарк, Э. И. Тарасова и др., ДАН, 192, № 5, 1181 (1970). ⁹ М. Б. Штарк, Мозг зимнеящих, «Наука», 1970, стр. 130. ¹⁰ M. B. Bunge, R. D. Bunge et al., J. Cell. Biol., 32, 439 (1967). ¹¹ St. M. Crain, M. B. Borenstein, E. R. Peterson, Brain Res., 8, 363 (1968). ¹² W. Hild, I. Tasaki, J. Neurophysiol., 25, 277 (1962). ¹³ C. E. Lumsden, Growth of Nervous System, London, 1968, p. 6. ¹⁴ W. Schlaffer, Bioelectric Activity, of Neurons in Tissue Culture, Ph. D. Thesis, 1969. ¹⁵ B. S. Scott, V. E. Engelbert, K. C. Fisher, Exp. Neurol., 23, 230 (1969). ¹⁶ F. D. Walker, W. J. Hild, Science, 165, № 3893, 602 (1969). ¹⁷ C. Yamamoto, J. Bak, M. Kurokawa, Exp. Brain. Res., 11, 4, 360 (1970).