

Grzegorz Hess *

Preparat skrawka hipokampa świnki morskiej in vitro w badaniach neurofizjologicznych

Streszczenie

Metoda rejestracji aktywności bioelektrycznej ze skrawków mózgu ssaków inkubowanych in vitro, rozwinięta szczególnie w ostatnich latach, pozwoliła na znaczne poszerzenie wiedzy na temat własności pojedynczych komórek nerwowych. Przedstawiono szczegółowo metodę preparowania skrawków hipokampa świnki morskiej i sposób ich inkubacji. Możliwości, jakie daje stabilna rejestracja, ilustrują wyniki badań nad długotrwałymi zmianami przewodnictwa synaptycznego oraz jego farmakologicznymi modyfikacjami.

Badania mikroelektrodowe aksonów olbrzymich mątwy oraz preparatów nerwowo-mięśniowych i motoneuronów rdzenia kręgowego ssaków przeprowadzone w latach pięćdziesiątych i sześćdziesiątych dostarczyły podstawowych danych dotyczących własności błony komórkowej neuronu, jak również przewodnictwa synaptycznego w obwodowym układzie nerwowym i rdzeniu (Eccles, 1968; Katz, 1967).

Prowadzone równocześnie badania aktywności bioelektrycznej mózgu ssaków łącznie z zastosowaniem technik histologicznych i anatomicznych pozwoliły na określenie budowy i funkcji szeregu struktur mózgowych oraz połączeń między nimi. Badania in vivo nie mogą jednak dostarczyć wyczerpujących informacji na temat wielu zagadnień dotyczących własności

* Zakład Fizjologii Zwierząt, Instytut Zoologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

pojedynczych neuronów i połączeń synaptycznych. W przypadku pojedynczych komórek nerwowych mózgu głównym ograniczeniem jest niewystarczająca stabilność rejestracji aktywności bioelektrycznej, ponieważ pulsacja naczyń tętnicznych oraz ruchy oddechowe zwierzęcia ograniczają znacznie czas trwania zapisu wewnątrz- i zewnątrzkomórkowego.

Zastosowanie techniki skrawków mózgu inkubowanych *in vitro* było podstawą znacznego postępu w badaniach neurobiologicznych na poziomie komórkowym w ostatnich latach. Skrawek, utrzymywany w odpowiednim środowisku wykazuje aktywność bioelektryczną zbliżoną do obserwowanej *in vivo*. Oprócz dużej stabilności rejestracji, drugą istotną zaletą tego preparatu jest możliwość dowolnej manipulacji składem płynu międzykomórkowego. Inne zalety preparatu skrawka to możliwość umieszczania mikroelektrod pod kontrolą wzrokową, brak wpływu anestetyków na tkankę oraz możliwość badania grup neuronów w izolacji od innych części mózgu. Nie należy jednak oczekiwać, że preparat *in vitro* przejawia własności identyczne, jak tkanka nienaruszona.

W niniejszym opracowaniu pominięto szczegóły dotyczące aparatury do stymulacji elektrycznej i rejestracji aktywności preparatu, która stanowi podstawowe wyposażenie pracowni elektrofizjologicznej. Nie jest tu również możliwe opisanie rozmaitych sposobów przygotowania skrawków, jakie podano w literaturze z ostatnich lat. Stosuje się preparaty kory mózgowej (Richards i McIllwain, 1967), prążkowie i przegrody (Miller, 1981), podwzgórcza (Hatton i wsp., 1980), mózdzku (Llinas i Sugimori, 1980) oraz pnia mózgu (Henderson i wsp., 1982). Jednakże ogromna większość badań, wykonanych techniką skrawków dotyczy hipokampa (Schwartzkroin, 1975).

Hipokamp, filogenetycznie stara część kory mózgowej, stanowiąca wyraźnie wyodrębnioną, obustronnie symetryczną strukturę przypominającą literę C, zwiniętą wokół dolnego rogu komory bocznej mózgu, jest szczególnie dogodny do badań ze względu na specyficzną budowę cytoarchitektoniczną. Układ warstwowy oraz znaczna homogenność (96 - 98% wszystkich neuronów hipokampa stanowią komórki piramidowe i granularne, Buzsaki i Eidelberg, 1982) ułatwiają znacznie precyzyjne umiejscowienie mikroelektrod. Ponadto trójsynaptyczny wewnętrzny obwód neuronalny hipokampa

przebiega w płaszczyźnie prostopadłej do długiej osi hipokampa, co pozwala na zachowanie go wewnątrz skrawka w nienaruszonej postaci (Andersen i wsp., 1971) (ryc. 1).

Do inkubacji skrawka służy płyn o następującym składzie: 124mM, NaCl, 5mM KCl, 2mM CaCl₂, 2mM MgSO₄, 1.25mM NaH₂PO₄, 26mM NaHCO₃, 10mM glukoza, przedmuchiwany mieszaniną 95% O₂, 5% CO₂ (karbogen).

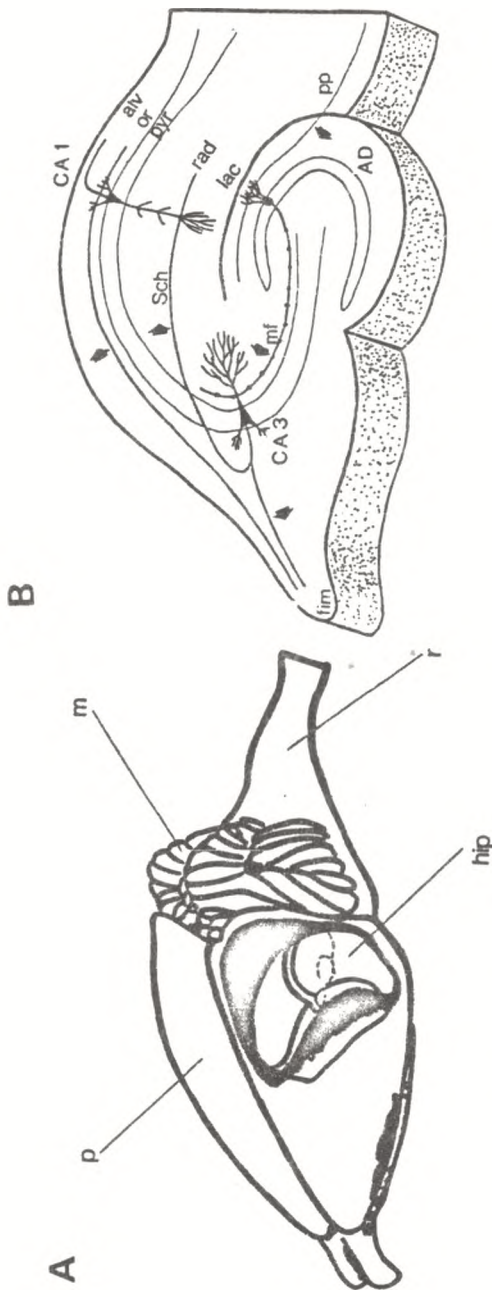
Skrawki preparowano, stosując zmodyfikowaną metodę Schwartzkroina (1981). Do przygotowania skrawków najlepiej nadają się świnki morskie o wadze 300-450 g. Kości czaszki zwierząt mniejszych są kruche, natomiast czaszka zwierząt większych jest twarda, co przysparza trudności w preparowaniu. Świnę zabija się silnym uderzeniem w szyję tuż za głową, co powoduje przerwanie rdzenia kręgowego, a następnie dekapituje przy pomocy dużych nożyczek i skalpela chirurgicznego. Z kolei skalpelem przecina się skórę na czaszce wzdłuż linii środkowej, po czym, wprowadziwszy jedno z ostrzy nożyczek do wnętrza poprzez otwór wielki czaszki, rozcina się ją wzdłuż linii środkowej. Nożyczki należy prowadzić jak najbardziej równoległe do powierzchni czaszki, aby nie uszkodzić mózgu. Przy pomocy łamacza kości lub dużej pensety wyłamuje się następnie kości czaszki, co prowadzi do odsłonięcia grzbietowej powierzchni półkul mózgu. Kolejny krok obejmuje wyjęcie mózgu z czaszki poprzez podważenie go przy pomocy zakrzywionej szpatułki, odcięcie opuszek węchowych, nerwów czaszkowych oraz pnia poniżej móżdżku (ryc. 1). Mózg w całości należy przenieść do szalki Petriego wypełnionej płynem inkubacyjnym, aby opłukać go z krwi. Wskazane jest zanurzenie mózgu w płynie oziębionym, co spowalnia metabolizm neuronów i ogranicza niekorzystne skutki niedotlenienia w czasie preparatyki. Następnie umieszcza się mózg na bibule zwilżonej płynem inkubacyjnym, powierzchnią grzbietową do dołu. Odcinając do góry pień mózgu wraz z móżdżkiem oddziela się jedną z półkul, płaską szpatułką naciskając w dół na płat skroniowy kory, co uwidoczni przyśrodkową i brzuszną część hipokampa. Szpatułkę wprowadza się głębiej do światła trzeciej komory mózgu i odcina półkulę od pnia i móżdżku. Następnie szpatułkę wprowadza się do światła komory bocznej, pomiędzy korę mózgową a grzbietową powierzchnią hipokampa, odcina połączenia na obu końcach hipokampa, podważa i oddziela od kory,

Po opłukaniu w ochłodzonym płynie inkubacyjnym, hipokamp przenosi się na szpatułce na pokryty warstwą agaru stolik przyrządu do cięcia skrawków.

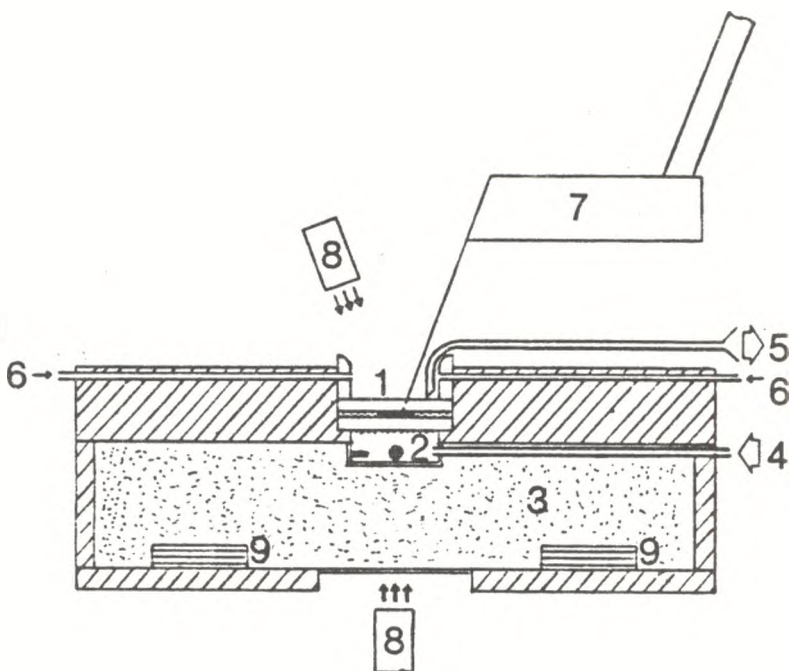
Wygodne w użyciu, lecz drogie są przyrządy półautomatyczne Sorvall lub McIllwain z regulowaną siłą cięcia. Wystarczający jest jednakże przyrząd możliwy do wykonania w warunkach warsztatowych, składający się ze stolika, na którym umieszcza się ciętą tkankę, przesuwanego przy pomocy śruby mikrometrycznej z dokładnością do 10 μm oraz ramienia z uchwytem do mocowania żyłki, służącego do cięcia, poruszającego się w płaszczyźnie prostopadłej do powierzchni stolika.

Na ogół skrawki odcina się prostopadle do długiej osi hipokampa, chociaż niekiedy zalecany jest obrót o 25-45^o w celu zachowania określonych połączeń synaptycznych (Andersen i wsp., 1971). Pierwszym cięciem oddziela się jeden z końców hipokampa, następnie zaś odcina skrawki o żądanej grubości, 350-500 μm . W cieńszych skrawkach pozostaje niewiele nienaruszonych neuronów, ponieważ uszkodzenia spowodowane cięciem sięgają do 100 μm od powierzchni. W skrawkach grubszych natomiast dochodzi do nekroz w części środkowej, gdzie nie dociera wystarczająca ilość tlenu w czasie inkubacji (Yamamoto i McIllwain, 1966). Z jednego hipokampa można wykonać do ok. 10 skrawków. Skrawek po odcięciu pozostaje na ostrzu żyłki, skąd zdejmuje się go miękkim pędzelkiem lub przy pomocy strumienia płynu inkubacyjnego ze strzykawki. Następnie zakraplaczem o szerokim otworze przenosi się skrawki do komory, wypełnionej płynem inkubacyjnym przedmuchiwanym karbogenem. Skrawki spoczywają tam w osobnych przedziałach zanurzone w płynie, mieszanym przy pomocy mieszadła magnetycznego w temperaturze pokojowej. Pojedyncze skrawki są następnie przenoszone do doświadczalnej (rejestracyjnej) komory inkubacyjnej. Preparatyka nie powinna trwać dłużej niż 5 minut.

Rozwiązanie komory służącej do rejestracji aktywności bioelektrycznej zależy od potrzeb i możliwości danej pracowni. W pracowni autora jest używana komora wykonana z plexi, składająca się z przedziału, w którym pomiędzy dwoma siateczkami nylonowymi umieszcza się skrawek, oraz z zewnętrznej termostatowanej łaźni wodnej (ryc. 2). Przedział skrawka wykonany jest w formie zamkniętego od dołu cylindra o średnicy 1,5 cm i wysokości 1,7 cm. Do przedziału skrawka wpływa od dołu płyn inkuba-



Ryc. 1. A: Mózg świnki morskiej z usuniętym fragmentem kory z lewej półkuli w celu uwidocznienia hipokam-
 pa: p - półkula prawa, m - mózdzek, r - rdzeń przedłużony, hip - hipokamp. Zaznaczono sposób wycięcia
 skrawka
 B: Schemat skrawka hipokampa. AD - zakręt zębaty; CA 3, CA 1 - pola hipokampa; fim - strzepek
 hipokampa; pp - aksony neuronów kory entorinalnej; mf - aksony komórek granularnych zakrętu zębatego;
 Sch - kolaterale Schaffera, aksonów neuronów piramidowych CA 3. Zaznaczono warstwy w obrębie pola CA 1:
 alv - alveus; or - str. oriens; pyr - str. pyramidale; rad - str. radiatum; lac - str. lacunosum-molecula-
 re. Strzałki wskazują kierunek przewodzenia impulsów. Według Andersena i wsp. 1971, zmodyfikowane



Ryc. 2. Schematyczny przekrój komory do rejestracji aktywności bioelektrycznej skrawków mózgu. 1 - przedział, w którym pomiędzy dwoma siateczkami nylonowymi znajduje się skrawek; 2 - dolna część przedziału skrawka z dopływem płynu inkubacyjnego, elektrodą odniesienia i czujnikiem temperatury; 3 - łaźnia wodna; 4 - wpływ płynu inkubacyjnego; 5 - odsysanie płynu inkubacyjnego; 6 - dopływ karbogenu; 7 - końcówka mikro-manipulatora z zamocowaną mikroelektrodą wprowadzoną do skrawka; 8 - oświetlenie; 9 - elementy grzejne

cyjny, jego nadmiar jest odsysany od góry przez cienki wężyk połączony z pompką wodną. Ruchome umieszczenie odsysania pozwala na regulowanie poziomu płynu ponad górną powierzchnią skrawka (zazwyczaj 1-1,5 mm). W przedziale skrawka znajduje się ponadto chlorosrebrowa elektroda odniesienia układu rejestracji elektrycznej oraz miniaturowy czujnik układu regulacji temperatury. Woda znajdująca się pomiędzy zewnętrznymi ściankami komory a przedziałem skrawka jest ogrzewana, tak aby zapewnić żądaną temperaturę wewnątrz przedziału skrawka ($34-36^{\circ}\text{C}$ z dokładnością do $0,2^{\circ}\text{C}$). Rurka doprowadzająca płyn inkubacyjny przebiega przez łaźnię,

co ułatwia jego ogrzanie. Ponad powierzchnię płynu w przedziale skrawka jest kierowany nadmiar nawilżonego karbogenu, przedmuchującego płyn inkubacyjny w butli, skąd jest dostarczany do komory rejestracyjnej. Butla ta znajduje się ok. 70 cm powyżej komory. Prędkość przepływu grawitacyjnego ustala się przy pomocy zacisku na 1,5-3,0 ml/min, możliwe jest także zastosowanie pompy perystaltycznej, zapewniającej przepływ precyzyjnie regulowany. Do wykonania połączeń nadają się węże z jednorazowych zestawów infuzyjnych.

Istnieje możliwość podawania związków farmakologicznie czynnych do płynu inkubacyjnego przy pomocy pompy infuzyjnej, pomiędzy pojemnikiem z płynem a komorą rejestracyjną.

Umieszczenie komory rejestracyjnej na podwyższeniu umożliwia oświetlenie preparatu od dołu, wygodne jest jednocześnie zastosowanie oświetlenia od góry, wskazane jest zastosowanie oświetlaczy światłowodowych.

Do skrawka umieszczonego w komorze rejestracyjnej wprowadza się mikroelektrody stymulujące i rejestrujące pod kontrolą wzrokową w mikroskopie stereoskopowym. W czasie pierwszej godziny po wypreparowaniu skrawki nie wykazują reaktywności elektrycznej. Jest to spowodowane prawdopodobnie zmianą środowiska neuronów oraz urazem (Schwartzkroin, 1981).

Istnieje szereg wariantów wykonania elektrod stymulujących. Do stymulacji jednobiegunowej można stosować elektrody wykonane z drutu wolframowego o średnicy 0,2 mm, zaostrome elektrolitycznie lub w płomieniu palnika gazowego i izolowane lakierem lub szkłem. Średnica końca elektrody powinna wynosić ok. 10 μ m. Na ogół stosuje się elektrody o odizolowanym końcu na długości 0,2-0,3 mm. Gdy warunki doświadczalne wymagają stymulacji niewielkiego obszaru tkanki, długość odcinka odizolowanego powinna być znacznie mniejsza.

Do rejestracji najczęściej stosuje się mikroelektrody szklane, wykonywane z kapilar przy pomocy wyciągarki do mikroelektrod. Do pomiarów zewnątrzkomórkowych stosuje się mikroelektrody o średnicy końca 2-3 μ m i oporności 5-10 Mohm, wypełnione 4 M NaCl. Pomiar wewnątrzkomórkowy wymaga zastosowania mikroelektrod o średnicy końca wynoszącej 0,4-0,9 μ m i oporności 30-80 Mohm, wypełnionych 3 M roztworem octanu potasu. Do wykonania

mikroelektrod najlepsze jest szkło borokrzemowe, a do rejestracji pozakomórkowej mikroelektrody o zadowalających parametrach można wykonać z nieheparynowanych kapilar do hematokrytu.

Do zamocowania i umieszczania mikroelektrod w preparacie służą mikro-manipulatory, zapewniające dokładność przesuwu o kilka mikrometrów. Rejestracja wewnątrzkomórkowa wymaga przemieszczenia mikroelektrody wzdłuż jej osi z dokładnością 1 μm .

Dzięki charakterystycznej "lamellarnej" budowie hipokampa skrawek o grubości 300-500 μm wykonany poprzecznie do długiej osi hipokampa zawiera czteroelementową pętlę neuronalną (ryc. 1) (Andersen, 1971): szlak perforujący z kory entorinalnej do zakrętu zębatego, włókna mszyste, czyli aksony komórek granularnych zakrętu zębatego tworzące synapsy na dendrytach apikalnych neuronów piramidowych pola CA3, kolaterale Schaffera pochodzące z aksonów neuronów CA1, tworzące synapsy na dendrytach apikalnych neuronów piramidowych pola CA1, oraz aksony tych ostatnich, biegnące do kory entorinalnej. Przeprowadzone doświadczenia dotyczyły neuronów piramidowych pola CA1. Ciały tych komórek znajdują się w stratum pyramidale, zaś monosynaptyczne szlaki aferentne tego rejonu to oprócz kolaterali Schaffera biegnących w stratum radiatum także włókna komisuralne, pochodzące z kontralateralnego hipokampa, tworzące synapsy na dendrytach apikalnych w stratum radiatum i bazalnych w stratum oriens. Aksony neuronów CA1 przebiegają w alveus.

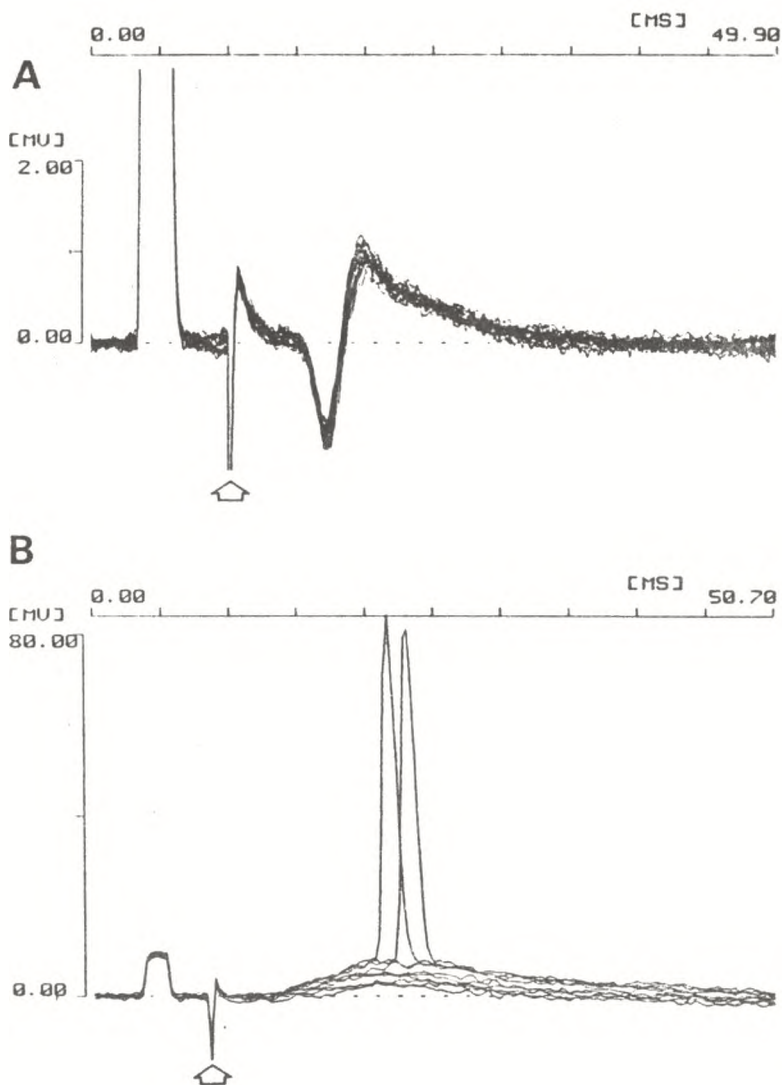
Stymulacja włókien aferentnych w str. radiatum lub str. oriens powoduje pobudzenie połączeń monosynaptycznych na dendrytach apikalnych i bazalnych komórek piramidowych pola CA1 hipokampa. Powstałe potencjały polowe można rejestrować mikroelektrodą pozakomórkową. Przy słabej stymulacji w warstwie synaptycznej rejestruje się falę ujemną, której polaryzacja zmienia się w warstwie ciał komórek nerwowych. Sygnał ten nosi nazwę "pozakomórkowego zbiorczego EPSP" (Lomo, 1971); jest on wywołany przepływem prądów związanych z generacją potencjałów postsynaptycznych. Silniejsza stymulacja wywołuje potencjał o zbliżonym przebiegu, lecz z nakładającą się nań szybką falą dodatnią w warstwie dendrytów, zmieniającą polaryzację w warstwie ciał komórek, noszącą nazwę "pozakomórkowego zbiorczego potencjału czynnościowego" (Lomo, 1971). Zbiorczy

potencjał czynnościowy powstaje w wyniku synchronicznych wyładowań iglicowych wielu neuronów. Przykład typowego potencjału polowego, rejestrowanego w str. piramidale przedstawia ryc. 3 A. Potencjały wywołane o podobnym przebiegu można rejestrować również w polu CA 3 i zakręcie zębatym przy stymulacji odpowiednich monosynaptycznych szlaków aferentnych.

Rejestracja wewnątrzkomórkowa z neuronów piramidowych CA1 przy słabej sile stymulacji pozwala na zapis pobudzeniowych potencjałów postsynaptycznych (EPSP). Przy większej sile bodźca depolaryzacja osiąga wartość progową i wywołuje potencjał czynnościowy (ryc. 3 B). Przy wartościach potencjału spoczynkowego neuronu powyżej -60 mV oprócz dodatniej fali EPSP obserwuje się późniejszą, ujemną falę hamulcowego potencjału postsynaptycznego (IPSP).

Przebieg w synapsach na neuronach hipokampa wykazuje kilka zjawisk tzw. wzmocnienia postaktywacyjnego, polegającego na wzroście amplitudy odpowiedzi na pobudzenie włókien presynaptycznych w wyniku stymulacji o odpowiednich parametrach. Zjawiska krótkotrwałe, prowadzące do wzrostu wydajności przekazywania synaptycznego w czasie setek milisekund do kilku minut, są zbliżone do obserwowanych w synapsach obwodowych (Racine i Milgram, 1983). Szczególne zainteresowanie wzbudziło natomiast długotrwałe wzmocnienie przekazywania synaptycznego (ang. long-term potentiation. LTP) odkryte w hipokampie w r. 1973 (Bliss i Lomo, 1973). LTP przejawia się trwającym *in vivo* do kilku tygodni wzrostem wydajności przekazywania w synapsach na włóknach nerwowych poddanych stymulacji serią bodźców o częstotliwości tępcowej. Szczególne właściwości LTP powodują, że zjawisko to jest atrakcyjne z punktu widzenia teoretycznych modeli procesów uczenia się i pamięci. Znamy również szereg wyników doświadczalnych, wskazujących na możliwość uczestniczenia procesów podobnych do LTP w warunkowaniu.

Na temat LTP istnieje obszerna literatura (przegląd: Teyler i DiScenna, 1987), przy czym wskazuje się na udział mechanizmów pre- i postsynaptycznych. Zastosowanie analizy statystycznej rozkładu amplitud pobudzeniowych potencjałów postsynaptycznych (EPSP) umożliwia określenie lokalizacji zmian w procesie przekazywania synaptycznego, odpowiedzialnych za wzrost jego wydajności (Voronin, 1979). Według hipotezy kwantowej



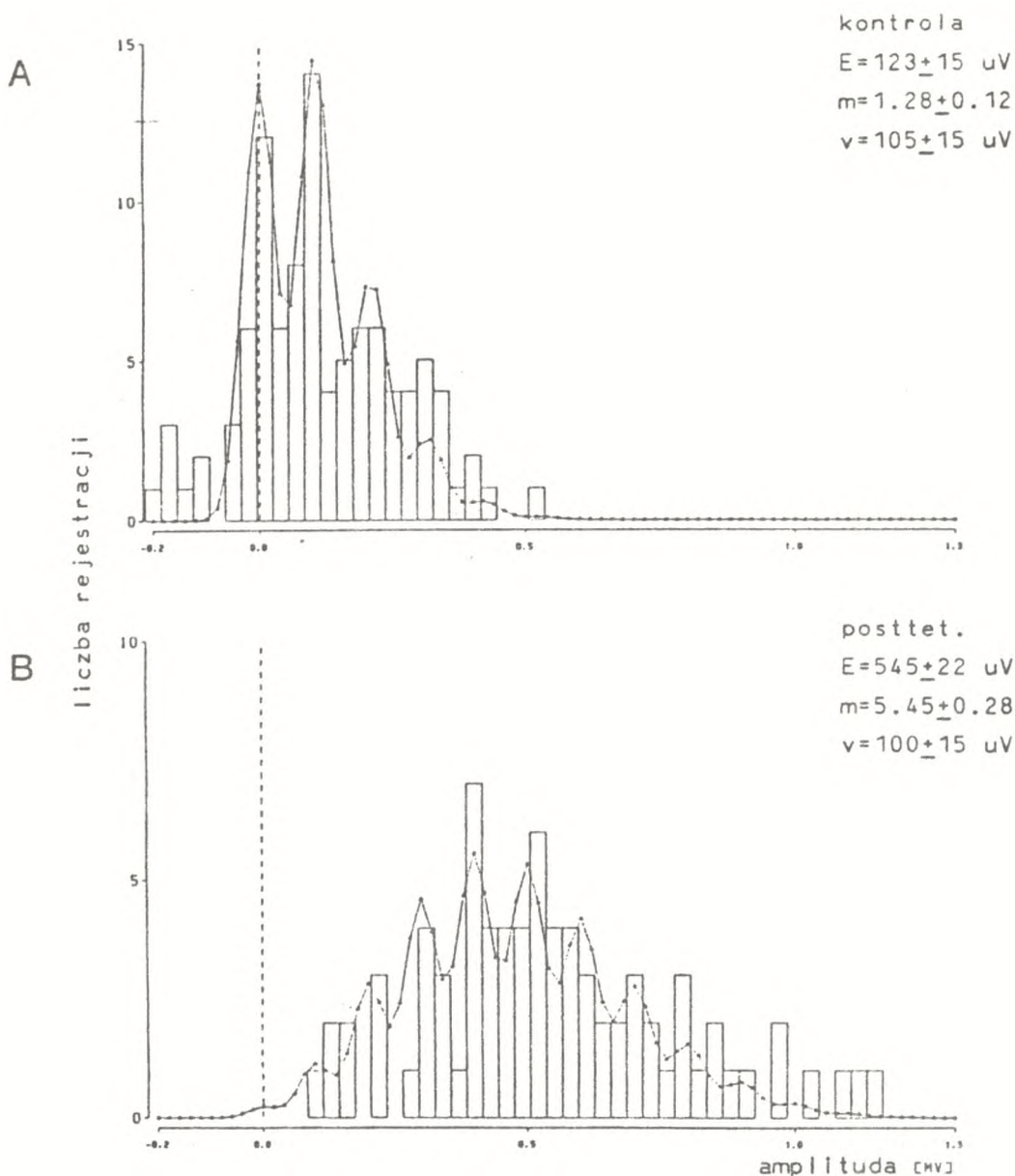
Ryc. 3. Typowe potencjały rejestrowane w str. piramidale w odpowiedzi na stymulację włókien aferentnych. A: potencjał polowy (zapis zewnątrzkomórkowy), nałożenie 10 pojedynczych przebiegów z silnie zaznaczonym zbiorczym potencjałem czynnościowym.

B: zapis wewnątrzkomórkowy, nałożenie 10 przebiegów. Widoczne pobudzeniowe potencjały postsynaptyczne (EPSP), dwa EPSP o największej amplitudzie wywołują potencjały czynnościowe. W początkowej części obu przebiegów znajduje się sygnał kalibracyjny 10 mV, strzałki oznaczają artefakt stymulacji

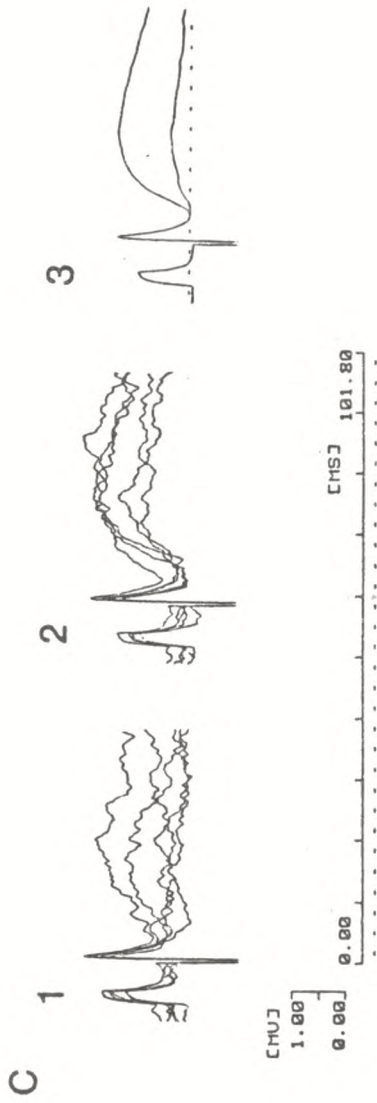
przebiegu synaptycznego, amplituda potencjału postsynaptycznego jest całkowitą wielokrotnością średniej amplitudy tzw. jednostkowego EPSP, powstałego w wyniku uwolnienia pakietu (kwantu) cząsteczek neuroprzebiegu przez element presynaptyczny. Średnia amplituda potencjału postsynaptycznego jest iloczynem średniej zawartości kwantowej m , czyli liczby uwolnionych kwantów i wielkości kwantu v , odpowiadającej amplitudzie jednostkowego EPSP. Jeżeli po zmodyfikowaniu procesu przebiegu wzrasta wartość parametru m , świadczy to o zmianach presynaptycznych; zmiany wartości parametru v mają na ogół charakter postsynaptyczny.

W celu wykonania analizy statystycznej rozkładu amplitud potencjałów postsynaptycznych po indukcji LTP rejestrowano 70-100 pojedynczych przebiegów kontrolnych i w 15-55 min. po zastosowaniu stymulacji tężkowej. Analizę prowadzono według dwóch metod (Hess i wsp., 1987). Wykazano, że za wzrost średniej amplitudy potencjału postsynaptycznego po indukcji LTP odpowiada głównie zwiększenie średniej liczby uwolnianych kwantów m , a więc mechanizm presynaptyczny (Voronin i wsp., 1987). W doświadczeniu zilustrowanym na ryc. 4 duży wzrost średniej amplitudy EPSP w okresie 15-30 minut po zastosowaniu stymulacji tężkowej nastąpił wyłącznie na skutek wzrostu wartości m przy niezmiennym v . Świadczy o tym przesunięcie histogramu w prawo, ku większym wartościom amplitud, bez zmian odległości pomiędzy szczytami, odpowiadającej amplitudzie jednostkowego EPSP.

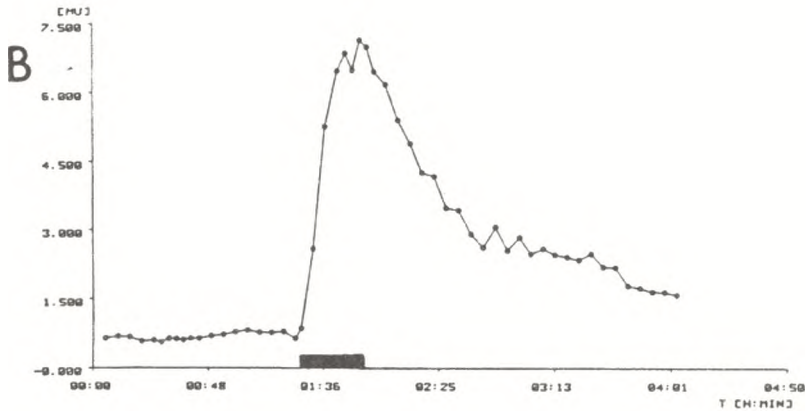
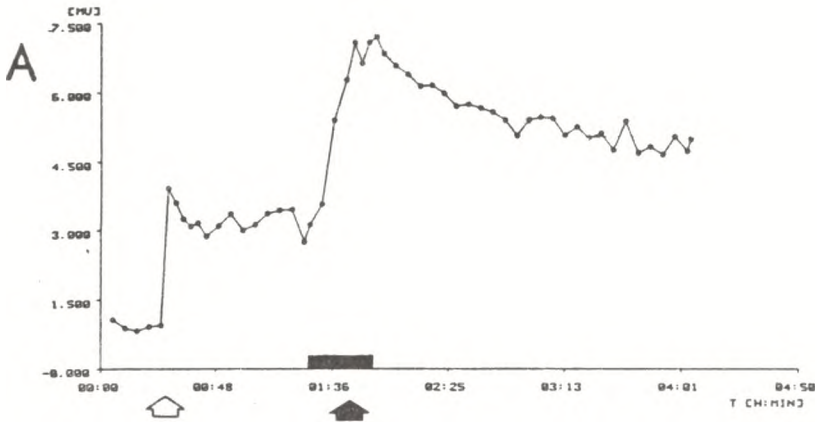
Wśród procesów regulujących aktywność komórek nerwowych szczególnie znaczenie ma fosforylacja białek. Istotną rolę w mechanizmie długotrwałego wzmocnienia przebiegu synaptycznego przypisuje się aktywacji kinazy białkowej C (De Graan i wsp., 1986). Enzym ten odgrywa kluczową rolę w transdukcji sygnałów, dostarczanych przez hormony, neuroprzebieg i czynniki wzrostowe, które aktywują różne funkcje metaboliczne i proliferację (Nishizuka, 1984). Estrы forbolu, związki aktywujące kinazę C, wywołują w skrawkach hipokampa efekty wzmocnienia przebiegu synaptycznego podobne do LTP (Malenka i wsp., 1986). Wyniki uzyskane przez autora potwierdzają tę hipotezę. Pod wpływem podania 2 μM 12, 13-dwuoctanu forbolu w płynie inkubacyjnym, w czasie pierwszych 20 min. nastąpił silny wzrost amplitudy rejestrowanych potencjałów (ryc. 5).



Ryc. 4. A, B: Doświadczalne (słupki) i teoretyczne (krzywe kropkowane) rozkłady amplitud pobudzeniowych potencjałów postsynaptycznych przed (A) i po indukcji długotrwałego wzmocnienia przewodnictwa synaptycznego (B). Podano wartości średniej amplitudy EPSP (E), średniej liczby uwalnianych kwantów neuroprzekaźnika (m) i wielkości kwantu (v)



Ryc. 4. C: Przykłady pojedynczych przebiegów w warunkach kontrolnych (C1) i po indukcji LTP (C2) oraz nałożenie uśrednień wszystkich przebiegów (C3) przed (krzywa dolna) i po indukcji LTP (krzywa górna)



Ryc. 5. Wpływ estru forbolu na amplitudę potencjału polowego
 A: stymulacja w str. radiatum, strzałka pusta oznacza kontrolną stymulację tężcową, gruba pozioma linia określa czas podawania estru forbolu. Powtórna stymulacja tężcowa nie wywołała dalszego wzrostu amplitudy rejestrowanego sygnału.
 B: stymulacja w str. oriens

Stymulacja tężcowa w str. radiatum w obecności estru nie powodowała dalszego wzrostu, w przeciwieństwie do kontrolnej stymulacji tężcowej. Zwiększona amplituda rejestrowanego sygnału utrzymywała się co najmniej 120 min. po zaprzestaniu podawania estru, kiedy zakończono doświadczenie.

Technika skrawków mózgu inkubowanych in vitro stała się często stosowanym narzędziem badawczym w neurofizjologii, neurofarmakologii i biochemii mózgu. Szczególnie istotna jest możliwość stosowania w tym samym preparacie manipulacji farmakologicznych i elektrofizjologicznych. Wydaje się, że z uwagi na swoje zalety, warta jest upowszechnienia i szerszego niż obecnie zastosowania w kraju.

Literatura

- Andersen P., Bliss T. V. P., Skrede K. K., 1971. Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Experimental Brain Research* 13, 222-238.
- Bliss T. V. P., Lomo T., 1973. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology* 232, 331-356.
- Buzaski G., Eidelberg E., 1982. Direct afferent excitation and long-term potentiation of hippocampal interneurons. *Journal of Neurophysiology* 48, 597-607.
- De Graan P., Lopes da Silva F., Gispen W., 1986. The role of hippocampal phosphoproteins in long-term potentiation. W: R. L. Isaacson i K. H. Pribram (red.) *The hippocampus*, Vol. 3, Plenum, New York.
- Eccles J. C., 1964. *Fizjologia synaps nerwowych*. PZWL, Warszawa.
- Hatton G. I., Doran A. D., Salm A. K., Tweedle C. D., 1980. Brain slice preparation: hypothalamus. *Brain Research Bulletin* 5, 405-414.
- Henderson G., Pepper C. M., Shefner S. A., 1982. Electrophysiological properties of neurones contained in the locus coeruleus and mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve in vitro. *Experimental Brain Research* 45, 29-37.
- Hess G., Kuhnt U., Voronin L. L., 1987. Quantal analysis of paired-pulse facilitation in quinea-pig hippocampal slices. *Neuroscience Letters* 77, 187-192.
- Katz B., 1967. *Nerve, Muscle and Synapse*. McGraw-Hill Book Co. New York.

- Linás R., Sugimori M., 1980. Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell somata in mammalian cerebellar slices. *Journal of Physiology* 305, 171-195.
- Lomo T., 1971. Patterns of activation in a monosynaptic cortical pathway: the perforant path input to the dentate area of the hippocampal formation. *Experimental Brain Research* 12, 18-45.
- Malenka R. C., Madison D. V., Nicoll R. A., 1986. Potentiation of synaptic transmission in the hippocampus by phorbol esters. *Nature* 321, 175-177.
- Miller J. J., 1981. Characteristics of neuronal activity in striatal and limbic forebrain regions maintained in vitro. W: Kerkut G. H. i Wheal H. V. (red.) *Electrophysiology of isolated mammalian CNS preparations*. Academic Press, London.
- Nishizuka Y., 1984. The role of Protein Kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* 308, 693-696.
- Racine R. J., Milgram N. W., 1983. Short-term potentiation phenomena in the rat limbic forbrain. *Brain Research* 260, 201-216.
- Richards C. D., McIllwain H. 1967. Electrical responses in brain samples. *Nature* 215, 704-707.
- Schwartzkroin P. A., 1975. Characteristics of CA1 neurons recorded intracellularly in the hippocampal in vitro slice preparation. *Brain Research* 85, 423-436.
- Schwartzkroin P. A., 1981. To slice or not to slice. W: Kerkut G. A. i Wheal H. V. (red.) *Electrophysiology of isolated mammalian CNS preparations*. Academic Press, London.
- Teyler T. J., DiScenna P., 1987. Long-term potentiation. *Annual Review of Neuroscience* 10, 131-161.
- Voronin L. L., 1979. Quantal analysis of postsynaptic potentials. *Neurophysiology (Kiev)* 11, 491-505.
- Voronin L. L., Kuhnt U., Hess G., Ehrenreich L., 1987. Statistical analysis of hippocampal long-term potentiation evoked by afferent and intracellulat tetanization in vitro. *Neuroscience Supplement* 22, 41.
- Yamamoto C., McIllwain H. 1966. Electrical activities in thin sections form the mammalian brain maintained in chemically defined media in vitro. *Journal of Neurochemistry* 13, 1333-1343.

Переживающие срезы гиппокампа
в нейрофизиологических исследованиях

Резюме

Переживающие срезы мозга являются удобной моделью для исследования деятельности мозга млекопитающих на клеточном уровне. Преимущества этого метода это возможность менять состав среды, омывающей срезы, отсутствие пульсации ткани, связанной с экспериментами *in vivo* и контроль манипуляции микроэлектродами посредством микроскопа. Использование техники переживающих срезов мозга обеспечивает возможность длительного внутриклеточного отведения электрической активности нейронов. Особенно срезы гиппокампа привлекают внимание многих исследователей. Описан метод изготовления и инкубации срезов гиппокампа. Также представлены некоторые результаты, полученные при использовании вне- и внутриклеточного отведения из нейронов гиппокампа, как влияние эстров фторбоньа на синаптическую передачу и квантовый анализ долговременной потенциации этой передачи.

THE HIPPOCAMPAL SLICE IN VITRO IN NEUROPHYSIOLOGICAL RESEARCH

Summary

The isolated brain slices have been accepted as an useful preparations to investigate the function of mammalian brain at the cellular level. The advantages of the technique include control over the environment of the neurons, absence of pulsation of the tissue which accompanies in vivo experiments and visual control over the placement of electrodes. The technique offers a possibility of long-term stable intracellular recordings of bioelectrical activity. Particular interest has been focused on slices prepared from hippocampus. In the paper, the method of slicing and incubation of the hippocampus from guinea-pig is described. In addition, some results obtained with extra- and intracellular recording, including the influence of phorbol esters on synaptic transmission and quantal analysis of long-term potentiation of the transmission are presented.