

УДК 577.352.54

Бурковський Михайло Олексійович

студент кафедри прикладної фізики

Національного технічного університету України

«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

ЗМІНА ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНИХ ПАРАМЕТРІВ НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПА ПРИ ЕКСАЙТОТОКСИЧНОМУ ПОШКОДЖЕННІ

Анотація. У роботі було досліджено зміни електрофізіологічних характеристик, параметрів потенціалу дії, натрієвої та калієвої провідності нейронів гіпокампа щура при ексайтотоксичному пошкодженні. Отримані значення зміни мембранної провідності вказують на те що головну роль в змінах параметрів імпульсації пошкодженого нейрона відіграє зменшення натрієвої провідності.

Ключові слова: *глутамат натрію, гіпокамп, ексайтотоксичність, провідність, потенціал дії, іонні канали, імпульсація, деполяризація.*

Вступ. Здатність нейрона проводити, передавати та отримувати електричні сигнали зумовлена відкриттям та закриття специфічних білкових іонних каналів. Тимчасова зміна проникності поверхні клітини для іонів Na^+ та K^+ визначає утворення потенціалу дії, що в свою чергу забезпечує зв'язок нейронів між собою та іншими клітинами організму. Кожен відкритий канал дозволяє лише невеликій кількості іонів переміститись з однієї сторони мембрани в іншу, при цьому викликаючи значні зміни мембранного потенціалу.

В експерименті культивовані нейрони гіпокама щура піддавались ексайтотоксичному пошкодженню у вигляді аплікації натрієвої солі

глутамінової кислоти в концентрації 100 мкмоль/л, в результаті чого були зафіксовані та проаналізовані зміни електрофізіологічних параметрів нейрона. Головну увагу в роботі зосереджено на зв'язку зміни значення Na^+ та K^+ провідності зі змінами характеристик потенціалу дії: частоти генерації, амплітуди, тривалості, швидкості деполяризації та реполяризації.

Проведення експерименту. Електрофізіологічну реєстрацію струмів від нейронів гіпокампа щура проводили з використанням підсилювача AxoClamp 200B в конфігурації «ціла клітина» при кімнатній температурі з використанням зовнішньоклітинного фізіологічного розчину наступного складу (ммоль/л): NaCl – 140, KCl – 3, CaCl_2 , MgCl_2 – 2, Hepes – 10, глюкоза – 12, pH – 7,4. Електроди-піпетки заповнювали внутрішньоклітинним розчином (ммоль/л): глюканат калію – 100, KCl – 50, MgCl_2 – 5, EGHTA – 10, Hepes – 20, pH – 7,4 [1, с. 4].

Дослід розділявся на дві частини: реєстрація сигналу від клітин що перебували в контролі та реєстрація сигналу від тих самих клітин після впливу L-натрієвої солі глутамінової кислоти (Glu) у концентрації 100мкМ/л.

В ході проведення електрофізіологічного дослідження після формування конфігурації «ціла клітина» безпосередньо за показниками підсилювача визначали потенціал спокою нейрона, після чого нейрон в режимі фіксації потенціалу підтримували при потенціалі -70 мВ, пропускаючи відповідний гіперполяризуючий струм (10-150 пА). Нейрони активували прикладанням деполяризуючих командних імпульсів тривалістю 200 мс від підтримуваного потенціалу з інкрементом 10 мВ. При цьому реєстрували відповідний потенціалзалежний (інтегральний) струм [1, с. 4].

Після контрольної реєстрації експериментальну камеру протягом 5 хвилин перфузували зовнішнім фізіологічним розчином з доданою натрієвою сіллю глютамінової кислоти в концентрації 100 мкмоль/л. Після відмивання нормальним зовнішнім розчином електрофізіологічні характеристики нейрона вимірювали повторно. Значення амплітуди струмів коректувалось з врахуванням змін струму витоку, викликаного змінами опору мембрани пошкоджених нейронів. На Рис.1 проілюстровано приклад зареєстрованого потенціалзалежного струму нейрона гіпокампа щура до та після впливу глютамату.

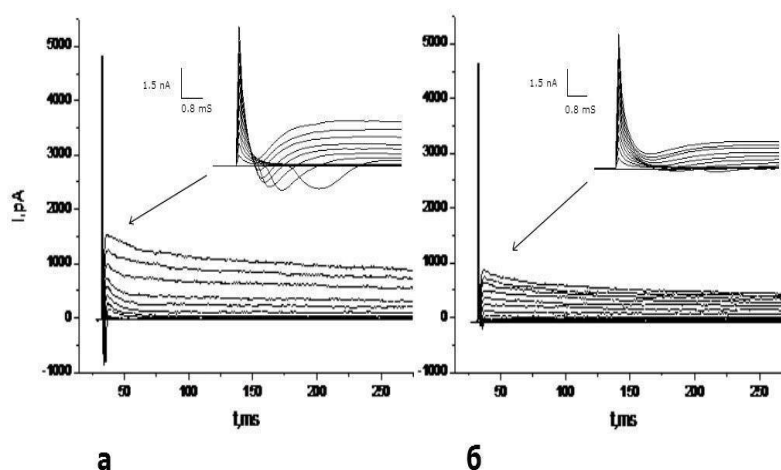


Рис.1. Потенціал-залежний струм культивованих нейронів гіпокампа щура в контролі (а) та після ексайтотоксичного пошкодження(б)

В ході досліду вдалось записати сигнал потенціал-залежного струму в контролі та після впливу глютамата для 5-ти клітин. Подальший аналіз струму нейронів та вивчення заміни його характеристик проводили за допомогою програмного пакета Clampfit 10.3. Визначенні в процесі обробки сигналу характеристики нейронів представлено у вигляді: середнє $\pm$ стандартна похибка середнього. Гіпотези про відмінність відповідних середніх перевірялась за критерієм Стюдента з рівнем значимості 0,05.

Результати і обговорення. В ході досліду вдалось записати сигнал потенціал-залежного струму в контролі та після впливу глютамата для 5-ти

клітин. Подальший аналіз струму нейронів та вивчення заміни його характеристик проводили за допомогою програмного пакета Clampfit 10.3.

Отримані результати показують що середнє значення опору та потенціалу спокою клітин в контролі: $R=2,1\pm0,8\text{Гом}$, $U=-51,8\pm5,4\text{мВ}$ та після впливу глутамату: $R=1,1\pm0,4\text{ ГОм}$ $U=-27,4\pm7,2\text{ мВ}$, в свою чергу значення провідностей для натрієвого струму при фіксованому потенціалі величиною $+40\text{мВ}$ змінюється від $-1000\pm200\text{пА}$ до $-500\pm100\text{пА}$ ($40\pm9\%$), а калієвої провідності від $1100\pm200\text{пА}$ до $800\pm200\text{пА}$. ($25\pm8\%$). Гіпотези про відмінність відповідних середніх перевірялась за критерієм Стюдента з рівнем значимості 0,05.

Потенціал дії для нейрона після ексайтотоксичного пошкодження [1, с. 6]. відповідно до експериментальних даних має наступний вигляд (Рис.2).

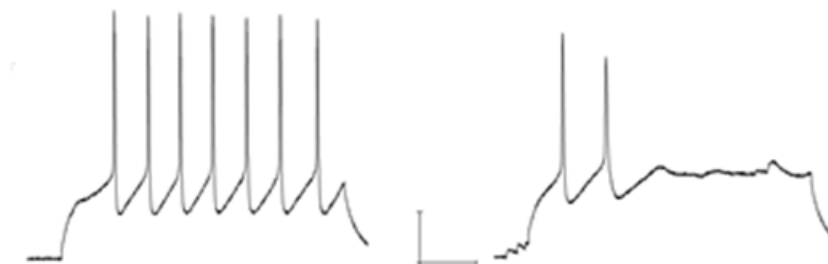


Рис. 2. Потенціал дії нейронів гіпокампа до(ліворуч) та після(праворуч) аплікації глутамату. Калібрування: 20мВ, 20с.

У якості характеристики що описує 5 хвилинний вплив глутамату у концентрації 100 мкМ на клітину гіпокампа виберемо значення вхідного та вихідного струмів при мембранному потенціалі $U=+40\text{ мВ}$. Зміни характеристик потенціалу дії в наслідок зміни провідності каналів відповідають: амплітуда ПД зменшилась від 91 ± 4 до $65\pm5\text{ мВ}$, тривалість ПД збільшилась від $4,3\pm0,4$ до $9,5\pm1,6\text{ мс}$, максимальна швидкість деполяризації змінилась від 56 до 27 мВ/мс, максимальна швидкість реполяризації змінилась від -29 до -20 мВ/мс.

Отримані результати кількісно характеризують ексайтотоксичний вплив на основні електрофізіологічні характеристики нейронів та свідчать, що описані зміни, викликані пошкодженням у характері імпульсації нейрона виникають головним чином завдяки зменшенню потенціал-залежного натрієвого струму.

Висновки. В роботі встановлено, що в наслідок ексайтотоксичного пошкодження глутамату суттєво (приблизно удвічі) зменшуються потенціал спокою, опір мембрани та амплітуда натрієвого струму, а також помірно (близько 20%) зменшується амплітуда калієвого струму. Дані результати кількісно описують ексайтотоксичний вплив на основні електрофізіологічних характеристик нейронів (порогового значення, амплітуди, швидкості деполяризації та реполяризації), та свідчать що описані зміни в характері імпульсації культивованих нейронів гіпокампа виникають головним чином за рахунок зменшення потенціал-залежного натрієвого струму. Також в процесі аналізу отриманих результатів у 40% клітин спостерігався швидкоінактивуючий вихідний (калієвий) струм зі значною зміною своєї амплітуди (приблизно удвічі) . Характерна зміна даної провідності викликає великий інтерес та потребує додаткового вивчення через малу вибірку прояву даного ефекту.

Оскільки концентрація глутамату в головному мозку підвищується в широкому колі нейродегенеративних захворювань, то отримані дані зміни характеристик потенціалу дії можуть бути використані для подальшого вивчення протекторних можливостей деяких речовин.

Література

1. Протекторна дія пептиду пролін-гліцин-пролін на електрофізіологічні властивості культивованих нейронів гіпокампа при ексайтотоксичному пошкодженні / В.Ю. Маслов, М.С. Веселовський, А.О. Москалюк та ін.— Фізіологічний журнал Т.60 №2, 2014.