

ЗМІНИ ЕЛЕКТРОФІЗІОЛОГІЧНИХ ХАРАКТЕРИСТИК КУЛЬТИВОВАНИХ НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПА ЩУРА ПРИ ЕКСАЙТОТОКСИЧНОМУ ПОШКОДЖЕННІ

М. О. Бурковський¹, В. Ю. Маслов²

¹Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

²Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України

Анотація

Досліджено зміни електрофізіологічних характеристик (потенціалу спокою, опору мембрани та амплітуди потенціал-залежного струму) культивованих нейронів гіпокампа щура при ексайтотоксичному пошкодженні, викликаному аплікацією натрієвої солі глютамінової кислоти в концентрації 100 мкмоль/л протягом 5 хвилин. Встановлено, що при пошкодженні суттєво (приблизно удвічі) зменшуються потенціал спокою, опір мембрани та амплітуда натрієвого струму, а також помірно (близько 10 %) зменшується амплітуда калієвого струму. Отримані результати кількісно характеризують ексайтотоксичний вплив на основні електрофізіологічні характеристики нейронів та свідчать, що описані раніше зміни, викликані пошкодженням, у характері імпульсації нейронів виникають головним чином завдяки зменшенню потенціал-залежного натрієвого струму.

Ключові слова: гіпокамп, ексайтотоксичне пошкодження, глютамат натрія, провідність

Вступ

Глутамінова кислота (глутамат), найпоширеніший збуджувальний нейромедіатор в центральній нервовій системі, при патологічних станах, викликаних порушенням мозкового кровопостачання, вивільняється у міжклітинний простір та негативно впливає на нейрони, викликаючи їх додаткове пошкодження або загибель. Таку властивість глютамату було використано для розробки моделі глютаматної ексайтотоксичності, експериментального підходу, що надає можливість досліджувати процеси пошкодження нейронів на культивованих клітинах. Раніше було встановлено [1], що ексайтотоксичне пошкодження призводило до змін імпульсації культивованих нейронів гіпокампа у відповідь на прикладання деполяризуючого імпульсу струму: зменшувалась частота генерації потенціалів дії та частка нейронів з тонічним характером імпульсації. Такі зміни, очевидно, мають бути пов'язані зі змінами характеристик потенціал-залежних мембранних провідностей. Метою даної роботи було визначення впливу глютамату на амплітуду натрієвого та калієвого струму в культивованих нейронах гіпокампа.

1. Методика

1.1. Культивування нейронів гіпокампа

Новонароджених щурів анестезували та декапітували. Виділений гіпокамп протягом 10 хв обробляли розчином трипсину в концентрації 0,025 % при температурі 34°C. За допомогою пастерівських піпеток різного діаметру клітини дисоціювали та висівали на покритті поліарнітіном пластикові чашки Петрі

та культивували у середовищі наступного складу: 10 % кінська сироватка, 2,3 г/л NaHCO₃, 6 мг/мл інсуліну, 100 од/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину. На третю добу культивування для пригнічення росту гліальних клітин на добу додавали 5 мкМ/л цитозин-А-D-арабіно-фуранозид. Електрофізіологічні дослідження проводились через 7–10 днів після початку культивування.

1.2. Електрофізіологія

Електрофізіологічну реєстрацію 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, CaCl₂, MgCl₂ – 2, Hepes – 10, глюкоза – 12, рН – 7,4. Електроди-піпетки заповнювали внутрішньоклітинним розчином (ммоль/л): глюканат калію – 100, KCl – 50, MgCl₂ – 5, EGTA – 10, Hepes – 20, рН – 7,4. 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 –70мВ, пропускаючи відповідний гіперполяризуючий струм (10 – 150пА). Опір мембрани визначали за значенням струму при прикладанні командного потенціалу –10мВ. Нейрони активували прикладанням деполяризуючих командних імпульсів тривалістю 200 мс від підтримуваного потенціалу з інкрементом 10 мВ. При цьому реєстрували відповідний потенціал-залежний (інтегральний) струм, характеристики якого визначали при подальшому аналізі

зі за допомогою програмного пакета **Clampfit 10.3**. Після контрольної реєстрації експериментальну камеру протягом 5 хвилин перфузювали зовнішнім фізіологічним розчином з доданою натрієвою сіллю глутамінової кислоти в концентрації 100 мкмоль/л. Після відмивання нормальним зовнішнім розчином електрофізіологічні характеристики нейрона вимірювали повторно. Значення амплітуди струмів коректувалось з врахуванням змін струму витoku, викликаного змінами опору мембрани пошкоджених нейронів. Дані представлено у вигляді: середнє $\pm$ стандартна похибка середнього. Гіпотези про відмінність відповідних середніх перевірялась за критерієм Стюдента з рівнем значимості 0,05.

2. Результати та обговорення

В конфігурації «цїла клітина» в режимі фіксації потенціалу було визначено електрофізіологічні характеристики п'яти культивованих нейронів гіпокампа щура. Середні значення потенціалу спокою та опору мембрани склали відповідно 42 ± 10 мВ та $2,0 \pm 0,7$ ГОм. У відповідь на прикладання командного деполаризуючого імпульсу спостерігали розвиток інтегрального потенціал-залежного струму, репрезентативна реєстрація якого представлена на рис. 1, а. У якості характеристик натрієвої та калієвої мембранних провідностей використовували відповідно значення максимальної амплітуди вхідного струму та максимальної стаціонарної компоненти вихідного струму при командному потенціалі +40 мВ.

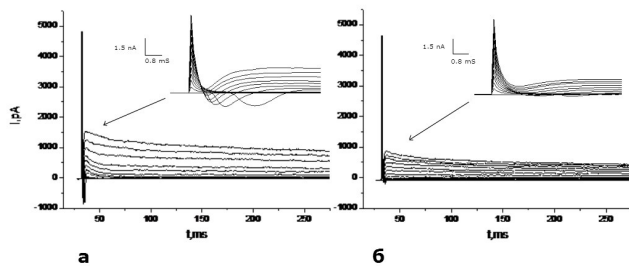


Рис. 1. Потенціал-залежні струми культивованого нейрона гіпокампа щура в контролі (а) та після ексайтотоксичного пошкодження (б).

Середнє значення максимального вхідного (натрієвого) струму склало -1100 ± 200 пА, а вихідного (калієвого) 1500 ± 300 . Аплікація глутамату призводила до суттєвих змін електрофізіологічних характеристик, а саме: зменшення приблизно удвічі потенціалу спокою, опору мембрани та амплітуди вхідного струму, а також помірне (близько 10 %) зменшення амплітуди вихідного струму. Середнє значення потенціалу спокою для пошкоджених нейронів склало -28 ± 9 мВ, опору мембрани $1,2 \pm 0,3$ ГОм, вхідного струму -550 ± 150 пА та вихідного 1300 ± 200 пА. Відповідні репрезентативні реєстрації потенціал-залежних струмів представлені на рис. 1, б. Отримані дані свідчать про істотне погіршення стану культивованих нейронів гіпокампа

при аплікації глутамату, а також у суттєву відмінність у стійкості до ексайтотоксичного пошкодження натрієвих та калієвих потенціал-керованих каналів.

Зважаючи на невеликий розмір вибірки та істотну розбіжність характеристик, що визначались, у різних клітин, статистичний аналіз було проведено для нормалізованих на контроль відповідних значень. Результати статистичного аналізу представлені на діаграмі рис. 2. Зміни опору, потенціалу спокою та вхідного струму були статистично достовірними, тоді як вихідного струму виявились статистично не достовірними.

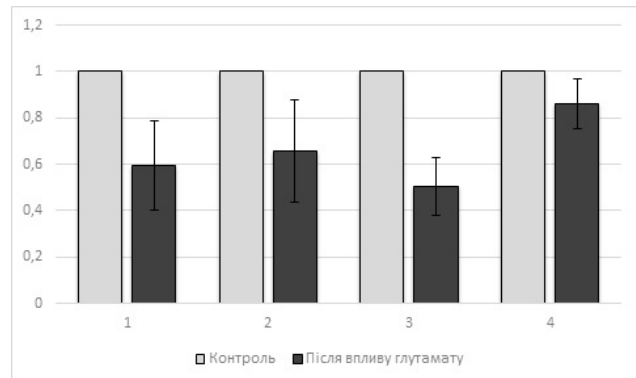


Рис. 2. Статистичний аналіз змін електрофізіологічних характеристик культивованих нейронів гіпокампа щура при ексайтотоксичному пошкодженні. Представлено зміни опору мембрани* (1), потенціалу спокою* (2), максимального вхідного струму* (3) та максимального вихідного струму (4). Ексайтотоксичне пошкодження викликали аплікацією натрієвої солі глутамінової кислоти в концентрації 100 мкмоль/л протягом 5 хв.
* – зміни статистично достовірні, $p < 0,05$.

Висновки

Аплікація натрієвої солі глутамінової кислоти призводить до наступних змін електрофізіологічних характеристик культивованих нейронів гіпокампа щура: зменшення приблизно удвічі потенціалу спокою, опору мембрани та амплітуди вхідного струму, а також помірне (близько 10 %) зменшення амплітуди вихідного струму. Отримані результати кількісно характеризують ексайтотоксичний вплив глутамату на основні електрофізіологічні характеристики нейронів та свідчать, що описані раніше зміни, викликані пошкодженням, у характері імпульсації виникають головним чином завдяки зменшенню потенціал-залежного натрієвого струму.

Перелік використаних джерел

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. — С. 3–11.