

МЕТОДИ РЕЄСТРАЦІЇ ЕЛЕКТРИЧНИХ СИГНАЛІВ ВІД НЕЙРОНІВ МАЛОГО ДІАМЕТРА.

С. В. Листопад^{1,a}, О. Е. Пурнинь²

¹ Навчально-науковий Фізико-технічний інститут

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

Анотація

У цій статті ми надаємо огляд електрофізіологічних методів реєстрації, зокрема, їх принципи, переваги і недоліки, щоб визначити найбільш оптимальний метод для реєстрації електричних сигналів від нейронів малого діаметра.

Ключові слова: нейрон, електрофізіологічні реєстрації: позаклітинна реєстрація, внутрішньоклітинна реєстрація, patch clamp

Вступ

Нейрони є основними структурними і функціональними одиницями нервової системи, які відповідають за отримання, обробку та передачу інформації за допомогою електричних і хімічних сигналів.

Електрична активність нейрона виникає внаслідок руху заряджених частинок, головним чином неорганічних іонів, таких як натрій Na^+ , калій K^+ і хлор Cl^- , через клітинну мембрану.

Натрій-калієвий насос відповідає за підтримку мембранного потенціалу спокою. Він транспортує іони Na^+ із клітини в обмін на іони K^+ у клітину. (Рис. 1) Цей обмін іонами спричиняє негативний мембранний потенціал спокою, який становить приблизно -70 мВ у більшості нейронів.

У стані спокою мембрана нейрона називається поляризованою, а внутрішня частина заряджена негативно відносно зовнішньої. Активні нейрони викликають зміни мембранного потенціалу в інших нейронах. Якщо зміна є достатньо великою, вона запускає потенціал дії, який включає швидку деполяризацію та подальшу реполяризацію мембрани.

Під час деполяризації відкриваються натрієві канали, дозволяючи іонам Na^+ надходити в клітину, внаслідок чого потенціал підіймається до 40 мВ. Коли мембранний потенціал досягає свого піку, натрієві канали закриваються, а напругозалежні калієві канали відкриваються, дозволяючи іонам K^+ виходити з клітини. Цей вихід іонів K^+ призводить до реполяризації, відновлення мембранного потенціалу до стану спокою. (Див. Рис. 2)

Електрофізіологічні реєстрації необхідні для вивчення електричних властивостей нейронів. Для вимірювання мембранного потенціалу, іонних струмів і потенціалів дії нейронів за різних умов використовуються різні електрофізіологічні методи. Ці методи

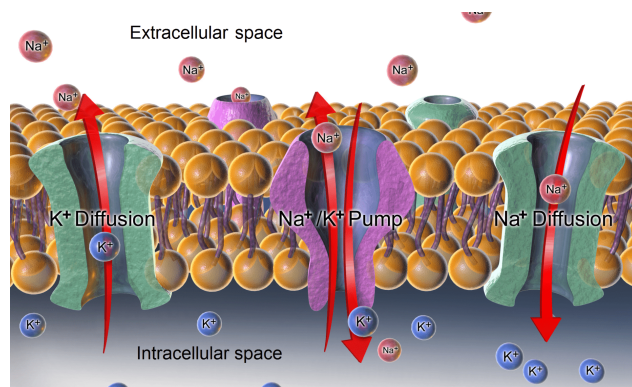


Рис. 1. Градієнти концентрації іонів через клітинну мембрану. Рисунок взятий з [1]

класифікують на три основні категорії: внутрішньоклітинна реєстрація, позаклітинна реєстрація та техніка patch clamp. На Рис. 3 показано, як електрод розміщується в залежності від типу реєстрації.

1. Внутрішньоклітинна реєстрація

При використанні внутрішньоклітинної реєстрації, мікроелектрод вводять всередину нейрона та вимірюють різницю потенціалів між електродом, який розташовується поза межами клітини (електрод порівняння) та кінцем внутрішньоклітинного електрода. Завдяки цій реєстрації ми можемо записати сигнали нейронної мембрани з високим відношенням сигнал/шум. Також цей метод дає високу роздільну здатність при записі мембранних потенціалів та струмів, що може бути корисним для вивчення нейронів малого діаметру. Але при використанні цього методу можна пошкодити клітинну мембрану, тому мікроелектрод потрібно обережно вводити в нейрон.

^alystopadserhii14@gmail.com

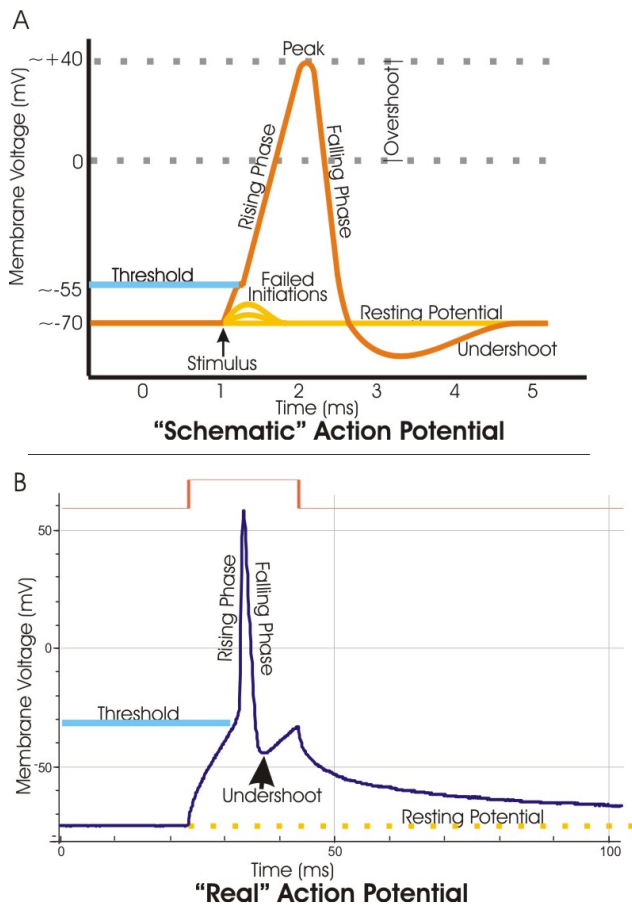


Рис. 2. Потенціал дії нейронів. Рисунок взятий з [2]

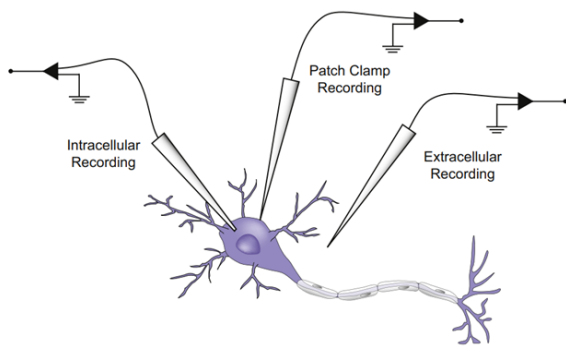


Рис. 3. Три категорії електрофізіологічних реєстрацій. Рисунок взятий з [3]

2. Позаклітинна реєстрація

Вимірювання в позаклітинній реєстрації проводять шляхом розміщення електроду в позаклітинній рідині, поблизу мембрани. Це дозволяє вимірювати електричні сигнали не порушуючи мембрану клітини. На відміну від внутрішньоклітинної реєстрації цей метод є неінвазивним. Але зареєстровані сигнали мають меншу роздільну здатність, тому можуть неточно відображати активність нейронів малого діаметру.

3. Техніка patch clamp

Техніка patch clamp вимагає встановлення щільного контакту між мікропіпеткою та клітинною мембраною. Завдяки високому опору ущільнення між піпеткою та клітинною мембраною можна досліджувати окремі іонні канали. Реєстрації patch clamp має різні конфігурації: приєднання до клітини, ціла клітина, вирізана ділянка (зсередини-назовні або назовні-всередину) (Рис. 4). Конфігурації patch clamp, зокрема таблиця 1 з їх перевагами та недоліками, наведені в книзі [3].

Приєднання до клітини (cell-attached)

В цій конфігурації мікроелектрод приєднується до мембрани клітини, не входячи в сам нейрон. Завдяки цій конфігурації можна вивчати активність нейронів малого діаметру без зміни їх внутрішнього середовища.

Ціла клітина (whole-cell)

У цьому режимі, після встановлення герметичного контакту між мікроелектродом та мембраною клітини, тонкий шар мембрани всередині мікроелектрода руйнується, створюючи електричний контакт між електролітом у мікроелектроді та цитоплазмою клітини.

Вирізана ділянка

Зсередини-назовні (inside-out) – після утворення герметичного контакту, піпетка відривається від клітини разом з мембраною. Мембрана відривається зі сторони внутрішнього середовища клітини, в результаті чого внутрішньоклітинна сторона мембрани повернута назовні. Це дозволяє вивчати індивідуальні іонні канали та їх реакцію на зміни внутрішнього середовища клітини, що імітується в мікроелектроді. Зсередини-назовні конфігурація дозволяє оцінити вплив зовнішньоклітинних речовин на активність каналів.

Назовні-всередину (outside-out) – мембрана відривається зі сторони зовнішнього середовища клітини, і зовнішня сторона мембрани повернута всередину. Це дозволяє вивчати реакцію іонних каналів на зміни зовнішнього середовища клітини, яке імітується в мікроелектроді. Назовні-всередину конфігурація корисна для вивчення впливу зовнішніх речовин на активність іонних каналів.

4. Обговорення

Внутрішньоклітинна реєстрація надає перевагу в вимірюванні мембранних потенціалів і струмів з високою роздільною здатністю, що особливо корисно при дослідженні нейронів малого діаметру. Однак цей метод є інвазивним і є ризик пошкодити клітинну мембрану під час введення електрода.

В позаклітинній реєстрації ж ризику пошкодження мембрани немає і цей метод реєстрації є менш інвазивним. Однак через нижчу роздільну здатність

Таблиця 1. Відносні переваги та недоліки різних конфігурацій patch clamp

Конфігурація	Переваги	Недоліки
Приєднання до клітини.	Можна записати окремі іонні канали, і властивості каналів не змінюються. Фізіологічно релевантне, оскільки клітина нешкоджена. Найпростіша конфігурація фіксатора.	Точний потенціал патчу невідомий. Непросто контролювати середовище окремих іонних каналів.
Ціла клітина	Здатність фармакологічно маніпулювати цитоплазмою клітини. Відносно велика величина струму полегшує вимірювання.	Цитоплазма клітини є безперервною з реєструючим електродом, тому вміст клітини може розріджуватися або витікати.
Вирізана ділянка (зсередини-назовні або назовні-всередину)	Записи можна робити з окремих іонних каналів. Чудовий контроль навколишнього середовища як над внутрішньоклітинними, так і позаклітинними сторонами окремих іонних каналів.	Існує ризик зміни властивостей каналу через суттєві зміни клітинного середовища.

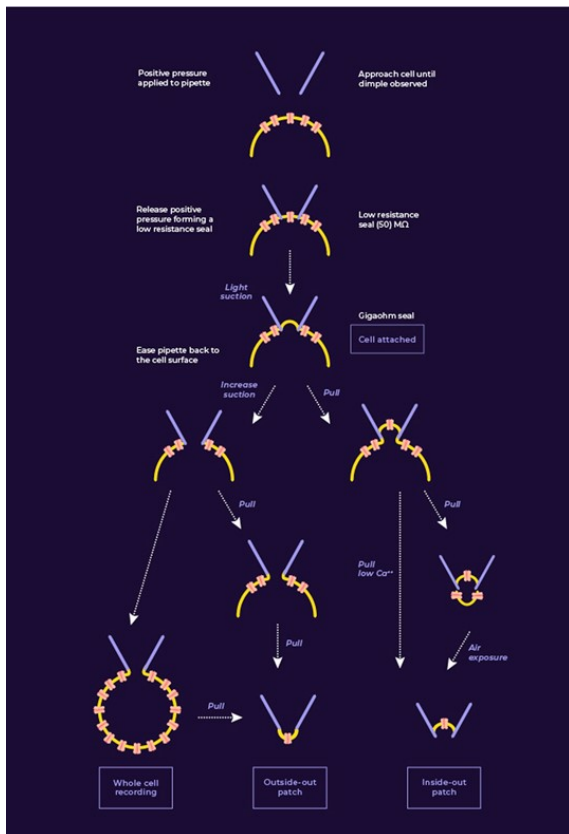


Рис. 4. Техніка patch clamp. Рисунок взятий з [4]

цей метод може неточно відображати активність нейронів малого діаметру.

Техніка patch clamp надає декілька конфігурацій, які дозволяють вивчати окремі іонні канали та їх реакцію на зміни в зовнішньому та внутрішньому клітинному середовищі. При використанні конфігурації приєднання до клітини ми можемо отримати інформацію про функціонування нейронів малого діаметру без істотної зміни їх внутрішнього середовища.

Висновки

Внутрішньоклітинна реєстрація виявляється найбільш оптимальним методом для запису електричних сигналів від нейронів малого діаметра. Цей метод реєстрації дає можливість вимірювати мембранні потенціали і струми з високою роздільною здатністю, які є важливими для розуміння електричних властивостей і функцій цих нейронів. Однак недоліком є можливість пошкодити клітинну мембрану.

Методи позаклітинної реєстрації та техніки patch clamp також можуть стати у нагоді при дослідженні нейронів малого діаметру, однак вони мають нижчу роздільну здатність та потенційні зміни у клітинному середовищі.

Зрештою вибір конкретного методу реєстрації має базуватись на конкретних потребах дослідника.

Перелік використаних джерел

1. *Wikipedia contributors*. Resting potential — Wikipedia, The Free Encyclopedia. — 03.2022. — URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Resting_potential.
2. *Wikipedia contributors*. Threshold potential — Wikipedia, The Free Encyclopedia. — 02.2023. — URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Threshold_potential.
3. *Carter M., Shieh J. C.* Guide to research techniques in neuroscience. — Academic Press, 2015.
4. *Tozer A., Forsythe I.* Electrophysiology Fundamentals, Membrane Potential and Electrophysiological Techniques // *Neuron News and Research*. — 2022. — Oct. 3. — URL: <https://www.technologynetworks.com/neuroscience/articles/electrophysiology-fundamentals-membrane-potential-and-electrophysiological-techniques-359363>.