

## 1. ЗАГАЛЬНІ ТЕОРЕТИЧНІ ВІДОМОСТІ

### 1.1 Іонні канали та потенціал дії

Активність нейрона – його здатність проводити, передавати і отримувати електричні сигнали обумовлена відкриттям та закриттям специфічних білкових каналів в плазматичній мембрані нейрона.

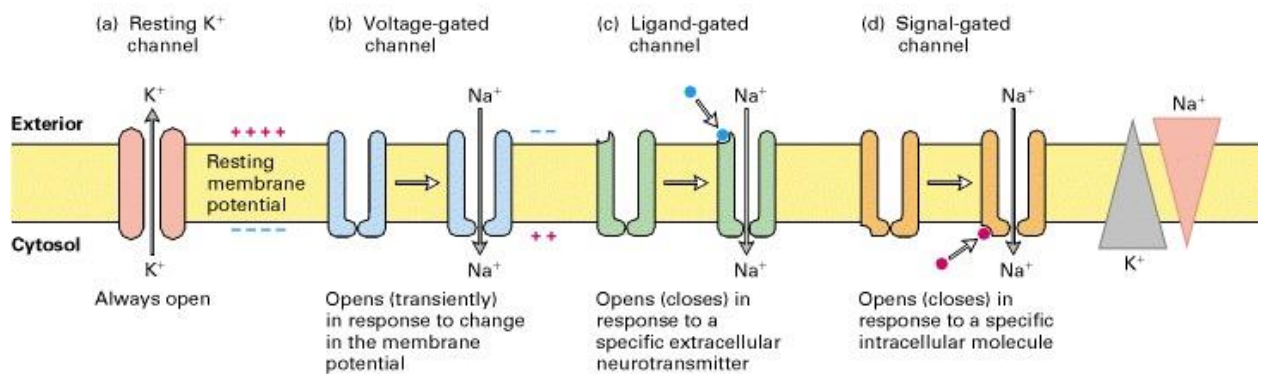


Рис. 1.1. Схематичне зображення структури мембрани та іонних каналів

Кожен відкритий канал дозволяє лише невеликій кількості іонів переміститись з однієї сторони мембрани в іншу, при цьому викликаючи значні зміни мембранного потенціалу.

Розглянемо зв'язок між відкриттям/закриттям іонних каналів та результуючими змінами напруги на мембрані, що і призводить до поширення потенціалу дії, для цього розглянемо більш детально структуру та функціонування декількох типів іонних каналів.

## 1.2 Загальні властивості потенціал-залежних натрієвих та калієвих каналів

Потенціал дії – це цикл деполяризації мембрани, гіперполяризації та повернення до стану спокою. Цикл триває 1-2мс і може виникати сотні разів на секунду. Ці циклічні зміни мембранного потенціалу обумовлені тимчасовим підвищенням проникності області мембрани, спочатку для іонів  $\text{Na}^+$ , а потім  $\text{K}^+$ . Будучи більш конкретним - ці зміни обумовлені в основному натрієвими та калієвими каналами, що й були вивчені Гочкіном та Гакслі в класичному дослідженні на гігантському аксоні кальмара. [1]

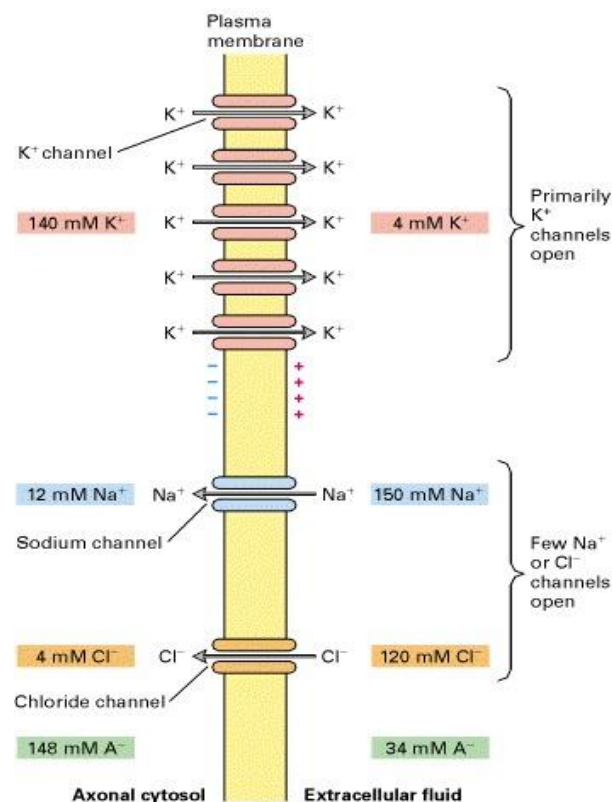


Рис.1.2 Схематичне зображення селективної здатності іонних каналів

Розглянемо деякі властивості іонних каналів. Хоч Гочкін і Гакслі не знали фізичної природи механізмів провідності, що лежать в основі

виникнення потенціалу дії, спираючись що мембрани нервових клітин мають канали, які дозволяють вибірково проводити іони з однієї сторони мембрани в іншу, вони зробили наступні висновки.

Виходячи з іонних провідностей та струмів виміряних в експерименті виявилось що мембранні канали повинні мати деякі властивості. По-перше, оскільки іонні струми мають велике значення, то канали мають дозволяти іонам рухатись по всій поверхні мембрани з великою швидкістю. По-друге, оскільки іонні струми залежать від електрохімічного градієнту по всій мембрані, то іонні канали мають використовувати ці градієнти. По-третє, оскільки натрій та калій потрапляють до клітини незалежно один від одного, то різні типи каналів мають бути здатними розпізнавати  $\text{Na}^+$  та  $\text{K}^+$ , дозволяючи лише одному з цих іонів текти через мембрану при відповідних умовах [2]. І, нарешті, оскільки провідність залежить від напруги на мембрані, то сам канал має бути чутливим до падіння напруги на мембрані, відкриваючись та закриваючись при фіксованих значеннях напруги (Рис.1.2).

Крім того, подальші дослідження показали що канали мають часовий поріг відкриття, закриття та інактивації, що відповідає кінетиці макроскопічних рухів іонів. Цю тенденцію важко помітити при дослідженні мікроскопічних потоків іонів через одиничний канал, оскільки окремі канали відкриваються та закриваються у випадковий спосіб. Проте при повторній деполяризації мембранного потенціалу призводить до того що кожен канал  $\text{Na}^+$  багато разів відкривається та закривається. Коли поточні відповіді на велику кількість подразників усереднюються разом, виявляється що колективний відгук має часовий порядок, що виглядає так само як макроскопічний натрієвий струм. Зокрема канали відкриваються в основному на початку тривалої деполяризації (Рис.1.3.), та інактивуються в подальшому.

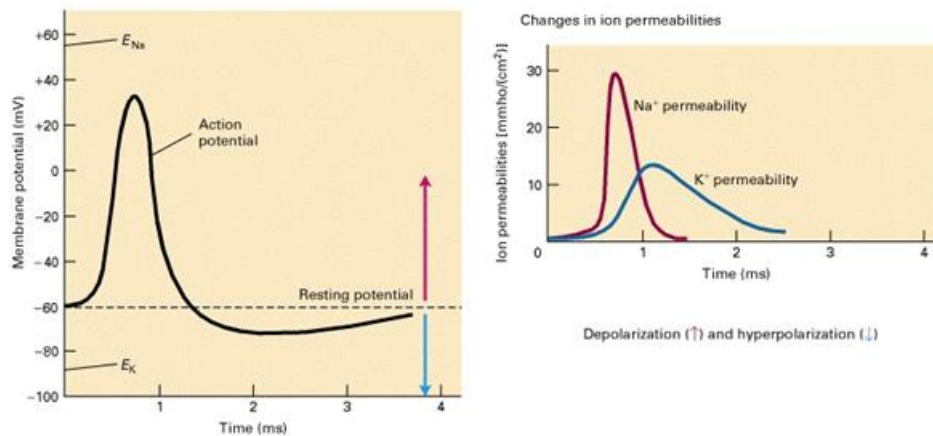


Рис1.3. Зв'язок потенціалу дії зі зміною провідності натрієвих та калієвих іонних каналів

Згадавши той факт що як відкриття так і закриття каналу залежить від напруги мембрани, то маємо що ймовірність того що певний канал буде відкритий змінюється разом із напругою на мембрані, а сумарний вимірний струм є сумою всіх мікроскопічних струмів.

Щоб розрахувати мембранний потенціал як функцію концентрації різних іонів, корисно визначити константу проникності  $g$  для кожного іона.  $g$  – міра легкості з якою іон може перетинати одиницю площі мембрани, що керується різницею концентрації, яка в свою чергу пропорційна кількості відкритих каналів[2]. Як правило, важливим у значенні мембранного потенціалу є лише натрієві, калієві та хлорні канали ( $g_K$ ,  $g_{Na}$  і  $g_{Cl}$  відповідно).

Значення напруги на мембрані не залежить від абсолютного значення проникності, як вже згадувалось раніше, а залежить лише від співвідношення проникності іонів  $Na^+$  та  $Cl^-$  до рівня  $K^+$ . Електричний потенціал на кінтинній поверхні визначається наступним рівнянням, в яком концентрації іонів зважуються відносним величинам їх констант проникності.

$$E = 59 \log_{10} \frac{[K_o] + [Na_o] \frac{g_{Na}}{g_K} + [Cl_i] \frac{g_{Cl}}{g_K}}{[K_i] + [Na_i] \frac{g_{Na}}{g_K} + [Cl_o] \frac{g_{Cl}}{g_K}} \quad (1.1)$$

де індекс  $i$ - відповідає внутрішньоклітинній концентрації, а  $o$  – зовнішньоклітинній концентрації.

### 1.3. Зв'язок провідності каналів зі змінами мембранного потенціалу

З рівняння (1.1) помітно що зміна проникності мембрани для різних іонів призводить до зміни потенціалу мембрани [3]. Узагальнимо зв'язок провідності каналів зі змінами мембранного потенціалу:

1. Відкриття натрієвих каналів викликає деполяризацію мембрани, мембранний потенціал стає менш негативним і якщо значення  $g_{Na}$  стає досить великим, потенціал може стати додатнім всередині клітини.
2. Відкриття калієвих каналів викликає гіперполяризацію мембрани, мембранний потенціал стає більш негативним. Інтуїтивно, очевидно, що чим більше іонів виходить з клітини на зовні, знижуючи градієнт концентрації, залишаючи надмірну кількість негативних зарядів на цитозольній поверхні тим більш негативним стає потенціал на мембрані. І навпаки, закриття калієвих каналів викликає деполяризацію та збільшення потенціалу мембрани.
3. Відкриття «неспецифічних» катіонних каналів, що допускають вихід калію з клітини та вхід натрію в клітину також викликає деполяризацію мембрани.
4. Відкриття хлорних каналів викликає гіперполяризацію мембрани. Інтуїтивно зрозуміло, що іони хлору потрапляють всередину мембрани з зовнішньоклітинного середовища, зменшуючи градієнт концентрації,

залишаючи надлишок позитивно заряджених іонів на зовнішній стороні мембрани.

Вважається що при потенціалі спокою іонні канали закриті (або скомпенсовані потоки, так що мембранний потенціал не змінюється). Проте, коли область плазматичної мембрани деполяризується навіть на невелике значення, натрієві канали відкриваються на короткий час, що викликає приток іонів натрію та раптову деполяризацію. Після відкриття та закриття натрієвих каналів та виникнення ПД відбувається відкриття каналів  $K^+$  що в свою чергу призводить до того що мембранний потенціал знову повертається до стану спокою і може навіть ставати більш негативним за рахунок іонів хлору та відповідних каналів.

#### **1.4. Субклітинна локалізація потенціал-залежних натрієвих та калієвих каналів**

Нейрони - це високо поляризовані клітини, що складаються з соми, великого дендритного дерева та аксональної області. Унікальність набору іонних каналів в сомато-дендритній та аксональній області є одним з важливих факторів, що визначають функціональність нейрона. В даному підрозділі розглянемо локалізацію сім'ї натрієвих та калієвих потенціал-залежних іонних каналів на прикладі нейронів гіпокампа щура.

*$Na^+$ -канали:*

Потенціал-залежні натрієві канали спеціалізуються на електричних сигналізаціях і відповідях за ініціацію поширення потенціалів дії в нервовій системі завдяки швидкому і тимчасовому напливу іонів натрію через їх пори. Залежно від їх локалізації, канали можуть бути ключовими компонентами

ініціації збудження постсинаптичного потенціалу, ініціації дендритного сплеску або поширення потенціалу дії.

Усередині центральної нервової системи, дослідники, з використанням імуноцитохімічних методів, визначили локалізацію пороутворюючих білкових каналів наступних типів  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$ ,  $Na_v1.3$ ,  $Na_v1.6$  у конкретних субклітинних доменах нейронів.

Розглянемо локалізацію вищезгаданих натрієвих іонних каналів [4]:

1)  $Na_v1.1$  канал локалізується переважно в тілі та дендритах нейронів гіпокампа щура.  $Na_v1.1$  Згідно з останніми дослідженнями також може знаходитись в аксонах.

2) На відміну від  $Na_v1.1$ ,  $Na_v1.2$  канали – локалізуються в основному на аксонах. Щільний вміст даних каналів характерний для аксонів нейронів гіпокампа, що й спостерігається на Рис 1.3 (темніше забарвлення відповідає більшій концентрації іонних каналів). Анатомічні результати показують, що  $Na_v1.1$  канали беруть участь у поширенні сигналів над поверхнею соми, а  $Na_v1.2$  канали мають важливе значення для провідності потенціалу дії вздовж аксона.

3)  $Na_v1.3$  іонний канал. У щурів спостерігається соматичний, іноді дендритний візерунок забарвлення в обмеженій області кори головного мозку, гіпокампа та черепно-мозжечкових гранул, а також аксональне забарвлення у волокнистих ділянках. Важливо зазначити, що експресія  $Na_v1.3$  каналів висока в ембріональному мозку і низька у дорослих тварин.

4)  $Na_v1.6$  локалізується переважно в сомах і проксимальних дендритах вихідних нейронах, таких як пірамідальні і гранульовані нейрони гіпокампу, клітини Пуркін'є мозочка та пірамідних нейронах кори головного мозку, де вони беруть участь у інтеграції синаптичного введення.

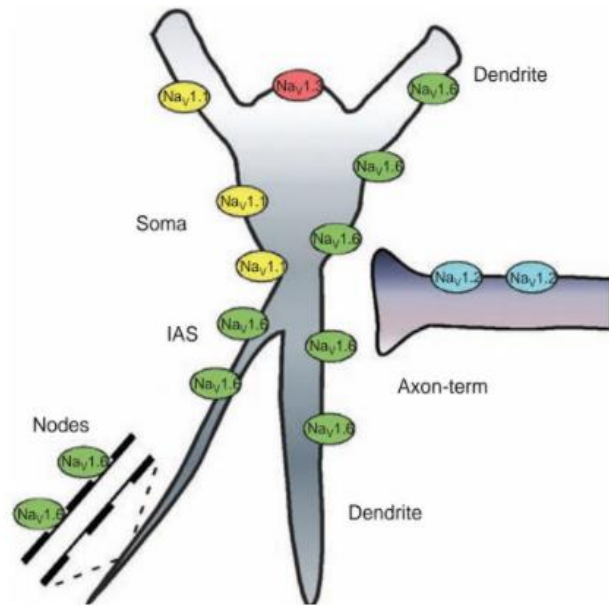


Рис.1.3. Локалізація різних типів натрієвих каналів в нейроні гіпокампа щура.

*K<sup>+</sup>-канали:*

Оскільки потенціал залежних калієвих каналів існує значно більше ніж натрієвих, для зручності представимо лише їх місця локалізації[4] (Рис 1.4).

Аксон: *K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>3.1, K<sub>v</sub>3.4, K<sub>v</sub>7.2, K<sub>v</sub>7.*

Дендрит: *K<sub>v</sub>2.2, K<sub>v</sub>7.2, K<sub>v</sub>7.3, K<sub>v</sub>4.2, K<sub>v</sub>4.3, K<sub>v</sub>10.1, K<sub>v</sub>10.2.*

Сома: *K<sub>v</sub>1.1, K<sub>v</sub>2.1, K<sub>v</sub>11.1, K<sub>v</sub>11.2, K<sub>v</sub>7.2, K<sub>v</sub>7.3.*





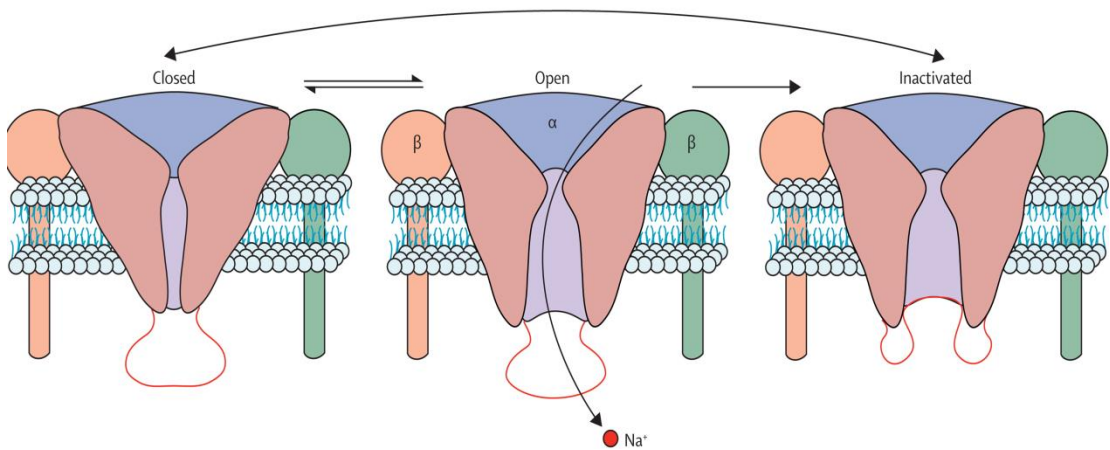


Рис.1.5. Схема будови натрієвого каналу

Стан натрієвих каналів залежить від потенціалу мембрани клітини, що визначається «датчиком» напруги білка [5]. При гіперполяризованих потенціалах ймовірність того що канал буде відкритий надзвичайно мала, а підвищення потенціалу мембрани викликає конформаційну зміну  $\alpha$ -субодиниці білка що призводить до відкриття пори  $\text{Na}^+$  селективного каналу. Відкриття каналів відбувається з великою швидкістю і визначають потік натрію до клітини, що і є основою швидкого зростання потенціалу дії в нервових клітинах. Впродовж мілісекунд відкриті канали переходять у інактивований стан – відбувається стрімке зменшення натрієвого струму, що і можна спостерігати при низькій деполяризації.

Із десяти відомих  $\alpha$ -субодиниць натрієвих каналів лише чотири зустрічають в головному мозку:  $\text{Na}_v1.1$ ,  $\text{Na}_v1.2$ ,  $\text{Na}_v1.3$  і  $\text{Na}_v1.6$ . Розглянемо як змінюється амплітуда вхідного натрієвого струму для вищеперелічених іонних каналів в залежності від потенціалу [6] (Рис.1.6).

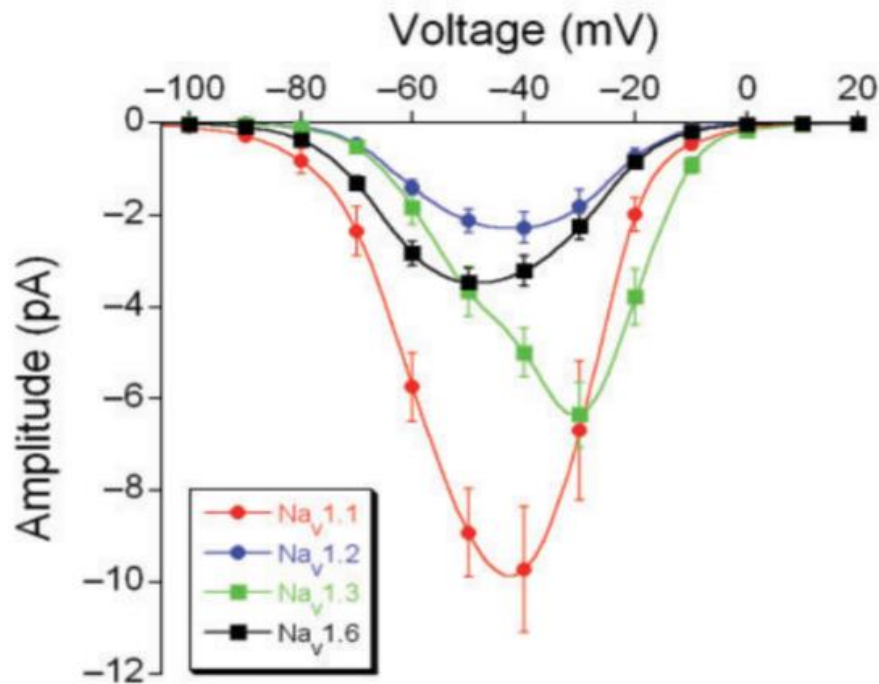


Рис.1.6 Залежність амплітуди вхідного натрієвого струму від потенціалу мембрани

Існують значні відмінності між чотирма лізоформами натрієвих каналів стосовно постійного струму:

- *Na<sub>v</sub>1.1* демонструє стійкий струм, великий при негативних потенціалах і зменшується з більш позитивними потенціалами мембрани. Накопичений струм від *Na<sub>v</sub>1.1* також може мати важливі наслідки в роботі нейрона.

- *Na<sub>v</sub>1.2* має найменшу кількість стійкого струму при всіх деполяризаціях.

- *Na<sub>v</sub>1.6* демонструє стійкий струм, який зростає з більш позитивними потенціалами мембрани, досягнувши максимуму при найбільш позитивних потенціалах. Ці результати узгоджуються з гіпотезою про те, що канали *Na<sub>v</sub>1.6* опосередковують стійкий струм, який є найбільшим, коли випадає

потенціал дії, що може відіграти вирішальну роль у повторному спрацьовуванні потенціалів дії, що спостерігаються в нейронах Пуркін'є.

Розглянемо основні електрофізіологічні властивості каналу  $Na_v1.1$ [7].

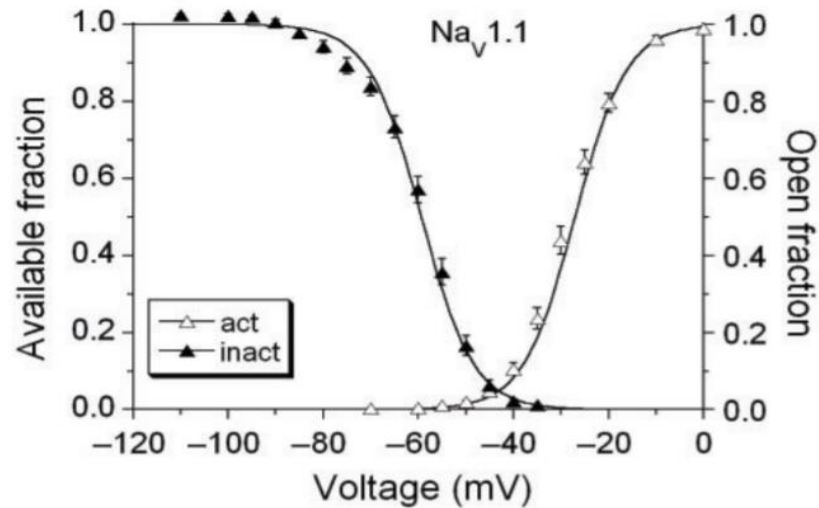


Рис.1.7 Залежність відкритого та закритого стану  $Na_v1.1$  каналу від напруги на мембрані.

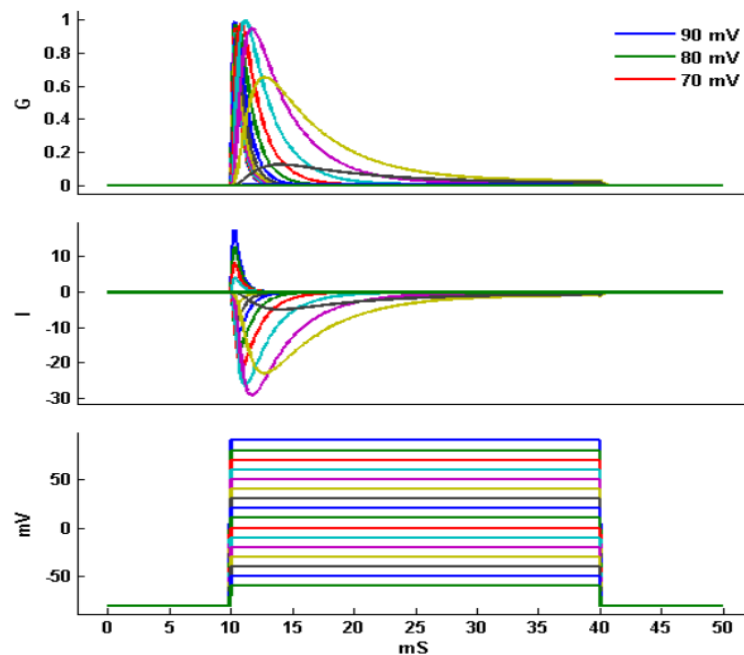


Рис.1.8 Зміна провідності та сили струму  $Na_v1.1$  каналу при різних значеннях підтримуваного потенціалу.

Враховуючи локалізації, потенціал активації та амплітуди натрієвих струмів можемо зробити висновок що найбільше значення в генерації потенціалу дії в сомі нейронів гіпокампа відіграє  $Na_v1.1$  канал.

Потенціал-залежні калієві канали. Дані канали відіграють важливу роль в різноманітних проявах електричної активності клітини: їх активація викликає реполяризацію мембрани під час потенціалу дії і розвитку гіперполяризації; беруть участь в підтриманні ритмічності ряду збуджуваних клітин. [8]

Існує надзвичайно велика кількість різновидів калієвих каналів, що відрізняються один від одного потенціал-залежністю, здатністю інактивуватись, кінетикою активації та інактивації, фармакологічними характеристиками. Потенціал залежні калієві канали складаються з чотирьох субодниць що оточують центральний шлях проходження іона. Кожна субодниця має шість трансмембранних доменів(S1-S6) і область пори що має сигнальну послідовність GYG. Даний тип іонних каналів утворює найрізноманітніший клас в надсімействі іонних каналів, що й призводить до великого різноманіття утворюючих струмів, кінетика яких формується відповідно до фізіологічних потреб. Частина цього різноманіття є наслідком комбінаторного походження, оскільки калієві канали представляють собою олігомерні білкові комплекси. Участь різноманітних білків в утворенні калієвих каналів відбувається за двома механізмами – або різні  $\alpha$ -субодиниці збираються в гетеротетрамерні канали зі всіма субодиницями що вистилають пори, або допоміжні  $\beta$ -субодиниці взаємодіють з комплексами тетрамерного каналу, змінюючи їх кінетичні властивості [5]. Модулюючі  $\alpha$ -субодиниці утворюють групу білків які вносять вклад в різноманіття каналів через перший механізм утворення.

На основі гомології було ідентифіковано вісім різних залежностей калієвих каналів від напруги. Наведемо приклади декількох з них [9]:

1) Повільно інактивуючі калієві канали. До них відносяться:

$K_v1.1, K_v1.2, K_v1.3, K_v1.5, K_v1.6;$

$K_v2.1, K_v2.2;$

$K_v7.1-K_v7.5$

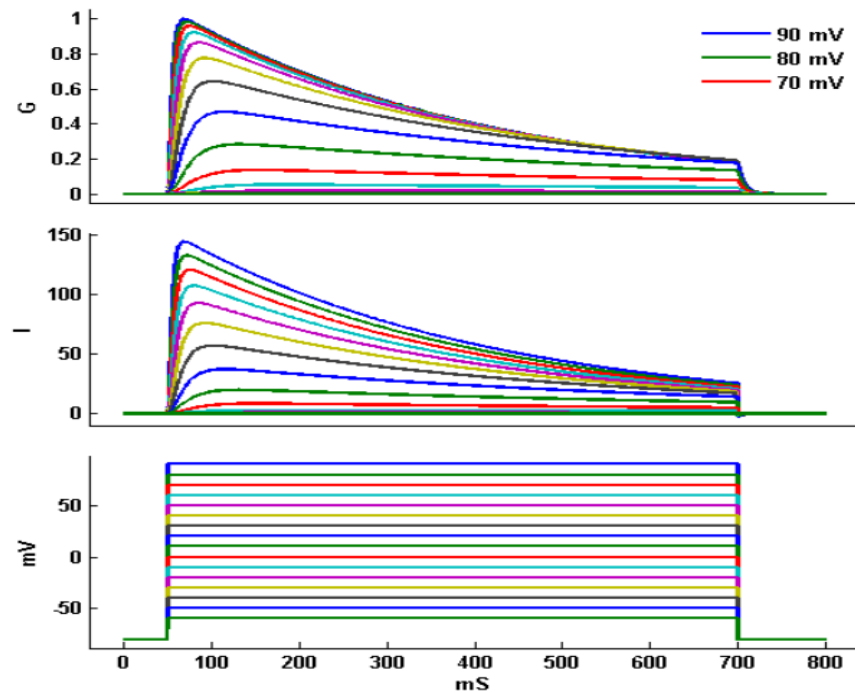


Рис.1.9. Залежність провідності та струму повільно інактивуючих калієвих каналів від напруги на мембрані

2) Швидко інактивуючі калієві канали. До них відносяться[9]:

$K_v1.4;$

$K_v3.3, K_v3.4;$

$K_v4.1, K_v4.2, K_v4.3.$

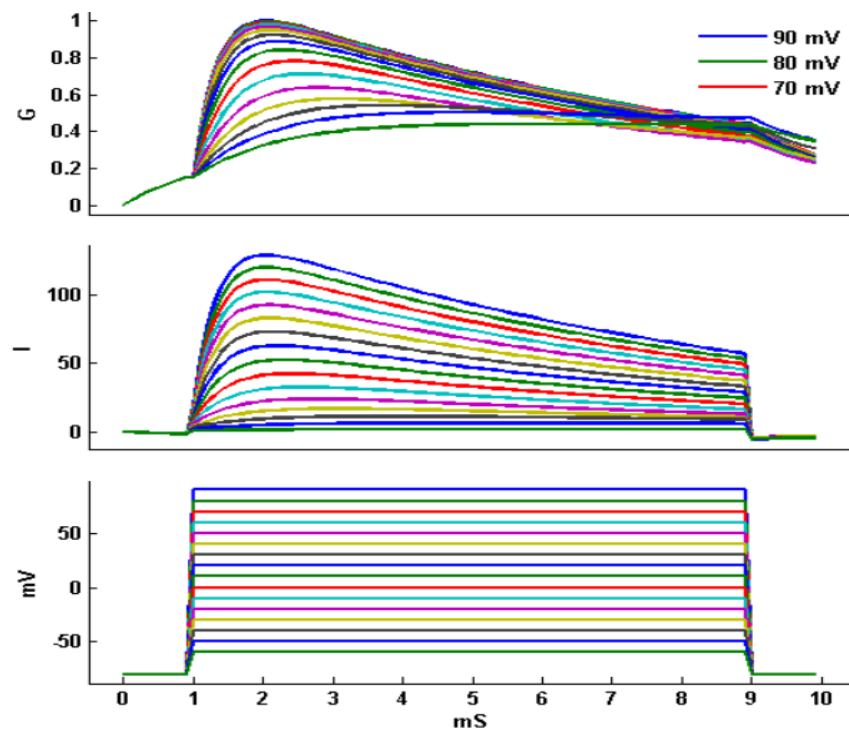


Рис.1.9. Залежність провідності та струму швидко інактивуючих калієвих каналів від напруги на мембрані

Враховуючи локалізацію та електрофізіологічні властивості можемо зробити висновок що вплив на утворення потенціалу дії в сомі нейронів гіпокампа відіграють повільні калієві канали:  $K_v1.1, K_v1.2, K_v7.1, K_v7.2$  – низька концентрація іонів даного типу малою мірою впливає на формування потенціалу дії,  $K_v2.1$  – велика концентрація потенціал залежних каналів даного типу здатна пропускати велику кількість іонів калію що може значним чином впливати на формування потенціалу дії.

## 1.6 Глутаматергічна система

Глутамат є основним збуджувальним нейромедіатором в нервовій системі. Глутаматні шляхи пов'язані з багатьма іншими нейромедіаторними шляхами, а рецептори глутамату зустрічаються в головному і спинному мозку в нейронах і гліях. Як амінокислота та нейромедіатор, глутамат має

великий набір нормальних фізіологічних функцій. Отже, глутаматна дисфункція має серйозні наслідки як при захворюванні, так і травмах.

Як мінімум 30 білків використовуються при регуляції глутаматного синапсу або модуляції нейронної збудливості. Ці білки є мембранними рецепторами або транспортними білками (Рис.1.10). Вони стратегічно розташовані на декількох типах клітин, що зближаються з глутаматним синапсом: до і після синаптичних нейронів, астроцитів (тип гліальної клітини) та сусідніх інгібіторних нейронів, які використовують  $\gamma$ -аміномасляну кислоту (ГАМК). ГАМК є головним інгібіторним нейромедіатором в мозку, і головна відмінність між глутаматом і ГАМК полягає в тому, що останній синтезується з першого ферменту L-глутаматної кислоти декарбоксилази. Шопп сказав, що той факт, що нейрони ГАМК та глутаматні нейрони відрізняються цим єдиним ферментом, можуть еволюційно ефективним чином контролювати збудливість у нервовій системі.

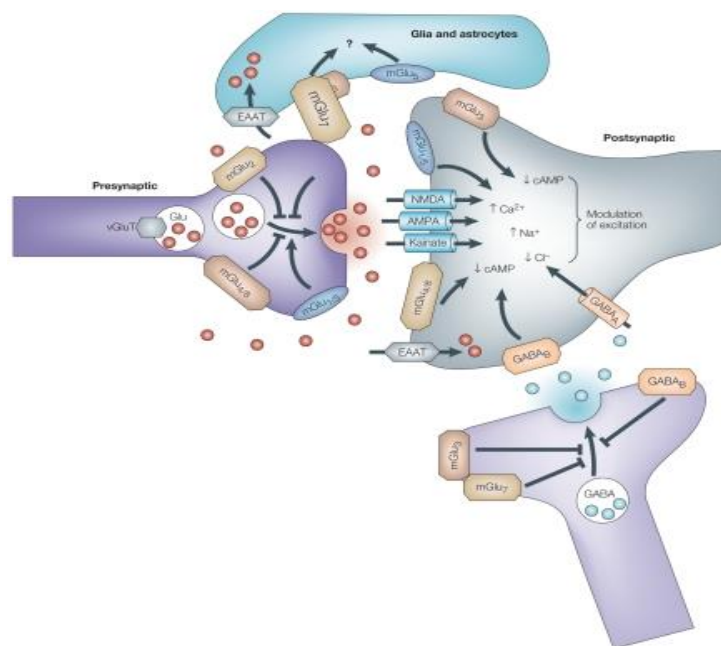


Рис. 1.10. Ілюстрація гіпотетичного синапсу з локалізацією та функцією глутаматних рецепторів, транспортерів



Концентрації глутамату в позаклітинному просторі є низькими і щільно контролюються великою кількістю механізмів на синапсі. Збудження до цієї регуляторної системи можуть мати шкідливі наслідки, такі як надлишок виділення глутамату, що може викликати гіперзбудливість у постінаптичних нейронах до точки екситотоксичності та смерті клітин (цитотоксичність). Глутамат-індукована ексайтотоксичність, особливо в гіпокампі, була пов'язана із зменшенням нейрональної регенерації та дендритного розгалуження. З цих та інших причин нейромедіатор функціонального значення глутамату повинен бути жорстко регульований.

Складність регуляції глутамату та її широкомасштабної присутності в усьому мозку може пояснити чому протягом останніх десятиліть було розроблено лише три рецепторні препарати, які розроблені спеціально для глутамату або глутаматних рецепторів: мемантин, кетамін і D-циклозин. Потенціал побічних ефектів від цих препаратів надзвичайно високий, що частково стримує подальші інвестиції. На відміну від цього, широкомасштабні лікарські засоби були продані для модуляції інших нейромедіаторів, таких як дофамін, серотонін та ацетилхолін, чия синаптична регуляція є менш складною, а роль та шляхи в центральних нервових системах не такі великі.

Це є найбільш фундаментальною перешкодою для розвитку глутаматних біомаркерів та лікувальної терапії. Будь-який агоніст або антагоніст має потенціал для виявлення як токсичних, так і не токсичних побічних ефектів залежно від його концентрації, шляхів введення, дозових побічних ефектів та інших ключових чинників. З точки зору розробки лікарських засобів, метою є ретельний вибір молекулярної цілі, яка модулює дисфункціональні шляхи глутамату, без порушення здорових шляхів і мінімізує несприятливі ефекти.

### 1.6.1 Глутаматні рецептори

Глутаматні рецептори є численними і дуже складними; у центральній нервовій системі ссавців виявлено більше 20 рецепторів глутамату. Вони діляться на дві основні категорії: іонотропні (потенціал-чутливі) та метаботропні (чутливі до ліганду). Кожен іонотропний або метаботропний рецептор має три типи, залежно від специфічності зв'язування, проникності іонів, властивостей провідності та інших факторів. Кожен тип має декілька підтипів (Таблиця 1.1).

Таблиця 1.1

Типи глутаматних рецепторів та їх властивості

Receptor	Protein Subunit	Receptor Properties
<b>Ionotropic Receptors</b>		
NMDAR	NR1, NR2A <sup>+</sup> , NR2B <sup>+</sup> , NR2C, NR2D, NR3A, and NR3B	Heterotetrameric; calcium permeability high; long channel open time
AMPA	GluR1 <sup>+</sup> , GluR2 edited, GluR2, GluR3 <sup>+</sup> , and GluR4 <sup>+</sup>	Heterotetrameric; calcium permeability low if edited GluR2, otherwise moderate; short channel open time
Kainate receptor	GluR5 <sup>+</sup> , GluR6, GluR7, KA1, and KA2	Homotetrameric or heterotetrameric; calcium permeability low; short channel open time
<b>Metabotropic Receptors</b>		
Group 1	mGluR1 <sup>+</sup> and mGluR5	Homodimeric; signals via phospholipase C; located post-synaptically
Group 2	mGluR2 and mGluR3	Homodimeric; signals via adenylyl cyclase; located mostly pre-synaptically; agonists and antagonists mostly distinct from Group 3
Group 3	mGluR4, mGluR6, mGluR7, and mGluR8	Homodimeric; signals via adenylyl cyclase; located mostly pre-synaptically; agonists and antagonists mostly distinct from Group 2

Іонотропні рецептори швидко діють, і після відкриття вони можуть виробляти великі зміни поточного струму, навіть якщо різниця напруг на мембрані невелика. Після того, як глутамат, як ліганд, зв'язується з іонотропним рецептором, в рецепторному каналі проходять конформаційні зміни, що дозволяють швидкому припливу позаклітинного натрію серед інших іонів і витік іонів калію [10]. Це викликає деполяризацію мембран в постсинаптичній клітині, що достатньо для індукції передачі сигналу. Одним з основних глутаматних іонотропних рецепторів N-метил D-аспартату

(NMDA) є проникність іонів кальцію крім іонів натрію та калію; іони кальцію мають як корисні, так і токсичні ефекти. Рецептор NMDA є незвичним, оскільки він є детектором збіжності; щоб відкрити канал, глутамат повинен зв'язуватися з рецептором, а постсинаптична клітина повинна бути деполяризована, оскільки канал блокується магнієм на фізіологічних рівнях і тільки відкривається, коли клітина деполяризується.

Іонотропні рецепторні канали формуються збірками гетеротетрамерних або гомотетрамерних білкових субодиниць. Три типи монотропних рецепторів були названі на честь ліганду, який прямо зв'язується з одним, але не з двома іншими: NMDA,  $\alpha$ -аміно-3-гідрокси-5-метил-4-ізоксазолпропіонова кислота (AMPA) та каїнова кислота. Як тільки ці ліганди були виявлені, багато інших, будь то агоністик або антагоністи, згодом були знайдені. Рецептори NMDA є не тільки високовираженими на нейронах, але вони також виражені на астроцитах. Розширювальна здатність людського мозку до пластичності, навчання, пам'яті та відновлення пошкоджень пояснюється покращенням синаптичної анатомії та фізіології сигналів NMDA, особливо в гіпокампі та інших регіонах ЦНС ссавців. Основні механізми, що лежать в основі пластичності, включають нейрогенез, залежну від активності очищення синаптичної міцності та обрізка синапсів.

Метаботропні глутаматні рецептори повільніше діють; вони впливають на їх вплив опосередковано, як правило, через експресію генів та синтез білка. Ці ефекти часто сприяють підвищенню збудливості клітин глутамату, регуляції ступеня нейротрансмісії та сприяють синаптичній пластичності. Коли глутамат зв'язується з метаботропним рецептором, зв'язування активізує постсинаптичний зв'язаний з мембраною G-протеїн, який, в свою чергу відкриває мембранний канал для передачі сигналу [10]. Активація білка також викликає функціональні зміни в цитоплазмі, кульмінацією якої є експресія генів та синтез білка. Існує три широкі групи глутамат-

метаботропних рецепторів, які відрізняються їх фармакологічними та сигнальними трансдукційними властивостями.

Метаботропні рецептори групи I в основному виражаються на постсинаптичній мембрані. Вони були пов'язані з проблемами навчання та пам'яті, наркоманії, рухового регулювання та синдрому Мартіна - Белла. Метаботропні рецептори групи II розташовані не тільки на постсинаптичних клітинах, але також і на попередньо синаптичних клітинах, можуть пригнічувати передачу глутамату. Їх подвійне розташування може дозволити їм застосовувати більшу ступінь модуляції сигналізації. Дисфункція метаботропних рецепторів групи II була пов'язана з тривогою, шизофренією та хворобою Альцгеймера. Метаботропні рецептори III групи, подібні до групи II, є попередньо синаптичними та інгібують вивільнення нейромедіаторів. Вони знаходяться в межах гіпокампу та гіпоталамуса і можуть відігравати роль у хворобі Паркінсона та тривожних розладах.

### **1.6.2 Глутаматні транспортери**

Тісна регуляція концентрації позаклітинних глутаматів у синапсі і в позасинаптичних локаціях є критичною для нормальної синаптичної передачі та для запобігання ексайтотоксичності. Транспортери глутамату регулюють концентрації глутамату і розташовуються як на до-, так і післясинаптичних нейронах, а також на навколишніх астроцитах, типу гліальної клітини. П'ять збуджувальних амінокислотних транспортерів (EAATs), раніше відомі як транспортувальники глутамату: EAAT-1 до EAAT-5, причому EAAT-2 експресується переважно на клітинах у районах мозку, багатих глутаматом. Визнається, що глутаматні транспортери на гліальних клітинах перш за все несуть відповідальність за підтримку концентрації позаклітинних глутаматів.

Проте наявність транспортерів на декількох типах клітин говорить про високий рівень взаємодії.

Гліальні клітини, найчастіше астроцити, а також мікроглія та олігодендроцити, виконують ключову роль у модуляції рівнів позаклітинних глутаматів. У звичайних умовах глутамат постійно переробляється між нейронами та глією в тому, що називається глутамат-глутаміновим циклом. Надлишок глутамату в синапсі поглинається гліальними клітинами через транспортні засоби EAAT, де він перетворюється в глутамін. Глутамін потім переноситься назад у нейрони, де він перетворюється знову до глутамату. Проте гліальні клітини за певних умов можуть також вивільняти глутамат за допомогою щонайменше шести механізмів, одним з яких є зміна поглинання глутаматними транспортерами. Цей вид зворотного транспорту може бути залучений до пошкодження мозку та інсульту. Нарешті, змінений вираз EAAT-2 виявлено в аміотрофічному бічному склерозі. Хвороба також відзначається надлишковими рівнями глутамату в спинномозковій рідині головного мозку. Нова терапія розробляється для того, щоб перешкоджати цьому патологічному процесу шляхом орієнтації на EAAT-2 на астроцити [10].

Враховуючи кількість рецепторів і транспортерів, діапазон типів клітин, що їх експресують, різноманітність регуляторного контролю та вузька концентраційна різниця між нормальною синаптичною функцією та ексайтотоксичністю, залишається багато основних питань щодо вибору потенційних фармакологічних цілей.

### 1.7. Зміна електрофізіологічних параметрів нейронів гіпокампа при ексайтотоксичному пошкодженні.

Результати експерименту по вивченню впливу глутамату на зміну електрофізіологічних параметрів нейрона гіпокампу щура при ексайтотоксичному пошкодженні 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  $800\pm200\text{пА}$ . ( $25\pm8\%$ ) (Рис. 1.11).

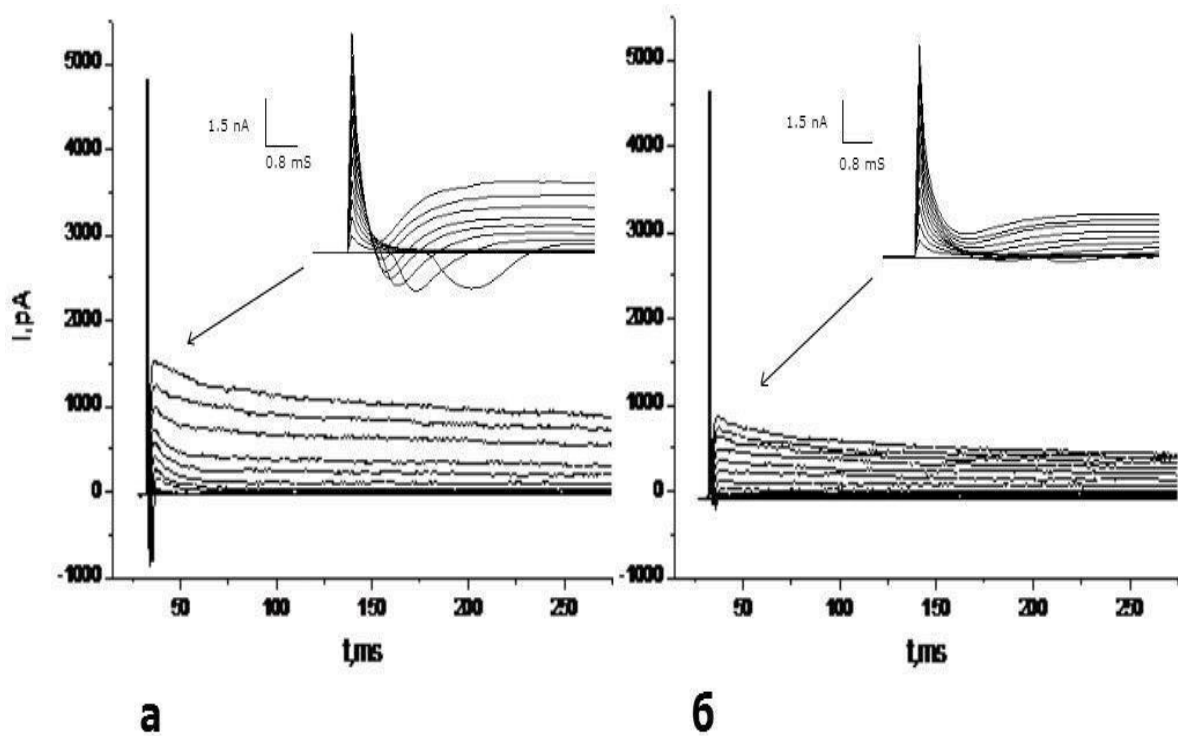


Рис.1.11 Потенціал-залежний струм культивованих нейронів гіпокампа щура в контролі (а) та після ексайтотоксичного пошкодження(б).

## Висновки до розділу 1

В ході опрацювання літератури та аналізуючи результати експерименту над нейронами гіпокампа в результаті ексайтотоксичного пошкодження глутамату, великий інтерес представив зв'язок між зміною пасивних електрофізіологічних параметрів, вхідного та вихідного потенціал-залежного струму та зміною в характері імпульсації нейрона, а саме зменшенням амплітуди, тривалості ПД та зміна швидкості деполяризації. В результаті чого було вирішено проаналізувати зв'язок цих змін та побудувати модель потенціалу дії для нейрона гіпокампа щура в контрольному стані щоб продемонструвати його залежність від зміни провідності іонних каналів та визначити вплив натрієвих та калієвих каналів на формування ПД.

## 2 МОДЕЛЬ ПОТЕНЦІАЛА ДІЇ

Модель нейрона - це математичний опис властивостей клітини, яка розроблюється з метою точного опису та передбачення біологічних процесів. В свою чергу модель що описує мембранний потенціал нейрона - це підклас біологічних моделей який має за мету відтворення потенціалу дії клітини опираючись на інформацію про іонні провідності.[11]

В даному розділі розглядаються різні типи моделей для опису одиничного нейрона, а саме мембранного потенціалу, та пояснюється доречність вибору моделі Гочкіна-Гакслі.

### 2.1. Моделі опису нейрона

#### 2.1.1. Модель Фітцъ Хью-Нагумо

Дана модель може бути застосована для опису нейрона як системи із збудженням. Модель Фітцъ Хью-Нагумо здатна відтворювати велику кількість якісних характеристик для електричного імпульсу в нейроні або вздовж нервового волокна [12]. Серед таких параметрів модель здатна описати: можливість існування порогу збудження, інактивованого періоду, генерації імпульсу під дією зовнішніх струмів. Система рівнянь що описує модель Фітцъ Хью-Нагумо має наступний вигляд:

$$\begin{cases} \frac{dV_M}{dt} = V_M - V_M^3 - \omega + I_{ext} \\ \tau \frac{d\omega}{dt} = V_M - a - b\omega \end{cases} \quad (2.1)$$

де  $V_M$  – напруга на мембрані,  $I_{ext}$  – вхідний струм,  $\omega$  – змінна що характеризує повернення системи в попереднє положення («відновлювана напруга»),  $a$ ,  $b$ ,  $\tau$  – параметри конкретної системи.



### 2.1.2. Модель Хіндмарш-Роуз

Модель пропонує опис активності нейрона трьома диференціальними рівняннями першого порядку та на відміну від попередньої моделі враховує проникність мембрани для іонів декількох типів. Система що описує даний метод має наступний вигляд [14]:

$$\begin{cases} \frac{dx}{dt} = y + ax^2 - x^3 - z + I \\ \frac{dy}{dt} = 1 - bx^2 - y \\ \frac{dz}{dt} = r[s(x - x_R) - z] \end{cases} \quad (2.2)$$

де  $x(t)$ - мембранний потенціал;  $y(t)$ ,  $z(t)$  – змінні що характеризують здатність іонів проникати через мембрану;  $I$  – вхідний струм;  $a$ ,  $b$ ,  $r$ ,  $s$ ,  $x_R$  – параметри системи.

Дана модель застосовується лише для одного нейрона та зосереджена на вивченні поведінки потенціалу мембрани.

### 2.1.3. Integrate-and-Fire (IF) модель

На відміну від моделей що складаються з іонних каналів з різними провідностями, що розглядалися раніше, одновимірна модель використовує порогове значення потенціалу та регулює механізм створення потенціалу дії [15].

Найпростіша модель опису роботи нейрона з часом представляється у вигляді:

$$I(t) = C_M \frac{dV_M}{dt} \quad (2.3)$$

де  $V_M$ -значення мембранного потенціалу;  $I(t)$  –вхідна сила струму,  $C_M$  –ємність мембрани.

Генерація потенціалу дії на нейроні в цьому випадку відбувається лише коли значення потенціалу досягає порогового значення після чого значення потенціалу стрибком повертається до значення потенціалу спокою. Тобто потенціал на мембрані зростає за рахунок зовнішнього струму доки не досягне критичного значення і не повернеться до попереднього положення.

Недолік моделі полягає в тому що вона не реалізує жодного сигналу що не досягає порогового значення, система буде зберігати цю напругу («вічна пам'ять») аж доки не поверне значення потенціалу до початкового значення.

#### 2.1.4. LIF модель

Дана модель вирішує проблему «вічної пам'яті» шляхом включення в ланцюг паралельно до конденсатора додаткового опору. Таким чином струм розділяється на дві компоненти. Перша компонента заряджає конденсатор (аналогічно до минулої моделі), а інший – струм що проходить через резистор. Таким чином динаміка системи задається наступним чином [16]:

$$I(t) - \frac{V_M(t)}{R_M} = C_M \frac{dV_M}{dt} \quad (2.4)$$

де  $I(t)$  – стимулюючий струм,  $V(t)$  – напруга на мембрані нейрона,  $C_M$  – ємність мембрани,  $R_M$  – опір мембрани.

Дана система, на відміну від попередньої має витік струму, таким чином:

$$C_M \frac{dV_M}{dt} = I(t) - g_L(V_M(t) - E_L) \quad (2.5)$$

де  $g_L$  – провідність мембрани.

Ця динаміка продовжується до перетину порогового значення, після чого значення напруги повертається до початкового.

### 2.1.5 Квадратична модель IF(QIF)

Альтернативою LIF моделі нейрону є квадратична IF модель. Дана модель описує потенціал дії в нейронах та на відміну від фізіологічно достовірних моделей, дана модель прагне лише виробити потенціал-подібні закономірності та ігнорує «тонкощі», так як зміна певних параметрів що відіграють важливу роль у створенні потенціалу дії в реальному нейроні. Тим не менше, модель QIF неймовірно проста у здійсненні та обчисленні [17]. Еволюція мембранного потенціалу в залежності від часу в даному випадку представляється у вигляді [16]:

$$\tau_m \frac{dV_M}{dt} = a_0 \cdot (V_M(t) - V_{rest}) \cdot (V_M(t) - V_{th}) + R_M \cdot I(t) \quad (2.6)$$

де  $\tau_m = R_M \cdot C_M, a > 0$  -парметр системи,  $V_{th}$  – порогове значення напруги,  $V_{rest}$  – потенціал спокою.

У випадку коли напруга мембрани менше порогового значення її потенціал зменшується до потенціалу спокою, а якщо напруга на мембрані більша від порогового значення то відбувається утворення потенціалу дії.

### 2.1.6. Модель Іжикевича

Дана модель нейрона описується наступною системою рівнянь [17]:

$$\begin{cases} \frac{dV_M}{dt} = 0.04 \cdot V_M(t)^2 + 5 \cdot V_M(t) + 140 - u(t) + I(t) \\ \frac{du}{dt} = a \cdot (b \cdot V_M(t) - u(t)) \\ \text{if } v \geq +30mV \end{cases} \quad \text{then } v \leftarrow c, u \leftarrow u + d \quad (2.7)$$

де  $u(t)$ -змінна що характеризує відновлення потенціалу мембрани до потенціалу спокою;  $a, b, c, d$ —параметри системи.

$u(t)$  - пояснює активацію калієвих та інактивацію натрієвих струмів. Після досягнення потенціалом дії свого піку значення напруги на мембрані та  $u(t)$  повертаються до початкових значень.

### 2.1.7 Вибір моделі

Вище ми розглянули велику кількість моделей для опису потенціалу дії нейрона. Який із методів найкращий? Відповідь залежить від поставленої проблеми. Якщо потрібно зімітувати поведінку багатьох нейронів, то можна

використати будь-який з вищеперерахованих методів, найбільш ефективними будуть інтегральний та ІФметод. В нашому випадку для повного розуміння явищ що відбуваються в процесі виникнення потенціалу дії, вибрана модель має бути найбільш біологічно правдоподібною, тому для отримання необхідної точності та коректного опису процесів будемо використовувати модель Гочкіна-Гакслі.

## 2.2. Модель Гочкіна-Гакслі

Гочкін і Гакслі в 1952 році представили кількісний опис струмів що генерують потенціал дії нейрона. Обмежуючись твердженням що електричні властивості клітини залежать насамперед від натрієвої та калієвої провідності представимо спрощену електричну схему нейрона. (Рис.2.1)

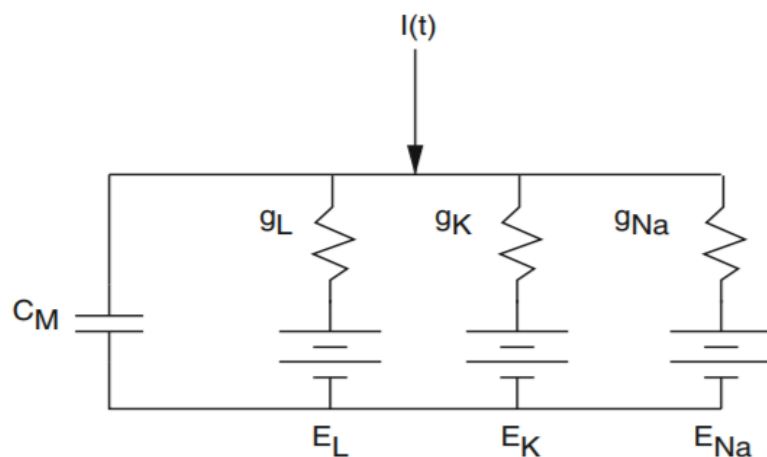


Рис.2.1. Еквівалентна схема нейрона що лежить в основі моделі Гочкіна-Гакслі

Мембранний потенціал в цьому випадку задовільняє наступне рівняння:

$$C_M \frac{dV}{dt} = -g_{Na}(V - E_{Na}) - g_K(V - E_K) - g_L(V - E_L) \quad (2.8)$$

де  $C_M$ - ємність мембрани клітини;  $g_i$ -провідність каналу «і»;

$E_i$ - реверсний потенціал каналу «і»

Перший та другий доданок рівняння (2.8) описують струми що течуть через натрієві та калієві канали відповідно [18]. Останній доданок в свою чергу описує струм витоку, що відповідає пасивному потоку іонів через мембрану. Важливо відмітити що пасивна провідність мембрани не змінюється з часом на відміну від провідності натрієвих та калієвих каналів.

В моделі Гочкіна-Гакслі кожен канал розглядається як трансмембранний білок що утворює пору, через яку іони можуть розсіювати свої градієнти концентрацій. Пори мають ворота, які можуть бути відкритими або закритими, ймовірність того що канал відкритий залежить від мембранного потенціалу. Зв'язок відкритого та закритого стану каналу зображено на Рис.2.2.

$$C \xrightleftharpoons[\beta(V)]{\alpha(V)} O,$$

Рис.2.2 Діаграма можливих станів іонного каналу

На діаграмі С та О відповідають замкненому та відкритому станам, а  $\alpha(V)$  і  $\beta(V)$  – константи швидкості що залежать від напруги. [13] Якщо ми позначимо за  $m$  частину відкритих воріт, то  $(1-m)$  буде відповідати частині закритих каналів для яких має виконуватись наступне рівняння:

$$\frac{dm}{dt} = \alpha(V)(1 - m) - \beta(V)m = (m_{\infty}(V) - m)/\tau(V) \quad (2.9)$$

Відповідні змінні в рівнянні (2.9) приймають значення:

$$m_{\infty}(V) = \frac{\alpha(V)}{\alpha(V) + \beta(V)} \quad (2.10)$$

$$\tau(V) = \frac{1}{\alpha(V) + \beta(V)} \quad (2.11)$$

Розв'язок рівняння (2.9) показує залежність стану іонного каналу від мембранного потенціалу:

$$m(t) = m_{\infty}(V) + ((m(0) - m_{\infty}(V))e^{-t/\tau(V)}) \quad (2.11)$$

### 2.2.1 Зміна провідності іонних каналів

У моделі Гочкіна-Гакслі вирази для залежності констант швидкості від напруги отримані шляхом підбору даних. Проте Борг-Грем запропонував просте формулювання на основі термодинаміки. Ідея полягала в тому, що залежність ймовірності відкриття чи закриття каналу експонентційно залежить від потенціалу мембрани. Таким чином константи швидкості мають наступний вигляд:

$$\alpha(V) = A_{\alpha} \exp(-B_{\alpha} V)$$

$$\beta(V) = A_{\beta} \exp(-B_{\beta} V) \quad (2.12)$$

Побудуємо модель поширення потенціалу дії вздовж гігантського аксона кальмара. Розглянемо аксон як циліндр фіксованого радіуса  $a$ , тому потенціал мембрани залежить від просторової змінної  $x$  та часу  $t$ . Припустимо що потенціал залежні канали натрію та калію і струм витоку задовольняють рівняння балансу струмів:

$$I_L = I_{cap} + I_{ion} \quad (2.13)$$

Розписавши змінні, отримаємо:

$$\frac{a}{2r_L} \frac{\partial^2 V_M}{\partial x^2} = c_M \frac{\partial V_M}{\partial t} + I_K + I_{Na} + I_L \quad (2.14)$$

Підставимо значення іонних струмів та струму витоку:

$$c_M \frac{\partial V_M}{\partial t} = \frac{a}{2r_L} \frac{\partial^2 V_M}{\partial x^2} - g_K(V_M - E_K) - g_{Na}(V_M - E_{Na}) - g_L(V_M - E_L) \quad (2.15)$$

Для отримання кінцевого результату потрібно розписати значення провідності іонних каналів в залежності від потенціалу на мембрані.

Гочкін і Гакслі використовували два експериментальні методи для відокремлення іонних струмів та обрахунку залежності провідності відповідних іонних каналів від напруги. Перший метод – метод фіксації потенціалів на постійному рівні дозволив шляхом введення в аксон відповідного струму рівного і протилежного за знаком до струму що протікає через іонні канали певного типу виміряти його значення [17]. Будь-які зміни в величині струму в цьому випадку мали бути пов'язані з відкриттям або закриттям каналу.

Визначимо відповідні провідності. У випадку значної гіперполяризації клітини можемо вважати що усі канали закриті (або потоки компенсують



один одного) і сумарний струм визначається витоком. Звідки з легкістю можна обрахувати  $g_L$ .

$$I_M \approx g_L(V_C - E_L) \quad (2.16)$$

На Рис.2.3 зображені результати із підтриманням потенціалу мембрани на рівні 0 мВ. Спочатку спостерігається внутрішній (викликаний напливом іонів натрію) струм за яким слідує зовнішній (викликаний потоками калію) струм.

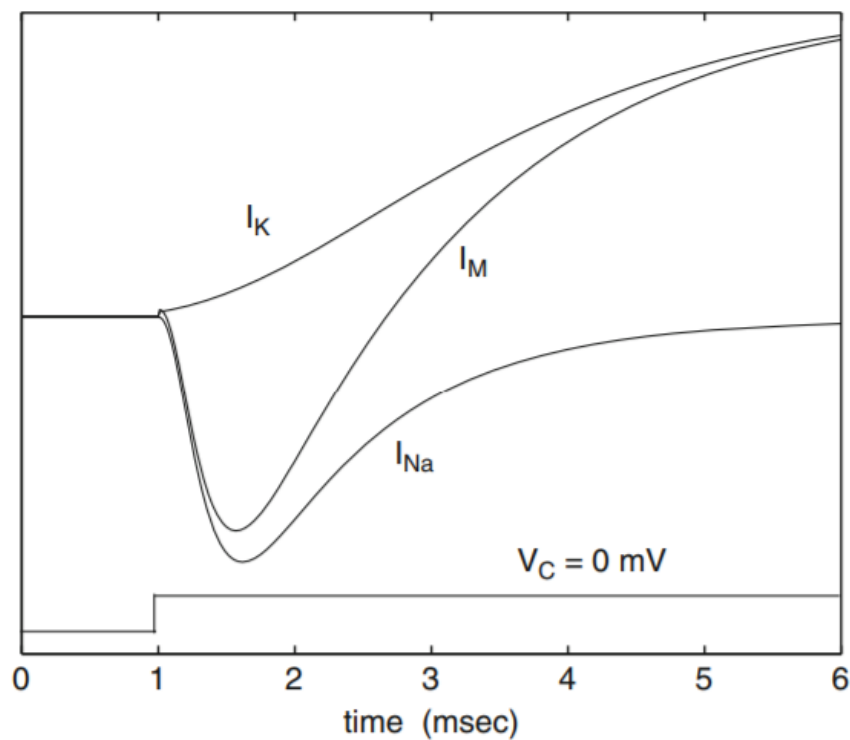


Рис.2.3. Внутрішні та зовнішні струми зафіксовані для аксона кальмара при фіксованій напрузі

Для визначення того як два струми сприяють утворюють загальний потенціал мембрани Гочкін і Гакслі ізолювали калієвий струм шляхом заміни іонів натрію у зовнішньому розчині на непроникний для даної мембрани

катіон. Таким чином затискач був використаний для вимірювання того як калієвий струм залежить від мембранного потенціалу.

Аналогічним чином блокуючи калієві канали за допомогою препарату тетратиамонія можна було визначити залежність натрієвого струму від мембранного потенціалу. Даний спосіб не був доступний на момент проведення експерименту, однак знаючи калієвий струм та струм витоку можна обчислити натрієвий струм вираховуючи ці два струми із загального струму. Знаючи залежності струмів для іонних каналів від напруги можемо за допомогою закону Ома обрахувати провідності каналів:

$$g_K(t) = \frac{I_K(t)}{(V_M - E_K)} \qquad g_{Na} = \frac{I_{Na}(t)}{(V_M - E_{Na})} \quad (2.17)$$

Проілюструємо вищезгадані залежності - на Рис.2.4 зображено натрієві та калієві провідності при різних значеннях напруги.

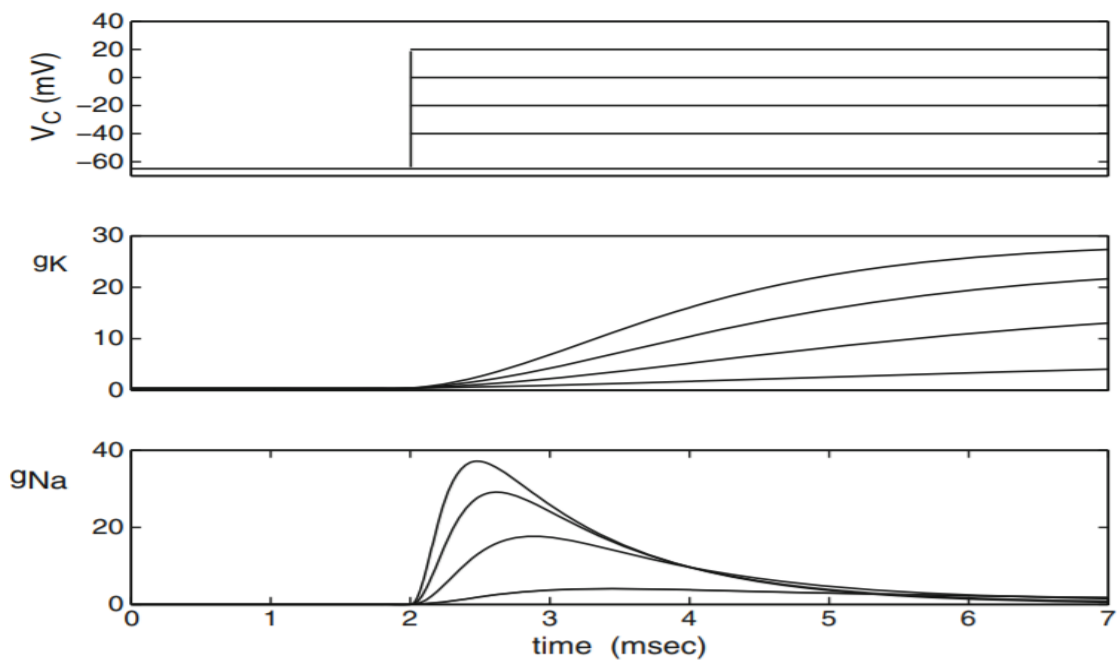


Рис.2.4 Зміна провідності натрієвих та калієвих каналів при різних підтримуючих потенціалах мембрани

Фізичну інтерпретацію натрієвого каналу зображено на Рис.2.5. Таким чином в натрієвому каналі існує два воротних механізми: швидкий – активаційні ворота (представлені лінією) та повільний - ворота інактивації (представлені кулею на рисунку). Обидва воротні механізми мають бути відкритими для проведення іонів натрію. В стані спокою інактиваційні ворота відкриті, а під час певного часу деполяризації інактиваційна куля закривається.

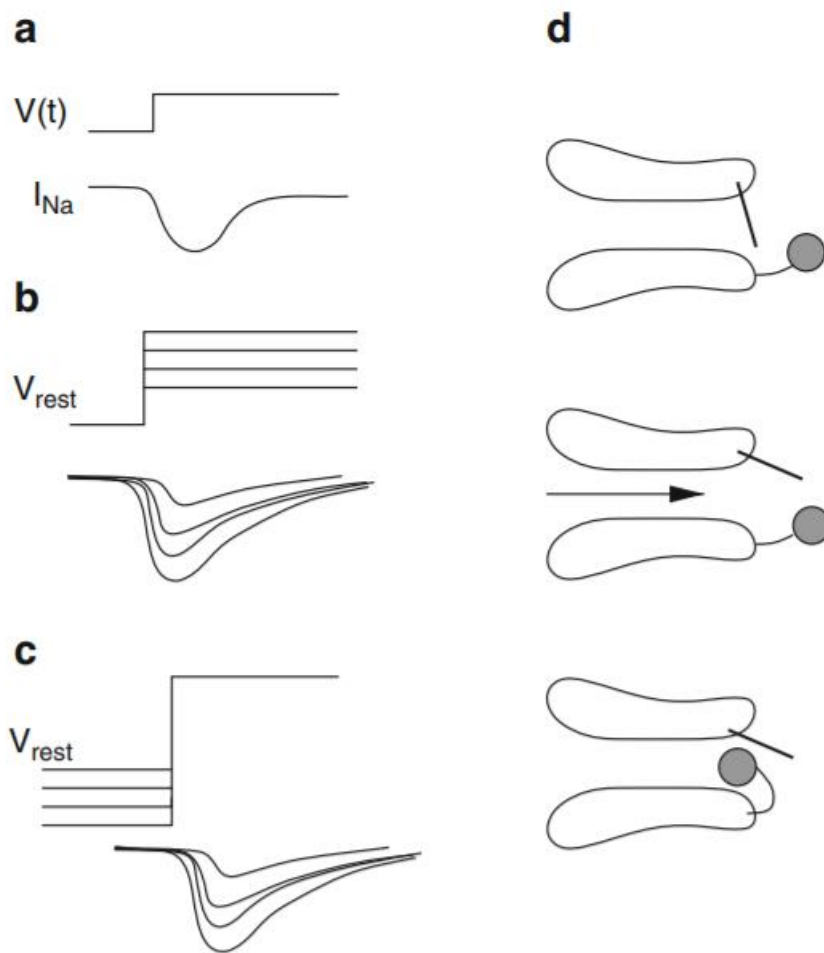


Рис.2.5 Залежність натрієвого струму від прикладеного потенціалу (а-с).

Фізична модель активації, інактивації та закриття каналу (d).

### 2.2.3 Опис станів натрієвих та калієвих воротних механізмів

Використовуючи дані отримані в наслідок встановлення постійної напруги та вимірювання відповідних провідностей, Гочкін і Гакслі встановили наступні співвідношення для натрієвої та калієвої провідностей:

$$g_K = \bar{g}_K n^4 \quad g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h \quad (2.18)$$

де  $\bar{g}_K$  та  $\bar{g}_{Na}$  – максимальне значення провідностей;  $m$ ,  $h$ ,  $n$  – змінні що приймають значення від 0 до 1 та характеризують частку відкритих каналів.

Характер провідностей в формулі (2.18) пояснюється наступним фактом:

- калієві канали складаються з чотирьох ідентичних компонент, тому імовірність того що канал знаходиться в відкритому стані становить  $n^4$ ;
- імовірність відкриття воротного механізму активації натрієвого каналу відповідає  $m^3$ , а імовірність того що воротний механізм інактивації відкритий –  $h$ ;

Кожна із вищезгаданих змінних задовільняє відповідне диференціальне рівняння першої степені:

$$\begin{aligned} \frac{dn}{dt} &= \alpha_n(V)(1-n) - \beta_n(V)n = (n_\infty(V) - n)/\tau_n(V) \\ \frac{dm}{dt} &= \alpha_m(V)(1-m) - \beta_m(V)m = (m_\infty(V) - m)/\tau_m(V) \\ \frac{dh}{dt} &= \alpha_h(V)(1-h) - \beta_h(V)h = (h_\infty(V) - h)/\tau_h(V) \end{aligned} \quad (2.19)$$

Якщо  $X = n, m$ , або  $h$ , то введені змінні мають наступний вигляд:

$$X_{\infty}(V) = \frac{\alpha_X(V)}{\alpha_X(V) + \beta_X(V)}$$

$$\tau_X(V) = \frac{1}{\alpha_X(V) + \beta_X(V)} \quad (2.20)$$

$$\begin{aligned} \beta_m(V) &= 4 \exp(-(V + 65)/18) \\ \alpha_h(V) &= 0.07 \exp(-(V + 65)/20) \\ \beta_h(V) &= 1 / (1 + \exp(-(V + 35)/10)) \end{aligned} \quad (2.21)$$

Для узгодження даних експерименту Гочкін і Гакслі встановили значення наступних параметрів для провідності аксона кальмара [18]:

- максимальна провідність натрієвих каналів:  $\bar{g}_{Na} = 120 \text{ mS/cm}^3$ ;
- максимальна провідність калієвих каналів:  $\bar{g}_K = 36 \text{ mS/cm}^3$ ;
- провідність витоків:  $\bar{g}_L = 0.3 \text{ mS/cm}^3$ ;
- реверсний потенціал для каналів натрію:  $E_{Na} = 50 \text{ мВ}$ ;
- реверсний потенціал для каналів калію:  $E_K = -77 \text{ мВ}$ ;
- реверсний потенціал витоків:  $E_L = -54.4 \text{ мВ}$ ;

Враховуючи вище перелічені параметри константи швидкості приймають вигляд:

$$\begin{aligned} \alpha_n(V) &= 0.01(V + 55) / (1 - \exp(-(V + 55)/10)) \\ \beta_n(V) &= 0.125 \exp(-(V + 65)/20) \\ \alpha_m(V) &= 0.1(V + 40) / (1 - \exp(-(V + 40)/10)) \\ \beta_m(V) &= 4 \exp(-(V + 65)/18) \\ \alpha_h(V) &= 0.07 \exp(-(V + 65)/20) \\ \beta_h(V) &= 1 / (1 + \exp(-(V + 35)/10)) \end{aligned} \quad (2.22)$$

Для повного розуміння пропускної здатності іонних каналів побудуємо графік залежності стану воротних механізмів натрієвих та калієвих каналів бути відкритими від напруги на мембрані.

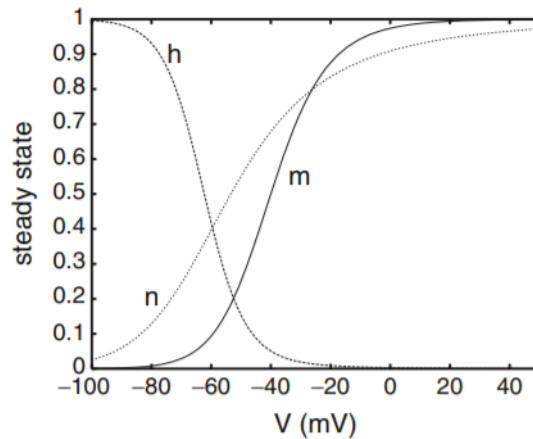


Рис.2.6. Графіки залежності стану воротних механізмів натрієвих та калієвих каналів від потенціалу на мембрані.

Врахувавши рівняння (2.18) побудуємо графік зміни стану воротних механізмів та самих каналів в цілому від часу при фіксованій напрузі  $U=0\text{mV}$  (Рис.2.7).

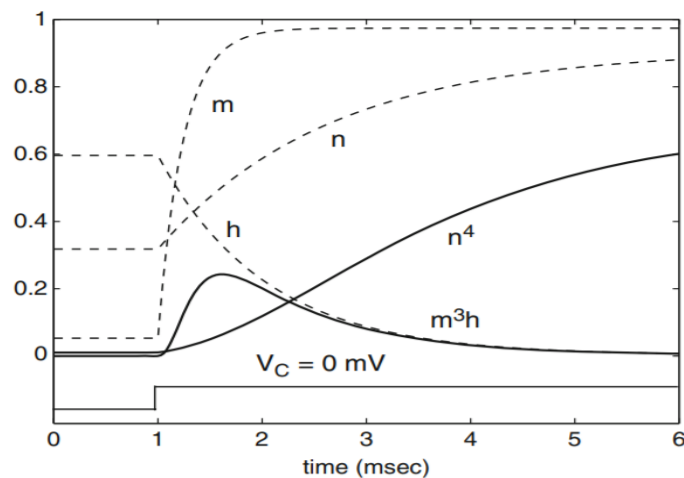


Рис.2.7. Зміна з часом стану воротних механізмів натрієвих та калієвих каналів.

### 2.2.4 Адаптація моделі Гочкіна-Гакслі для різних типів нейронів

В даному підрозділі представлена модель Гочкіна-Гакслі для нейронів різних типів.

Опис кінетичних коефіцієнтів для потенціал утворюючих натрієвих та калієвих каналів обраховані на основі вивчення збудження аксона кальмара може бути застосовано не лише для даного типу нейронів. Опис провідності на основі моделі Гочкіна-Гакслі добре підходить для опису збудження нейронів гіпокампа і кортикальних пірамідальних клітин [19].

Константи швидкості в даному випадку приймають наступний вигляд:

-натрієві канали:

$$\begin{aligned}\alpha_m &= \frac{-0.32(V-V_T-13)}{\exp[-(V-V_T-13)/4]-1} \\ \beta_m &= \frac{0.28(V-V_T-40)}{\exp[(V-V_T-40)/5]-1} \\ \alpha_h &= 0.128 \exp[-(V-V_T-17)/18] \\ \beta_h &= \frac{4}{1+\exp[-(V-V_T-40)/5]}\end{aligned}\tag{2.23}$$

-калієві канали:

$$\begin{aligned}\alpha_n &= \frac{-0.032(V-V_T-15)}{\exp[-(V-V_T-15)/5]-1} \\ \beta_n &= 0.5 \exp[-(V-V_T-10)/40]\end{aligned}\tag{2.24}$$

На відміну від розглянутої раніше моделі, нейрони гіпокампа потребують розгляду додаткових повільно інактивуючих калієвих каналів. Відповідні рівняння опису кінетичних параметрів для каналів даного типу у моделі Гочкіна-Гакслі мають наступний вигляд:

$$\begin{aligned}
 I_m &= \bar{g}_M p(V - E_K) \\
 \frac{dp}{dt} &= (p_\infty(V) - p) / \tau_p(V) \\
 p_\infty(V) &= \frac{1}{1 + \exp[-(V + 35)/10]} \\
 \tau_p(V) &= \frac{\tau_{max}}{3.3 \exp[(V + 35)/20] + \exp[-(V + 35)/20]}
 \end{aligned}
 \tag{2.25}$$

## Висновки до розділу 2

Аналізуючи існуючі моделі для опису нейрона, а саме однієї із найважливіших його функціональних характеристик – потенціалу дії, було прийняте рішення використовувати адаптовану до нейронів гіпокампа модель опису Гочкіна–Гакслі для досягнення максимальної біологічної правдоподібності та можливості чисельного аналізу зміни характеристик імпульсації за відомих змінах потенціал-залежних струмів у випадку ексайтотоксичного пошкодження даного нейрона глутаматом в концентрації 100мкМ/л.



### 3 МЕТОДИКА ТА ЕКСПЕРИМЕНТ

#### 3.1 Культивування нейронів гіпокампа щура

Новонароджених щурів анестезували та декапітували. Виділений гіпокамп протягом 10 хв обробляли розчином трипсину з концентрацією 0,025% при температурі 34<sup>0</sup>С. За допомогою пастерівських піпеток різного діаметру клітини дисоціювали та висівали на покритті поліарнітином пластикові чашки Петрі та культивували у середовищі наступного складу: 10% кінська сироватка, 2,3 г/л NaHCO<sub>3</sub>, 6 мг/мл інсуліну, 100 од/мл пеніциліну, 100мкг/мл стрептоміцину[20]. На третю добу культивування для пригнічення росту гліальних клітин на добу додавали 5мкМ/л цитозин-А-D-арабіно-фуранозид, після чого середовище замінювали на нормальне. Електрофізіологічні дослідження проводились через 7-10 днів після початку культивування.

#### 3.2 Метод «Петч-клемп»

«Петч-клемп», або метод локальної фіксації потенціалу – це електрофізіологічний метод що дозволяє ізолювати вплив на фрагмент мембрани заданою напругою з метою вимірювання результуючого струму, також даний метод використовується як вплив на частину мембрани встановленим струмом з метою вимірювання напруги на даному фрагменті[21]. Зауважимо, що зазвичай говорячи про метод локальної фіксації потенціалу(«петч-клемп») найчастіше мають на увазі «вольтеч-клемп».

Запровадили цей метод в 1967р. Неєрі Сакманн застосувавши дану техніку для того щоб зафіксувати крихітний (в декілька десятків пікоампер) іонний струм, що проходить через поодинокі канали в

мембранах клітини[22]. Дана методика відкрила цю можливість для широкого спектру клітин і тому назавжди змінила курс електрофізіології. На час відкриття, це було практично немислиме досягнення, за яке вчені, згодом, отримали Нобелівську Премію (1992р.)

Дивно, але чисто з механічного боку, метод досить простий. Все що потрібно це повільно натиснути скляною мікропіпеткою на клітку. Шматочок мембрани, який закриває піпетку піддається захопленню через піпетку що знаходиться ззовні клітини та стає ізольованою від решти мембрани.

### **3.3 П'ять конфігурацій методу «Петч-Клемп»**

Неєр, Сакманн і їх колеги незабаром після вищеописаного досліджу відкрили простий спосіб поліпшити метод «петч-клемп». Вони використовували скляні піпетки з супер-чистими наконечниками в відфільтрованих розчинах і застосовували деяке зменшення тиску в самій піпетці. За такої процедури, утворювався щільний контакт мембрани і піпетки, вимірюваний в термінах опору: гіга-омний контакт (гігасил).[22] Ця конфігурація і цей метод дозволяв записувати результати з одноканального струму фіксованого фрагмента, в той час як неушкоджена клітина все ще була приєднана до фрагменту.

Процедура гіга-омної фіксації дозволила Неєру, Сакманну і колегам винайти ще три конфігурації вимірювань, включаючи одну для внутрішньоклітинної фіксації напруги і струму. У останній конфігурації шматок мембрани між розчином піпетки і цитоплазмою розбивається імпульсом від'ємного тиску, підтримуючи при цьому щільний контакт, а прикладний потенціал піпетки розширюється в клітку щоб діяти фіксацією напруги на плазму мембрани. Альтернативно, підсилювач може бути використаний щоб

ввести струм в клітку для того щоб використовувати фіксацію напруги на мембрані клітини і зафіксувати напругу, наприклад, щоб вивчити потенціал дії малих збудливих клітин, що було неможливим до винаходу гіга-омного контакту.

Два інших варіанти конфігурації є прямими спадкоємцями техніки «петч-клемпінга», так як в їх основі лежить «клемпінг» маленького фрагмента мембрани. Гіга-омним контактом приєднуються до цілої клітини, фрагмент нейрона може бути вирваний з клітки різким відведенням піпетки від клітини. Найчастіше, клітина переживає цю процедуру запечатуванням пошкодженої мембрани - таким чином видалення фрагмента клітини може бути зроблено ще раз. Вирізаний фрагмент називається «фрагмент вивернутий навиворіт», тому що «нутроці» плазми мембрани тепер піддаються формальному впливу сольового розчину. Ця конфігурація дозволяє піддавати цитоплазму впливу різних розчинів в певному порядку, наприклад, щоб протестувати внутрішньоклітинні фактори, які контролюють активність каналів мембрани.

Другий тип вирізаного фрагмента може бути отриманий з вищезгаданої конфігурації за допомогою повільного (в цьому випадку не різкого!) відсування піпетки від цільної клітини. За допомогою такого маневру, спочатку створюється тонка фібра яка незабаром розривається і утворює бульбашку на кінці піпетки. Отримана конфігурація дійсно є мікро-версією конфігурації цілої клітини, що дозволяє досліджувати невелику кількість каналів або одиночний канал та з легкістю відправляти «міні клітину» в різні розчини.

Підключення, в данні конфігурації, підсилювача що вимірює струм або напругу до піпетки і ванни з розчином показано на рисунку 2.1, але це під'єднання так само можна застосувати для інших конфігурацій. Вимірювальний електрод вставляється в піпетку, в той час як еталонний електрод поміщається в ванночку.

«Проникаючий Петч» конфігурації «ціла клітина» є п'ятою конфігурацією, в якій контакт до приєднаної клітини по суті не рветься, але з метою отримати доступ до «нутрощів» клітини, в нього проникають за допомогою додавання штучних іонних каналів (одновалентних катіонів канало-формуєчих антибіотиків) за допомогою розчину з піпетки. Прикладами таких антибіотиків служать амфотерицин і ністатин, обидва з яких виробляються мікроорганізмами. Велика перевага таких конфігурацій в тому що вона дозволяє виконувати внутрішньоклітинні вимірювання постійної напруги та постійного струму на відносно недоторканній клітці, іншими словами на клітці з практично нормальним цитоплазматичним складом.

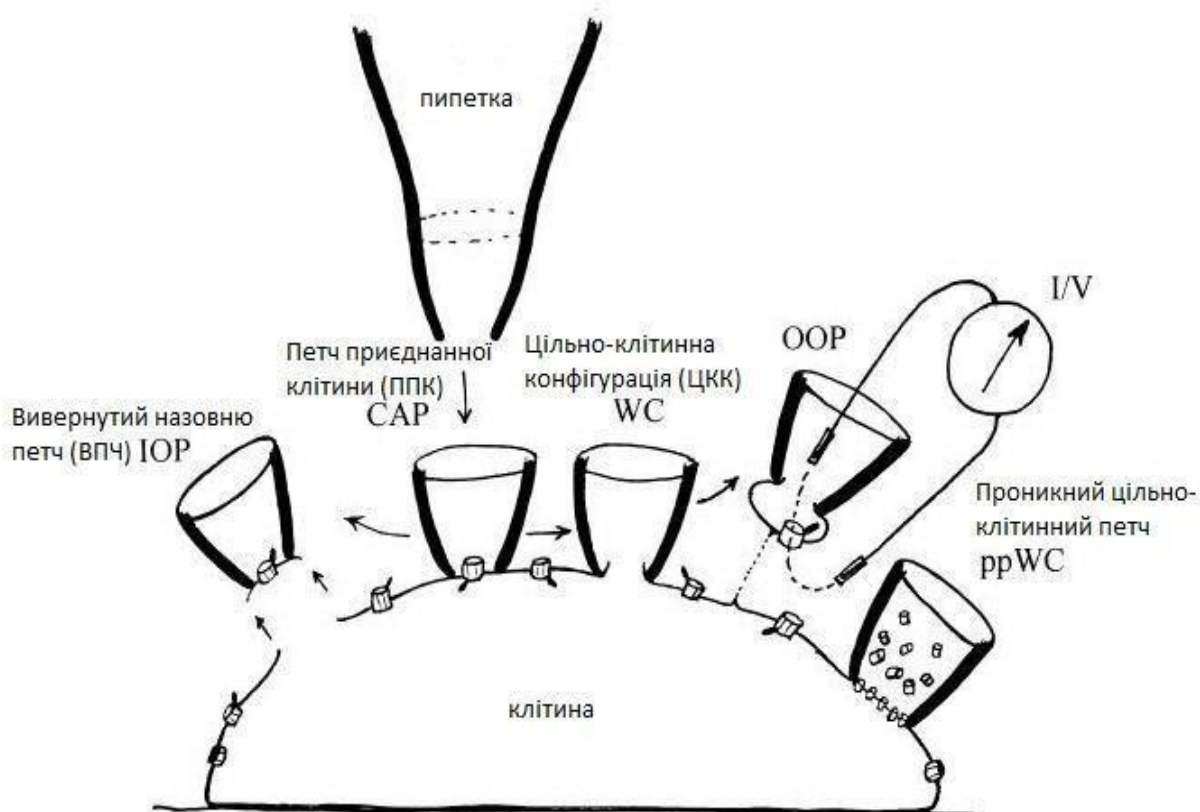


Рисунок 3.1 Ілюстрація 5-ти конфігурацій методу «петч-клемп»

### 3.4 «Петч-клемп» і електроеквівалентні схеми

«Петч-клемп» це техніка в основі якої лежить електрика. При реалізації однієї з п'яти методик «петч-клемпу» необхідно постійно спостерігати реакції струму\напруги на поступовий вплив напругою\струмом, щоб переконатися що конфігурація коректно працює. Тобто експериментатор повинен весь час візуалізувати систему як просту електричну схему що складається з резисторів, конденсаторів і батарей. Так як ці конфігурації практично еквівалентні реальним умовам вимірювань в деяких відносинах, ці моделі також називають еквівалентними схемами[22]. Приклади такого тестування наведені на рисунку 3.2а.

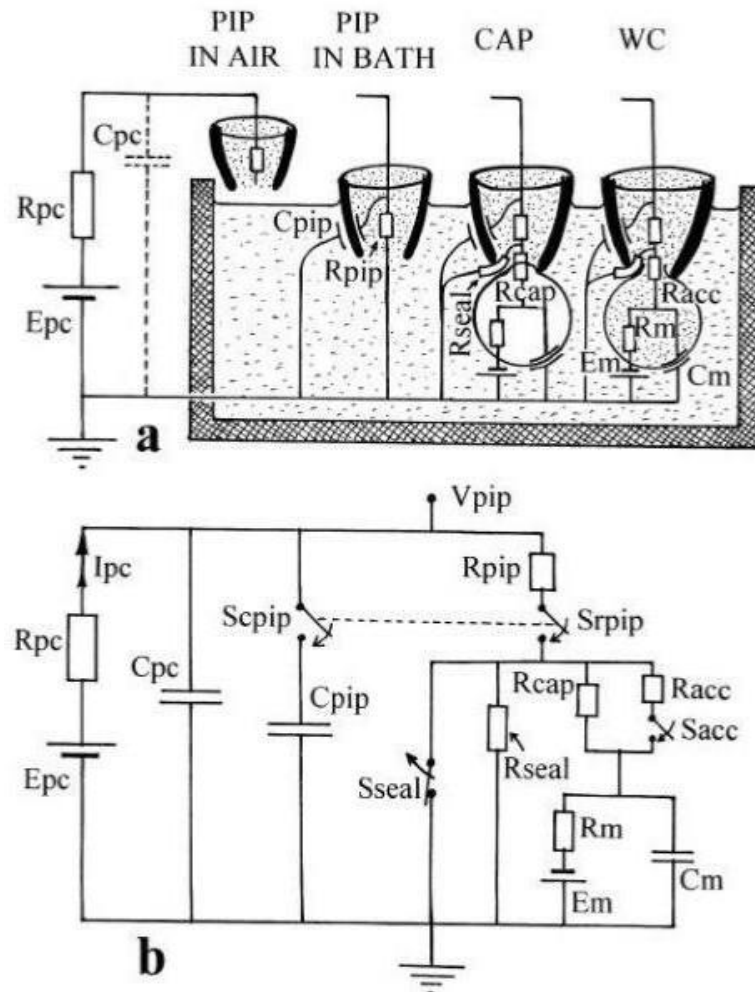


Рисунок 3.2 Еквівалентна електрична схема для конфігурації цілої клітини. (а) – візуалізація експерименту як простої електричної схеми, (б) – повністю еквівалентна електрична схема.

На цьому малюнку, «петч-клемп» підсилювач представлений джерелом напруги, з набором резисторів, обидва з яких шунтовані вхідною ємністю. У той момент як піпетка входить в розчин - піпетка представлена як опір піпетки і ємність піпетки. Гіга-омний контакт піпетки до мембрани клітини може бути представлено заміною прямого підключення піпетки до заземленої ванночки.

Після того як гіга-омний контакт сформувався, отвір піпетки закривається «петчем» приєднаної клітини з його високим опором. Руйнування «петча» до приєднаної клітини замінює опір петча на опір доступу, що дає зв'язок з «нутрощами» цілої клітини з її  $E_m$ :  $R_m$ :  $C_m$ .

Рисунок 3.2(б) показує що три кроки, необхідні для отримання конфігурації «цілої клітини» можуть бути симулювання простою електричною схемою з трьома перемикачами[22]. Закриття  $S_{pip}$  (подвійний перемикач з  $S_{cpip}$  і  $S_{rpip}$ ) відображає вхід в ванночку піпеткою, відкриття перемикача  $S_{seal}$  символізує запечатування і закриття перемикача  $S_{acc}$  симулює встановлення конфігурації «ціла клітина» за допомогою короткого замикання  $R_{cap}$  з додатковим опором  $R_{acc}$ . Під час самого досліду, експериментатор може розпізнати входження в ванночку гіга-омного контакту клітини і створення конфігурації «ціла клітина», подачею напруги в піпетку і інтерпретуючи реакцію струму, так як ніби це була електрична схема. Це є головною цінністю еквівалентних схем. Те ж справедливо і для отримання інших конфігурацій «Петч-клемпа» описаних вище.

### 3.5 Проведення експерименту

Електрофізіологічну реєстрацію струмів від нейронів гіпокампа щура проводили з використанням підсилювача AxoClamp 200В в конфігурації «ціла клітина» при кімнатній температурі з використанням

зовнішньоклітинного фізіологічного розчину наступного складу(ммоль/л): NaCl–140, KCl–3, CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> – 2, Hepes – 10, глюкоза – 12, рН – 7,4. Електроди-піпетки заповнювали внутрішньоклітинним розчином (ммоль/л): глюканат калію – 100, KCl – 50 , MgCl<sub>2</sub> – 5, EGHTA – 10, Hepes – 20, рН –7,4.

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 глютамінової 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 10мВ. При цьому реєстрували відповідний потенціал- залежний (інтегральний)струм.

Після контрольної реєстрації експериментальну камеру протягом 5 хвилин перфузіювали 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 [1].

В ході дослідження вдалось записати сигнал потенціал-залежного струму в контролі та після впливу глютамата для 5-ти клітин.

### **Висновок до розділу 3**

В результаті аналізу можливих методів дослідження культивованих нейронів гіпокампу щура було вибрано конфігурацію «цілої клітини» методу «петч-клемп», оскільки в даній конфігурації мікропіпетка фіксує лише частину мембрани та не впливає на поведінку всієї клітини, така конфігурація дає можливість досліджувати функціонування всієї клітини внаслідок глутаматної ексайтотоксичності.

При цьому еквівалентність приєднання піпетки та проведення експерименту в конфігурації «ціла клітина» з проведеною вище електричною схемою дозволяє визначити вклад саме мембранних струмів в виміряну силу струму.



## 4 ПОБУДОВА МОДЕЛІ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

### 4.1 Побудова моделі потенціалу дії

Почнемо побудову моделі з визначення іонних каналів які беруть участь в утворенні активації потенціалу дії до впливу глутамату (контроль). Розглянемо реальний нейрон в режимі фіксації потенціалу. Для цього клітину підтримували при потенціалі  $-70$  мВ, пропускаючи відповідний гіперполяризуючий струм (10-150 пА). Далі нейрони активували прикладанням деполяризуючих командних імпульсів тривалістю 200 мс від підтримуваного потенціалу з інкрементом 10мВ. При цьому реєстрували відповідний потенціал-залежний (інтегральний) струм (Рис.4.1).

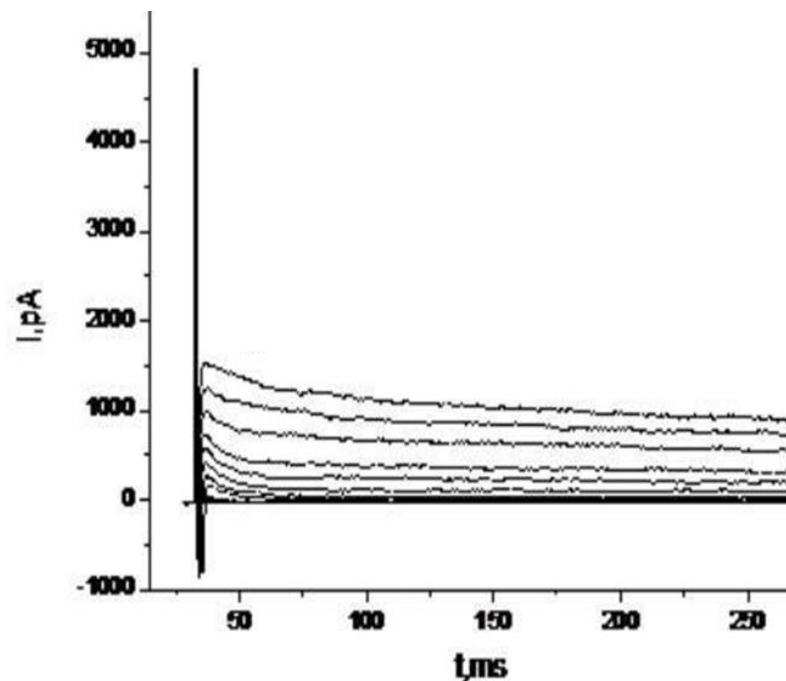


Рис.4.1 Експериментально визначений потенціал-залежний струм нейрона гіпокампа (контроль)

Виділимо з Рис.4.1 компоненти вхідного (натрієвого) та вихідного(калієвого) струмів та порівняємо з відповідними струмами що були розглянуті в першому розділі роботи (Рис.4.2). Через те що з експериментального запису потенціал-залежних струмів графічно виділити лише вхідні або вихідні іонні струми маломожливо, зосередимось на частинах в яких переважають ті чи інші компоненти іонних струмів.

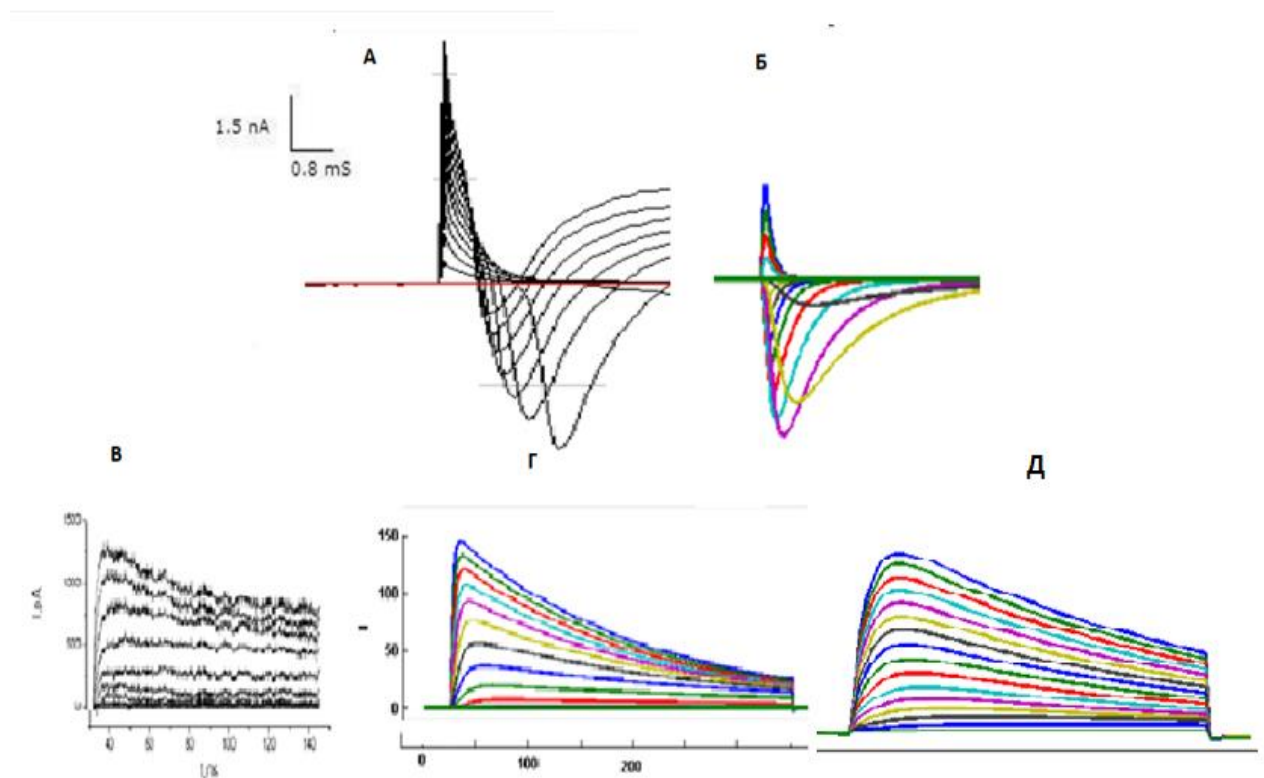


Рис.4.2 Експериментально визначений потенціал-залежний вхідний струм(А); Експериментально визначений потенціал-залежний вихідний струм(В); Модель вхідного струму для іонного каналу  $Na_v1.1$ (Б); Модель вихідного струму для повільноінактивуючих  $K^+$  каналів (Г);Модель вихідного струму швидкоінактивуючих  $K^+$  каналів(Д).

Як можна бачити з Рис.4.2 характер вхідних іонних струмів зафіксований експериментально та визначений для окремих каналів має схожий характер, що доводить гіпотезу зроблену в першому пункті даної

роботи про основну роль  $Na_v1.1$  в генерації потенціалу дії. Якщо ж порівняти експериментальні вихідні струми з потенціал-залежними повільноінактивуючими та швидкоінактивуючими калієвими каналами, то побачимо що в цьому випадку експериментальний вихідний струм є суперпозицією вищеперерахованих каналів.

Для створення моделі потенціалу дії використаємо адаптивну модель Гочкіна-Гакслі. З попередніх міркувань та експериментальних даних, очевидно, що в генерації потенціала дії нейрона гіпокампа відіграють важливу роль наступні компоненти: стан натрієвих воротних механізмів, стан повільноінактивуючих та швидкоінактивуючих калієвих воротних механізмів що в свою чергу залежать від потенціалу мембрани, що описуються рівняннями які ми вже згадували в минулому розділі.

Розглянемо математичну схему моделювання потенціалу дії:

1) Провідність відповідних іонних каналів - визначний фактор утворення та формування ПД.

$$g_K = \bar{g}_K n^4 g_{Na} = \bar{g}_{Na} m^3 h \quad (4.1)$$

2) Диференційні рівняння що описують ймовірності відповідних воротних механізмів потенціал-залежних каналів знаходиться у відкритому чи закритому стані:

$$\begin{aligned} \frac{dn}{dt} &= \alpha_n(V)(1-n) - \beta_n(V)n = (n_\infty(V) - n)/\tau_n(V) \\ \frac{dm}{dt} &= \alpha_m(V)(1-m) - \beta_m(V)m = (m_\infty(V) - m)/\tau_m(V) \\ \frac{dh}{dt} &= \alpha_h(V)(1-h) - \beta_h(V)h = (h_\infty(V) - h)/\tau_h(V) \end{aligned} \quad (4.2)$$

Залежність констант швидкості різних типів іонних каналів від напруги:

- Натрій.

$$\alpha_m = \frac{-0.32(V-V_T-13)}{\exp[(V-V_T-13)/4]-1}$$

$$\beta_m = \frac{0.28(V-V_T-40)}{\exp[(V-V_T-40)/5]-1}$$

$$\alpha_h = 0.128 \cdot \exp[-(V-V_T-17)/18]$$

$$\beta_h = \frac{4}{1+\exp[-(V-V_T-40)/5]}$$

- Калій швидко-інактивуючий

$$\alpha_n = \frac{-0.032(V-V_T-15)}{\exp[-(V-V_T-15)/5]-1}$$

$$\beta_n = 0.5 \exp[-(V-V_T-10)/40]$$

- Калій повільно-інактивуючий

$$I_M = \bar{g}_M p(V - E_K)$$

$$\frac{dp}{dt} = (p_\infty(V) - p)/\tau_p(V)$$

$$p_\infty(V) = \frac{1}{1+\exp[-(V+35)/10]}$$

$$\tau_p(V) = \frac{\tau_{max}}{3.3 \exp[(V+35)/20] + \exp[-(V+35)/20]}$$

3) Розв'язавши вищезгадані диференційні рівняння 4.2 за відомих констант швидкості отримаємо залежність від напруги ймовірності знайти певні канали відкритими або закритими, якщо при цьому відомі максимальні значення провідності іонних каналів за допомогою рівняння 4.1 отримаємо залежність провідності самих іонних каналів від МП.

4) Знаючи залежність провідності іонних каналів від напруги та деякі константи можемо розв'язати диференційне рівняння:

$$C_M \frac{dV}{dt} = -g_{Na}(V - E_{Na}) - g_K(V - E_K) - g_L(V - E_L) + g_M(V - E_M) \quad (4.3)$$

та отримати залежність напруги на мембрані від часу, тобто потенціал дії.

Моделювання потенціалу відбувалось в програмному середовищі NEURON і включало наступні етапи:

- 1) Створення відповідних станів воротних механізмів різних іонних каналів.
- 2) Встановлення відповідних залежностей для констант швидкості від напруги на мембрані.
- 3) Встановлення відповідних числових параметрів для іонних каналів клітини.
- 4) Встановлення параметрів соми нейрона.
- 5) Задання стимулу.
- 6) Будуємо потенціал дії.

Моделювання ПД для нейронів гіпокампа в середовищі NEURON можна виконати двома способами:

- 1) через модуль “ChannelBilder” сформувати відповідні канали, після чого створити об’єкт “soma”, задати відповідні параметри та подати на клітину стимул.
- 2) за допомогою мови програмування NMODL можна створити потрібні канали та зберегти їх з розширенням .mod, після чого в .hoc файлі прописати всі необхідні параметри для тіла нейрона та для стимулу. Даний спосіб заощаджує достатньо часу через відсутність зайвих дій та маніпуляції з меню середовища, тобто дає можливість створювати досить громіздкі проекти та легко ними керувати. Єдиним недоліком даного способу є те що всі файли з розширення .mod при кожному редагуванні потрібно заново компілювати.

## 4.2 Числові параметри моделі

Розглянемо необхідні параметри для того щоб вищевказана модель коректно відображала поведінку нейрона гіпокампа щура. Створимо потенціал дії що відповідає стану клітини в «контролі» та порівняємо його з потенціалом дії отриманого в експерименті. В Таблиці 4.2 відповідно до літературних даних [19] наведений перелік необхідних параметрів для обрахунку ПД.

Таблиця 4.2

Основні характеристики іонних каналів

Максимальна провідність іонних каналів, $S/cm^2$	$g_{leak}$	$g_{Na}$	$g_k$	$g_M$	$V_T$ , мВ	$\tau$ , мс
	0.001	0.1	0.01	$1e-6$	55	1000
Реверсний потенціал, мВ	-70.3	50	-95	-	-	-

Таблиця 4.3

Основні характеристики соми нейрона гіпокампа

D, мкм	L, мкм	$C_m$ , мкФ	$R_a$ , Ом·см
61.4	61,4	1	100

де D – діаметр соми клітини, L – довжина соми,  $C_m$  – ємність мембрани,  $R_a$  – осьовий опір,  $g_{leak}$  – провідність витоків,  $g_{Na}$  – проникність натрієвих каналів,  $g_k$  – провідність швидкоінактивовуючих калієвих каналів,  $g_M$  – проникність повільноінактивовуючих калієвих каналів.  $V_T$ ,  $\tau$  – параметри моделі опису потенціалу дії.

### 4.3. Порівняння моделі з експериментом

Порівнюємо отриману модель ПД з експериментальною залежністю мембранного потенціалу від часу. Реєстрацію викликаних ПД проводили при мембранному потенціалі  $-70\text{мВ}$ , для підтримування якого через нейрон пропускали відповідний гіперполяризуючий струм [1]. Нейрон активували послідовними прямокутними деполяризуючими імпульсами струму тривалістю  $500\text{ мс}$  з інкриментом амплітуди  $5\text{-}10\text{ пА}$ . Експеримент був проведений над 5 - тьма нейронами гіпокампа. Представимо ПД для однієї із клітин – Рис. 4.3.

Електрофізіологічні характеристики даної клітини мають наступні значення (Таблиця 4.4).

Таблиця 4.4

Електрофізіологічні властивості нейрона гіпокампу до впливу глутамату

Опір, ГОм	2,69	Піковий вхідний струм, при $U=+40, \text{пА}$	-810,38
Успок, мВ	-40,26	Піковий вихідний струм, при $U=+40, \text{пА}$	647,7

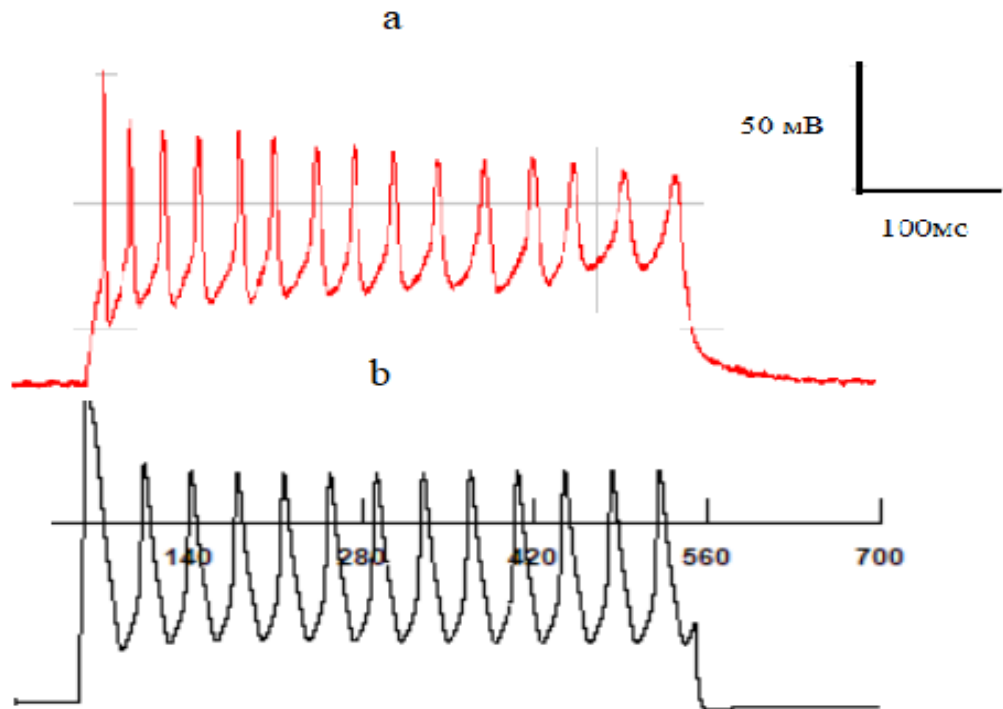


Рис. 4.3. Порівняння потенціалу дії отриманого з експерименту над центральним нейроном гіпокампу в наслідок його стимуляції прямокутними імпульсами тривалості 500мс та інкрементом амплітуди 5-10пА (а) з потенціалом що обрахований за допомогою адаптивної моделі Гочкіна – Гакслі (b).

Отже, як помітно з Рис.4.3 – створений на основі моделі Гочкіна-Гакслі потенціал дії для нейронів гіпокампу може бути використаний у якості математичного опису клітини.

Розглянемо вплив зміни провідності іонних каналів на генерацію ПД для того ж нейрона гіпокампа але після ексайтотоксичного пошкодження глутаматом.

Отримані з попередньої роботи результати по зміні амплітудного значення вхідних та вихідних струмів наведені в Таблиці 4.5.



Таблиця 4.5

Електрофізіологічні параметри нейрона гіпокампа після 5хв впливу 100мкМ глутамату.

Опір, Гом	1,59	Піковий вхідний струм, при $U=+40, \text{пА}$	-629,13
Успок, мВ	-15,51	Піковий вихідний струм, при $U=+40, \text{пА}$	545,69

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  $U=+40 \text{ мВ}$  що наведені в Таблиці 4.4 – 4.5. Потенціал дії для нейрона після ексайтотоксичного пошкодження згідно до експериментальних даних має наступний вигляд (Рис. 4.4).

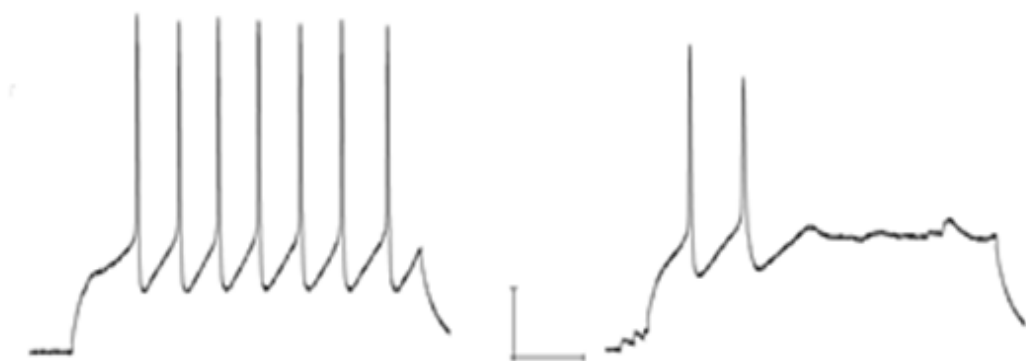


Рис. 1.13. Потенціал дії нейронів гіпокампа до (ліворуч) та після (праворуч) аплікації глутамату. Калібрування: 20мВ, 20с.

Оскільки провідність каналів та іонні струми пов'язані лінійно, робимо висновок що максимальне значення провідності натрієвих та калієв каналів  $g_K$ ,  $g_{Na}$  зменшується на той же відсоток що і відповідні іонні струми.

Усереднивши зміни провідностей по п'яти клітинам маємо що значення провідностей для натрієвого струму при фіксованому потенціалі величиною +40мВ змінюється від  $-1000 \pm 200$ пА до  $-500 \pm 100$ пА ( $40 \pm 9\%$ ), а калієвої провідності від  $1100 \pm 200$ пА до  $800 \pm 200$ пА. ( $25 \pm 8\%$ ) в наслідок ексайтотоксичного пошкодження.

Дані зміни провідності іонних каналів викликані додаванням глутамату змінюють характеристики потенціала дії наступним чином :

- амплітуда ПД зменшилась від  $91 \pm 4$  до  $65 \pm 5$ мВ;
- тривалість ПД збільшилась від  $4,3 \pm 0,4$  до  $9,5 \pm 1,6$ мс;
- максимальна швидкість деполяризації змінилась від 56 до 27мВ/мс;
- максимальна швидкість реполяризації змінилась від -29 до -20мВ/мс;

Аналізуючи характер описаного за допомогою математичної моделі Гочкіна-Гакслі потенціалу дії в контролі та його залежність від пропускну здатності іонних каналів можемо зробити висновок що зміна функціональних властивостей нейрона є наслідком руйнування його структурних.

Поведінка потенціалу дії в реальному досліді після відмивання з розчину глутамата має наступний характер - спочатку нейрон частково відновлює здатність до генерації потенціалу дії (що не стосується усіх реальних нейронів, адже частка нейронів що гибнуть складає близько половини від загальної популяції [1]) яку втрачає з часом прямуючи до нульового потенціалу.

## 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.

## СПИСОК 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.
2. Molecular Cell Biology / Alberts B., Johnson A., Lewis J., et al.— 4th edition – New Y: Garland Science, 2002. – p.1634-1639.
3. Principles of Neural Science/ Kandel, E.R.; Schwartz, J.H.; Jessel, T.M. - McGraw Hill, 2000. - p. 928.
4. Encyclopedia of Neuroscience: Volume One/ Floyd E. Bloom, Nicholas C. Spitzer, Fred Gage, Tom Albright - Academic Press, 2009. – p. 221-228.
5. Na Channel  $\beta$  Subunits: Overachievers of the Ion Channel Family/ Brackenbury, W.J., and Isom - Front Pharmacol, 2011. – p. 2, 53.
6. Properties of human brain sodium channel  $\alpha$ -subunits expressed in HEK293 cells and their modulation by carbamazepine, phenytoin and lamotrigine/ Xin Qiao, Guangchun Sun , Jeffrey J Clare - British Journal of Pharmacology, 2013. – p. 1054–1067.
7. A model of the electrophysiological properties of thalamocortical relay neurons/ McCormick DA. et al. - J. Neurophysiol., 1992 – p.68.
8. Біофізика/П. Г. Костюк , Д. М. Гродзинский, В. Л. Зима, И. С. Магура, Е. П. Сидорик, М. Ф. Шуба. - Киев: Вища школа, 1988 - с.211-213.
9. Voltage-gated K<sup>+</sup> channels in layer 5 neocortical pyramidal neurones from young rats: subtypes and gradients/Korngreen A. et al. – London: J. Physiol., 2000 - p.525.
10. Glutamate-Related Biomarkers in Drug Development for Disorders of the Nervous System: Workshop Summary/ Institute of Medicine (US) Forum on Neuroscience and Nervous System Disorders - Washington (DC): National Academies Press (US), 2011 - p.1-5.

- 11.The neuron simulation environment. Neural Comput 9 / Hines ML - Carnevale NT ,1997 – p.1179–1189.
- 12.Mathematical models of threshold phenomena in the nerve membrane./ FitzHugh, R. - The Bulletin of Mathematical Biophysics, 1955. -p. 257–278.
- 13.Neuronal networks of the Hippocampus/ Traub RD, Miles R - Cambridge University Press, Cambridge,1991.
- 14.A model of neuronal bursting using three coupled first order differential equations./ Hindmarsh, J. L. and Rose, R. M. - In Proceedings of the Royal Society B, 1984 – p. 87–102.
- 15.Lapicque's introduction of the integrate-and-fire model neuron/ Abbott, L. F. - Brain Res Bull, 1999 – p.303–304.
- 16.Spiking Neuron Models: Single Neurons, Populations, Plasticity/ Gerstner, W. and Kistler, W. M. - Cambridge University Press,2002.
- 17.Real-time interaction between a neuromorphic electronic circuit and the spinal cord/ Jung, R., Brauer, E. J., and Abbas, J. J. - IEEE Transactions on Neural Systems and Rehabilitation Engineering, 2001 p.319–326.
- 18.A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve/ Hodgkin A.L, Huxley A.F - J Physiol,1952 – p. 500–544.
- 19.Neuronal networks of the Hippocampus/ Traub RD, Miles R. - Cambridge University Press, 1991.
- 20.Possibility of multiquantal transmission at single inhibitory synapse in cultured rat hippocampal neurons / Fedulova S.A., Vasilev D.V., Isaeva E.V.,Romanyuk S.G., Veselovskiy N.S. Neurosci,1999 – p. 92.
- 21.Single-channel recording/ B.Sakmann, E.Neher. – J. Physiol., 1995 - p. 42-60.
- 22.The patch-clamp technique: a theoretical and practical / Dirk L.Y, Louis J. - BTOL-Channels, 1999, - p.5-10;27 – 35.