

Синаптичні відповіді нейронів верхнього шийного ганглія у щурів при експериментальному цукровому діабеті

А.О. Настенко, О.Е. Пурнинь, С.А. Федулова, М.С. Веселовський

Інститут фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України; e-mail: aurum197@bigmir.net

У щурів з експериментальним стрептозотозиніндукованим цукровим діабетом (ЦД) реєстрували збуджуючі постсинаптичні потенціали (ЗПСП) від нейронів верхнього шийного ганглія (ВШГ), які викликали електричним подразненням шийного симпатичного нерва (ШСН). Встановлено, що середнє значення постійної часу спаду ЗПСП у щурів з ЦД на 15% перевищувало значення у контрольних щурів. При цьому амплітуди ЗПСП нейронів ВШГ та блокуюча дія бензогексонію у щурів з ЦД через 30 днів після ін'єкції стрептозотозину достовірно не відрізнялися від таких у контрольних щурів. Це може свідчити про специфічні функціональні порушення, пов'язані з нікотиновими холінергічними рецепторами нейронів ВШГ при стаціонарно підвищених значеннях вмісту глюкози в крові у щурів. Ключові слова: верхній шийний ганглії; стрептозотозиніндукований цукровий діабет; бензогексоній.

ВСТУП

Цукровий діабет (ЦД) є невиліковним порушенням обміну речовин в організмі людини, що викликає такі хронічні ускладнення, як полінейропатія, ретинопатія, катаракта тощо. Відомо, що симпатичні і сенсорні нейрони вражаються на ранніх стадіях ЦД [1], однак основні механізми, що призводять до цих ускладнень, залишаються малодослідженими. У пацієнтів, що страждають на ЦД, у паравертебральних верхніх брижових і черевних гангліях було виявлено значну кількість нервових закінчень, що значно збільшена в розмірі і виглядає дистрофічною [2]. Але в паравертебральних гангліях, в тому числі і у верхньому шийному, такі структурні дефекти не виявлені [2]. Також відомо, що хворі на ЦД страждають на такі порушення серцево-судинної системи, як аритмія, ортостатична гіпотензія, серцево-судинна дизавтономія, порушення периферичної судинної динаміки тощо. Отже, можна припустити, що, незважаючи на відсутність структурних порушень нейронів паравертебральних гангліїв, в тому

числі і верхнього шийного ганглія (ВШГ), наведені ускладнення можуть бути результатом їх функціональних змін [1].

Метою нашої роботи було визначити особливості синаптичних відповідей нейронів ВШГ, що викликані стимуляцією шийного симпатичного нерва (ШСН) у щурів з експериментальним стрептозотозиніндукованим ЦД через 30 днів після ін'єкції.

МЕТОДИКА

Експерименти проводили на самцях щурів лінії Вістар віком 75 ± 10 діб, масою 150–200 г. Стрептозотозиніндукований ЦД викликали одноразовим інтрапарієтальним введенням 65 мг/кг стрептозотозину, розчиненого у 0,1 М цитратному буфері (рН 4,5). Таким чином моделювали ЦД 1-го типу; стрептозотозин викликає некроз β -клітин підшлункової залози з їх подальшою дегрануляцією та втратою цілісності, що призводить до постійної діабетичної гіперглікемії [3]. Вміст цукру в крові щурів вимірювали перед введенням стрептозотозину та за добу перед дослідом, вико-

ристовуючи глюкометр On-Call Plus (США). Всі експерименти проводили з дотриманням етичних норм та вимог статті 26 Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (від 21.02.2006 р.) та «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальною та іншою науковою метою» (Страсбург, 1986). Під час проведення експерименту всі тварини отримували збалансоване харчування та мали вільний доступ до води. У експеримент відбирали щурів, вміст цукру в крові яких через 30 днів після ін'єкції стрептозотцину перевищував 30 ммоль/л. Електрофізіологічні властивості нейронів ВШГ досліджували на цілих ізольованих нефарбованих препаратах ВШГ *in vitro*, з використанням методу мікроелектродних відведень за допомогою підсилювача Axoclamp 2B Current and Voltage Clamp («Axon Instruments», США). Збуджуючі постсинаптичні потенціали (ЗПСП) реєстрували у відповідь на подразнення ШСН короткими (0,1 мс) прямокутними імпульсами напруги з частотою 1 Гц. Для стимуляції нервів використовували чотириканальний ізольований пристрій. Для дослідження впливу ЦД на механізми синаптичної нейропередачі до нейронів ВШГ використовували бензогексоній, який є селективним блокатором нейрональних нікотинних ацетилхолінових рецепторів та здатен швидко проникати через сполучнотканинну капсулу нейронів ВШГ неконкурентно зв'язуючись з нікотинними ацетилхоліновими рецепторами. Бензогексоній не змінює поляризацію мембрани та повністю відмивається чистим фізіологічним розчином [4]. ЗПСП реєстрували під час контролю, потім препарат перфузували фізіологічним розчином з бензогексонієм у концентрації 0,1 ммоль/л, після чого записували відмив. Порівнювали амплітуди та постійна часу спаду ЗПСП.

ЗПСП аналізували, застосовуючи програму Clampfit 9.0 («Axon Instruments», США). Результати обробляли з використанням програм Origin 8,5 (Microcall Inc., США) та ППП

STATISTICA 7.0 (StatSoft, США, 2006). Перевірку на нормальність їх розподілу проводили із використанням тесту Шапіро–Уїлка. Порівняння отриманих результатів здійснювали використовуючи критерій t Стьюдента. Статистично значущими вважали зміни показників, які мали рівень значущості $P \leq 0,05$. Опис вибіркового розподілу вказували таким чином: $M \pm s.d.$ (M – середнє значення, $s.d.$ – середнє квадратичне відхилення).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

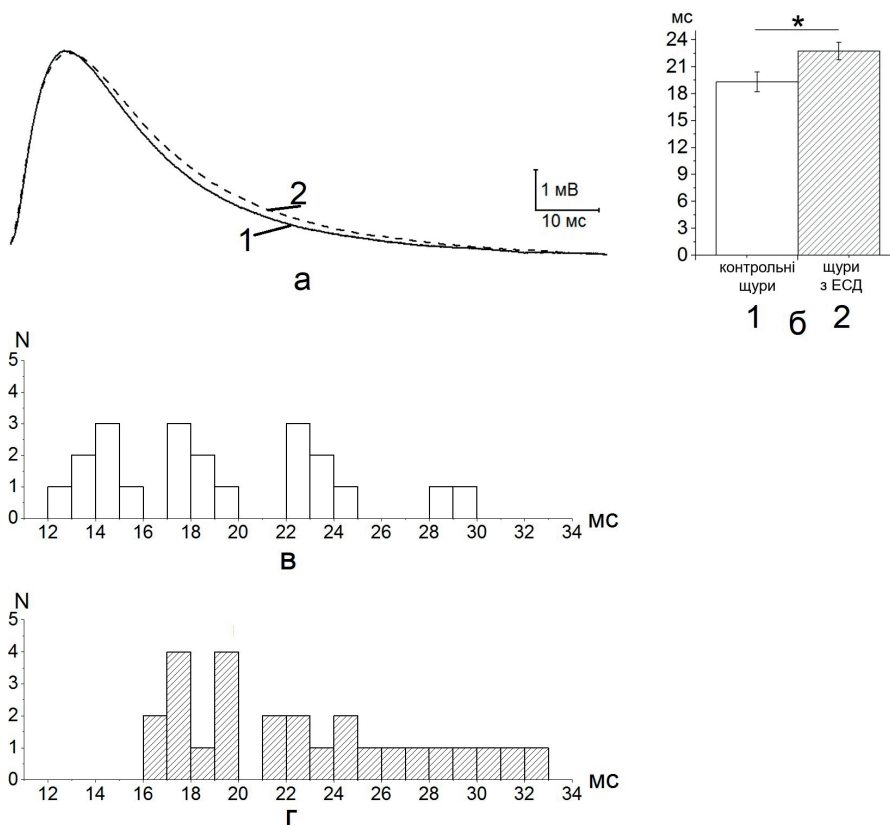
Були проаналізовані показники мембранного потенціалу спокою, опору та ємності мембрани нейронів ВШГ у контрольній групі щурів та у щурів з ЦД. Мембранний потенціал спокою нейронів ВШГ становив $-50,4 \pm 10,5$ мВ ($n = 82$) у контрольній групі щурів та $-50,5 \pm 12,5$ мВ ($n = 50$) у щурів з ЦД. Опір та ємність мембрани сягали $88,3 \pm 58,7$ МОм ($n = 81$) і $132,7 \pm 5$ пФ ($n = 81$) у контрольних щурів та $89,8 \pm 40$ МОм ($n = 44$) і 135 ± 4 пФ ($n = 44$) у щурів з ЦД відповідно. Статистичний аналіз показав, що наведені електрофізіологічні параметри нейронів ВШГ контрольної групи та у щурів з ЦД достовірно не відрізнялися. Це може пояснюватися тим, що незважаючи на відмінності у морфологічних, функціональних та електрофізіологічних властивостях нейронів ВШГ, деякі електрофізіологічні показники у більшості цих клітин досить схожі і не змінюються за умов ЦД [3, 6].

Були розраховані амплітуди ЗПСП нейронів ВШГ у відповідь на подразнення ШСН. Вони становили $5,6 \pm 3,9$ мВ ($n = 42$) у контрольних щурів та $5,9 \pm 4$ мВ ($n = 42$) у щурів з ЦД. При додаванні в розчин 0,1 ммоль/л бензогексонію ЗПСП контрольних щурів та щурів з ЦД знижувалися і становили $1,8 \pm 0,7$ мВ ($n = 8$) та $1,7 \pm 0,7$ мВ ($n = 8$) відповідно. Блокуюча дія бензогексонію була $70 \pm 5\%$ ($n = 8$) та $70,4 \pm 2,1\%$ ($n = 8$) відповідно. Зниження амплітуд ЗПСП пояснюється тим, що збудження від прегангліонарних волокон передається до ВШГ через синапси. Генерація

потенціалів дії в нейронах ВШГ здійснюється за допомогою холінергічної передачі та активації нейрональних нікотинових ацетилхолінових рецепторів [4, 7]. Амплітуда ЗПСП та показники блокуючої дії бензогексонію у контрольній групі щурів статистично не відрізнялися від значень у щурів з ЦД. Отже, метаболічні зміни в організмі щура, що викликані ЦД, не вплинули на синаптичну передачу до нейронів ВШГ та чутливість нікотинових ацетилхолінових рецепторів через 30 днів після ін'єкції стрептозотоцину.

Була проаналізована постійна часу спаду ЗПСП, що виникали в нейронах ВШГ у відповідь на стимуляцію ШСН (рисунок). У контрольних щурів вона становила в середньому $19,31 \pm 5,02$ мс ($n = 21$), а у щурів із ЦД – $22,76 \pm$

$4,91$ мс ($n = 26$). Були виявлені статистично значущі відмінності між цими результатами. Середнє значення постійної часу спаду ЗПСП у щурів з ЦД виявилось на $3,5$ мс довше, ніж у контрольних щурів. Тобто у щурів з ЦД мембранний потенціал нейронів ВШГ після виникнення ЗПСП повільніше повертається до початкового рівня. Можна висунути кілька припущень щодо фізіологічного механізму, що лежать в основі цих відмінностей. Час спаду ЗПСП залежить від типу іонних каналів на постсинаптичній мембрані нейрона та провідності мембрани до K^+ та Cl^- . Можливо, за умов ЦД порушується провідність мембрани до цих іонів. Вірогідно може відбуватися зниження активності Na^+/K^+ -АТФ-ази, яке може призвести до сповільнення процесу



Усереднені збуджуючі постсинаптичні потенціали (ЗПСП) нейронів верхнього шийного ганглія, що виникають у відповідь на подразнення шийного симпатичного нерва (а) у контрольних щурів (1) та щурів з експериментальним стрептозотоциніндукованим цукровим діабетом (2). Середнє значення та похибка середнього постійних часу спаду ЗПСП у контрольних щурів та щурів з ЦД (б), гістограми розподілу значень постійних часу спаду ЗПСП у контрольних щурів (в), та щурів з ЦД (г). * $P \leq 0,05$

відновлення мембранного потенціалу спокою після деполяризації мембрани нейронів ВШГ та зростання часу спаду ЗПСП. Також слід зауважити, що для ВШГ характерна конвергенція прегангліонарних волокон на нейронах ганглія. Можливо, зростання постійної часу спаду сумарного ЗПСП є наслідком накладання амплітуд пізніх низькоамплітудних ЗПСП. Відмінності цих показників у щурів з ЦД можуть свідчити про зменшення швидкості проведення збудження по деяким з прегангліонарних нервових волокон до нейронів ганглія за рахунок процесів демієлінізації або про зростання синаптичної затримки. Однак ця гіпотеза потребує подальших додаткових досліджень. У будь-якому випадку наведені відмінності за умов ЦД можуть говорити про початок розвитку нейродегенеративних процесів у нейронах ВШГ або в синаптичних зв'язках, що на них утворені.

ВИСНОВКИ

Розробка моделі діабетичного ураження нейронів симпатичної нервової системи є важливим завданням для подальшого дослідження дії лікарських препаратів, що можуть допомогти запобігти виникненню нейродегенеративних ускладнень у хворих, що страждають на ЦД.

Отримані результати свідчать про те, що при стаціонарно підвищених значеннях вмісту глюкози в крові виникають специфічні порушення, пов'язані зі зростанням постійної часу спаду ЗПСП нейронів ВШГ. Ми припускаємо, що через 30 діб після ін'єкції стрептозотоцину в нейронах ВШГ відбуваються порушення, які, ймовірно, асоційовані зі зміною провідності мембрани нейронів до K^+ або Cl^- , або зі зниженням активності Na^+/K^+ -АТФ-ази. Також, можливо, зростання часу спаду ЗПСП зумовлене зниженням швидкості проведення збудження по деяким з прегангліонарних волокон, що утворюють конвергентні зв'язки на нейронах ганглія або до зростання синаптичної затримки.

Однак не було виявлено порушень у пасивних властивостях мембрани нейронів ВШГ, амплітудах викликаних ЗПСП та у чутливості нікотинових ацетилхолінових рецепторів до дії бензогексонію.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

А.А. Настенко, Е. Э. Пурнинь, С.А. Федулова, Н.С. Веселовский

СИНАПТИЧЕСКИЕ ОТВЕТЫ НЕЙРОНОВ ВЕРХНЕГО ШЕЙНОГО ГАНГЛИЯ У КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

У крыс с экспериментальным стрептозотоцининдуцированным сахарным диабетом (ЭСД) регистрировали возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП) от нейронов верхнего шейного ганглия (ВШГ), которые вызывались электрическим раздражением шейного симпатического нерва. Установлено, что среднее значение постоянной времени спада ВПСП у крыс с ЭСД на 15% превышало такое значение, полученное у контрольных крыс. При этом амплитуды ВПСП нейронов ВШГ и блокирующее действие бензогексония у крыс с ЭСД через 30 дней после инъекции стрептозотоцина достоверно не отличались от таковых в контроле. Это может свидетельствовать о специфических функциональных нарушениях, связанных с никотиновыми холинергическими рецепторами нейронов ВШГ при стационарно повышенных значениях уровня глюкозы в крови крыс.

Ключевые слова: верхний шейный ганглий; стрептозотоцининдуцированный сахарный диабет; бензогексоний.

A.O. Nastenko, H.E. Purnyn, S.A. Fedulova, M.S. Veselovsky

SYNAPTIC RESPONSES OF SUPERIOR CERVICAL GANGLION NEURONS OF RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

O.O. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: aurum197@bigmir.net

Excitatory postsynaptic potentials (EPSP) were recorded from the superior cervical ganglion neurons (SCG) in the rats

with experimental streptozotocin-induced diabetes (ESD). EPSP was induced by electrical stimulation of the cervical sympathetic trunk. It was founded that the average value of the EPSP time constant decay in the rats with ESD was 15% higher. At the same time, the amplitudes of EPSP of SCG neurons and the hexamethonium blocking effect in the rats with ESD on 30th day after streptozotocin injection didn't differ significantly from those in control rats. This may indicate specific functional disorders associated as with steady-state elevated blood glucose level in rats as SCG neurons nicotinic cholinergic receptors.

Key words: superior cervical ganglion; streptozotocin-induced diabetes; hexamethonium.

REFERENCES

1. Campanucci V, Krishnaswamy A, Cooper E. Diabetes depresses synaptic transmission in sympathetic ganglia by inactivating nAChRs through a conserved intracellular cysteine residue. *Neuron*. 2010 Jun 24;66(6):827-34.
2. Schmidt RE, Plurad SB, Parvin CA, Roth KA. Effect of diabetes and aging on human sympathetic autonomic ganglia. *Am J Pathol*. 1993 Jul;143(1):143-53.
3. Lenzen S. Alloxan and streptozotocin diabetes. *Diabetologia*. 2008 Feb;51(2):216-26.
4. Skok VI, Ivanov AY. Natural activity of vegetative ganglia. Kiev: Nauk Dumka; 1989. [Russian].
5. Li C, Horn JP. Physiological classification of sympathetic neurons in the rat superior cervical ganglion. *J Neurophysiol*. 2006 Jan;95(1):187-95.
6. Silva-Dos-Santos NM, Oliveira-Abreu K, Moreira-Junior L, Santos-Nascimento TD, Silva-Alves KSD, Coelho-de-Souza AN, et al. Diabetes mellitus alters electrophysiological properties in neurons of superior cervical ganglion of rats. *Brain Res*. 2020 Feb;1729:1465-99.
7. Purnyn H, Rikhalsky O, Fedulova S, Veselovsky N. Transmission pathways in the rat superior cervical ganglion. *Neurophysiology*. 2007 Jul;39(4):347-9.

*Матеріал надійшов
до редакції 01.12.2020*